



(19) INSTITUTO NACIONAL  
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* PT 87390 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5)

C12N015/00 A	C07K015/00 B
C12P021/00 B	A61K039/395 B
G01N033/574 B	A61K049/00 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) *Data de depósito:* 1988.05.03

(30) *Prioridade:* 1987.05.04 US 045963  
1987.11.01 US 115798  
1988.02.16 US 155943

(43) *Data de publicação do pedido:*  
1989.05.31

(45) *Data e BPI da concessão:*  
05/93 1993.05.26

(73) *Titular(es):*

DANA FARBER CANCER INSTITUTE  
44, BINNEY STR. BOSTON, MASSACHUSETTS 02115  
US

(72) *Inventor(es):*

TIMOTHY ALAN SPRINGER	US
MICHAEL LORAN DUSTIN	US
ROBERT ROTHLEIN	US
STEVEN DEAN MARLIN	US

(74) *Mandatário(s):*

JOÃO DE ARANTES E OLIVEIRA  
RUA DO PATROCÍNIO 94 1350 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO INTERCELULAR E DE LIGANTES QUE PROMOVEM A LIGAÇÃO DESTAS MOLÉCULAS BEM COMO DE AGENTES TERAPÊUTICOS E DE DIAGNÓSTICO QUE OS CONTÊM

(57) *Resumo:*

[Fig.]

**DESCRIÇÃO**  
**DA**  
**PATENTE DE INVENÇÃO**

**N.º 87 390**

**REQUERENTE:** DANA FARBER CANCER INSTITUTE, norte-americano, com domicílio 44, Binney Street, Boston, Massachusetts 02115, Estados Unidos da América.

**EPÍGRAFE:** " PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO INTERCELULAR E DE LIGANTES QUE PROMOVEM A LIGAÇÃO DESTAS MOLÉCULAS BEM COMO DE AGENTES TERAPÊUTICOS E DE DIAGNÓSTICO QUE OS CONTÊM ".

**INVENTORES:** Timothy Alan Springer, Robert Rothlein, Steven Dean Marlin e Michael Loran Dustin.

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883. Estados Unidos da América, em 4 de Maio de 1987, 1 de Novembro de 1987 e 16 de Fevereiro de 1988, sob os n.ºs. 045,963, 115,798 e 155,943, respectivamente.

~~CONFIDENTIAL~~

Descrição referente à patente de invenção de DANA FARBER CANCER INSTITUTE, instituto de investigação científica, norte-americano, com domicílio 44, Binney Street, Boston, Massachusetts 02115, Estados Unidos da América, (inventores: Timothy Alan Springer, Robert Rothlein, Steven Dean Marlin e Michael Loran Dustin, residentes nos E.U.A.), para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO INTERCELULAR E DE LIGANTES QUE PROMOVEM A LIGAÇÃO DESTAS MOLÉCULAS BEM COMO DE AGENTES TERAPÊUTICOS E DE DIAGNÓSTICO QUE OS CONTEM".

#### DESCRIÇÃO


#### ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

##### Referência cruzada de pedidos relacionados

Este pedido é em parte continuação do Pedido de Patente dos US Nº. de Série 045 963, depositado em 4 de Maio de 1987. Esta invenção foi em parte feita com o apoio do Governo. O Governo tem alguns direitos nesta invenção.

##### Domínio da invenção

A presente invenção diz respeito a



moléculas de adesão intercelular tais como ICAM-1 que estão envolvidas em processos através dos quais populações de linfócitos reconhecem e aderem a substratos celulares de tal modo que podem migrar para locais de inflamação e interagir com as células durante reacções inflamatórias. A presente invenção diz respeito adicionalmente a moléculas de ligante capazes de junção a essas moléculas de adesão intercelular, a um ensaio de selecção para esses ligantes e a usos para a molécula de adesão intercelular, para as moléculas de ligante e para o ensaio de separação.

#### Descrição da técnica relacionada

Os leucócitos devem ser capazes de se fixarem a substratos no sentido de defenderem o hospedeiro contra invasores estranhos, tais como bactérias ou vírus. Encontra-se publicada uma excelente revisão do sistema de defesa por Eisen, H.W., (I: Microbiology, 3<sup>a</sup> Ed. Harper & Row, Philadelphia, PA (1980), pp. 290-295 e 381-418). Os leucócitos devem ser capazes de se fixarem a células endoteliais de modo a poderem migrar a partir da circulação para locais de inflamação em actividade. Além disso devem fixar-se a células que apresentem antígenos de modo a que possa ocorrer uma resposta imune específica normal, e finalmente devem fixar-se a células visadas apropriadas de maneira que possa ocorrer a lise de células infectadas com vírus ou de células tumorais.

Recentemente as moléculas da superfície dos leucócitos envolvidas na medição destas fixações foram identificadas utilizando-se a tecnologia dos hibridomas. Em resumo, foram identificados os anticorpos monoclonais dirigidos contra células T humanas (Davignon, D. et al., proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 4535-4539 (1981)) e células de baço de rato (Springer, T. et al. Eur. J. Immunol. 9: 301-306 (1979)) que se ligam a superfícies de leucócitos e inibem as funções relacionadas com a fixação descritas acima (Springer, T. et al., Fed. Proc. 44: 2660-2663 (1985)). As moléculas identificadas por aqueles anticorpos foram denominadas Mac-1 e Antigene-1 associado a Função de Linfócito (LFA-1). O Mac-1 é um heterodímero que se encontra nos macrófagos, granulócitos e grandes linfócitos granulares. O

~~CONFIDENTIAL~~

LFA-1 é um heterodímero que se encontra na maior parte dos linfócitos (Springer, T.A., et al., Immunol. Rev. 68: 111-135 (1982)). Estas duas moléculas, mais uma terceira molécula, p150,95 (que tem uma distribuição nos tecidos semelhantes a Mac-1) desempenham um papel na adesão celular (Keiser, G. et al., Eur. J. Immunol. 15: 1142-1147 (1985)).

Verificou-se que as moléculas dos leucócitos acima mencionadas eram membros de uma família relacionada de glicoproteínas (Sanchez-Madrid, F. et al., Exper. Med. 158: 1785-1803 (1983); Keiser, G.D. et al., Eur. J. Immunol. 15: 1142-1147 (1985)). Esta família de glicoproteínas é composta por heterodímeros que têm uma cadeia alfa e uma cadeia beta. Apesar de as cadeias alfa de cada um dos antígenos diferirem umas das outras, verificou-se que a cadeia beta se mantinha em alto grau sem alterações (Sanchez-Madrid, F. et al., Exper. Med. 158: 1785-1803 (1983)). Verificou-se que a cadeia beta da família de glicoproteínas (por vezes referida como "CD18") tinha um peso molecular de 95 kd enquanto que se verificou que as cadeias alfa variavam de 150 kd a 180 kd (Springer, T., Fed. Proc. 44: 2660-2663 (1985)). Apesar de as subunidades de alfa das proteínas da membrana não participarem da homologia extensiva como as subunidades de beta participam, uma análise mais pormenorizada de subunidades de alfa das glicoproteínas revelaram que existem substanciais semelhanças entre elas. São feitas revisões das semelhanças entre as subunidades de alfa e beta das glicoproteínas relacionadas com LFA-1 por Sanchez-Madrid, F. et al., J. Exper. Med. 158: 586-602 (1983); J. Exper. Med. 158: 1785-1803 (1983).

Identificou-se um grupo de indivíduos que são incapazes de exprimir quantidades normais de qualquer membro desta família de proteínas de adesão nas superfícies celulares dos seus leucócitos (Anderson, D.C., et al., Fed. Proc. 44: 2671-2677 (1985); Anderson, D.C. et al., J. Infect. Dis. 152: 668-689 (1985)). Linfócitos desses pacientes mostraram in vitro defeitos semelhantes a linfócitos normais de que a família LFA-1 de moléculas tivesse sido antagonizada por anticorpos. Além disso, estes indivíduos eram incapazes de dar uma resposta imune normal devido à incapacidade das suas células para aderir a subs

~~CONFIDENTIAL~~

tratos celulares (Anderson, D.C., et al., Fed. Proc. 44: 2671-2677 (1985); Anderson, D.C., et al., J. Infect. Dis. 152: 668-689 (1985)). Estes dados mostram que as respostas imunes são mitigadas quando os linfócitos são incapazes de aderir dum modo normal devido à falta de moléculas de adesão funcionais da família LFA-1.


Assim, em resumo, a capacidade dos linfócitos de manter a saúde e viabilidade de um animal requer que eles sejam capazes de aderir a outras células (tais como células endoteliais). Verificou-se que esta aderência requer contactos célula-célula que envolvem moléculas receptoras específicas presentes na superfície das células dos linfócitos. Estes receptores capacitam um linfócito para aderir a outros linfócitos ou a células endoteliais ou outras células não vasculares. As moléculas receptoras da superfície da célula estão altamente relacionadas umas com as outras como se tem verificado. Os seres humanos a cujos linfócitos faltam estas moléculas receptoras da superfície das células mostram infecções crônicas e recorrentes, bem como outros sintomas clínicos incluindo respostas de anticorpo deficientes.

Dado que a adesão de linfócitos está envolvida no processo através do qual qualquer tecido estranho é identificado e rejeitado, uma compressão deste processo é de valor significativo nos campos da transplantação de órgãos, enxerto de tecidos, alergia e oncologia.

#### RESUMO DA INVENÇÃO

A presente invenção diz respeito a Molécula de Adesão Intercelular-1 (ICAM-1) bem como aos seus derivados funcionais. A invenção refere-se adicionalmente a anticorpos e a fragmentos de anticorpos capazes de inibir a função de ICAM-1 e a outros inibidores da função de ICAM-1; e a análises capazes de identificar tais inibidores. A invenção inclui adicionalmente procedimentos de diagnóstico e terapêutica para todas as moléculas acima descritas.

Em pormenor, a invenção inclui a mo



lêcula de adesão intercelular ICAM-1 ou os seus derivados funcionais substancialmente livres de contaminantes naturais. A invenção refere-se além disso àquelas moléculas que são capazes adicionalmente de se ligarem a uma molécula presente na superfície de um linfócito.

A invenção refere-se para além disso à molécula de adesão intercelular ICAM-1 e aos seus derivados que estão marcados permitindo a detecção.

A invenção inclui adicionalmente uma molécula de ADN recombinante capaz de exprimir ICAM-1 ou um seu derivado funcional.

A invenção também inclui um processo para recuperar ICAM-1 numa forma substancialmente pura que compreende as seguintes fases:

- (a) solubilizar ICAM-1 a partir das membranas de células que exprimem ICAM-1, para formar uma preparação de ICAM-1 solubilizada,
- (b) introduzir a preparação de ICAM-1 solubilizada numa matriz de afinidade, matriz esta que contém anticorpos capazes de se ligarem a ICAM-1,
- (c) permitir a ligação de ICAM-1 ao anticorpo da matriz de afinidade,
- (d) remover da matriz qualquer composto incapaz de ligação ao anticorpo e
- (e) recuperar o ICAM-1 numa forma substancialmente pura por eluição da ICAM-1 a partir da matriz.

A invenção inclui adicionalmente um anticorpo capaz de ligação a uma molécula seleccionada do grupo constituído por ICAM-1 e um derivado funcional de ICAM-1. A invenção também inclui uma célula de hibridoma capaz de produzir um tal anticorpo.

A invenção inclui para além disso uma célula de hibridoma capaz de produzir o anticorpo monoclonal R6-5-D6.

A invenção inclui para além disso um processo para produzir uma célula de hibridoma desejada que produz um anticorpo que é capaz de ligação a ICAM-1 que compreen

de:

- (A) imunizar um animal com uma célula que expressa ICAM-1,
- (B) fundir as células de baço do animal com uma linha de células de mieloma,
- (C) permitir que as células de baço e de mieloma fundidas formem células de hibridoma que segregam anticorpos e
- (D) seleccionar de entre as células de hibridoma a célula de hibridoma pretendida que é capaz de produzir um anticorpo capaz de ligação a ICAM-1.

A invenção inclui tanto a célula de hibridoma como o anticorpo produzido pela célula de hibridoma, obtido pelo método acima descrito.

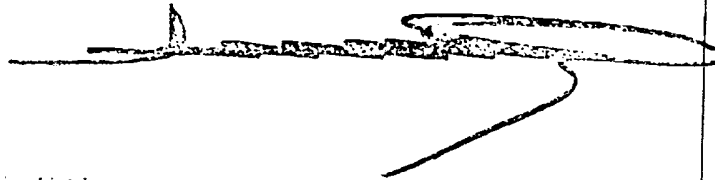
A invenção diz respeito também a um método de identificação de um antagonista de não-imunoglobulina de adesão intercelular que compreende:

- (A) incubar um agente não-imunoglobulina capaz de ser um antagonista de adesão intercelular com uma preparação de linfócito que contém uma pluralidade de células capazes de agregação;
- (B) examinar a preparação de linfócito para determinar se a presença do agente inibe a agregação das células da preparação de linfócito; sendo o agente identificado como um antagonista de adesão intercelular pela inibição de agregação.

A invenção diz ainda respeito a um método para tratar uma inflamação resultante de uma resposta do sistema de defesa específico num mamífero que compreende providenciar a um indivíduo com necessidade de um tal tratamento uma quantidade de um agente anti-inflamatório suficiente para suprimir a inflamação; sendo o agente anti-inflamatório seleccionado do grupo constituído por: um anticorpo capaz de ligação a ICAM-1; um fragmento de um anticorpo em que o fragmento é capaz de ligação a ICAM-1; ICAM-1; um derivado funcional de ICAM-1; e um antagonista não-imunoglobulina de ICAM-1.

A invenção inclui além disso o método acima descrito de tratamento da inflamação em que o antagonista não-imunoglobulina de ICAM-1 é um antagonista não-imunoglobulina de ICAM-1 diferente de LFA-1.

A invenção diz também respeito a um



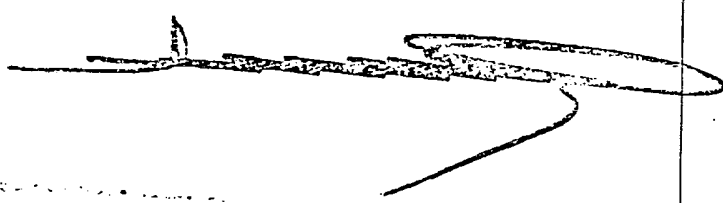
método de suprimir as metástases de células de tumor hematopoiético, requerendo a célula um membro funcional da família de LFA-1 para migrar, método esse que compreende dar ao paciente que necessita de tal tratamento uma quantidade de um agente anti-inflamatório suficiente para suprimir as metástases; sendo o agente anti-inflamatório seleccionado do grupo constituído por: um anticorpo capaz de ligação a ICAM-1; um fragmento de um anticorpo, sendo o fragmento capaz de ligação a ICAM-1; ICAM-1; um derivado funcional de ICAM-1; e um antagonista não-imunoglobulina de ICAM-1.

A invenção inclui para além disso o método acima descrito de suprimir as metástases das células de tumor hematopoiético em que o antagonista não-imunoglobulina de ICAM-1 é um antagonista não imunoglobulina de ICAM-1 diferente de LFA-1.

A invenção inclui também um método de supressão do crescimento de células de tumor expressas em ICAM-1 que compreende dar a um paciente com necessidade de tal tratamento uma quantidade de uma toxina suficiente para suprimir o crescimento, sendo a toxina seleccionada do grupo constituído por uma toxina derivatizada de um anticorpo capaz de ligação a ICAM-1; uma toxina derivatizada de um fragmento de anticorpo, sendo o fragmento capaz de ligação a ICAM-1; uma toxina derivatizada membro de uma família de moléculas LFA-1; e uma toxina derivatizada derivada funcional de um membro da família de moléculas LFA-1.

A invenção também diz respeito a um método para suprimir o crescimento de células de tumor expressas em LFA-1 que compreende dar a um paciente que necessita tal tratamento uma quantidade de toxina suficiente para suprimir tal crescimento, sendo a toxina seleccionada do grupo constituído por ICAM-1 derivatizado por uma toxina; e um derivado funcional de ICAM-1 derivatizado por uma toxina.

A invenção diz além disso respeito a um método para diagnosticar a presença e a localização de uma inflamação resultante de uma resposta do sistema de defesa específico num mamífero suspeito de ter a inflamação que compreende:

- 
- (a) administrar ao indivíduo uma composição que contém um ligante de junção marcado detectavelmente capaz de identificar uma célula que expressa ICAM-1, e
- (b) detectar o ligante de junção.

Adicionalmente a invenção proporciona um método para diagnosticar a presença e a localização de uma inflamação resultante de uma resposta do sistema de defesa específico num mamífero suspeito de ter a inflamação que compreende:

- (a) incubar uma amostra de tecido do indivíduo com a composição contendo um ligante de junção marcado detectavelmente capaz de identificar uma célula que expressa ICAM-1, e
- (b) detectar o ligante de junção.

A invenção também se refere a um método de diagnosticar a presença e a localização de uma célula de tumor que expressa ICAM-1 num mamífero suspeito de ter uma tal célula, que compreende:

- (a) administrar ao indivíduo a composição que contém um ligante de junção marcado detectavelmente capaz de junção a ICAM-1, sendo o ligante seleccionado do grupo constituído por um anticorpo e um fragmento de um anticorpo, sendo o fragmento capaz de ligação a ICAM-1, e
- (b) detectar o ligante de junção.

A invenção também diz respeito a um método de diagnosticar a presença e a localização de uma célula de tumor que expressa ICAM-1 num mamífero suspeito de ter uma tal célula, que compreende:

- (a) incubar uma amostra de tecido do indivíduo com uma composição contendo um ligante de junção marcado detectavelmente capaz de ligação a ICAM-1, sendo o ligante seleccionado de um grupo constituído por um anticorpo e um fragmento de anticorpo, sendo o fragmento capaz de ligação a ICAM-1, e
- (b) detectar o ligante de junção.

A invenção também se refere a um método de diagnosticar a presença e a localização de uma célula de tumor que expressa um membro da família de moléculas LFA-1 num indivíduo suspeito de ter uma tal célula, que compreende:

- (a) administrar ao indivíduo uma composição que contém um ligante

te de junção marcado detectavelmente capaz de ligação a um membro da família de moléculas LFA-1, sendo o ligante selecionado do grupo constituído por ICAM-1 e um derivado funcional de ICAM-1, e

(b) detectar o ligante de junção.

A invenção também diz respeito a um método para diagnosticar a presença e a localização de uma célula de tumor que expressa um membro da família de moléculas LFA-1 num indivíduo suspeito de ter uma tal célula que compreende:

(a) incubar uma amostra de tecido do indivíduo na presença de um ligante de junção marcado detectavelmente capaz de ligação a um membro da família de moléculas LFA-1, sendo o ligante selecionado do grupo constituído por ICAM-1 e por um derivado funcional de ICAM-1, e

(b) detectar o ligante de junção que está ligado a um membro da família de moléculas LFA-1 presente na amostra do tecido.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 mostra sob a forma de diagrama a adesão entre uma célula normal e uma célula com deficiência em LFA-1.

A Figura 2 mostra sob a forma de diagrama o processo de adesão de célula normal/normal.

A Figura 3 mostra a cinética de agregação celular na ausência de (X) ou na presença de 50 ng/ml de PMA (O).

A Figura 4 mostra a coagregação entre as células LFA-1<sup>-</sup> e LFA-1<sup>+</sup>. Células transformadas EBV ( $10^4$ ) marcadas com diacetato de carboxifluoresceína, como designado na figura, foram misturadas com  $10^5$  células autólogas não marcadas (barras a cheio) ou células JY (barras vazias) na presença de PMA. Depois de 1,5 horas as células marcadas, em agregados ou livres, foram numeradas usando a análise qualitativa do Exemplo 2. A percentagem de células marcadas em agregados é evidenciada. Mostra-se um ensaio representativo de dois.

A Figura 5 mostra a imunoprecipita-

ção de ICAM-1 e de LFA-1 a partir das células JY. Os lisados de Triton X-100 de células JY (pistas 1 e 2) ou tampão de lise para comparação (pistas 3 e 4) foram imunoprecipitados com anticorpos capazes de ligação a ICAM-1 (pistas 1 e 3) ou com anticorpos capazes de ligação a LFA-1 (pistas 2 e 4). O painel A mostra resultados sob condições redutoras; o painel B mostra resultados obtidos sob condições não redutoras. Os pesos moleculares padrão correram na pista S.

A Figura 6 mostra a cinética dos efeitos de IL-1 e de interferão gama na expressão de ICAM-1 em fibroblastos dérmicos humanos. Os fibroblastos dérmicos humanos foram cultivados até uma densidade de  $8 \times 10^4$  células/alvéolo de  $0,32 \text{ cm}^2$ . Adicionou-se IL-1 (10 U/ml, círculos fechados) ou interferão gama recombinante (10 U/ml, quadrados abertos) e no tempo indicado, arrefeceu-se o ensaio a  $4^\circ \text{ C}$  e realizou-se uma análise de ligação indirecta. O desvio padrão não excedeu 10%.

A Figura 7 mostra a dependência de concentração dos efeitos de IL-1 e de gama interferão sobre a ICAM-1. Os fibroblastos dérmicos humanos foram cultivados até uma densidade de  $8 \times 10^4$  células/ $0,32 \text{ cm}^2$ /alvéolo. Adicionaram-se IL-2 (círculo aberto), IL-1 humano recombinante (quadrado aberto), IL-1 de rato recombinante (quadrado a cheio), interferão gama humano recombinante (círculos a cheio) e interferão beta recombinante (triângulo aberto) na diluição indicada e incubaram-se durante 4 horas (IL-1) ou 16 horas (interferão gama e beta). Os resultados indicados são as médias de determinações em quadruplicado; o desvio padrão não excedeu 10%.

A Figura 8 mostra a sequência de nucleótidos e de ácidos aminados do ADNc de ICAM-1. O primeiro ATG está na posição 58. As sequências traduzidas correspondentes aos peptídeos trípticos de ICAM-1 estão sublinhadas. O presumível peptídeo de sinal hidrofóbico e as sequências de transmembrana têm um sublinhado forte. Os locais de glicosilação N-ligada estão enquadrados. O sinal de poliadenilação AATAAA na posição 2976 tem um traço por cima. A sequência apresentada é para o clone de ADNc de HL-60. O ADNc de célula endotelial foi sequenciado na maior parte do seu comprimento e mostrou apenas diferenças míni-

mas.

A Figura 9 mostra os domínios homólogos de ICAM-1 e as relações com a família de supergenes de imunoglobulina. (A) alinhamento de 5 domínios homólogos (D1-5). Dois ou mais resíduos idênticos que alinham estão enquadrados. Os resíduos que se mantêm duas ou mais vezes nos domínios de NCAM, bem como os resíduos que se conservam nos domínios dos conjuntos C2 e C1 foram alinhados com as repetições internas de ICAM-1. A localização das cadeias  $\beta$  previstas no domínio de ICAM-1 está marcada com barras e letras minúsculas por cima dos alinhamentos, e a localização conhecida de cadeias  $\beta$  nos domínios de imunoglobulina C é marcada com barras e letras maiúsculas por baixo do alinhamento. A posição da presumível ponte de dissulfureto entre os domínios de ICAM-1 é indicada por S-S. O alinhamento (B-D) de domínios de proteína homólogos aos domínios de ICAM-1; as proteínas foram inicialmente alinhadas por busca nas bases de dados NBRF usando o programa FASTP. As sequências de proteína são MAG, NCAM, domínio V de subunidade  $\alpha$  de receptor de células T, cadeia IgM $\mu$  e glicoproteína  $\alpha$ -1-B.

A Figura 10 mostra uma comparação por meio de diagrama das estruturas secundárias de ICAM-1 e de MAG.

A Figura 11 mostra células linfoblásticas B transformadas por EBV LFA-1 positivas ligadas a ICAM-1 em membranas planares.

A Figura 12 mostra a ligação de linfoblastos T e de células de linfoma T LFA-1-positivos a ICAM-1 em vesículas de ligação plástica.

A Figura 13 mostra a inibição de ligação de células JY linfoblásticas B que se ligam a ICAM-1 em vesículas ligadas a plástico por pré-tratamento de células ou de vesículas com anticorpos monoclonais.

A Figura 14 mostra o efeito da temperatura na ligação de linfoblastos T a ICAM-1 em vesículas ligadas a plástico.

A Figura 15 mostra a necessidade de catiões divalentes para a ligação de linfoblastos T a ICAM-1 em

vesículas ligadas a plástico.

A Figura 16 mostra o efeito de anticorpos de anti-adesão na capacidade das células mononucleares de sangue periférico de proliferarem em resposta ao reconhecimento do antigene associado às células T OKT3. "OKT3" indica a adição do antigene.

A Figura 17 mostra o efeito de anticorpos de antiadesão na capacidade das células mononucleares de sangue periférico de proliferarem em resposta ao reconhecimento do mitogene de células T não específico, concanavalin A. "CONA" indica a adição de concanavalin A.

A Figura 18 mostra o efeito de anticorpos de antiadesão na capacidade de células mononucleares de sangue periférico de proliferarem em resposta ao reconhecimento do antigene da hemocianina de Megathura crenulata ("Keyhole limpet hemocyanin"). A adição da hemocianina de Megathura crenulata às células é indicado por "KLH".

A Figura 19 mostra o efeito de anticorpos de antiadesão na capacidade de células mononucleares de sangue periférico de proliferarem em resposta ao reconhecimento do antigene toxoide do tétano. A adição do antigene toxoide do tétano às células é indicado por "AGN".

A Figura 20 mostra a expressão de ICAM-1 sobre monócitos periféricos humanos. (A) células sensíveis não cultivadas; (B) células estimulador x sensíveis não cultivadas; (C) células sensíveis cultivadas durante 24 horas; (D) células estimulador x sensíveis cultivadas durante 24 horas.

(legenda: ----- sem anticorpo monoclonal;  
..... imunoglobulina de rato;  
\_\_\_\_\_ anti-ICAM-1 de rato).

#### DESCRIÇÃO DAS CONCRETIZAÇÕES PREFERIDAS

Um aspecto da presente invenção diz respeito à descoberta de um ligante de junção natural a LFA-1. Moléculas como as da família LFA-1, que estão envolvidas no processo de adesão celular, são referidas como "moléculas de adesão".

~~CONFIDENTIAL~~


O ligante de junção natural da presente invenção é designado por "Molécula-1 de Adesão Intercelular" (Intercellular Adhesion Molecule-1) ou "ICAM-1". A ICAM-1 é uma glicoproteína de 76 a 97 Kd. A ICAM-1 não é um heterodímero. A presente invenção refere-se a ICAM-1 e aos seus "derivados funcionais". Um "derivado funcional" de ICAM-1 é um composto que possui uma actividade biológica (quer seja funcional ou estrutural) que é substancialmente semelhante à actividade biológica de ICAM-1. O termo "derivados funcionais" é entendido incluir "fragmentos", "variantes", "análogos" ou "derivados químicos" duma molécula. Um "fragmento" de uma molécula tal como ICAM-1 é entendido referir-se a qualquer subconjunto de polipeptídeos da molécula. Um "variante" da molécula tal como ICAM-1 é entendido referir-se a uma molécula substancialmente semelhante em estrutura e função seja à molécula inteira seja a um seu fragmento. Diz-se que uma molécula é "substancialmente semelhante" a uma outra molécula se ambas as moléculas tem estruturas substancialmente semelhantes ou se ambas as moléculas possuem actividade biológica semelhante. Assim, contanto que duas moléculas possuam uma actividade semelhante, elas são consideradas variantes na acepção com que este termo é aqui usado mesmo se a estrutura de uma das moléculas não existe na outra ou se a sequência de resíduos de ácidos aminados não é idêntica. Um "análogo" de uma molécula tal como ICAM-1 é entendido referir-se a uma molécula substancialmente semelhante em função seja à molécula inteira seja a um seu fragmento. Como se usa aqui, diz-se que uma molécula é um derivado químico de uma outra molécula quando contém fracções químicas adicionais que não são normalmente uma parte de molécula. Tais fracções podem melhorar a solubilidade da molécula, a absorção, a semi-vida biológica, etc.. As fracções podem em alternativa diminuir a toxicidade da molécula, eliminar ou atenuar qualquer efeito lateral indesejável da molécula, etc.. Estão descritas fracções capazes de mediar tais efeitos em Remington's Pharmaceutical Sciences (1980). As moléculas de "toxina derivatizada" constituem uma classe especial de "derivados químicos". Uma molécula de "toxina derivatizada" é uma molécula (tal como ICAM-1 ou um anticorpo) que contém uma fracção de toxina. A ligação de tal

~~SECRET~~

molécula a uma célula trás a fracção de toxina para a proximidade restrita da célula e por isso provoca a morte da célula. Qualquer fracção de toxina adequada pode ser utilizada; contudo é preferível utilizar toxinas tais como, por exemplo, toxina de ricino, toxina de difetaria, toxinas radioisotópicas, toxinas que formam canal de membrana, etc.. Os processos para acoplar tais fracções a uma molécula são bem conhecidos na especialidade.

Uma molécula antigénica tal como ICAM-1 ou membros da família de moléculas LFA-1 são naturalmente expressos nas superfícies dos linfócitos. Por isso a introdução de tais células num animal apropriado, por exemplo por injeção intraperitoneal, etc., dará como resultado a produção de anticorpos capazes de ligação a ICAM-1 ou a membros da família de moléculas LFA-1. Se desejarmos, o soro de um tal animal pode ser retirado e usado como fonte de anticorpos policlonais capazes de ligação a essas moléculas. É contudo preferível remover esplenócitos a partir de tais animais, para fundir as células de baço referidas com uma linha de células de mieloma e permitir que tais células de fusão formem uma célula hibridoma que segrega anticorpos monoclonais capazes de ligação a ICAM-1 ou a membros de família de moléculas LFA-1.

As células de hibridoma obtidas do modo descrito acima podem ser seleccionados por uma variedade de métodos para identificar as células de hibridoma pretendidas que segregam anticorpo capaz de ligação quer a ICAM-1 quer a membros da família de moléculas LFA-1. Num ensaio de selecção preferido as referidas moléculas são identificadas pela sua capacidade de inibir a agregação de células transformadas por vírus Epstein-Barr. Os anticorpos capazes de inibir esta agregação são mais tarde seleccionados para determinar se inibem esta agregação por ligação a ICAM-1 ou a um membro da família de moléculas LFA-1. Qualquer meio capaz de distinguir ICAM-1 da família de moléculas LFA-1 pode ser utilizado nesta selecção. Assim, por exemplo, o antigene ligado pelo anticorpo pode ser analisado por exemplo por imunoprecipitação e por electroforese em gel de poliacrilamida. Se o antigene ligado é um membro da família de moléculas LFA-1, então verificar-se-á que o antigene imunoprecipitado é um dí



mero, enquanto que se o antigene é ICAM-1 ter-se-ão imunoprecipitado espécies de peso molecular simples. Em alternativa, é possível distinguir entre estes anticorpos que se ligam a membros da família de moléculas LFA-1 daqueles que se ligam a ICAM-1 por selecção pela capacidade do anticorpo se ligar a células tais como granulócitos que exprimem LFA-1, mas não ICAM-1. A capacidade de um anticorpo (conhecido por inibir a agregação celular) para se ligar a granulócitos indica que o anticorpo é capaz de ligação a LFA-1. A ausência de tal ligação é indicativa de um anticorpo capaz de reconhecer ICAM-1. A capacidade de um anticorpo de se ligar a uma célula tal como um granulócito pode ser detectada por meio de técnicas comumente utilizadas. Tais meios incluem análises imunológicas, aglutinação celular, estudos de ligação em filtro, precipitação de anticorpos, etc..

Os anticorpos de anti-agregação da presente invenção podem em alternativa ser identificados por medição da sua capacidade de se ligarem diferencialmente às células que expressam ICAM-1 (tais como células endoteliais activadas), e da sua incapacidade de se ligarem a células que não conseguem expressar ICAM-1. Como será brevemente apreciado pelos conhecedores da matéria, os ensaios citados podem ser modificados, ou realizados numa ordem sequencial diferente para fornecer uma variedade de análises de selecção potenciais cada uma das quais é capaz de identificar e discriminar entre anticorpos capazes de ligação a ICAM-1 e membros da família de moléculas LFA-1.

Os agentes anti-inflamatórios da presente invenção podem ser obtidos por processos naturais (tais como, por exemplo, por indução num animal, fungo, bactéria, etc. para produzir um antagonista não imunoglobulina de ICAM-1, ou por induzir um animal a produzir anticorpos policlonais capazes de ligação a ICAM-1); por métodos de síntese (tais como, por exemplo, usando o método de Merrifield de síntese de polipeptídeos para sintetizar ICAM-1, derivados funcionais de ICAM-1 ou antagonistas de proteína de ICAM-1 (quer imunoglobulina ou não-imunoglobulina); por tecnologia de hibridoma (tal como, por exemplo, para produzir anticorpos monoclonais capazes de ligação a ICAM-1); ou por tecnologia recombinante (tal como, por exemplo,

~~SECRET~~

para produzir os agentes anti-inflamatórios da presente invenção em diversos hospedeiros (i.e., em fermentos, bactérias, fungos, células de mamíferos cultivadas, etc.), ou a partir de plasmídeos recombinantes ou de vectores virais). A escolha de cada método a empregar dependerá acima de tudo de factores tais como conveniência, rendimento desejado, etc.. Não é necessário empregar somente um dos métodos, processos, ou tecnologias acima descritos para produzir um agente anti-inflamatório particular; os processos, métodos e tecnologias acima descritos podem combinar-se no sentido de obter um agente anti-inflamatório particular.

A. Identificação do Parceiro de Ligação de LFA-1 (ICAM-1)

1. Análise de Agregação dependente de LFA-1

Muitas células transformadas por vírus de Epstein-Barr apresentam agregação. Esta agregação pode ser realçada na presença de ésteres de forbol. Verificou-se que esta agregação homotípica (isto é, agregação envolvendo somente um tipo de células) é bloqueada por anticorpos anti-LFA-1 (Rothlein, R. et al., J. Exper. Med. 163: 1132-1149 (1986)), cuja referência está incorporada aqui por referência). Assim o grau de ligação dependente de LFA-1 pode ser determinada por análise do grau da formação do agregado espontâneo ou dependente do éster de forbol.

Um agente que interfere com a agregação dependente de LFA-1 pode ser identificado através do uso de uma análise capaz de determinar se o agente interfere quer com o agregado espontâneo quer com o dependente do éster de forbol das células transformadas por vírus de Epstein-Barr. A maior parte das células transformadas por vírus de Epstein-Barr podem ser utilizadas num tal ensaio sempre que as células sejam capazes de expressar a molécula de receptor de LFA-1. Estas células podem ser preparadas de acordo com a técnica de Springer, T.A. et al., J. Exper. Med. 160: 1901-1918 (1984), cuja referência é aqui incorporada por citação. Apesar de ser possível empregar quaisquer destas células na análise de ligação dependente de LFA-1 da presente invenção, é preferível empregar células da linha

~~CONFIDENTIAL~~

de células JY (Terhost, C.T. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 910 (1976)). As células podem ser cultivadas em qualquer meio adequado; contudo é altamente preferível cultivar as células no meio de cultura RMPI 1640 suplementado com soro fetal de vitela a 10% e 50 ug/ml de gentamicina (Laboratórios Gibco, NY). As células devem ser cultivadas sob condições adequadas para a proliferação de células de mamífero (isto é, a uma temperatura de geralmente 37° C, numa atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, a uma humidade relativa de 95%, etc.).

## 2. Ligação de LFA-1 a ICAM-1

Foram identificados indivíduos humanos a cujos linfócitos falta a família de moléculas de receptor de LFA-1 (Anderson, D.C. et al., Fed. Proc. 44: 2671-2677 (1985); Andersen, D.C. et al., J. Infect. dis. 152: 668-689 (1985)). Diz-se de tais indivíduos que sofrem de Deficiência de Adesão dos Leucócitos ("Leukocyte Adhesion Deficiency" = LAD). As células transformadas por EBV de tais indivíduos não conseguem agregar-se quer espontaneamente quer em presença de ésteres de forbol na análise de agregação atrás citada. Quando estas células são misturadas com células que expressam LFA-1 verificou-se agregação (Rothlein, R et al., J. Exper. Med. 163: 1132-1149 (1986)) (Figura 1). Muito importante é que estes agregados não se formam se estas células eram incubadas na presença de anticorpos anti-LFA-1. Assim, apesar de que a agregação requeria LFA-1, a capacidade das células com deficiência em LFA-1 para formar agregados com células que contêm LFA-1 indicava que o parceiro de ligação de LFA-1 não era LFA-1 mas em vez disso uma molécula de adesão celular não descoberta previamente. A figura 1 mostra o mecanismo de adesão celular.

## B. Molécula-1 de Adesão Intercelular (ICAM-1)

A nova molécula de adesão intercelular foi identificada em primeiro lugar e parcialmente caracterizada de acordo com o processo de Rothlein, R. et al., J Immunol. 137: 1270-1274 (1986) cuja referência é aqui incorporada por citação. Para detectar a molécula ICAM-1, os anticorpos monoclonais

~~SECRET~~


foram preparados com células de baço de rato imunizado com células de indivíduos geneticamente deficientes em expressão em LFA-1. Os anticorpos resultantes foram seleccionados pela sua capacidade de inibir a agregação das células que expressam LFA-1 (Figura 2). Em pormenor, a molécula ICAM-1, foram imunizados ratos com células B transformadas por EBV de pacientes LAD que não expressam o antigene de LFA-1. As células de baço destes animais foram em seguida removidas, fundidas com células de mieloma, deixando-se que se tornassem células de hibridoma produtoras de anticorpos monoclonais. As células B de indivíduos normais transformadas por EBV que exprimem LFA-1 foram depois incubadas na presença do anticorpo monoclonal da célula de hibridoma a fim de identificar qualquer anticorpo monoclonal que fosse capaz de inibir a agregação espontânea mediada pelo éster de forbol dependente de LFA-1 das células B transformadas por EBV. Uma vez que as células de hibridoma tinham sido derivadas de células que nunca tinham encontrado o antigene LFA-1 não se produziu qualquer anticorpo monoclonal para LFA-1. Assim qualquer anticorpo que se verifique inibir a agregação deve ser capaz de ligação a um antigene, que, apesar de não ser LFA-1, participa no processo de adesão de LFA-1. Apesar de se poder utilizar qualquer método para obter tais anticorpos monoclonais, é preferível obter anticorpos monoclonais de ligação a ICAM-1 por imunização de ratos BALB/C usando as vias e programas descritos por Rothlein, R et al., (J. Immunol. 137: 1270-1274 (1986)) com células mononucleares de sangue periférico transformadas por vírus de Epstein-Barr a partir de indivíduos deficientes em LFA-1. Tais células são descritas por Springer, T. A., et al., (J. Exper. Med. 160: 1901-1918 (1984)).

Num método preferido para a geração e detecção de anticorpos capazes de ligação a ICAM-1, imunizam-se ratos quer com células transformadas por EBV que expressam tanto ICAM-1 como LFA-1 quer de preferência com células endoteliais activadas por TNF que expressam ICAM-1 mas não LFA-1. Num método especialmente preferido para gerar células de hibridoma que produzem anticorpos anti-ICAM-1, um rato Balb/C foi imunizado sequencialmente com células JY e com células diferenciadas

~~SECRET~~

U937 (ATCC CRL-1593). As células de baço desses animais são removidas, fundidas com células de mieloma, possibilitando-se que desenvolvam em células de hibridoma produtoras de anticorpos. Os anticorpos são seleccionados pela sua capacidade de inibir a agregação induzida pelo éster de forbol dependente de LFA-1 de uma linha de células transformadas por EBV, tais como células JY, que expressam tanto o receptor LFA-1 como ICAM-1. Como foi mostrado por Rothlein, R., et al., (J. Immunol. 137: 1270-1274 (1987)), anticorpos capazes de inibir esta agregação são depois ensaiados para verificação da sua capacidade de inibir a agregação induzida pelo éster de forbol de uma linha de células, tal como SKW3 (Dustin, M., et al., J. Exper. Med. 165: 672-692 (1987)) cuja capacidade para se agregar espontaneamente na presença do éster de forbol é inibida por um anticorpo capaz de ligação a LFA-1 mas não é inibida por anticorpos anti-ICAM-1. Os anticorpos capazes de inibir a agregação induzida pelo éster de forbol de células tais como células JY, mas incapazes de inibir a agregação induzida pelo éster de forbol de células tais como células SKW3 são provavelmente anticorpos anti-ICAM-1. Em alternativa, os anticorpos que são capazes de ligação a ICAM-1 podem ser identificados por selecção de anticorpos que são capazes de inibir a agregação dependente de LFA-1 de células que expressam LFA (tal como células JY) mas são incapazes de ligação a células que expressam LFA-1 mas pouco ou nada ICAM-1 (tais como granulócitos normais) ou são capazes de ligação a células que expressam ICAM-1 mas não LFA-1 (tais como células endoteliais activadas por TNF). Uma outra alternativa consiste em imunoprecipitar a partir de células que expressam ICAM-1, LFA-1, ou ambas, usando anticorpos que inibem a agregação dependente de LFA-1 de células, tais como células JY, e, através de SDS-PAGE ou de um método equivalente, determinar algumas características moleculares da molécula precipitada com o anticorpo. Se a característica é a mesma que a de ICAM-1 então o anticorpo pode ser aceite como sendo um anticorpo anti-ICAM-1.

Usando anticorpos monoclonais preparados do modo descrito acima, a molécula ICAM-1 de superfície da célula foi purificada e caracterizada. A ICAM-1 foi purificada a



partir de células ou de tecido humano usando cromatografia de afinidade de anticorpo monoclonal. Neste método um anticorpo monoclonal que reage com ICAM-1 é acoplado a uma matriz inerte de uma coluna. Qualquer método de realizar tal acoplamento pode ser utilizado; contudo é preferível usar o método de Oettgen, H.C. et al., J. Biol. Chem. 259: 12034 (1984). Quando se passa um lisado celular através da matriz, as moléculas de ICAM-1 presentes são absorvidas e retidas pela matriz. Alterando o pH ou a concentração de iões da coluna as moléculas ICAM-1 ligadas podem ser eluídas da coluna. Apesar de poder ser utilizada qualquer matriz apropriada, é preferível empregar Sepharose (Pharmacia) para material da matriz. A formação de matrizes de coluna e o seu uso na purificação de proteínas são bem conhecidas na especialidade.

Dum modo conhecido normalmente pelos técnicos, as análises acima descritas podem ser usadas para identificar compostos capazes de atenuar ou de inibir a velocidade ou a extensão da adesão celular.

A ICAM-1 é uma glicoproteína de superfície de célula expressa em células não hematopoiéticas, tais como células endoteliais vasculares, células epiteliais tímicas, algumas outras células epiteliais e fibroblastos, e em células hematopoiéticas, tais como macrófagos de tecido, blastos de linfócito T estimulados por mitogénio e células B centradas germinais, e células dendríticas em amígdalas, gânglios linfáticos e placas de Peyer. A ICAM-1 é expressa em alto grau em células endoteliais vasculares, em áreas de células T, em gânglios linfáticos e em amígdalas que mostram hiperplasia reactiva. A ICAM-1 é expressa em pequenas quantidades em linfócitos de sangue periférico. A diferenciação estimulada por ésteres de forbol de algumas linhas de células mielomonocíticas aumenta em alto grau a expressão de ICAM-1. Deste modo, a ICAM-1 é preferencialmente expressa em locais de inflamação e não é geralmente expressa por células inactivas. A expressão de ICAM-1 em fibroblastos dérmicos é aumentada três a cinco vezes quer pela interleuquina 1 quer pelo interferão gama a níveis de 10 U/ml durante um período de 4 a 10 horas, respectivamente. A indução é dependente da síntese de ARNm e de proteína e é reversível.

~~SECRET~~

A ICAM-1 apresenta heterogeneidade no peso molecular em diferentes tipos de células com um peso molecular de 97 kd nos fibroblastos, 114 kd na linha de células mielomonocíticas U937 e 90 kd nas células linfoblastóides B JY. Verificou-se que a biossíntese de ICAM-1 envolve um precursor intracelular de aproximadamente 73 kd. A forma não N-glicosilada resultante do tratamento com tunicamicina (que inibe a glicosilação) tem um peso molecular de 55 kd.

A ICAM-1 isolada a partir de células U937 estimuladas com éster de forbol ou a partir de células fibroblásticas dá um produto maioritário idêntico com um peso molecular de 60 kd depois da desglicosilação. Os anticorpos monoclonais ICAM-1 interferem com a adesão dos blastos de fito-hemaglutinina a linhas de células com deficiência em LFA-1. O tratamento prévio de fibroblastos, mas não linfócitos, com anticorpos monoclonais capazes de ligação a ICAM-1 inibe a adesão linfócito-fibroblasto. Também se verificou que o tratamento prévio de linfócitos, mas não de fibroblastos, com anticorpos contra LFA-1 inibe a adesão linfócito-fibroblasto.

A ICAM-1 é, assim, o ligante de junção do complexo 18 CD em leucócitos. É induzível em fibroblastos e em células endoteliais in vitro por mediadores inflamatórios tais como IL-1, interferon gama e factor de necrose de tumor num período de tempo consentâneo com a infiltração de linfócitos em lesões inflamatórias in vivo (Dustin M. L., et al., J. Immunol. 137: 245-254, (1986); Prober, J. S., et al., J. Immunol. 137: 1893-1896 (1986)). Além disso a ICAM-1 é expressa em células não-hematopoiéticas tal como células endoteliais vasculares, células endoteliais tímicas ou outras células epiteliais e fibroblastos e em células hematopoiéticas tais como macrófagos de tecidos, blastos de linfócito T estimulados por mitógenos e células B de centro germinal e células dendríticas em amígdalas, gânglios linfáticos e placas de Peyer (Dustin, M. L., et al., J. Immunol. 137: 245-254, (1986)). A ICAM-1 é expressa em queratinócitos em lesões inflamatórias benignas tais como eczema alérgico, líquen plano, exantema, urticária e doenças "bullous". As reacções alérgicas da pele provocadas pela aplicação de um hapteno na pele ao

qual o paciente é alérgico revelam uma expressão de ICAM-1 forte nos queratinócitos. Por outro lado a aplicação de pensos tóxicos na pele não revela expressão de ICAM-1 nos queratinócitos. A ICAM-1 está presente nos queratinócitos das biópsias das lesões da pele de várias perturbações dermatológicas e a expressão de ICAM-1 é induzida em lesões de ensaios de pensos alérgicos enquanto os queratinócitos das lesões de ensaios de pensos tóxicos não conseguem expressar ICAM-1.

A ICAM-1 é, portanto, um substracto celular ao qual se podem fixar os linfócitos, de modo que os linfócitos possam migrar para locais de inflamação e/ou levando a efeito várias funções efectoras que contribuem para essa inflamação. Estas funções incluem a produção de anticorpos, lise de células alvo infectadas por vírus, etc.. O termo "inflamação" tal como é usado na presente invenção deve incluir somente as reacções do sistema de defesa específico. O termo "sistema de defesa específico" tal como usado aqui refere-se ao componente do sistema imunitário que reage à presença de antígenos específicos. Diz-se que a inflamação resulta de uma resposta do sistema de defesa específico se a inflamação for causada por, for mediada por ou for associada com a reacção do sistema de defesa específico. Exemplos de inflamações resultantes da resposta do sistema de defesa específico incluem a resposta a antígenos tais como vírus de rubéola, doenças auto-imunes, resposta de hipersensibilidade de tipo retardado mediada por células T (como foi visto, por exemplo em indivíduos com resposta positiva no teste de Mantoux), etc..

### C. Clonagem do gene de ICAM-1


Qualquer procedimento de uma grande variedade pode ser utilizado para clonar o gene de ICAM-1. Um destes métodos impõe a análise de inserções de ADNc um banco de um vector vai e vem de (derivados de uma célula que expressa ICAM-1) para a presença de uma inserção que contenha o gene de ICAM-1. Tal análise pode ser levada a cabo por transferência de células com o vector e em seguida analisando para expressão de ICAM-1. O método preferido para clonagem deste gene impõe deter-

minar-se a sequência de ácidos aminados da molécula de ICAM-1. Para realizar esta tarefa a proteína de ICAM-1 pode ser purificada e analisada por sequenciadores. Em alternativa, a molécula pode ser fragmentada como com cianogênio ou com proteases tais como papaína, quimotripsina ou tripsina (Oike, Y. et al., J. Biol. Chem. 257: 9751-9758 (1982); Liu, C. et al., Int. J. Pept. Protein Res. 21: 209-215 (1983)). Apesar de ser possível determinar a sequência integral de ácidos aminados da ICAM-1, é preferível determinar a sequência de fragmentos peptídicos da molécula. Se os peptídeos são maiores que o comprimento de 10 ácidos aminados a informação da sequência é geralmente suficiente para permitir clonar um gene tal como o gene para ICAM-1.

A sequência de resíduos de ácido aminados num peptídeo é designada aqui quer através do uso das suas designações de três letras comumente empregues quer pelas suas designações de uma única letra. Uma lista dessas designações de 3 letras e de 1 letra encontra-se em livros de texto tal como Biochemistry, Lehninger, A., Worth Publishers, New York, NY (1970). Quando uma tal sequência é listada verticalmente, o resíduo amino-terminal deve estar no cimo da lista e o resíduo carboxi-terminal do peptídeo deve estar ao fundo da lista. De um modo semelhante, quando é listada horizontalmente, a extremidade amino-terminal deve estar na extremidade da esquerda enquanto a extremidade carboxi-terminal deve estar na extremidade da direita. Os resíduos de ácidos aminados num peptídeo podem ser separados por hífens. Tais hífens devem servir somente para facilitar a apresentação da sequência. Como exemplo puramente ilustrativo, a sequência de ácidos aminados designada por:

-Gly-Ala-Ser-Phe-

indica que um resíduo de Ala está ligado ao grupo carboxilo de Gly, e que um resíduo de Ser está ligado ao grupo carboxilo do resíduo de Ala e ao grupo amina de um resíduo Phe. A designação indica além disso que a sequência de ácidos aminados contém o tetrapeptídeo Gly-Ala-Ser-Phe. A designação não deve ser entendida como limitando a sequência de ácidos aminados a este único tetrapeptídeo, mas deve incluir (1) o tetrapeptídeo que tem um ou



mais resíduos de ácidos aminados ligados quer ao seu terminal amino quer ao seu terminal carboxi, (2) o tetrapeptídeo que tem um ou mais resíduos de ácidos aminados ligados tanto ao seu terminal amino como ao seu terminal carboxi, (3) o tetrapeptídeo que não tem resíduos adicionais de ácidos aminados.

Uma vez que um ou mais fragmentos peptídicos adequados tenham sido sequenciados, as sequências de ADN capazes de codificá-los são examinadas. Devido a que o código genético é degenerado, mais do que um codão pode ser usado para codificar um ácido aminado particular (Watson, J.D., In: Molecular Biology of the Gene, 3rd Ed., W.A. Benjamin, Inc., Menlo Park, CA (1977), pp. 356-357). Os fragmentos peptídicos são analisados a fim de identificar sequências de ácidos aminados que possam ser codificadas por oligonucleótidos que tenham o mais baixo grau de degenerescência. Isto é realizado de preferência por identificação de sequências que contenham ácidos aminados que são codificados somente por um codão simples. Apesar de ocasionalmente tais sequências de ácidos aminados poderem ser codificadas só por um oligonucleótido simples, frequentemente a sequência de ácidos aminados pode ser codificada por um qualquer de um conjunto de oligonucleótidos semelhantes. É importante que, enquanto que todos os membros do conjunto contêm oligonucleótidos que são capazes de codificar o fragmento peptídico e assim contêm potencialmente a mesma sequência de nucleótidos que o gene que codifica para o fragmento peptídico, somente um membro do conjunto contêm a sequência de nucleótidos que é idêntica à sequência de nucleótidos deste gene. Como este membro está presente dentro do conjunto e é capaz de hibridar para ADN mesmo em presença de outros membros do conjunto, é possível empregar o conjunto não fraccionado de oligonucleótidos do mesmo modo em que se empregaria um oligonucleotido simples para clonar o gene que codifica para o peptídeo.

Dum modo exactamente análogo ao descrito acima, pode empregar-se um oligonucleótido (ou conjunto de oligonucleótidos) que tenha uma sequência de nucleótidos que é complementar à sequência de nucleótidos ou conjunto de sequências que é capaz de codificar para o fragmento peptídico.

~~CONFIDENTIAL~~

Um oligonucleótido adequado ou conjunto de oligonucleótidos que é capaz de codificar para um fragmento do gene de ICAM-1 (ou que é complementar de um tal oligonucleótido ou conjunto de oligonucleótidos) é identificado (usando o procedimento acima descrito), sintetizado e hibridado, por meios bem conhecidos da especialidade, contra um ADN ou, de preferência, contra um preparado de ADNc derivado de células humanas que são capazes de expressar sequências de genes de ICAM-1. Técnicas de hibridação de ácidos nucleicos são apresentadas por Maniatis, T. et al., In: Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Coldspring Harbor, NY (1982) e por Haymes, B.D. et al., In: Nucleic acid Hybrization, a Pratical Approach, IRL Press, Washington, DC (1985), indicações estas que são aqui incorporadas por referência. A fonte de ADN ou de ADNc terá sido de preferência enriquecida para sequências de ICAM-1. Tal enriquecimento pode mais facilmente ser obtido a partir de ADNc obtido por extracção de ARN de células cultivadas sob condições que induzem a síntese de ICAM-1 (tal como U937 cultivadas em presença de ésteres de forbol, etc.).

Técnicas tais como ou semelhantes àquelas descritas acima têm sucessivamente permitido a clonagem de genes para de-hidrogenases de aldeído humanas (Hsu, L.C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3771-3775 (1985)), fibronectina (Suzuki, S. et al., Eur. Mol. Biol. Organ. J. 4: 2519-2524 (1985), gene receptor de estrogênio humano (Walter, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7889-7893 (1985), activador de plasminogênio de tipo de tecido (Pennica, D. et al., Nature 301: 214-221 (1983)) e ADN complementar de fosfatase alcalina placentária de termo humana (Kam, W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8715-8719 (1985)).

Numa via alternativa preferida de clonagem do gene de ICAM-1, prepara-se um banco de vectores de expressão por clonagem de ADN ou de preferência de ADNc de uma célula capaz de exprimir ICAM-1 num vector de expressão. O banco é então submetido a selecção para membros capazes de expressar uma proteína que se liga ao anticorpo anti-ICAM-1 e que tem uma sequênciã de nucleótidos que é capaz de codificar para polipeptí

deos que têm a mesma sequência de ácido aminados que a ICAM-1 ou fragmentos de ICAM-1.

O gene de ICAM-1 clonado, obtido através dos métodos descritos atrás, pode ser operacionalmente ligado a um vector de expressão e introduzido em células bacterianas ou eucarióticas para produzir proteína ICAM-1. Técnicas para tais manipulações são apresentadas por Maniatis, T. et al., supra, e são bem conhecidas na especialidade.

#### D. Utilizações de Análises de Agregação Dependente de LFA-1

A análise descrita acima, capaz de medir a agregação dependente de LFA-1, pode ser utilizada para identificar agentes que actuam como antagonistas para inibir a extensão da agregação dependente de LFA-1. Tais antagonistas podem actuar destruindo a capacidade de LFA-1 ou de ICAM-1 para mediar a agregação. Assim, tais agentes incluem imunoglobulinas tal como um anticorpo capaz de ligação quer a LFA-1 quer a ICAM-1. Adicionalmente, agentes não-imunoglobulina (i.e., químicos) podem ser examinados, usando a análise acima descrita, para determinar se são antagonistas da agregação de LFA-1.

#### E. Utilizações de Anticorpos Capazes de Ligação a Proteínas Receptoras de ICAM-1

##### 1. Agentes anti-inflamatórios

Os anticorpos monoclonais para membros do complexo CD 18 inibem muitas funções dependentes de adesão de leucócitos incluindo a ligação a endotélio Haskard, D., et al., J. Immunol. 137: 2901-2906 (1986)), adesões homotípicas (Rothlein, R., et al., J. Exp. Med. 163: 1132-1149 (1986)), proliferação induzida por antígenos e mitógenos de linfócitos (davignon, D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 4535-4539 (1981)), formação de anticorpos (Fischer, A., et al., J. Immunol. 136: 3198-3203 (1986)) e funções efectoras de todos os leucócitos tais como actividade lítica de células T citotóxicas (Krensky, A.M., et al., J. Immunol. 132: 2180-2182 (1984)), macrófagos (Strassman, G., et al., J. Immunol. 136: 4328-4333 (1986)) e

~~CONFIDENTIAL~~

todas as células envolvidas em reações de citotoxicidade celular dependente de anticorpos (Kohl, S., et al., J. Immunol. 133: 2972-2978 (1984)). Em todas as funções referidas os anticorpos inibem a capacidade do leucócito de aderir ao substrato celular apropriado, o qual por seu turno inibe o resultado final.


Como discutido acima, a ligação de moléculas de ICAM-1 aos membros da família LFA-1 de moléculas é de importância fundamental na adesão celular. Através do processo de adesão, os linfócitos são capazes de monitorizar de modo contínuo um animal no que se refere à presença de antígenos estranhos. Apesar de estes processos serem normalmente desejáveis, eles são também a causa da rejeição no caso de transplantações de órgãos, de rejeição de enxertos de tecido e de muitas doenças autoimunes. Assim quaisquer meios capazes de atenuar ou inibir a adesão celular seriam altamente desejáveis em receptores de transplantações de órgãos e de enxertos de tecidos ou em doentes autoimunes.

Os anticorpos monoclonais capazes de ligação a ICAM-1 são altamente desejáveis como agentes anti-inflamatórios num indivíduo mamífero. Significativamente, tais agentes diferem do geral dos agentes anti-inflamatórios na circunstância de que eles são capazes de inibirem a inibição de modo selectivo e não oferecem outros efeitos secundários tais como nefrotoxicidade que é encontrada com agentes convencionais. Os anticorpos monoclonais capazes de ligação a ICAM-1 podem no entanto ser usados para prevenir a rejeição de órgãos ou tecidos, ou para modificar as respostas autoimunes sem o receio de tais efeitos secundários no indivíduo mamífero.

É importante notar que o uso de anticorpos monoclonais capazes de reconhecer ICAM-1 pode permitir a realização de transplantes de órgãos mesmo entre indivíduos que tenham incoerência de HLA.

## 2. Supressores de Reacção Hipersensitiva de Tipo Retardado

Uma vez que as moléculas de ICAM-1 são expressas a maior parte das vezes em locais de inflamação, tais como aqueles sítios envolvidos em reacção hipersensitiva de



tipo retardado, os anticorpos (especialmente os anticorpos monoclonais) capazes de ligação a moléculas de ICAM-1 têm potencial terapêutico na atenuação ou eliminação de tais reacções. Esta utilização do potencial terapêutico pode ser explorada por um qualquer de dois modos. Primeiro, uma composição contendo um anticorpo monoclonal contra ICAM-1 pode ser administrada ao paciente que tem reacção sensitiva de tipo retardado. Por exemplo, tais composições podem ser dadas a um indivíduo que tenha estado em contacto com antigenes tais como toxicoendro, sumagre venenoso, etc.. Na segunda concretização, o anticorpo monoclonal capaz de ligação a ICAM-1 é administrado a um doente em conjunto com um antigene a fim de evitar uma reacção inflamatória subsequente. Assim, a co-administração de um antigene e de um anticorpo monoclonal de ligação a ICAM-1 podem tornar temporariamente um indivíduo tolerante para a subsequente apresentação de um tal gene.

### 3. Terapêutica para Doenças Inflamatórias Crônicas

Uma vez que pacientes com LAD desprovidos de LFA-1 não dão uma resposta inflamatória, acredita-se que o antagonismo do ligante natural de LFA-1, também inibirá uma resposta inflamatória. A capacidade de anticorpos contra ICAM-1 para inibir a inflamação fornece a base para o seu uso terapêutico no tratamento de doenças inflamatórias crônicas e doenças autoimunes, tal como lupus eritematoso, tiroidite autoimune, encefalomielite alérgica experimental (EAE), esclerose múltipla, algumas formas de síndrome de Reynaud diabético, artrite reumatóide, etc.. No geral, os anticorpos monoclonais capazes de ligação a ICAM-1 podem ser utilizados no tratamento daqueles doenças correntemente tratadas através de terapia com esteróides.

### 4. Aplicações em diagnóstico e prognóstico

Uma vez que a ICAM-1 é expressa principalmente em locais de inflamação, os anticorpos monoclonais capazes de ligação a ICAM-1 podem ser empregues como um meio de dar imagem ou visualizar os locais de infecção e de inflamação num paciente. Em tal utilização, os anticorpos monoclonais são marcados para serem detectados através do uso de radio-

~~\_\_\_\_\_~~


isótopos, marcações de afinidade (tal como biotina, avidina, etc.) marcações fluorescentes, átomos paramagnéticos, etc.. Os procedimentos para realizar tal marcação são conhecidos na especialidade. A aplicação clínica de anticorpos para fornecer imagem para diagnóstico são revistos por Grossman, H.B., Urol. Clin. North Amer. 13: 465-474 (1986), Unger, E.C., et al., Invest. Radiol. 20: 693-700 (1985) e Khaw, B.A., et al., Science 209: 295-297 (1980).

A presença de inflamação pode ser também detectada através do uso de ligantes de junção tais como ARNc ou ADN que se ligue às sequências do gene de ICAM-1 ou às sequências do ARNm de ICAM-1 de células que expressam ICAM-1. As técnicas para realizar tais análises de hibridação são descritas por Maniatais, T. (supra).

A detecção de focos de tais anticorpos marcados de forma detectável é indicativa de um local de inflamação ou de desenvolvimento de tumor. Numa forma de concretização, este exame de inflamação é feito por remoção de amostras de tecido ou sangue e incubação de tais amostras na presença de anticorpos marcados de forma detectável. Numa forma de concretização preferida, esta técnica é feita dum modo não invasivo através do uso de desenvolvimento magnética de imagem, de fluorografia, etc. Um tal teste de diagnóstico pode ser empregue na monitorização em receptores de transplante de órgãos de sinais precoces de potencial rejeição. Tais análises podem também ser conduzidas em tentativas para determinar uma propensão pessoal para a artrite reumatóide ou outras doenças inflamatórias crônicas.

##### 5. Adicional para a Introdução de Material Antigénico Administrado com Intenções Terapêuticas ou de Diagnóstico

As respostas imunes a agentes terapêuticos ou de diagnóstico tais como, por exemplo, insulina de bovino, interferão, activador de plasminogéneo de tipo de tecido ou anticorpos monoclonais de murino prejudicam substancialmente o valor da terapêutica ou do diagnóstico de tais agentes e podem de facto causar doenças tal como a doença do soro. Uma tal situação pode ser remediada através do uso dos anticorpos da presente



invenção. Nesta concretização, tais anticorpos poderiam ser administrados em combinação com o agente terapêutico ou de diagnóstico. A adição de anticorpos evita que o receptor reconheça o agente, e além disso evita que o receptor de dar início a uma resposta imune contra este agente. A falta de uma tal resposta imune resulta na capacidade do paciente para receber administrações adicionais do agente terapêutico ou de diagnóstico.

#### F. Utilizações da Molécula-1 de Adesão Intercelular (ICAM-1)

A ICAM-1 é um parceiro de ligação de LFA-1. Como tal, a ICAM-1 ou os seus derivados funcionais podem ser empregues por permuta com anticorpos capazes de ligação a LFA-1 no tratamento da doença. Assim, na forma solubilizada, tais moléculas podem ser empregues para inibir uma inflamação, uma rejeição de órgão, uma rejeição de enxerto, etc.. A ICAM-1 ou os seus derivados funcionais podem ser usados da mesma maneira que anticorpos anti-ICAM para diminuir a imunogenicidade de agentes terapêuticos ou de diagnóstico.

A ICAM-1, os seus derivados funcionais e os seus antagonistas podem ser usados para bloquear as metástases ou a proliferação de células de tumor que expressam quer ICAM-1 quer LFA-1 nas suas superfícies. Podem ser usados variados métodos para realizar tal objectivo. Por exemplo, a migração de células hematopoiéticas requer a ligação LFA-1-ICAM-1. Os antagonistas de tal ligação contudo suprimem esta migração e bloqueiam a metástese de células de tumor da linhagem de leucócitos. Em alternativa, moléculas de toxina derivatizada capazes de ligação quer de ICAM-1 quer de um membro da família de moléculas LFA-1 podem ser administradas ao paciente. Quando tais moléculas de toxina derivatizada se ligam a células de tumor que expressam ICAM-1 ou um membro da família de moléculas LFA-1, a presença da toxina mata a célula de tumor deste modo inibindo a proliferação do tumor.

#### G. Utilizações de Antagonistas de Não-Imunoglobulina de Adesão dependente de ICAM-1

A adesão dependente de ICAM-1 pode

~~CONFIDENTIAL~~

ser inibida por antagonistas de não-imunoglobulina que são capazes de ligação quer a ICAM-1 quer a LFA-1. Um exemplo de um antagonista não-imunoglobulina de ICAM-1 é LFA-1. Um exemplo de um antagonista não-imunoglobulina que se liga a LFA-1 é ICAM-1. Através do uso das análises acima descritas podem ser identificados e purificados antagonistas não-imunoglobulina adicionais. Os antagonistas não-imunoglobulina de adesão dependente de ICAM-1 podem ser usados com o mesmo fim que os anticorpos para LFA-1 ou que os anticorpos para ICAM-1.


#### H. Administração das Composições da Presente Invenção

Os efeitos terapêuticos da ICAM-1 podem ser obtidos proporcionando a um paciente a molécula de ICAM-1 inteira ou quaisquer fragmentos peptídicos terapêuticamente activos de ICAM-1.

A ICAM-1 e os seus derivados funcionais podem ser obtidos quer por via sintética, mediante a utilização de tecnologia recombinante, ou por via proteolítica. As vantagens terapêuticas da ICAM-1 podem ser aumentadas através do uso de derivados funcionais de ICAM-1 que possuam ácidos aminados adicionais integrados a fim de facilitar o acoplamento a um suporte ou a fim de aumentar a actividade da ICAM-1. O âmbito da presente invenção inclui ainda os derivados funcionais da ICAM-1 a que faltam alguns resíduos de ácidos aminados ou que contêm resíduos de ácidos aminados alterados sempre que estes derivados apresentem a capacidade de afectar a adesão celular.

Tanto os anticorpos da presente invenção como a molécula de ICAM-1 descritos na presente especificação são classificados como "substancialmente isentos de contaminantes naturais" se os preparados que os contêm estão substancialmente isentos dos materiais com que estes produtos são normalmente encontrados no estado natural.

A presente invenção abrange os anticorpos e os fragmentos biologicamente activos de anticorpos (sejam policlonais ou monoclonais) que têm capacidade de se ligarem a ICAM-1. Estes anticorpos podem ser produzidos por um animal, por cultura de tecidos ou por técnicas de ADN recombinante.




Ao administrar a um paciente os anticorpos ou os respectivos fragmentos com capacidade de ligação a ICAM-1 ou ao administrar ICAM-1 (ou um seu fragmento, variante ou derivado) a um paciente, a dose do agente administrativo variará de acordo com factores como a idade, o peso, a altura, o sexo, a condição clínica geral, a história médica anterior, etc. do paciente. Em geral é desejável proporcionar ao paciente uma dosagem de anticorpo que esteja na gama de desde cerca de 1 pg/kg a 10 mg/kg (de peso corporal do paciente), se bem que se possa administrar uma dosagem inferior ou superior. Para proporcionar moléculas de ICAM-1 ou dos seus derivados funcionais a um paciente é preferível administrar estas moléculas numa dosagem que se estende desde cerca de 1 pg/kg a 10 mg/kg (de peso corporal do paciente), se bem que possa ser administrada uma dosagem inferior ou superior. Conforme discutido seguidamente, a dose terapêutica eficaz pode ser reduzida se o anticorpo anti-ICAM-1 é administrado conjuntamente com um anticorpo anti-LFA-1. Na presente memória descritiva dois anticorpos (ou os seus derivados funcionais) são considerados como administrados conjuntamente a um paciente se são administrados ao paciente com uma proximidade temporal de tal ordem que é possível detectar ambos os compostos no soro do paciente.

Tanto o anticorpo capaz de ligação a ICAM-1 como a própria ICAM-1 podem ser administrados aos pacientes por via intravenosa, intramuscular, subcutânea, entérica ou parentérica. Quando se administra o anticorpo ou a ICAM-1 por injeção, a administração pode ser por perfusão contínua ou por injeções isoladas numa única ou em várias doses.

Os agentes anti-inflamatórios da presente invenção destinam-se a ser proporcionados aos indivíduos receptores numa quantidade suficiente para suprimir a inflamação. Diz-se que uma quantidade é suficiente para "suprimir" a inflamação se a dosagem, a via de administração, etc., do agente são suficientes para atenuar ou evitar a inflamação.

Os agentes anti-inflamatórios da presente invenção podem ser proporcionados antes de se declarar a inflamação (de modo a suprimir uma inflamação prevista) ou de-




pois do início da inflamação.

Diz-se que uma composição é "farmacologicamente aceitável" quando a sua administração pode ser tolerada pelo paciente receptor. Diz-se que um agente como este é administrado numa "quantidade terapêutica eficaz" se a quantidade administrada possui significado fisiológico. Um agente possui significado fisiológico se a sua presença tem como resultado uma alteração detectável num paciente receptor.

As moléculas de anticorpo e de ICAM-1 da presente invenção podem ser incorporadas em formulações de acordo com técnicas conhecidas para a preparação de composições farmacêuticas úteis, combinando estes materiais ou os seus derivados funcionais numa mistura com uma substância veicular farmacêuticamente activa. As substâncias veiculares adequadas e a respectiva formulação, tais como de outras proteínas humanas, por exemplo albumina de soro humano, são descritas, por exemplo, em Remington's Pharmaceutical Sciences (16th ed., Osol, A., Ed., Mack, Easton PA (1980)). A fim de formar uma composição farmacêuticamente aceitável adequada para a administração eficaz, tais composições deverão conter uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-ICAM-1 ou da molécula de ICAM-1 ou dos seus derivados funcionais juntamente com uma quantidade adequada de uma substância veicular.

Podem ser utilizadas outras técnicas farmacêuticas para regular a duração da acção. As preparações de libertação regulada podem ser conseguidas mediante o uso de polímeros para complexar ou para absorver o anticorpo anti-ICAM-1 ou a ICAM-1 ou os seus derivados funcionais. A libertação regulada pode ser conseguida por selecção das macromoléculas adequadas (por exemplo poliésteres, poliácidos aminados, polivinilpirrolidona, acetato de etilenoivinilo, metilcelulose, carboximetilcelulose ou sulfato de protamina) e da concentração das macromoléculas bem como dos métodos de incorporação a fim de regular a libertação. Outro método possível para regular a duração da acção por meio de preparados de libertação regulada consiste em incorporar as moléculas do anticorpo anti-ICAM-1 ou de ICAM-1 ou dos seus derivados funcionais em partículas de um material po





de vitela e 50 µg/ml de gentamicina) até se verificar o crescimento das células. As células cresceram na maioria dos alvéolos e foram expandidas no mesmo meio. Estabeleceram-se blastos de fito-hemaglutinina (PHA) a  $10^6$  células/ml em meio RPMI 1640 (suplementado com 20% de soro fetal de vitela) contendo uma diluição de 1:800 de PHA-P (Difco Laboratories, Inc., Detroit, MI). Expandiram-se linhas de PHA com meio condicionado com interleuquina 2 (IL-2) e reforçaram-se semanalmente com PHA (Cantrell, D.A. et al., J. Exper. Med. 158: 1895 (1983)). O processo acima descrito foi divulgado por Springer, T. et al., J. Exper. Med. 160: 1901-1918 (1984), cuja referência se encontra aqui incorporada por referência. As células obtidas por meio do processo acima descrito são então seleccionadas com anticorpos anti-LFA-1 a fim de determinar se expressam os antígenos LFA-1. Tais anticorpos foram descritos por Sanchez-Madrid, F. et al., J. Exper. Med. 158: 1785 (1983).

#### EXEMPLO 2

##### Análises de Agregação e Adesão Celular

A fim de avaliar a extensão da adesão celular, foram usadas análises de agregação. As linhas de células usadas em tais análises foram lavadas duas vezes com meio de RPMI 1640 contendo tampão de HEPES 5 mM (Sigma Chemical Co., St. Louis) e foram ressuspendidas a uma concentração de células/ml de  $2 \times 10^6$ . Adicionaram-se 50 µl de sobrenadantes de anticorpos monoclonais apropriados ou 50 µl de meio completo com ou sem anticorpos monoclonais purificados, 50 µl de meio completo contendo 200 ng/ml do éster de forbol miristato-acetato de forbol (PMA) e 100 µl de células a uma concentração de  $2 \times 10^6$  células/ml em meio completo a placas de microtitulação de 96 alvéolos de fundo raso (Nº. 3596; Costar, Cambridge, MA). Deste modo foi obtida uma concentração final de 50 ng/ml de PMA e  $2 \times 10^5$  de células/alvéolo. Deixou-se as células sedimentarem espontaneamente e o grau de agregação foi marcado após períodos de tempo variados. Os resultados variaram de 0 a 5+, onde 0 indicava que essencial-

mente nenhuma célula estava em aglomerados; 1+ indicava que menos de 10% das células estavam em agregados; 2+ indicava que menos de 50% das células estavam agregadas; 3+ indicava que até 100% das células estavam em pequenos aglomerados soltos; 4+ indicava que até 100% das células se tinham agregado em aglomerados maiores; e 5+ indicava que 100% das células estavam em agregados grandes muito compactos. A fim de obter uma estimativa mais precisa da adesão celular, adicionaram-se os reagentes e as células a tubos de poliestireno de 5 ml, na mesma ordem acima descrita. Os tubos foram colocados numa placa de um agitador orbital a 37°C. Após 1 hora a aproximadamente 200 rpm introduziram-se 10 ul da suspensão celular num hemocitómetro e o número de células livres foi determinado. Determinou-se a percentagem de agregação pela seguinte equação:


$$\% \text{ agregação} = 100 \times \left( 1 - \frac{\text{número de células livres}}{\text{número de células introduzidas}} \right)$$

O número de células introduzidas na fórmula acima é o número de células por ml num tubo de comparação contendo apenas células e meio completo que não foi incubado. O número de células livres na equação anterior é igual ao número de células não agregadas por ml dos tubos da experiência. Os processos acima foram descritos por Rothlein, R., et al., J. Exper. med. 163: 1132-1149 (1986).

### EXEMPLO 3

#### LFA-1 Agregação Celular Dependente

A análise qualitativa de agregação descrita no Exemplo 2 foi efectuada usando a linha de células JY transformada por Epstein-Barr. Por adição de PMA ao meio de cultura nas placas de microtitulação, verificou-se a agregação das células. Gravações vídeo efectuadas durante o decurso do processo mostraram que as células JY no fundo dos alvéolos da placa de microtitulação eram móveis e apresentavam membranas activas enrugadas e movimentos de pseudopódios. O contacto entre os pseudopódios de células vizinhas resultava muitas vezes em aderência cé-



lula-célula. Quando a aderência era mantida, a região de contacto celular deslocava-se para o urópode. Era possível manter o contacto, apesar dos movimentos vigorosos da célula e da tracção das células em direcções opostas. A diferença primária entre células tratadas por PMA e células não tratadas parecia estar na estabilidade destes contactos, uma vez formados. Com PMA, os agregados de células desenvolveram-se, crescendo em tamanho à medida que células adicionais aderiam à sua periferia.

Como segundo meio de medição da adesão, usou-se a análise quantitativa descrita no Exemplo 2. Agitaram-se suspensões de células a 200 rpm durante 2 horas, transferiram-se para um hemocitómetro e contaram-se as células que não estavam agregadas. Na ausência de PMA, 42% (D.P. = 20%, N = 6) de células JY encontravam-se em agregados após 2 horas, enquanto que células JY incubadas em condições idênticas com 50 ng/ml de PMA tinham 87% (D.P. = 8%, N = 6) das células em agregados. Estudos cinéticos de agregação mostraram que o PMA aumentava a velocidade e a grandeza da agregação em todos os períodos de tempo ensaiados (Figura 3).

#### EXEMPLO 4

##### Inibição de Agregação das Células Usando Anticorpos Monoclonais Anti-LFA-1

A fim de examinar os efeitos de anticorpos monoclonais anti-LFA-1 na agregação celular induzida por PMA, estes anticorpos foram adicionados a células incubadas, de acordo com a análise de agregação qualitativa do Exemplo 2. Verificou-se que os anticorpos monoclonais inibiam a formação de agregados de células, quer na presença quer na ausência de PMA. Tanto o fragmento F(ab')<sub>2</sub> como o Fab' de anticorpos monoclonais contra a cadeia alfa de LFA-1 foram capazes de inibir a agregação celular. Enquanto que essencialmente 100% das células formaram agregados na ausência de anticorpo anti-LFA-1, verificou-se que menos de 20% das células estavam em agregados quando se adicionou o anticorpo. Os resultados desta experiência foram descritos por Rothlein, R. et al. (J. Exper. Med. 163: 1132-1149 (1986)).

#### EXEMPLO 5

O Receptor LFA-1 é Necessário para a Agregação Celular

Foram preparadas células linfoblásticas transformadas por EBV de doentes, do modo descrito no Exemplo 1. Estas células foram verificadas por meio de anticorpos monoclonais capazes de reconhecer LFA-1 e constatou-se que as células eram deficientes em LFA-1.

A análise qualitativa de agregação descrita no Exemplo 2 foi utilizada, usando as células deficientes em LFA-1 acima descritas. Estas células não conseguiram agregar-se espontaneamente, mesmo na presença do PMA.

#### EXEMPLO 6

A Descoberta de ICAM-1

As células deficientes em LFA-1 do Exemplo 5, foram marcadas com diacetato de carboxifluoresceína (Patarroyo, M. et al., Cell Immunol. 63: 237-248 (1981)). As células marcadas foram misturadas numa proporção de 1:10 com células autólogas ou JY e a percentagem de células marcadas com fluoresceína em agregados foi determinada de acordo com o processo de Rothlein, R. et al., J. Exper. Med. 163: 1132-1149 (1986). Verificou-se que as células deficientes em LFA-1 eram capazes de se co-agregar com células que expressavam LFA-1 (Figura 4).

A fim de determinar se o LFA-1 era importante apenas na formação de agregados ou na sua manutenção, foram adicionados aos agregados já formados anticorpos capazes de se ligarem ao LFA-1 acima descritos. Verificou-se que a adição de anticorpos desfazia fortemente a agregação realizada. Gravações de vídeo efectuadas durante o decurso do processo confirmaram que a adição dos anticorpos monoclonais para agregados já formados começava a causar disrupção ao fim de 2 horas (Quadro 1). Após adição de anticorpos monoclonais contra LFA-1, os movimentos pseudopódicos e as mudanças na forma das células individuais nos agregados continuavam inalterados. As células individuais dissociaram-se gradualmente a partir da periferia do agre-

gado; ao fim de oito horas, a maioria das células estava dispersa. Na gravação vídeo do processo, a separação de agregados formados por anticorpos monoclonais LFA-1, parecia equivalente ao processo de agregação na ausência de anticorpo monoclonal LFA-1 em sentido contrário.

#### QUADRO 1

Capacidade de Anticorpos Monoclonais Anti-LFA-1 para Separar Agregados já Formados de Células JY Induzidas por PMA

Exp.	<u>Contagem de Agregação</u>		
	2 h <sup>a</sup>	18 h	
		-mAb	+mAb
1	4+	4+	1+ <sup>b</sup>
2	3+	4+	1+ <sup>c</sup>
3	5+	5+	1+ <sup>d</sup>

A agregação na análise qualitativa em placa de microtitulação foi avaliada visualmente. Com anti-LFA-1 presente durante o período de análise, a agregação foi menor que 1+.

a. Grau de agregação imediatamente antes da adição de anticorpo monoclonal ao fim de 2 horas.

b. TSI/18 + TSI/22.

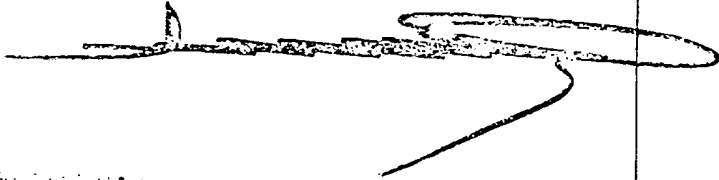
c. TSI/18.

d. TSI/22.

#### EXEMPLO 7

Necessidade de Iões Divalentes para Agregação Dependente de LFA-1

As adesões dependentes de LFA-1 entre células T citotóxicas e células visadas requerem a presença de magnésio (Martz, E. J. Cell. Biol. 84: 584-598 (1980)). A agregação de células JY induzida por PMA foi experimentada para



verificação de dependência de catiões divalente. As células JY não conseguiram agregar-se (usando a análise do Exemplo 2) em meio isento de íons de cálcio ou magnésio. A adição de magnésio divalente promoveu a agregação a concentrações tão baixas como 0,3 mM. A adição de íons de cálcio, por si só, teve pouco efeito. Verificou-se, no entanto, que os íons de cálcio aumentavam a capacidade de os íons de magnésio promoverem a agregação induzida por PMA. Quando se adicionaram íons de cálcio a 1,25 mM ao meio, verificou-se que concentrações de íons de magnésio tão baixas como 0,02 milimolares, promoviam a agregação. Estes dados mostram que a agregação de células dependente de LFA-1 necessita de íons de magnésio e que íons de cálcio, embora insuficientes por si só, podem ter um efeito sinérgico com os íons de magnésio, de modo a permitir a agregação.

#### EXEMPLO 8

O Isolamento de Células de Hibridoma Capazes de Expressar Anticorpos Monoclonais Anti-ICAM-1

Isolaram-se anticorpos monoclonais capazes de se ligar ao ICAM-1 de acordo com o método de Rothlein, R. et al., J. Immunol. 137: 1270-1274 (1986), cuja referência se considera aqui incorporada por referência. Deste modo, imunizaram-se intraperitonealmente 3 ratos BALB/C, com células mononucleares de sangue periférico transformadas por EBV de um indivíduo deficiente em LFA-1 (Springer, T.A. et al., J. Exper. Med. 160: 1901 (1984)). Foram usadas aproximadamente  $10^7$  células em 1 ml de meio RPMI 1640 para cada imunização. As imunizações foram administradas 45, 29 e 4 dias antes das células de baço terem sido removidas dos ratos, a fim de produzirem as linhas de células de hibridomas desejadas. No terceiro dia, antes da remoção das células de baço, foi dado aos ratos um adicional de  $10^7$  células em 0,15 ml de meio (por via intravenosa).

Fundiram-se células de baço isoladas a partir dos animais acima descritos com células de mieloma P3X73Ag8.653 numa proporção de 4:1, de acordo com o protocolo de Galfre, G. et al., Nature 266: 550 (1977). Introduziram-se ali-

quotas das células de hibridoma resultantes numa placa de microtitulação de 96 alvéolos. Os sobrenadantes do hibridoma foram selecionados com respeito à inibição de agregação e um hibridoma inibidor (de mais de 600 alvéolos testados) foi clonado e subclonado por diluição limitante. Este subclone foi designado RR1/1.1.1. (seguidamente designado "RR1/1").

Verificou-se que o anticorpo monoclonal RR1/1 inibia de modo regular a agregação estimulada por PMA da linha de células JY que expressa LFA-1. O anticorpo monoclonal RR1/1 inibia a agregação no mesmo grau ou ligeiramente menos que alguns anticorpos monoclonais das sub-unidades alfa ou beta de LFA-1. Pelo contrário, o anticorpo monoclonal de comparação contra HLA, que se expressa abundantemente em células JY, não inibiu a agregação. O antigene ligado pelo anticorpo monoclonal RR1/1 é definido como molécula-1 de adesão intercelular (intercellular adhesion molecule-1-ICAM-1).

#### EXEMPLO 9

Uso de Anticorpos Monoclonais Anti-ICAM-1 para Caracterizar a Molécula de ICAM-1

A fim de determinar a natureza de ICAM-1 e, particularmente, para determinar se a ICAM-1 era diferente de LFA-1, foram imunoprecipitadas proteínas celulares, usando o anticorpo monoclonal RR1/1. A imunoprecipitação foi realizada de acordo com o método de Rothlein, R. et al. (J. Immunol. 137: 1270-1274 (1986)). Lisaram-se células JY a  $5 \times 10^7$  células/ml em Triton X-100 a 1%, NaCl 0,14 m, Tris 10 mM a pH 8,0, com fluoreto de fenilmetilsulfonilo 1 mM, recentemente adicionado e 0,2 unidades por ml de aprotinina inibidora de tripsina (mistura de lise) durante 20 minutos a 49 C. Centrifugaram-se os lisados a 10 000 x g durante 10 minutos e realizou-se um tratamento prévio para tornar a solução límpida com 50 µl de uma suspensão a 50% de CNBr activado e Cl-4B de Sefarose temperada com glicina durante 1 hora a 49 C. Imunoprecipitou-se um mililitro de lisado com 20 µl de uma suspensão a 50% do anticorpo monoclonal RR1/1 ligado de um dia para o outro a Sefarose Cl-4B (1 mg/ml), a 49 C

(Springer, T.A. et al., J. Exper. Med. 160: 1901 (1984)). O anticorpo monoclonal ligado a Sepharose foi preparado usando activação por CNBr de Sepharose CL-4B em tampão de carbonato, de acordo com o método de March, S. et al. (Anal. Biochem. 60: 149 (1974)). Submeteram-se imunoprecipitados lavados a SDS-PAGE e coloração por prata, de acordo com o processo de Morrissey, J.H. Anal. Biochem. 117: 307 (1981).

Após diluição das proteínas com tampão de amostra de SDS (Ho, M.K. et al., J. Biol. Chem. 258: 636 (1983)) a 100°C, as amostras foram divididas ao meio e submetidas a electroforese (SDS-8% PAGE) sob condições redutoras (Figura 5A) ou não redutoras (Figura 5B). As bandas com pesos moleculares de 50 kd e 25 kd correspondiam às cadeias pesada e leve de imunoglobulinas da Sepharose com anticorpo monoclonal (Figura 5A, pista 3). Foram também observadas quantidades variáveis de outras bandas, na gama de pesos de 25 a 50 kd, mas não foram vistos em precipitados de células leucémicas reticuloendoteliais, que abrangiam apenas uma banda de peso molecular de 90 kd. Verificou-se que a sub-unidade alfa de 177 kd e a sub-unidade beta de 95 kd de LFA-1 migravam de modo diferente da ICAM-1 sob condições redutoras (Figura 5A, pista 2) e não redutoras (Figura 5B, pista 2).

A fim de determinar o efeito de anticorpo monoclonal RR1/1 na agregação de linfoblastos PHA, usou-se a análise de agregação quantitativa descrita no Exemplo 2. Deste modo, estimularam-se células blásticas de células T durante 4 dias, com PHA, lavaram-se cuidadosamente e em seguida cultivaram-se durante 6 dias na presença de meio condicionado por IL-2. Verificou-se que a PHA era interiorizada durante esta cultura de 6 dias e não contribuía para a análise de agregação. Em três análises diferentes, com diferentes preparações de blastos de células T, os anticorpos monoclonais ICAM-1 inibiram regularmente a agregação (Quadro 2).

QUADRO 2

Inibição pelo Anticorpo Monoclonal RR1/1 de Agregação de Linfoblastos de PHA Estimulados por PMA

Exp.	PMA	ACM	% de agregação	% de inibição <sup>b</sup>
1 <sup>c</sup>	-	Control	9	-
	+	Control	51	0
	+	HLA-A,B	58	-14 <sup>d</sup>
	+	LFA-1 alpha	31	39
	+	ICAM-1	31	39
2 <sup>e</sup>	-	Control	10	-
	+	Control	78	0
	+	LFA-1 beta	17	78
	+	ICAM-1	50	36
3 <sup>f</sup>	-	---	7	
	+	Control	70	
	+	HLA-A,B	80	-14
	+	LFA-3	83	-19
	+	LFA-1 alpha	2	97
	+	LFA-1 beta	3	96
	+	ICAM-1	34	51

a. A agregação de linfoblastos induzidos por PHA, estimulada com 50 ng/ml de PMA, foi avaliada indirectamente por contagem microscópica do número de células não agregadas, como se descreve no Exemplo 2.

b. Inibição percentual relativa a células tratadas com PMA e anticorpo monoclonal X63.

c. A agregação foi medida 1 hora após a adição simultânea de anticorpo monoclonal e de PMA. As células foram agitadas a 175 rpm.

d. Um número negativo indica realce percentual de agregação.

e. A agregação foi medida 1 hora após a adição simultânea de anticorpo monoclonal e de PMA. As células foram separadas por

centrifugação a 200 x G durante 1 minuto, incubadas a 37° C por 15 minutos, ressuspensas cuidadosamente e agitadas durante 45 minutos a 100 rpm.

f. Trataram-se previamente as células com PMA durante 4 horas a 37° C. Após a adição de anticorpo monoclonal, os tubos foram incubados a 37° C estacionariamente por 20 minutos e agitados a 75 rpm durante 100 minutos.

Os anticorpos monoclonais de LFA-1 eram, conseqüentemente, mais inibidores do que os anticorpos monoclonais de ICAM-1, enquanto que os anticorpos monoclonais de HLA-A, B e LFA-3 não tinham qualquer efeito. Estes resultados indicam que, dos anticorpos monoclonais testados, apenas os capazes de se ligar a LFA-1 ou a ICAM-1 eram capazes de inibir adesão celular.

#### EXEMPLO 10

Preparação de Anticorpo Monoclonal de ICAM-1

##### Imunização

Um rato BALB/C foi imunizado por via intraperitoneal (i.p.) com 0,5 ml de  $2 \times 10^7$  de células JY em meio de RPMI durante 103 dias e 24 dias antes da fusão. No quarto e terceiro dias antes da fusão, imunizaram-se ratos i.p. com  $10^7$  de células U937 diferenciadas por PMA em 0,5 ml de meio de RPMI.

##### Diferenciação de células U937

As células U937 (ATCC CRL-1593) foram diferenciadas por incubação a  $5 \times 10^5$ /ml em RPMI com 10% de soro fetal de bovino, 1% de glutamicina e 50 µg/ml de gentamicina (meio completo) contendo 2 ng/ml de 12-miristato-acetato de forbol (PMA) num recipiente estéril de polipropileno. No terceiro dia desta incubação, metade do volume de meio foi removido e substituído com meio completo fresco contendo PMA. No quarto dia as células foram separadas, lavadas e preparadas para imunização.

## Fusão

Fundiram-se células de baço de ratos imunizados com células de mieloma P3 x 63 Ag8-653 numa proporção de 4:1 de acordo com Galfre et al. (Nature 266:550 (1977)). Após a fusão, inocularam-se as células numa placa de microtitulação de 96 alvéolos de fundo raso a  $10^5$  células de baço/alvéolos.

## Seleção de células positivas anti-ICAM-1

Após uma semana, submeteram-se 50  $\mu$ l do sobrenadante à análise de agregação qualitativa do Exemplo 2, usando JY e SKW-3 como linhas de células agregantes. Selecionaram-se as células dos sobrenadantes que inibiam a agregação de células JY mas não SKW-3 e clonaram-se estas células duas vezes utilizando diluição limitante.

Esta experiência teve como resultado a identificação e a clonagem de três linhas separadas de hibridoma, que produziam anticorpos monoclonais anti-ICAM-1. Os anticorpos produzidos por estas linhas de hibridoma eram IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub> e IgM, respectivamente. A linha de células de hibridoma que produzia o anticorpo anti-ICAM-1 IgG<sub>2a</sub>, foi dada a designação de R6'5'D6'E9'B2. O anticorpo produzido pela linha de células de hibridoma preferida foi designado por R6'5'D6'E9'B2 (aqui referido como "R6-5-D6"). A linha de células de hibridoma R6'5'D6'E9'B2 foi depositada na American Type Culture Collection em 30 de Outubro de 1987, sendo-lhe atribuída a designação de ATCC HB 9580.

## EXEMPLO 11

### Expressão e Regulação de ICAM-1

A fim de se calcular a expressão ICAM-1, desenvolveu-se uma análise radioimunológica. Nesta análise, foi iodado RR1/1 purificado, usando iodogénio a uma actividade específica de 10 uCi/ $\mu$ g. Cultivaram-se células endoteliais em placas de 96 alvéolos e trataram-se como se descreve para cada experiência. As placas foram arrefecidas a 4°C, colocando-as num compartimento frio durante 0,5 a 1 hora e não imediatamente

em gelo. As monocamadas foram lavadas 3 vezes com meio completo frio e depois incubadas 30 minutos a 4°C com  $^{125}\text{I}$  RR1/1. As monocamadas foram então lavadas 3 vezes com meio completo. O  $^{125}\text{I}$  ligado foi liberto, usando NaOH 0,1 N, e medido. A actividade específica de  $^{125}\text{I}$  RR1/1 foi ajustada, usando RR1/1 não marcado para obter um sinal linear acima do nível de densidades de antigene encontrado neste estudo. Foi determinada a ligação não específica na presença de excessos de milhares de vezes de RR1/1 não marcados e esta ligação não específica foi subtraída da ligação total para se obter a ligação específica.

A expressão de ICAM-1 medida usando a análise radioimunológica acima descrita, é aumentada nas células endoteliais da veia umbilical humana (CEVUH) e nas células endoteliais da veia safena humana (CEVSH), por IL-1, TNF, LPS e IFN gama (Quadro 3). As células endoteliais da veia safena foram usadas neste estudo para confirmar os resultados das células endoteliais da veia umbilical em células endoteliais da veia cava inferior em cultura derivada de tecido adulto. A expressão básica de ICAM-1 é 2 vezes mais alta nas células endoteliais da veia safena do que nas células endoteliais da veia umbilical. A exposição de células endoteliais da veia umbilical a IL-1 alfa recombinante, IL-1 beta e TNF gama, aumenta a expressão de ICAM-1 10 a 20 vezes. IL-1 alfa, TNF e LPS foram os indutores mais potentes e IL-1 foi menos potente numa base de peso e também a concentrações saturantes para a resposta (Quadro 3). IL-1 beta a 100 ng/ml aumentou a expressão de ICAM-1 9 vezes mais na CEVUH e 7,3 vezes mais na CEVSH, com metade do aumento máximo ocorrendo a 15 ng/ml. O rTNF a 50 ng/ml, aumentou a expressão de ICAM-1 16 vezes mais na CEVUH e 11 vezes mais na CEVSH com metade dos efeitos máximos a 0,5 ng/ml. O interferão gama produziu um aumento significativo na expressão de ICAM-1, de 5,2 vezes mais no CEVUH ou 3,5 vezes mais no CEVSH, a 10 000 U/ml. O efeito de LPS a 10 ug/ml era semelhante em grandeza ao do rTNF. Combinações paralelas destes mediadores tiveram como resultado efeitos aditivos ou levemente menos do que aditivos na expressão de ICAM-1 (Quadro 3). A titulação cruzada de rTNF com rIL-1 beta ou rINF gama não mostrou sinergismo entre estes, a concentrações sub-óptimas ou

Óptimas.

Uma vez que o LPS aumentou a expressão de ICAM-1 nas células endoteliais, a níveis algumas vezes em contradição em meios de cultura, foi encarada a possibilidade de que a expressão de ICAM-1 basal possivelmente seria devida ao LPS. Quando foram analisadas várias quantidades de soro, verificou-se que o soro com baixa concentração de endotoxina dava uma expressão basal de ICAM-1 25% mais baixa. Todos os resultados aqui relatados referem-se a células endoteliais cultivadas em soro de baixa endotoxina. No entanto, a inclusão do antibiótico polimixina B que neutraliza o LPS a 10 µg/ml diminui a expressão de ICAM-1 em mais 25% (Quadro 3). O aumento na expressão de ICAM-1 no tratamento com IL-1 ou TNF não foi efectuado pela presença de 10 µg/ml de polimixina B, o que é compatível com os baixos níveis de endotoxina nestas preparações (Quadro 3).

### QUADRO 3

#### Anticorpos Monoclonais Anti-ICAM-1

Condição (16 h)	<sup>125</sup> I Ligado Especificamente (CPM)			
	CEVUH		CEVSH	
comparação	603 ± 11	-	1132 ± 31	-
100 ng/ml rIL-1 beta	5680 ± 633	9x	8320 ± 766	7,3x
50 ng/ml rIL-1 alfa	9910 ± 538	16x	-	-
50 ng/ml rTNF alfa	9650 ± 1500	16x	12690 ± 657	11,2x
10 µg/ml LPS	9530 ± 512	16x	10459 ± 388	9,2x
10 ng/ml rIFN gama	3120 ± 308	5.2x	4002 ± 664	3,5x
rIL-1 beta + rTNF	1469 ± 1410	24x	16269 ± 660	14x
rIL-1 beta + LPS	13986 ± 761	23x	10870 ± 805	10x
rIL-1 beta + rIFN gama	7849 ± 601	13x	8401 ± 390	7,4x
rTNF + LPS	15364 ± 1241	24x	16141 ± 1272	14x
rTNF + rIFN gama	13480 ± 1189	22x	13238 ± 761	12x
LPS + IFN gama	10206 ± 320	17x	10987 ± 668	10x
polimixina B (10 µg/ml)	480 ± 23	-	-	-
polimixina B + rIL-1	5390 ± 97	11x	-	-

QUADRO 3 (cont.)

Anticorpos Monoclonais Anti-ICAM-1

Condição (16 h)	<sup>125</sup> I Ligado Especificamente (CPM)		
	CEVUH	CEVSH	
polimixina B + rTNF	9785 ± 389	20x	-
1 ug/ml LPS	7598 ± 432	13x	-
polimixina B + LPS	510 ± 44	1.1x	

A regulação da expressão de ICAM-1 para níveis superiores em CEVUH E CEVSH- CEVUH ou CEVSH foi ensaiada por inoculação de placas de 96 alvéolos a 1:3 de uma camada confluyente e permitiu-se que crescessem de modo a reunirse. As células foram então tratadas com os materiais ou meios indicados durante 16 horas e realizou-se a análise de RIA como nos métodos. Todas as situações foram feitas em quaduplicado.

EXEMPLO 12

Cinética de Indução de ICAM-1 por Interleuquina 1 e por Interferão Gama

A cinética dos efeitos de Interleuquina 1 e do Interferão gama na expressão de ICAM-1 nos fibroblastos dérmicos foi determinada usando a análise de ligação IgG anti-rato de cabra com <sup>125</sup>I, de Dustin, M.L. et al. (J. Immunol. 137: 245-254 (1986); cuja referência se considera aqui incorporada por referência). Para realizar esta análise de ligação, cultivaram-se fibroblastos dérmicos humanos em placas de microtitulação de 96 alvéolos, a uma densidade de 2 a 8 x 10<sup>4</sup> células/alvéolo (0,32 cm<sup>2</sup>). As células foram lavadas duas vezes com meio completo RPMI 1640, como se descreve no Exemplo 1. As células foram lavadas adicionalmente uma vez com solução de sal equilibrada de Hanks (SSEM) HEPES 10 mM, NaN<sub>3</sub> a 0,05% e soro bovino fetal inativado pelo calor a 10%. A lavagem com este tampão de ligação foi feita a 4º C. A cada alvéolo, adicionaram-se 50 ul do tampão de ligação acima descrito e 50 ul do sobrenadante de hibridoma apropriado com X63 e W6/32 como amostras de comparação negativa e positiva, respectivamente. Depois da incubação durante 30 minu

~~\_\_\_\_\_~~

tos a 4º C, com agitação suave, os alvéolos foram lavados duas vezes com tampão de ligação, e adicionou-se o segundo anticorpo de IgG anti-rato de cabra <sup>125</sup>I a 50 nCi em 100 µl. O anticorpo anti-rato de cabra <sup>125</sup>I foi preparado usando iodogênio (Pierce), de acordo com o método de Fraker, P.J. et al. (Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 849 (1978)). Depois de 30 minutos a 4º C, os alvéolos foram lavados duas vezes com 200 µl de tampão de ligação e a camada celular foi dissolvida, adicionando 100 µl de NaOH 0,1 N. Esta solução e uma lavagem de 100 µl foram analisados num contador gama 5 500 de Beckman. A radioatividade ligada específica em impulsos por minuto. foi calculada como  $\frac{[\text{cpm com anticorpo monoclonal}]}{[\text{cpm com X63}]}$ . Todas as fases, incluindo a indução com reagentes específicos, foram levadas a cabo em quadriplificado.

O efeito da interleuquina-1 com um período de semi-vida para indução de Icam-1 de 2 horas foi mais rápido do que o do interferão gama com um período de semi-vida de 3,75 horas (Figura 6). O tempo decorrido para voltar aos níveis de repouso de ICAM-1 pareciam depender do ciclo da célula ou da taxa do crescimento da célula. Nas células em equilíbrio, os efeitos da interleuquina-1 e do interferão gama são estáveis por 2 ou 3 dias, enquanto que em culturas de fase de crescimento exponencial, a expressão de ICAM-1 está perto da linha de base 2 dias depois da remoção destes agentes indutores.

As curvas de resposta em relação à dose para indução de ICAM-1 por interleuquina-1 humana e de rato recombinantes, e para interferão gama humano recombinante, são apresentadas na Figura 7. Descobriu-se que o interferão gama e a interleuquina-1 tinham dependências de concentração similares com efeitos quase idênticos, a 1 ng/ml. As interleuquinas 1 recombinantes de rato e humana também têm curvas similares, mas são muito menos eficazes do que as preparações de interleuquina 1 humana para a indução da expressão de ICAM-1.

A ciclo-hexamida, um inibidor de síntese de proteínas, e a actinomicina D, um inibidor de síntese de ARNm, eliminam os efeitos tanto da interleuquina 1 como do interferão gama na expressão de ICAM-1 em fibroblastos (Quadro 4).

Além disso, a tunicamicina, um inibidor de glicosilação ligada a N, só inibia o efeito da interleuquina 1 em 43%. Estes resultados indicam que a síntese de proteína e de ARNm, mas não a glicosilação ligada a N, são necessários para o aumento estimulado pela interleuquina 1 e pelo interferão gama da expressão de ICAM-1.

#### QUADRO 4

Efeitos de Ciclo-hexamida, Actinomicina D e Tunicamicina na Indução de ICAM-1 por IL 1 e INF gama nos Fibroblastos Dêrmicos Humanos<sup>a</sup>

Tratamento	<sup>125</sup> I IgG anti-rato de cabra, ligado especificamente (cpm)	
	anti-ICAM-1	anti-HLA-A.B.C
Comparação (4 hr)	1524 ± 140	11928 ± 600
+ ciclohexamida	1513 ± 210	10678 ± 471
+ actinomicina D	1590 ± 46	12276 ± 608
+ tunicamicina	1461 ± 176	12340 ± 940
IL 1 (10 U/ml) (4 hr)	4264 ± 249	12155 ± 510
+ cicloheximida	1619 ± 381	12676 ± 446
+ actinomicina D	1613 ± 88	12294 ± 123
+ tunicamicina	3084 ± 113	13434 ± 661
IFN-γ (10 U/ml) (18 hr)	4659 ± 109	23675 ± 500
+ cicloheximida	1461 ± 59	10675 ± 800
+ actinomicina D	1326 ± 186	12089 ± 550

a. Cultivaram-se fibroblastos humanos até uma densidade de  $8 \times 10^4$  células/alvéolos de  $0,32 \text{ cm}^2$ . Os tratamentos foram levados a cabo num volume final de  $50 \mu\text{l}$  contendo os reagentes indicados. Foram adicionadas ciclo-hexamida, actinomicina D e tunicamicina, a  $20 \mu\text{g/ml}$ ,  $10 \mu\text{M}$  e  $2 \mu\text{g/ml}$ , respectivamente, ao mesmo tempo que as citoquinas. Todos os valores são médias de alvéolos em quadruplicado ± DP.


### EXEMPLO 13

#### A Distribuição de Tecido de ICAM-1

Foram efectuados estudos histoquímicos em tecido congelado de órgãos humanos a fim de determinar a distribuição de ICAM-1 no timo, em gânglios linfáticos, intestino, pele, rim e fígado. Para realizar esta análise, fixaram-se em acetona durante 10 minutos secções de tecidos congelados (4 µm de espessura) de tecidos humanos normais e coraram-se com anticorpo monoclonal RR1/1 por uma técnica de imunoperoxidase que empregou o método complexo de avidina-biotina (Vector Laboratories, Burlingame, CA) descrito por Cerf-Bensussan, N. et al. (J. Immunol. 130: 2615 (1983)). Após a incubação com o anticorpo, as secções foram incubadas consecutivamente com IgG anti-rato de cavalo biotinilada e com complexos de peroxidase avidina-biotinilada. As secções foram, por fim, mergulhadas numa solução contendo 3-amino-9-etil-carbazolo (Aldrich Chemical Co., Inc., Milwaukee, WI) para desenvolver uma reacção colorida. Em seguida as secções foram fixadas em formaldeído a 4% 5 minutos e foram contrastadas com hematoxilina. Para amostras de comparação tomaram-se secções incubadas com anticorpos monoclonais não relacionados, em vez do anticorpo RR1/1.

Verificou-se que a ICAM-1 tinha uma distribuição muito semelhante à dos antígenos da classe II do complexo de histocompatibilidade maioritário (MHC). A maioria dos vasos sanguíneos (tanto pequenos como grandes) em todos os tecidos mostravam coloração de células endoteliais com anticorpo ICAM-1. A coloração endotelial vascular era mais intensa nas áreas interfoliculares (para-corticais), em gânglios linfáticos, amígdalas e manchas de Peyer, em comparação com os vasos do rim, fígado e pele normal. No fígado, a coloração era bastante restrita às células de cobertura sinusoidais; os hepatócitos e as coberturas de células endoteliais, principalmente as veias e artérias portais, não foram coradas.

Na medula do timo, foi observada uma coloração difusa de células grandes e um padrão dentrítico de coloração. No córtice, o tipo de coloração era focal e predominante.



temente dentrítico. Os timócitos não foram corados. No tecido linfóide periférico, as células centrais germinais dos folículos linfóides secundários foram intensamente coloridas. Em alguns folículos linfóides, o padrão de coloração era principalmente dentrítico, sem coloração reconhecível de linfócitos. Foi também observada uma coloração tênue de células na zona exterior. Além disso, as células dentríticas com extensões citoplasmáticas (células reticulares interdigitais) e um pequeno número de linfócitos nas áreas interfoliculares ou paracorticais foram corados com o anticorpo de ligação de ICAM-1.

Foram coradas células semelhantes a macrófagos nos gânglios linfáticos e na mucosa do intestino delgado. Células semelhantes a fibroblastos (células fusiformes) e células dentríticas espalhadas no estroma da maioria dos órgãos estudados, foram coradas com o anticorpo de ligação ICAM-1. Não se descortinou qualquer coloração nas células indeterminantes de Langerhans na epiderme. Não foi observada qualquer coloração no tecido muscular liso.

A coloração das células epiteliais foi essencialmente vista na mucosa das amígdalas. Apesar de os hepatócitos, o epitélio das vias biliares, as células epiteliais intestinais e as células epiteliais tubulares no rim não se coram na maioria das circunstâncias, secções de tecido de rim normal obtido de um espécimen de uma nefrectomia com carcinoma de células renais apresentou coloração de muitas células tubulares próximas para ICAM-1. Estas células tubulares também se coraram com um anticorpo de ligação anti-HLA-DR.

Resumindo, o ICAM-1 é expressado em células não hematopoiéticas, como células endoteliais vasculares, e em células hematopoiéticas, como macrófagos de tecidos e blastos de linfócitos C estimulados por mitogene. Verificou-se que a ICAM-1 era expressa em pequenas quantidades nos linfócitos de sangue periférico.

#### EXEMPLO 14

•  
•  
• Purificação de Anticorpo Monoclonal de ICAM-1 Cromatografia de

Afinidade

Esquema de purificação geral

A ICAM-1 foi purificada a partir de células ou de tecido humano, usando cromatografia de afinidade de anticorpo monoclonal. O anticorpo monoclonal RR1/1, reactivo com ICAM-1, foi primeiro purificado e acoplado a uma matriz de coluna inerte. Este anticorpo é descrito por Rothlein, R. et al. (J. Immunol. 137: 1270-1274 (1986)), e Dustin, M.L. et al. (J. Immunol. 137: 245 (1986)). A ICAM-1 foi dissolvida a partir de membranas de células por lise das células num detergente não iónico, o Triton X-100, a um pH quase neutro. O lisado celular contendo a ICAM-1 dissolvida foi então passado através de pré-colunas projectadas para remover materiais que se ligam de modo não específico ao material da matriz da coluna e em seguida através da matriz da coluna de anticorpo monoclonal, permitindo que a ICAM-1 se ligasse ao anticorpo. A coluna do anticorpo foi então lavada com uma série de tampões detergentes de lavagem aumentando o pH para pH 11,0. Durante estas lavagens, a ICAM-1 ficou ligada à matriz do anticorpo, enquanto que os contaminantes não ligados e debilmente ligados foram eliminados. A ICAM-1 ligada foi depois eluída especificamente da coluna, por aplicação de uma mistura de detergente de pH 12,5.

Purificação do anticorpo monoclonal RR1/1 e acoplagem covalente a Sepharose CL-4B.

o anticorpo monoclonal anti-ICAM-1 RR1/1 foi purificado a partir do fluído ascítico de ratos portadores de hibridomas, ou de sobrenadantes de cultura de hibridomas, por técnicas normais de precipitação de sulfato de amónio e cromatografia de afinidade da proteína A (Ey, et al., Immunochem 15: 429 (1978)). A IgG purificada ou IgG de ratazana (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) foi acoplada covalentemente à Sepharose CL-4B (Pharmacia, Upsala, Suécia) usando uma modificação do método de March et al. (Anal. Biochem. 60: 149 (1974)). Resumidamente, a Sepharose CL-4B foi lavada em água destilada, activada em 40 mg/ml de CNBr em  $K_2HPO_4$  5 M (pH aproximadamente 12), duran


~~\_\_\_\_\_~~

te 5 minutos e depois lavada a fundo com HCl 0,1 mM a 4º C. A Sepharose filtrada e activada foi ressuspensa com um volume igual de anticorpo purificado (2-10 mg/ml em NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, NaCl 0,1 M). A suspensão foi incubada por 18 horas a 4º C, com rotação recíproca lenta. O sobrenadante foi então analisado para determinar a presença de anticorpos desligados medindo a absorvância a 280 nm e os restantes locais reactivos na Sepharose activada, foram saturados, juntando glicina a 0,05 M. O êxito do acoplamento foi normalmente superior a 90%.

Solubilização detergente de membranas preparadas a partir de baço humano.

Todos os processos foram efectuados a 4º C. Baço humano congelado (fragmentos de 200 g) de pacientes com leucemia de células reticuloendoteliais foi mergulhado em gelo, em 200 ml de solução tris-salina (tris 50 mM, NaCl 0,14 M, pH 7,4 a 4º C) contendo fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 0,2 U/ml de aprotinina, e iodocetalmida 5 mM. O tecido foi cortado em pedaços pequenos e foi homogeneizado a 4º C com um homogeneizador de potência Tekmar. O volume foi então ajustado a 300 ml com solução tris-salina e foram adicionados 100 ml de Tween 40 a 10% (Monopalmitato de polioxietileno sorbitol) em solução tris-salina, para alcançar uma concentração de 2,5% de Tween 40.

Para preparar membranas, o homogeneizado foi extraído usando três batidas de um homogeneizador de Dounce ou, de preferência, um homogeneizador de Potter Elvehjem de Teflon, e em seguida centrifugado a 1000 x g durante 15 minutos. O sobrenadante foi retido e a massa foi re-extraída em 200 ml de Tween 40 a 2,5% em solução tris-salina. Depois da centrifugação a 1000 x g durante 15 minutos, os sobrenadantes de ambas as extracções foram combinados e centrifugados a 150 000 x g, durante 1 hora, para agregar as membranas. As membranas foram lavadas por ressuspensão em 200 ml de solução tris-salina e foram centrifugadas a 150 000 x g durante 1 hora. O sólido de membranas foi ressuspensa em 200 ml de solução de tris-salina e homogeneizada com um homogeneizador motorizado e um almofariz de Teflon, até a suspensão ter uma turvação uniforme. O volume foi en-




tão preenchido até 900 ml com solução de tris-salina e adicionou-se N-lauroil-sarcosina, até uma concentração final de 1%. Depois de agitar a 4º C durante 30 minutos, o material insolúvel no lisado por detergente foi retirado por centrifugação a 150 000 x g, durante 1 hora. Adicionou-se então Triton X-100 ao sobrenadante até uma concentração final de 2% e o lisado foi agitado a 4º C durante 1 hora.

#### Dissolução por detergente de células linfoblastóides B JY

A linha de células linfoblastóides B JY transformadas por EBV cresceu em RPMI-1640, contendo 10% de soro fetal de vitela (FCS) e HEPES 10 mM, até uma densidade aproximada de  $0,8 \times 10^6$  células/ml. A fim de aumentar a expressão superficial das células de ICAM-1, foi adicionado 12-miristato-13-acetato de forbol (PMA) até 25 ng/ml durante 8 a 12 horas antes da colheita das células. Foi também adicionado vanadato de sódio (50 µM) às culturas durante este período. As células foram reunidas por centrifugação a 500 x g durante 10 minutos e lavadas duas vezes na solução salina equilibrada de Hank (HBSS) por ressuspensão e centrifugação. As células (aproximadamente 5 g por 5 litros de cultura) foram lisadas em 50 ml de tampão de lise (NaCl 0,14 M, Tris 60 mM a pH 8,0, Triton X-100 a 1%, 0,2 U/ml de aprotinina, PMSF 1 mM, 50 µM de vanadato de sódio) por agitação a 4º C durante 30 minutos. Os núcleos não lisados e os resíduos insolúveis foram removidos por centrifugação a 10 000 x g por 15 minutos, seguida de centrifugação do sobrenadante a 150 000 x g durante 1 hora e filtração do sobrenadante através de papel de filtro Whatman de 3 mm.

#### Cromatografia de afinidade de ICAM-1 para estudos de estrutura.

Para purificação de ICAM-1 em larga escala para ser usado em estudos de estrutura usou-se uma coluna de 10 ml de RR1/1 de Sepharose CL-4B (acoplada a 2,5 mg de anti-corpo/ml de gel) e duas pré-colunas de 10 ml de Sepharose CL-4B, temperadas com glicina e IgG de ratazana acoplada a Sepharose CL-4B (2 mg/ml). As colunas foram ligadas em séries e lavadas previamente com 10 volumes de coluna de tampão de lise, 10 volu-



mes de coluna de tampão de pH 12,5 (trietilamina 50 mM, Triton X-100 a 0,1%, pH 12,5 a 49 C), seguido por equilíbrio com 10 volumes de coluna de tampão de lise. Um litro de lisado por detergente de baço humano foi carregado com um caudal de 0,5 a 1,0 ml por minuto. As duas pré-colunas foram usadas para remover material não especificamente ligado do lisado antes da passagem através da coluna de Sepharose RRI/1.

Depois de carregada, a coluna de Sepharose RRI/1 e o ICAM-1 ligado foi lavada sequencialmente a um caudal de 1 ml/minuto com um mínimo de 5 volumes de coluna de cada uma das seguintes soluções: 1) tampão de lise; 2) Tris 20 mM a pH 8,0/NaCl 0,14 M/Triton X-100 a 0,1%; 3) glicina 20 mM pH 10,0/Triton X-100 a 0,1%, e 4) trietilamina 50 mM a pH 11,0/Triton X-100 a 0,1%. Todas as misturas de lavagem continham PMSF 1 mM e 0,2 U/ml de aprotinina. Depois da lavagem, a ICAM-1 de ligação restante foi eluída com 5 volumes de coluna de tampão de eluição (trietilamina 50 mM Triton X-100 a 0,1% pH 12,5 a 49 C) a um caudal de 1 ml/3 minutos. A ICAM-1 eluída foi reunida em fracções de 1 ml e imediatamente neutralizada pela adição de 0,1 ml de Tris 1 M a pH 6,7. Identificaram-se as fracções contendo ICAM-1 por electroforese em SDS poliacrilamida de alíquotas de 10 µl (Springer et al., J. Exper. Med. 160: 1901 (1984)), seguido de uma coloração por prata (Morrissey, J.H., Anal. Biochem. 117: 307 (1981)). Nestas condições a maior parte da ICAM-1 foi eluída num volume de coluna, aproximadamente, com uma pureza superior a 90%, a julgar pelos electroferogramas corados com prata (uma pequena quantidade de IgG, lixiviada da matriz de afinidade, era o contaminante principal). As fracções contendo ICAM-1 foram combinadas e concentradas, aproximadamente 20 vezes mais, usando microconcentradores Centricón-30 (Amicon, Danvers, MA). A ICAM-1 purificada foi avaliada por análise de proteína Lowry de uma alíquota precipitada por etanol do volume reunido: produziram-se aproximadamente 50 µg de ICAM-1 pura a partir de 200 g de baço humano.

Aproximadamente 200 µg de ICAM-1 purificada, foram submetidos a um segundo estágio de purificação, por electroforese de gel de SDS-poliacrilamina. A banda represen

tando a ICAM-1 foi visualizada embebendo o gel em KCL 1 M. A região de gel que continha a ICAM-1 foi, então, cortada e electro-eluída, de acordo com o método de Hunkapiller et al., Meth. Enzymol. 91: 227-236 (1983). A proteína purificada tinha um grau de pureza superior a 98%, a julgar pela coloração de prata e por SDS-PAGE.

#### Purificação de afinidade de ICAM-1 para estudos funcionais

A ICAM-1 foi purificada para uso em estudos funcionais a partir de lisados por detergentes de células JY, tal como descrito acima, mas numa escala mais pequena (uma coluna de 1 ml de Sepharose RR1/1), e com as modificações seguintes. Todas as soluções continham 50  $\mu$ M de vanadato de sódio. Depois de lavar a coluna com tampão de pH 11,0, contendo 0,1% de Triton X-100, a coluna foi lavada outra vez com 5 volumes de colunas do mesmo tampão, contendo 1% de n-octil-beta-D-glucopiranosido (octilglucósido) em lugar de 0,1% de Triton X-100. O detergente de octilglucósido desloca o Triton X-100 ligado à ICAM-1 e, ao contrário do Triton X-100 pode ser removido subsequentemente por diálise. A ICAM-1 foi então dissolvida com tampão de pH 12,5, contendo 1% octilglucósido em vez de 0,1% de Triton X-100 e foi analisado e concentrado, como acima descrito.

#### EXEMPLO 15

##### Características da ICAM-1 Purificada

A ICAM-1 purificada a partir de baço humano, migra em gel de SDS-poliacrilamida sob a forma de uma banda larga de Mr de 72 000 a 91 000. A ICAM-1 purificada a partir de células JY também migra sob a forma de uma banda larga de Pm de 76 500 a 97 000. Estes Pm situam-se na gama mencionada para imunoprecipitados de ICAM-1 de diferentes fontes celulares: Pm = 90 000 para células JY, 114 000 na linha de células mielomonocíticas U937 e 97 000 em fibroblastos (Dustin et al., J. Immunol. 137: 245 (1986)). Esta gama ampla de Pm foi atribuída a um grau de glicosilação elevado, mas variável. O precursor não glico

silado tem um Mr de 55 000 (Dustin et al.). A proteína purificada quer a partir das células JY quer de baço humano retém a sua actividade antigénica como evidência pela sua capacidade de ligação à coluna de afinidade original e, por imunoprecipitação com RRI/1-Sepharose e electroforese de SDS-poliacrilamida.

Para produzir fragmentos de peptídeos de ICAM-1, foram reduzidos aproximadamente 200 µg com ditrititol 2 mM/2% de SDS, seguido de alquilação com ácido iodoacético 5 mM. A proteína foi precipitada com etanol e dissolvida em NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub> 0,1 M/CaCl 10,1 mM/0,1% de zwittergent 3-14 (Calbiochem), e digerida com 1% p/p de tripsina a 37º C durante 4 horas, seguido de uma digestão adicional com 1% de tripsina, durante 12 horas a 37º C. Os peptídeos trípticos foram purificados por HPLC de fase inversa, usando uma coluna C4 (Vydac) de 0,4 x 15 cm. Os peptídeos foram eluídos com um gradiente linear de 0% a 60% de acetonitrilo, em ácido trifluoroacético a 0,1%. Submeteram-se peptídeos seleccionados a análise de sequência num microsequenciador de fase gasosa (Applied Biosystems). A informação sobre as sequências obtida deste estudo é apresentada no Quadro 5.

#### QUADRO 5

Sequência de ácidos Aminados dos Peptídeos Trípticos da ICAM-1

Resíduo de ácido aminado	Peptídeo											
	50a	50b	46a	46b	X	45	K	AA	J	U	O	M1
1	[T/V]	A	(V/A)	E	V	S	L	E	A	L	V	L
2	F	S	Q	P	E	F	N	L	G	L	T	L/E
3	L	I	T	A	L	P	P	D	S	G	L	P/(G)
4	T	S	F		A	A	T	L	V	I		P
5	V	L	P		P	P	V	R	L	E		G/Y
6	Y	G	L		L	N	T	P	V	T		N/L
7	P	W	P		P	V	Y	Q	T	P		(N)
8	T	P	I		I	T/I	G	G	C	P/V		(Q)
9	S	F	G		(G)	L	-	L	S	K		(E)
10	E		E		(Q)	-	D	E	T			(D)
11	A		S		D/P	K	S	L	S			
12	G/S		V		V	P	F	F	C			
13	A		T		D	Q	S	E	D			
14	G		V		W	V/L	A	-	Q			
15						I	K	T	P			
16								S	K			
17								A				

QUADRO 5 (cont.)

Sequência de Ácidos Aminados dos Peptídeos Trípticos da ICAM-1

Resíduo de Ácido Aminado	Peptídeo											
	50a	50b	46a	46b	X	45	K	AA	J	U	O	Ml
18								P				
19								X				
20								Q				
21								L				

( ) = Sequência de confiança baixa.

[ ] = Sequência de confiança muito baixa.

/ = Indica ambiguidade na sequência; o ácido aminado mais provável é catalogado primeiro.

a = Peptídeo maior.

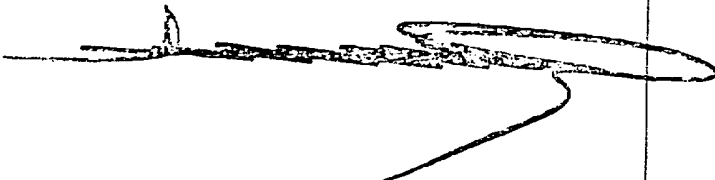
b = Peptídeo menor.

EXEMPLO 16

O gene para ICAM-1 pode ser clonado usando qualquer de vários procedimentos. Por exemplo a informação da sequência de ácidos aminados obtida por meio da sequenciação dos fragmentos de ICAM-1 provenientes do tratamento com tripsina (Quadro 5) pode ser usada para identificar uma sequência oligonucleotídica que corresponderia ao gene de ICAM-1. Em alternativa o gene de ICAM-1 pode ser clonado usando um anticorpo anti-ICAM-1 a fim de detectar clones que produzem ICAM-1.

Clonagem do gene para ICAM-1 por meio da utilização de sondas oligonucleotídicas

Por meio do uso do código genético (Watson, J.D., em: Molecular Biology of the Gene, 3ª Ed., W.A. Benjamin, Inc., Menlo Park, CA (1977)) é possível identificar um ou vários oligonucleotídeos diferentes, cada um dos quais tem a capacidade de codificar os peptídeos trípticos de ICAM-1. A probabilidade que um oligonucleotídeo particular constitua de facto a sequência real de codificação de ICAM-1 pode ser estimada por consideração das relações de emparelhamento anormal de bases e a



frequência com que um codão particular é realmente usado (para codificar para um ácido aminado particular) em células eucarióticas. Estas "regras de utilização de codões" são descritas por Lathe, R., et al., J. Molec. Biol. 183: 1 - 12 (1985). Usando as "regras de utilização de codões" de Lathe, identifica-se um único oligonucleótido ou um conjunto de oligonucleótidos contendo uma sequência de nucleótidos teoricamente "mais provável" (isto é, a sequência de nucleótidos com a redundância mais baixa) com capacidade para codificar as sequências peptídicas trípticas de ICAM1.

O oligonucleótido ou o conjunto de oligonucleótidos contendo a sequência teoricamente "mais provável" com capacidade de codificar os fragmentos de ICAM-1 é utilizado para identificar a sequência de um oligonucleótido ou de um conjunto de oligonucleótidos complementares com capacidade de hibridar com a sequência ou com o conjunto de sequências "mais prováveis". Um oligonucleótido contendo uma sequência complementar como estas pode ser utilizado como sonda para identificar e isolar o gene de ICAM-1 (Maniatis, T., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1982).

Tal como descrito anteriormente na secção C, é possível clonar o gene de ICAM-1 a partir de preparações de ADN eucariótico que se suponha conter este gene. A fim de identificar e clonar o gene que codifica para a proteína ICAM-1 submete-se a uma selecção um banco de ADN verificando a respectiva capacidade para hibridar com as sondas de oligonucleótidos acima descritas. Uma vez que é provável que apenas existam duas cópias do gene para ICAM-1 numa célula normal diplóide, e uma vez que é possível que o gene para ICAM-1 possa ter longas sequências não transcritas intercaladas (intrões) cuja clonagem não é pretendida, é preferível isolar as sequências que codificam para ICAM-1 a partir de um banco de ADNc preparado a partir de ARNm de uma célula produtora de ICAM-1 em vez de um banco de ADN genómico. As preparações de ADN ou de ADNc apropriadas são cindidas com enzimas ou fragmentos aleatoriamente e são em seguida ligadas em vectores recombinantes. A capacidade destes vecto-

~~SECRET~~

res recombinantes para hibridação com as sondas oligonucleotídicas acima descritas é então medida. Descrevem-se procedimentos de hibridação por exemplo em Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1982) ou em Haymes, B.T., et al., Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach, IRL Press, Oxford, Inglaterra (1985). Os vectores que se verificar serem capazes de hibridar nestas condições são então analisados a fim de determinar a extensão e a natureza das sequências de ICAM-1 que contêm. Com base unicamente em considerações estatísticas, é possível identificar inequivocamente um gene que codifica para a molécula de ICAM-1 (por selecção de hibridação) usando uma sonda oligonucleotídica de apenas 18 nucleótidos.

Deste modo, resumidamente, a identificação real das sequências peptídicas de ICAM-1 permite a identificação da sequência teórica "mais provável", ou de um conjunto de sequências nestas circunstâncias, capazes de codificar para o peptídeo. Por construção de um oligonucleótido complementar desta sequência teórica (ou por construção de um conjunto de oligonucleótidos complementares do conjunto dos oligonucleótidos "mais prováveis"), obtém-se uma molécula de ADN (ou um conjunto de moléculas de ADN) com a capacidade de funcionarem como sonda a fim de identificar e isolar o gene para ICAM-1.

Usando as sequências peptídicas de ICAM-1 do Quadro 5 determinou-se a sequência "mais provável" de um oligonucleótido capaz de codificar para os peptídeos AA e J (Quadros 6 e 7, respectivamente). Sintetizaram-se oligonucleótidos complementares destas sequências e purificaram-se para serem usados como sondas a fim de isolar sequências do gene de ICAM-1. Geraram-se bancos de ADNc de dimensões seleccionadas adequados a partir do poli(A)<sup>+</sup> ARN de células HL-60 induzidas por PMA e de células endoteliais da veia umbilical estimulada por PS. Preparou-se um banco de ADNc de dimensão seleccionada usando poli(A)<sup>+</sup> ARN de células HL-60 induzidas por PMA de acordo com o método de Gubler, U., et al., (Gene 25: 263-269 (1983)) e Corbi, A., Et al., (EMBO J. 6: 4023-4028 (1987)), cujas referências são incorporadas por referência na presente especificação.



QUADRO 6 (cont.)

Oligonucleótido Complementar da Sequência Nucleotídica mais provável capaz de codificar para o Peptídeo de ICAM-1 AA

Resíduo de Ácido Aminado de ICAM-1	Peptídeo AA de ICAM-1	Sequência mais provável que codifica para o peptídeo AA	Sequência Complementar
171	Glu	G A	C T
172	Leu	G C T	C G A
173	Phe	G T T	C A A
174	Glu	T G A G	A C T C
175	Asn	3' A A C	5' T T G
176	Thr	A C C	T G G
177	Ser	U C A 3'	A G 5'

QUADRO 7

Oligonucleótido Complementar da Sequência Nucleotídica mais provável capaz de codificar para o Peptídeo de ICAM-1 J

Resíduo de Ácido Aminado de ICAM-1	Peptídeo AA de ICAM-1	Sequência mais provável que Codifica para o peptídeo AA	Sequência Complementar
19	Val	5' G T G	3' C A C
20	Thr	A C C	T G G
21	Cys	T G C	A C G
22	Ser	T C C	A G G
23	Thr	A C C	T G G
24	Ser	T C C	A G G
25	Cys	T G T	A C A
26	Asp	G A C	C T G
27	Gln	C A G	G T C
28	Pro	G C C	C G G
29	Lys	C A A 3'	G T T 5'

A primeira cadeia de ADNc foi sintetizada usando 8 µg de poli(A)<sup>+</sup> ARN, transcriptase inversa de vírus da mieloblastose de aves e um iniciador oligo(dT). O híbrido ADN-ARN foi digerido com RNase H (BRL) e a segunda cadeia foi sintetizada usando polimerase I de ADN (New England Biolabs). O produto foi metilado com metilase de Eco RI (New England Biolabs),

ligada através de extremidades alinhadas a adaptadores Eco RI (New England Biolabs), digerida com Eco RI e selecionada por dimensão num gel de agarose de baixo ponto de fusão. O ADNc maior do que 500 pb foi ligado a  $\lambda$ gt10 previamente digerido com Eco RI e desfosforilado (Stratagene). O produto da ligação foi em seguida acondicionado (Stratagene gold).

Os bancos de células endoteliais da veia umbilical e HL-60 foram em seguida cultivadas em placa a 20 000 PFU/150 mm. O ADN recombinante foi transferido em duplicado para filtros de nitrocelulose, foi desnaturado em NaOH 0,5 M/NaCl 1,5 M, neutralizado em Tris 1 M a pH 7,5/NaCl 1,5 M e aquecido a 80°C durante 2 horas (Benton, W.D., et al., Science 196: 180-182 (1977)). Os filtros foram pré-hibridados e hibridados em SSC 5x contendo solução de Denhardt 5x, NaPO<sub>4</sub> 50 mM e 1 µg/ml de ADN de esperma de salmão. A pré-hibridação foi levada a efeito a 45°C durante 1 hora.

A hibridação foi levada a efeito usando oligonucleótidos de sentido oposto de 32 pb de (5'-TTGGG-CTGGTCACAGGAGGTGGAGCAGGTGAC) ou de 47 pb de (5'-GAGGTGTTCTCAAAC-AGCTCCAGGCCCTGGGGCCGCAGGTCCAGCTC) baseados, do modo acima discutido, nos peptídeos trípticos de ICAM-1 J e AA, respectivamente (Quadros 6 e 7) (Lathe, R., J. Molec. Biol., 183: 1-12 (1985)). Os oligonucleótidos foram marcados com  $\gamma$ -(<sup>32</sup>P)ATP usando quina-se de polinucleótidos T4 e sob condições recomendadas pelo fornecedor (New England Biolabs). Após hibridação dum dia para o outro, lavaram-se os filtros duas vezes com SSC 2x/SDS a 0,1% durante 30 minutos a 45°C. Isolaram-se destas placas os fagos que mostraram hibridação. Estes fagos foram purificados por sucessivos ciclos de hibridação e selecção.

#### Clonagem do gene para ICAM-1 mediante o uso de anticorpo anti-ICAM-1

O gene para ICAM-1 pode em alternativa ser clonado mediante o uso de um anticorpo anti-ICAM-1. O ADN, ou de preferência o ADNc, é extraído e purificado a partir de uma célula com capacidade de expressar ICAM-1. O ADNc purificado é fragmentado (por fragmentação mecânica, por digestão com endonucleases, etc.) para dar um conjunto de fragmentos de ADN

ou de ADNc.

#### EXEMPLO 17

##### Análise dos clones de ADNc

O ADN fágico dos clones positivos foi digerido com Eco RI e foi examinado por análise de Southern usando um ADNc de um clone como sonda. As inserções de ADNc de dimensão máxima que foram capazes de hibridação cruzada foram subclonadas no local Eco RI do vector plasmídeo pGEM 4Z (Promega). Os subclones de HL-60 contendo o ADNc tanto numa orientação como na orientação contrária foram suprimidos por digestão com exonuclease III (Henikoff, S., Gene 28: 351-359 (1984)) de acordo com as recomendações do fabricante (ERASE-a-Base, Promega). Os ADN's progressivamente suprimidos foram então clonados e submetidos a sequenciação de terminação de cadeia de didesoxinucleótido (Sanger, F. et al., Proc. Natt. Acad. Sci (USA) 74: 5463-5467 (1977)) de acordo com as recomendações do fabricante (Sequenase, U.S. Biochemical). As regiões 5' e de codificação do ADNc de HL-60 foram completamente sequenciadas nas duas cadeias e a região 3' foi sequenciada aproximadamente a 70% nas duas cadeias. Sequenciou-se um ADNc endotelial representativo ao longo da maior parte do seu comprimento por clonagem sistemática de fragmentos de enzimas de restrição de reconhecimento de 4 pb.

Estabeleceu-se a sequência de ADNc de um dos ADN's das células HL-60 e de uma das células endoteliais (Figura 8). A sequência de 3023 pb contém uma região 5' não traduzida curta e uma região 3' de 1,3 kb não traduzida com um sinal de poliademilação de consenso na posição 2966. O quadro de leitura livre mais comprido começa no primeiro ATG na posição 58 e acaba com um triplo de terminação TGA na posição 1653. A identidade entre a sequência de ácidos aminados traduzida e as sequências determinadas de 8 diferentes peptídeos trípticos totalizando 91 ácidos aminados (sublinhados na Figura 8) confirmam que se isolaram clones de ADNc de ICAM-1 autênticos. Com base em análises de sequência, apresentam-se no Quadro 8 possíveis peptídeos dentro da sequência de ICAM-1 reconhecida por LEA-1.

QUADRO 8

Sequência de ácidos aminados de peptídeos trípticos de ICAM-1

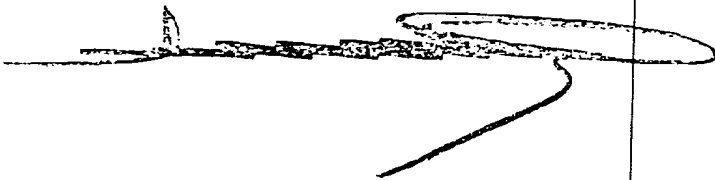
<u>Peptídeo</u>	<u>Resíduos</u>	<u>Sequência</u>
J	14-29	X G S V L <u>V T C S T S C D Q P K</u>
U	30-39	L L G I E T P L (P) (K)
50	78-85	(T) F L T V Y X T
X	89-95	V E L A P L P
AA	161-182	<u>X E L D L R P Q G L E --</u> <u>L F E X T S A P X Q L</u>
K	232-246	L N P T V T Y G X D S F S A K
45	282-295	S F P A P N V (T/I) L X K P Q (V/L)

-- indica que a sequência continua na linha seguinte.

As sequências sublinhadas foram usadas para preparar sondas oligonucleotídicas.

A análise de hidrofobicidade (Kytr, J., et al., J. Molec. Biol., 157: 105-132 (1982)) sugere a presença de uma sequência de sinal de 27 resíduos. A atribuição da glutamina +1 está de acordo com a impossibilidade verificada de obter a sequência N-terminal de 3 preparações diferentes da proteína ICAM-1; a glutamina pode ciclizar-se para formar ácido piroglutâmico, dando como resultado uma extremidade N-terminal bloqueada. A sequência traduzida de 1 a 453 é predominantemente hidrofílica, seguindo-se um domínio transmembranal presumível hidrofóbico de 24 resíduos. O domínio transmembranal é seguido imediatamente por vários resíduos com carga incluídos no domínio presumivelmente citoplasmático de 27 resíduos.

A dimensão prevista da cadeia do polipeptídeo maduro é de 55 219 Daltons, em concordância excelente com a dimensão observada de 55 000 para a ICAM-1 desglicosilada (Dustin, M.L., et al., J. Immunol., 137: 245-254 (1986)). Preveem-se oito locais de glicosilação ligada a N. A ausência de asparagina nas sequências peptídicas trípticas de dois destes locais confirma a sua glicosilação e a sua orientação extracelular. Tomando como base 2 500 Daltons por hidrato de carbono ligado a



N de alto conteúdo em manose, prevê-se uma dimensão de 75 000 para o precursor ICAM-1 em comparação com os seis observados de 73 000 Daltons (Dustin, M.L., et al., J. Immunol. 137: 245-254 (1986)). Após conversão do hidrato de carbono complexo de alto conteúdo em manose, a glicoproteína ICAM-1 tem 76 a 114 kd, conforme o tipo de célula (Dustin, M.L., et al., J. Immunol. 137: 245-254 (1986)). Deste modo o ICAM-1 é uma proteína de membrana integral altamente glicosilada mas, fora esse aspecto, normal.

#### EXEMPLO 18

ICAM-1 é um Membro de Ligação de Integrina da família de Supergenes da Imunoglobulina

O alinhamento das repetições internas de ICAM-1 foi levado a efeito usando o programa de alinhamento de proteínas Microgenie (Queen, C., et al., Nucl. Acid. Res., 12: 581-599 (1984)) seguido de inspeção. O alinhamento de ICAM-1 com IgM, N-CAM e MAG foi levado a efeito usando os programas Microgenie e ALIGN (Dayhoff, M.O., et al., Meth. Enzymol. 91: 524-545 (1983)). Fez-se uma busca em quatro bases de dados de sequências de proteínas mantidas pela National Biomedical Research Foundation para tentar encontrar similaridades de sequências proteicas usando o programa FASTP de William e Pearson (Lipman, D. J., et al., Science 227: 1435-1439 (1985)).

Uma vez que a ICAM-1 é um ligando de uma integrina, não era de esperar que fosse um membro da família dos supergenes das imunoglobulinas. No entanto a inspeção da sequência ICAM-1 mostra que preenche todos os critérios propostos para ser considerado membro da família de supergenes das imunoglobulinas. Estes critérios são discutidos mais adiante.

O domínio extracelular completo da ICAM-1 é constituído por 5 domínios homólogos semelhantes a imunoglobulinas, os quais são apresentados alinhados na Figura 9A. Os domínios 1 a 4 têm 88, 97, 99 e 99 resíduos de comprimento, respectivamente, e estão por conseguinte no domínio de dimensões normais para Ig; o domínio 5 está truncado em 68 resíduos. Buscas na base de dados NBRF usando o programa FASTP revelaram hom

logias significativas com membros da família de supergenes das imunoglobulinas, incluindo os domínios C de IgM e de IgG, o domínio variável de subunidade  $\alpha$  do receptor das células T e a glicoproteína beta alfa 1 (Figura 9B-D).

Usando a informação acima, comparou-se a sequência de ácidos aminados da ICAM-1 com as sequências de ácidos aminados de outros membros da família de supergenes das imunoglobulinas.

Foram diferenciados três tipos de domínios de superfamílias de Ig, V, C1 e C2. Tanto o domínio V como os domínios C são constituídos por 2 folhas  $\beta$  ligadas entre si pela ligação de dissulfureto intra-domínios; o domínio V contém 9 cadeias  $\beta$  anti-paralelas enquanto que os domínios C têm 7. Os domínios constantes foram divididos nos conjuntos C1 e C2 com base nos resíduos característicos apresentados na Figura 9A. O conjunto C1 inclui proteínas envolvidas no reconhecimento de antígenos. O conjunto C2 inclui vários receptores Fc e proteínas envolvidas na adesão, incluindo CD2, LFA-3, MAG e NCAM. Verificou-se que os domínios de ICAM-1 eram mais fortemente homólogos com domínios do conjunto C2, colocando a ICAM-1 neste conjunto; este facto reflecte-se numa mais forte similitude com os resíduos conservados em C2 do que em C1, como se apresenta para as cadeias  $\beta$  B-F na Figura 9. Além disso, é possível alinhar os domínios da ICAM-1 muito melhor com as cadeias  $\beta$  A e G dos domínios C2 do que com estas cadeias nos domínios V e C1, permitindo reforçar bons alinhamentos ao longo de todo o domínio C2. Nas Figuras 9B e 9C mostram-se os alinhamentos dos domínios C2 de NCAM, MAG e glicoproteína  $\beta$  alfa 1; a identidade vai de 28 a 33%. Também se mostram os alinhamentos com um receptor V $\alpha$  de uma célula T de 27% de identidade e do domínio C 3 IgM de 34% de identidade (Figuras 9B, 9D).

Uma das mais importantes características dos domínios das imunoglobulinas é a existência de pontes de dissulfureto entre as cisteínas das cadeias  $\beta$  B e F que estabilizam a "sandwich" da folha  $\beta$ ; na ICAM-1 as cisteínas são mantidas em todos os casos, excepto na cadeia f do domínio 4 onde se encontra uma leucina que pode fazer frente na "sandwich" e es

tabilizar o contacto, conforme proposto para alguns outros domínios dos conjuntos V e C2. A distância entre as cisteínas (43, 50, 52 e 37 resíduos) é como descrita para o conjunto C2.

A fim de verificar a presença de ligações de dissulfureto intracadeias na ICAM-1, submeteu-se ICAM-1 de células endoteliais a SDS-PAGE sob condições redutoras e não redutoras. A ICAM-1 de células endoteliais foi usado porque apresenta uma menor heterogeneidade de glicosilação do que a ICAM-1 de células esplênicas JY ou filiformes e permite uma maior sensibilidade a desvios de Mr. Por conseguinte, purificou-se a ICAM-1 a partir de culturas de células endoteliais da veia umbilical estimulada durante 16 horas por LPS (5 µg/ml) por cromatografia de imunoafinidade, tal como descrito acima. Ressuspendeu-se ICAM-1 precipitada por acetona em tampão de amostra (Laemmli, U.K., Nature 227: 680-685 (1970)) com 0,25% de 2-mercaptoetanol ou iodoacetamida 25 mM e levou-se a 100°C durante 5 min. As amostras foram submetidas a SDS-PAGE 4670 e coloração por prata 4613. A ICAM-1 das células endoteliais tinha um Mr aparente de 100 kd sob condições redutoras e de 96 kd sob condições não redutoras sugerindo fortemente a presença de pontes de dissulfureto intracadeia na ICAM-1 nativa.

Por meio da utilização da sequência primária para prever a estrutura secundária (Chon, P.Y., et al., Biochem 13: 211-245 (1974)) encontrou-se as cadeias tipo  $\beta$  em cada domínio de ICAM-1, como se esperava, marcadas de a até g na Figura 9 A parte superior, exactamente de acordo com a previsão de um domínio de imunoglobulina e correspondendo às posições das cadeias A a H nas imunoglobulinas (Figura 9A, parte inferior). No domínio 5 faltam as cadeias A e C mas, uma vez que estas formam os bordos das superfícies, as superfícies podem ainda formar-se, talvez com a cadeia D tomando o lugar da cadeia C, como foi proposto para alguns outros domínios C2; a ligação de dissulfureto característica entre as cadeias B e F não seria afectada. Desse modo, os critérios para a dimensão do domínio, a homologia das sequências, a manutenção das cisteínas formando as presumíveis ligações de dissulfureto intra-domínios, a presença de ligações de dissulfureto e a estrutura prevista da superfície  $\beta$  são

todos satisfeitos pela inclusão da ICAM-1 na família de supergenes de imunoglobulina.

Verificou-se que a ICAM-1 é mais fortemente homóloga com as glicoproteínas NCAM e MAG do conjunto C2. Este facto é de particular interesse uma vez que tanto a NCAM como a MAG são mediadoras da adesão célula-célula. A NCAM é importante nas interacções neurónio-neurónio e neuro-muscular (Cunningham, B.A., et al., Science 236: 799-806 (1987)); enquanto que a MAG é importante nas interacções neurónio-oligodendrócitos e oligodendrócito-oligodendrócito durante a mielinização (Poltorak, M., et al., J. Cell Biol. 105: 1893-1899 (1987)). A expressão de NCAM e de MAG na superfície celular é regulada de acordo com o desenvolvimento durante a formação do sistema nervoso e a mielinização, respectivamente, em analogia com a indução regulada da ICAM-1 na inflamação (Springer, T.A., et al., Ann. Rev. Immunol. 5: 223-252 (1987)). A ICAM-1, a NCAM (Cunningham, B.A., et al., Science 236: 799-806 (1987)), e a MAG (Salzer, J.L. et al., J. Cell Biol. 104: 957-965 (1987)) são similares na estrutura geral além de serem homólogas, uma vez que qualquer delas é uma glicoproteína de membrana integral constituída por 5 domínios C2 que formam a região extracelular N-terminal, se bem que na NCAM esteja presente alguma sequência adicional não semelhante a Ig entre o último domínio C2 e o domínio transmembranal. A ICAM-1 alinha-se ao longo de todo o seu comprimento, incluindo os domínios transmembranal e citoplasmático, com a MAG com 21% de identidade; encontra-se a mesma % de identidade na comparação dos 5 domínios de ICAM-1 e de NCAM-1. NA Figura 10 mostra-se uma comparação por meio de um diagrama das estruturas secundárias da ICAM-1 e da MAG. Uma comparação domínio a domínio mostra que o nível de homologia entre os domínios das moléculas de ICAM-1 e de NCAM ( $x \pm$  desvio padrão  $21 \pm 2,8\%$  e  $18,6 \pm 3,8\%$  respectivamente) é semelhante ao nível de homologia da comparação dos domínios da ICAM-1 com os domínios da NCAM e da MAG ( $20,4 \pm 3,7$  e  $21,9 \pm 2,7$ , respectivamente). Se bem que haja evidência de divisão alternativa nas regiões C-terminais de NCAM (Cunningham, B.A., et al., Science 236: 799-806 (1987); Barthels, D., et al., EMBO J. 6: 907-914 (1987)) e do MAG (Lai, C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci.

(USA) 84: 4377-4341 (1987)), não se encontrou qualquer evidência deste facto na sequenciação de clones de ICAM-1 de HL-60 ou endotelial ou em estudos da espinha dorsal proteica da ICAM-1 e do precursor em vários tipos de células (Dustin, M.L., et al., J. Immunol. 137: 245-254 (1986)).

A ICAM-1 funciona como um ligante para LFA-1 em interações entre linfócitos e vários tipos diferentes de células. Os linfócitos ligam-se à ICAM-1 incorporados em camadas duplas de membrana artificiais e esta ligação necessita da existência de LFA-1 no linfócito, demonstrando directamente a interacção de LFA-1 com a ICAM-1 (Marlin, S.D., et al., Cell 51: 813-819 (1987)). A LFA-1 é uma integrina dos leucócitos e não tem características de imunoglobulina. As integrinas leucocitárias incluem uma subfamília de integrinas. As outras duas subfamílias são mediadoras nas interações célula-matriz e reconhecem a sequência RGD no interior dos respectivos ligandos que incluem a fibronectina, a vitromectina, o colagénio e o fibrinogénio (Hynes, R.O., Cell 48: 459-554 (1987); Ruoslahti, E., et al., Science 238: 491-497 (1987)). As integrinas leucocitárias são expressas nos leucócitos, estão envolvidas nas interações célula-célula e os únicos ligandos conhecidos são ICAM-1 e iC3b, um fragmento do componente complementar C3 que não apresenta características semelhantes a uma imunoglobulina e que é reconhecido por Mac-1 (Kishimoto, T. K., et al., In: Henkoyte Typing III, McMichael, M. (ed.), Springer-Verlag, New York (1987); Springer, T.A., et al., Ann. Rev. Immunol. 5: 223-252 (1987); Anderson, D. C., et al., Ann. Rev. Med. 38: 175-194 (1987)). No Quadro 9 apresentam-se possíveis peptídeos da sequência ICAM-1, com base em análise sequencial, que são reconhecidos por LFA-1.


QUADRO 9

Peptídeos da sequência de ICAM-1 possivelmente reconhecidos por LFA-1

-L-R-G-E-K-E-L-  
-R-G-E-K-E-L-K-R-E-P-  
-L-R-G-E-K-E-L-K-R-E-P-A-V-G-E-P-A-E-  
-P-R-G-G-S-  
-P-G-N-N-R-K-  
-Q-E-D-S-Q-P-M-  
-T-P-E-R-V-E-L-A-P-L-P-S-  
-R-R-D-H-H-G-A-N-F-S-  
-D-L-R-P-Q-G-L-E-

A ICAM-1 constitui o primeiro exemplo de um membro da família de supergenes de imunoglobulina que se liga a uma integrina. Se bem que ambas estas famílias desempenhem um papel importante na adesão celular, a interação entre elas não tinha sido ainda prevista. Pelo contrário, as interações dentro da superfamília de genes de imunoglobulina são bastante comuns. É muito possível que se venham a encontrar outros exemplos de interação entre as famílias das integrinas e das imunoglobulinas. A LFA-1 reconhece um ligando diferente da ICAM-1 (Springer, T.A., et al., Ann. Rev. Immunol. 5: 223-252 (1987)) e a integrina leucocitária Mac-1 reconhece um ligando diferente de C3bi na adesão neutrófilo-neutrófilo (Anderson, D.C., et al., Ann. Rev. Med. 38: 175-194 (1987)). Além disso, vesículas contendo MAG purificada ligam-se a neurites, que são MAG, e portanto a MAG deve ser capaz de interação heterofílica com um receptor diferente (Poltorak, M. et al., J. Cell Biol. 105: 1893-1899 (1987)).

Foi sugerido que o papel da NCAM nas interações celulares neural-neural e neural-muscular seja devido a interações homofílicas NCAM-NCAM (Cunningham, B.A., et al., Science 236: 799-806 (1987)). O papel importante de Mag nas interações entre voltas girantes adjacentes de células de Schwann que envolvem os axônios durante a formação da bainha de mielina pode ser devido a interação com um receptor diferente ou a interação homofílica MAG-MAG. A homologia com NCAM e a ocorrência

  
cia frequente de interacções domínio-domínio dentro da família de supergenes de imunoglobulinas levanta a possibilidade de que a ICAM-1 possa participar em interacções homofílicas bem como em interacções heterofílicas ICAM-1-LFA-1. No entanto a ligação de células B linfoblásticas que co-expressam densidades semelhantes de LFA-1 e de ICAM-1 a ICAM-1 em monocamadas celulares artificiais pode ser completamente inibida por meio de pré-tratamento dos linfoblastos B com ACM de LFA-1, enquanto que a aderência não é afectada pelo pré-tratamento dos linfoblastos com ACM de LFA-1. O pré-tratamento da monocamada com ACM de ICAM-1 suprime completamente a ligação (Dustin, M.L., et al., J. Immunol 137: 245-254 (1986)). Estas constatações mostram que, se chegam a ocorrer interacções homofílicas de ICAM-1, estas devem ser muito mais fracas do que as interacções heterofílicas com LFA-1.

A possibilidade de que as integri-  
nas leucocitárias reconheçam ligandos de um modo fundamentalmente diferente está de acordo com a presença de uma sequência de 180 resíduos nas respectivas sub-unidades  $\alpha$ , o que pode ser importante na capacidade de ligação dos ligandos e que não está presente nas integrinas que reconhecem RGD (Corbi, A., et al., EMBO J. 6: 4023-4028 (1987)). Se bem que tenha sido proposto que a Mac-1 reconheça a sequência RGD presente em iC3b 5086, não há qualquer sequência RGD na ICAM-1 (Fig. 8). Este facto está em concordância com a incapacidade do peptídeo fibronectina GRGDSP e do peptídeo de regulação GRGESP de inibirem a adesão ICAM-1-LFA-1 (Marlin, D.D., et al., Cell 51: 813-819 (1987)). No entanto, existem sequências relacionadas tais como PRGGS e RGEKE em regiões da ICAM-1 que se prevê constituam ciclos entre as cadeias  $\beta$  a e b do domínio 2 e c e d do domínio 2, respectivamente (Fig. 9), que deste modo estão acessíveis para reconhecimento. Constitui um facto de interesse a circunstância de a molécula MAG homóloga conter uma sequência RGD entre os domínios 1 e 2 (Poltorak, M., et al., J. Cell Biol. 105: 1893-1899 (1987); Salzer, J. L., et al., J. Cell Biol. 104: 957-965 (1987)).

### EXEMPLO 19

Análise de mancha de Southern e Northern

Foram realizadas análises de mancha de Southern usando 5 µg de ADN genômico extraído de três linhas de células: BL2, uma linha de células de linfoma de Burkitt (oferta do Dr. Gilbert Lenoir); e linhas de células JY e Er-LCL linfoblástico B transformada por EBV

Os ADNs foram digeridos com 5X a quantidade recomendada pelos fornecedores de endonucleases Bam HI e Eco RI (New England Biolabs). Após electroforese através de um gel de agarose a 0,8%, os ADNs foram transferidos para uma membrana de nylon (Zeta Probe, Biorad). O filtro foi pré-hibridado e hibridado de acordo com procedimentos normais usando ADNc de ICAM obtido a partir de HL-60 marcado com  $\alpha$ -( $^{32}\text{P}$ )d XTP's por iniciação aleatória (Boehringer Mannheim). Realizaram-se análises de mancha de Northern usando 20 µg de ADN total ou 6 µg de poli(A)<sup>+</sup> ARN. O ARN foi desnaturado, separado por electroforese através de um gel de agarose-formaldeído a 1% e electrotransferido para Zeta Probe. Os filtros foram pré-hibridados e hibridados conforme anteriormente descrito (Staunton, D.E., et al., EMBO J. 6: 3695-3701 (1987)) usando a sonda de ADNc de HL-60 das sondas oligonucleotídicas marcadas por  $^{32}\text{P}$  (descritas acima).

As análises de mancha de Southern usando a sonda de ADNc de 3 kb e ADN genômico digerido com Bam HI e EcoRI mostraram fragmentos predominantes simples que hibridam de 20 e de 8 kb, respectivamente, sugerindo a ocorrência de um único gene e sugerindo que a maior parte da informação de codificação está presente na fracção de 8 kb. Em análises de mancha de 3 linhas de células diferentes não há evidência de polimorfismo dos fragmentos de restrição.

### EXEMPLO 20

Expressão do Gene de ICAM-1

Um "vector de expressão" é um vector (devido à presença de sequências apropriadas de regulação de



uma análise como esta possa ser realizada por qualquer técnica conveniente, é preferível determinar a sequência de nucleótidos do fragmento de ADN ou de ADNc que foi clonado no vector de expressão. Estas sequências nucleotídicas são em seguida examinadas para determinar se são capazes de codificar para polipeptídeos contendo a mesma sequência de ácidos aminados dos fragmentos de digestão triptica da ICAM-1 (Quadro 5).

Um vector de expressão que contém uma molécula de ADN ou de ADNc que codifica o gene de ICAM-1 pode, deste modo, ser reconhecido: (i) pela capacidade para dirigir a expressão de uma proteína que é capaz de ligação a anticorpo anti-ICAM-1; e (ii) pela presença de uma sequência nucleotídica que é capaz de codificar para qualquer dos fragmentos tripticos da ICAM-1. A molécula de ADN clonada de um vector de expressão como os descritos pode ser retirada do vector de expressão e isolada sob a forma pura.

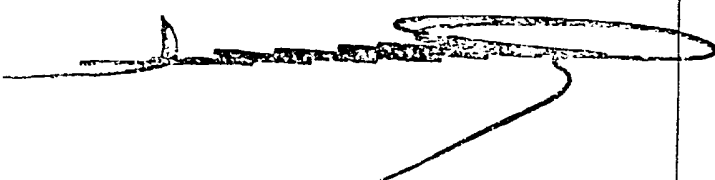
#### EXEMPLO 21

##### Actividades Funcionais de ICAM-1 Purificada

Nas células, normalmente, a ICAM-1 funciona como uma proteína de superfície associada com a membrana celular. Por conseguinte a função da ICAM-1 purificada foi ensaiada depois de uma molécula ter sido reconstituída em membranas lipídicas artificiais (lipossomas ou vesículas) por dissolução da proteína em lípidos solubilizados por detergentes após remoção do detergente por diálise. A ICAM-1 purificada a partir de células JY e eluída no detergente octilglucósido, conforme descrito acima, foi reconstituída em vesículas e as vesículas contendo ICAM-1 foram fundidas em lamelas de vidro ou em alvéolos de cultura em plástico a fim de permitir a detecção de células que se liguem à proteína.

##### Preparação de membranas planares e de vesículas ligadas a plástico

Preparam-se vesículas pelo método de Gay et al., (J. Immunol. 136: 2026 (1986)). Resumidamente,



dissolveram-se fosfatidilcolina de ovo e colesterol em clorofórmio e misturaram-se numa proporção molar de 7:2. A mistura de lípidos foi seca por rotação sob uma corrente de azoto até se obter uma película fina e em seguida foi liofilizada durante 1 hora a fim de eliminar completamente os traços de clorofórmio. A película lipídica foi em seguida dissolvida em octilglucósido a 1%/NaCl 0,14 M/tris 20 mM (pH 7,2) até uma concentração final de fosfatidilcolina de 0,1 mM. Aproximadamente 10 µg de ICAM-1 purificada ou de glicoforina humana (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), utilizada como glicoproteína de membrana de comparação, foram adicionados a cada ml de lípidos dissolvidos. A solução proteína-lípidos-detergente foi então dialisada a 4°C contra 3 mudanças de 200 volumes de tris 20 mM/NaCl 0,14 M a pH 7,2 e uma mudança de HBSS.

As membranas planares foram preparadas pelo método de Brian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 6159 (1984). Ferveram-se lamelas de vidro (11 mm de diâmetro) durante 15 minutos numa diluição de 1:6 de detergente 7X (Linbro), lavaram-se dum dia para o outro em água destilada, passaram-se por etanol a 70% e secaram-se ao ar. Colocou-se no fundo de cada alvéolo, numa placa de 24 alvéolos, uma gota de 80 µg de suspensão das vesículas contendo ICAM-1 ou glicoforina e as lamelas de vidro preparadas conforme descrito foram postas cuidadosamente a flutuar na superfície. Após 20 a 30 minutos de incubação à temperatura ambiente os alvéolos foram cheios com HBSS e as lamelas foram invertidas a fim de virar a membrana planar para cima. Os alvéolos foram em seguida lavados abundantemente com HBSS a fim de eliminar as vesículas não ligadas. A membrana planar nunca foi exposta ao ar.

Durante as experiências com membranas planares fundidas a superfície de vidro verificou-se que as vesículas contendo ICAM-1 se ligavam directamente à superfície de plástico de placas de cultura de tecidos multi-alvéolos e que conservavam a actividade funcional, conforme evidenciado pela ligação específica de células. Estas vesículas são seguidamente referidas por "vesículas ligadas ao plástico" ("plastic-bound vesicles" = PBV), uma vez que a natureza das vesículas lipídicas li-

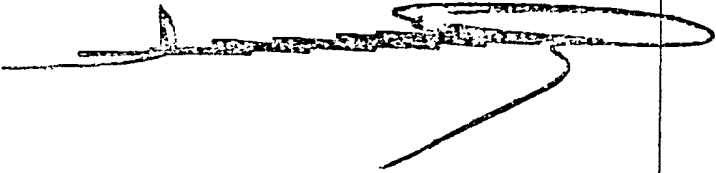
gadas ao plástico não foi determinada. As vesículas ligadas ao plástico foram preparadas por adição de 30 µl de uma suspensão de vesículas directamente ao fundo dos alvéolos em bandejas de cultura de tecidos de 96 alvéolos (Falcon), seguida de incubação e lavagem, de modo análogo ao descrito para as membranas planares.

#### Análise de adesão celular

As análises de adesão celular foram realizadas essencialmente de modo idêntico para as membranas planares e para as vesículas ligadas ao plástico, com a única diferença de que o número de células e os volumes para as análises para PBV foram reduzidos para um quinto dos valores usados em análises de membranas planares.

Prepararam-se linfócitos T de indivíduos normais para comparação e de um paciente com Deficiência de Adesão aos Leucócitos ("Leukocyte Adhesion Deficiency" = LAD) cujas células não tinham capacidade para expressar LFA-1 (Anderson, D.C. et al., J. Infect. Dis 152: 668 (1985)) por cultura de células monocleares de sangue periférico com 1 µg/ml de concavalina A (Con-A) em meio RPMI-1640 mais FCS a 20% a  $5 \times 10^5$  células/ml durante 3 dias. Em seguida as células foram lavadas duas vezes com RPMI e uma vez com metil-alfa-D-manopiranosido a fim de eliminar a lecitina residual da superfície celular. As células foram cultivadas em meio RPMI/FCS a 20% contendo 1 ng/ml de Il-2 recombinante e foram usadas entre 10 e 22 dias depois do início da cultura.


A fim de detectar a ligação das células às membranas planares ou a PBV, marcaram-se com isótopos radioactivados células blásticas Con-A, as linhas de células linfoma T SKW-3 e JY linfoblastóides B transformadas por EBV (positiva em relação a LFA-1) e a linha de células linfoblastóides deficientes em LFA-1 (BBN) (derivada a partir do paciente 1, Springer, T.A. et al., J. Exper. Med. 160: 1901-1918 (1986)) por incubação de  $1 \times 10^7$  células em 1 ml de meio RPMI-1640/FCS a 10% com 100 µCi de  $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$  durante 1 hora a 37°C, seguida de quatro lavagens com meio RPMI-1640 a fim de eliminar a marcação não incor



porada. Em experiências de bloqueio de anticorpos monoclonais, submeteram-se células ou vesículas ligadas ao plástico a pré-tratamento com 20 µg/ml de anticorpo purificado em meio RPMI-1640/FCS a 10% a 4º C durante 30 minutos, seguido de 4 lavagens para eliminar o anticorpo não ligado. Em experiências sobre os efeitos de cátions divalentes sobre a ligação celular, as células foram lavadas uma vez com Ca<sup>2+</sup>, HBSS isento de Mg<sup>2+</sup> mais 10% de FCS dialisado, e adicionou-se CaCl e MgCl até às concentrações indicadas. Em todas as experiências as células e as membranas planares ou as PBV foram pré-equilibradas à temperatura apropriada (4º C, 22º C ou 37º C) no tampão de análise apropriado.

A fim de medir a ligação das células a ICAM-1 purificada, centrifugaram-se durante 2 minutos a 25 x g células marcadas com <sup>51</sup>Cr (5 x 10<sup>5</sup>) transformantes de EBV em análise de membranas planares; 1 x 10<sup>5</sup> transformantes de EBV ou células SKW-3 e 2 x 10<sup>5</sup> células blásticas Con-A em análises de PBV) sobre as membranas planares ou as PBV, incubando em seguida a 4º C, 22º C ou 37º C durante uma hora. Após a incubação, eliminaram-se as células não ligadas por oito ciclos de enchimento e aspiração com tampão pré-equilibrado à temperatura apropriada. Determinou-se a quantidade de células ligadas por solubilização do conteúdo dos alvéolos com NaOH 0,1 N/tritou X-100 a 1% e contagem num contador gama. Determinou-se a percentagem de ligação dividindo o resultado em cpm do valor associado à células, Em análises de membranas planares o valor em cpm foi corrigido para a razão entre a superfície das lamelas e a superfície dos alvéolos de cultura.

Nesta análises, as células linfoblastóides B transformadas por EBV, as células T de linfoma SKW-3 e os linfoblastos T Con-A ligaram-se especificamente a ICAM-1 em membranas artificiais (Figuras 11 e 12). A ligação era específica uma vez que as células se ligaram de modo muito fraco às membranas planares ou a vesículas de comparação contendo quantidades equivalentes de outra glicoproteína de superfície das células humanas, a glicoforina. Além disso, os transformantes por EBV positivos em relação a LFA-1 e os blastos ligaram-se, enquanto que as células correspondentes negativas em relação a LFA-1

  
não se conseguiram ligar em quantidade significativa, demonstrando que a ligação era dependente da presença de LFA-1 nas células.

Tanto a especificidade da ligação das células como a dependência de LFA-1 celular foram confirmados em experiências de bloqueio de anticorpos monoclonais (Figura 13). Foi possível inibir a ligação de células JY em 97% quando as PBV contendo ICAM-1 foram tratadas previamente com o anticorpo monoclonal anti-ICAM-1 RR1/1. O tratamento prévio das células com o mesmo anticorpo teve um efeito reduzido. Pelo contrário, o anticorpo monoclonal anti-LFA-1 TS1/18 inibiu a ligação em 96%, mas apenas quando o tratamento prévio foi feito às células e não às PBV. Um anticorpo de comparação TS2/9 reactivo com LFA-3 (um antigene de superfície dos linfócitos diferente) não teve qualquer efeito de inibição significativo quando se efectuou o tratamento prévio quer nas células quer nas PBV. Esta experiência demonstra que a ICAM-1 medeia nas membranas artificiais só por si, e não qualquer contaminante presente em pequena quantidade, a adesão celular observada e que a adesão é dependente da existência de LFA-1 na célula a ligar.

A ligação de células a ICAM-1 em membranas artificiais também apresentou duas outras características do sistema de adesão dependente de LFA-1: dependência da temperatura e necessidade da presença de catiões divalentes. Como se mostra na Figura 14, os blastos Con-4 ligam-se a ICAM-1 em PBV mais eficazmente a 37°C, parcialmente a 22°C e muito francamente a 4°C. Como se mostra na Figura 15, a ligação era completamente dependente da presença de iões divalentes. A concentração fisiológica era suficiente apenas  $Mg^{2+}$  para a máxima ligação das células, enquanto que  $Ca^{2+}$  isoladamente produzia níveis de ligação muito baixos. No entanto  $Mg^{2+}$  a um décimo da concentração normal com  $Ca^{2+}$  apresentava um efeito sinérgico e produzia a ligação máxima.

Resumidamente, a especificidade da ligação das células a ICAM-1 purificada incorporada em membranas artificiais, a inibição específica com anticorpos monoclonais e a dependência da temperatura e de catiões divalentes demonstram que a ICAM-1 é um ligando específico para o sistema de adesão de

pendente de LFA-1.

#### EXEMPLO 22

Expressão de ICAM-1 e de HLA-DR em Reacções Alérgicas e ao Ensaio do Penso Tóxico

Estudaram-se biópsias da pele de cinco indivíduos normais no que respeita à respectiva expressão de ICAM-1 e de HLA-DR. Verificou-se que enquanto que as células endoteliais em alguns vasos sanguíneos normalmente expressam ICAM-1, não existe expressão de ICAM-1 em queratinócitos de pele normal. Não se observou coloração de HLA-DR em qualquer queratinócito de biópsias de pele normal. Estudou-se então a cinética da expressão de ICAM-1 e de antígenos da classe II em células em biópsias de lesões da pele alérgicas e tóxicas. Verificou-se que metade dos indivíduos estudados tinham queratinócitos que expressavam ICAM-1 quatro horas após a aplicação do hepteno (quadro 10). Havia um aumento na percentagem de indivíduos que expressavam ICAM-1 nos seus queratinócitos com o tempo de exposição ao hapteno bem como um aumento na intensidade da coloração indicando maior expressão de ICAM-1 por queratinócito até às 48 horas. De facto, nesse momento uma quantidade de queratinócitos em todas as biópsias apresentaram coloração positiva para ICAM-1. Às 72 horas (24 horas após se ter retirado o hapteno), sete dos oito indivíduos ainda tinham expressão de ICAM-1 nos seus queratinócitos, enquanto a expressão de ICAM-1 num indivíduo decaiu entre 48 e 72 horas.


QUADRO 10

Cinética da Indução de ICAM-1 e de HLA-DR em Queratinócitos de Biópsias dos Ensaio de Penso Alérgico

Tempo após aplicação do penso (h)	Nº de biópsias	Apenas ICAM-1	Apenas HLA-DR	ICAM-1 + HLA-DR
Pele Normal	5	0	0	0
Ensaio do Penso alérgico				
4	6	3 <sup>a</sup>	0	0
8	9	3	0	0
24	8	7	0	0
48 <sup>b</sup>	8	5	0	3
72	8	6	0	1

- a) As amostras foram consideradas positivas se pelo menos se coraram pequenos conjuntos de queratinócitos
- b) Todos os pensos foram retirados neste momento.

Histologicamente o padrão de coloração para ICAM-1 nos queratinócitos de biópsias colhidas quatro horas após a aplicação do hapteno era normalmente em pequenos conjuntos. Às 48 horas, a ICAM-1 era expressa na superfície da maioria dos queratinócitos, não se verificando qualquer diferença entre o centro e a periferia da lesão. A intensidade da coloração diminuía à medida que os queratinócitos estavam mais próximos do stratum corneum. Esta verificação foi feita em biópsias colhidas tanto do centro como da periferia das lesões. Também nesse momento o ensaio do penso era positivo (infiltração, eritema e vesículas). Não se observou qualquer diferença na expressão da ICAM-1 quando se aplicaram diferentes haptenos nos indivíduos sensíveis. Além dos queratinócitos, a ICAM-1 também era expressa em algumas células mononucleares e células endoteliais no local da lesão.



A expressão de HLA-DR em queratinócitos em lesões alérgicas da pele era menos frequente do que a de ICAM-1. Nenhum dos indivíduos estudados tinha lesões com queratinócitos que adquiriam coloração positiva para HLA-DR até 24 horas após a aplicação do hapteno. De facto, apenas quatro amostras submetidas a biópsia tinham queratinócitos que expressavam HLA-DR e nenhuma biópsia tinha queratinócitos que eram positivos em relação a HLA-DR e não de ICAM-1 (Quadro 10).

Em contraste com a lesão do ensaio do penso alérgico, a lesão do ensaio do penso tóxico, induzida com óleo de cróton ou com sulfato de sódio e laurilo tinha queratinócitos que apresentavam pouca ICAM-1 ou nenhuma nas respectivas superfícies em todos os momentos do ensaio (Quadro 11). De facto, às 48 horas após a aplicação do penso, que era o momento óptimo para a expressão de ICAM-1 nos indivíduos do ensaio do penso alérgico, apenas um dos 14 indivíduos do ensaio do penso tóxico tinha expressão de ICAM-1 nos queratinócitos nas suas lesões. Também em contraste com as biópsias do ensaio do penso alérgico, não havia expressão de HLA-DR nos queratinócitos das lesões de ensaios do penso tóxico.

Estes dados indicam que a ICAM-1 é expressa em inflamação de origem imune e não em inflamação de origem tóxica, e deste modo a expressão de ICAM-1 pode ser usada para distinguir entre inflamação de origem imune e de origem tóxica, tal como uma insuficiência renal aguda em pacientes com transplantes do rim em que é difícil de determinar se a insuficiência é devida à rejeição ou à nefrotoxicidade do agente terapêutico de imuno-supressão. A biópsia renal e a avaliação da regulação para o aumento da expressão de ICAM-1 permitirão uma diferenciação da rejeição de origem imune e da reacção de toxicidade de origem não-imune.

QUADRO 11

Cinética da Indução de ICAM-1 e de HLA-DR em Queratinócitos de Biópsias dos Ensaios do Penso Tóxico

Tempo após aplicação do penso (h)	Nº de biópsias	Apenas ICAM-1	Apenas HLA-DR	ICAM-1 + HLA-DR
4	4	0	0	0
8	3	1 <sup>a</sup>	0	0
24	3	1	0	0
48 <sup>b</sup>	14	1	0	0
72	3	1	0	0

- a) As amostras foram consideradas positivas se pelo menos se coraram pequenos conjuntos de queratinócitos.
- b) Todos os pensos foram retirados neste momento.

EXEMPLO 23

Expressão de ICAM-1 e de HLA-DR em Doenças Cutâneas Benignas

Estudaram-se células de biópsias de pele de pacientes com vários tipos de doenças inflamatórias da pele no que respeita à sua expressão de ICAM-1 e de HLA-DR. Uma quantidade de queratinócitos em biópsias de eczema de contacto alérgico, de penfigoide/pênfigo e de líquen plano expressavam ICAM-1. As biópsias de líquen plano mostraram a coloração mais intensa com um padrão similar a ou ainda mais forte do que o observado nas biópsias de ensaios de penso alérgico de 48 horas (Quadro 12). Em concordância com os resultados observados no ensaio de penso alérgico, a coloração de ICAM-1 mais intensa foi observada em locais de infiltração intensa de células monocleares. Além disso, 8 de 11 biópsias de líquen plano ensaiadas foram positivas no que se refere à expressão de HLA-DR em queratinócitos.

A expressão de ICAM-1 nos queratinócitos de biópsias da pele de pacientes com exantema e urticária

foi menos pronunciada. Apenas quatro de sete pacientes ensaiados com estas doenças tinham queratinócitos que expressavam ICAM-1 no local da lesão. A expressão HLA-DR foi encontrada apenas num paciente e em conjunto com ICAM-1.

As células endoteliais e alguns infiltrados de células mononucleares de todas as doenças de pele inflamatórias benignas ensaiadas expressavam ICAM-1 em graus variáveis.

#### QUADRO 12

Expressão de ICAM-1 e de HLA-DR em Queratinócitos de Doenças Cutâneas Benignas

Diagnóstico	Nº de casos	Apenas ICAM-1	Apenas HLA-DR	ICAM-1 + HLA-DR
Eczema alérgico de contacto	5	3 <sup>a</sup>	0	2
Líquen plano	11	3	0	8
Penfigóide/ /Pênfigo	2	2	0	0
Exantema	3	2	0	0
Urticária	4	1	0	1

a) As amostras foram consideradas como positivas se pelo menos se coraram pequenos conjuntos de queratinócitos.

#### EXEMPLO 24

Expressão de ICAM-1 em Queratinócitos de Lesões de Pele de Psoríase

Estudou-se a expressão de ICAM-1 em biópsias de pele de 5 pacientes com psoríase antes do início e periodicamente durante o tratamento com PUVA. Foram obtidas biópsias de 5 pacientes com psoríase clássica confirmada histologicamente. As biópsias foram colhidas sequencialmente antes e du-


rante o período indicado de tratamento com PUVA. Administrou-se PUVA 3 a 4 vezes por semana. As biópsias foram colhidas da periferia das placas de psoríase de cinco pacientes e foram, além disso, colhidas biópsias de pele clinicamente normal em quatro dos pacientes.

As amostras de biópsias de pele frescas foram congeladas e conservadas em azoto líquido. Secaram-se ao ar dum dia para o outro à temperatura ambiente secções criostáticas de 6 microns, fixaram-se em acetona durante 10 minutos e coraram-se imediatamente ou embrulharam-se em folha de alumínio e guardaram-se a -80° C até serem coradas.

A coloração foi realizada do modo seguinte. Incubaram-se as secções com anticorpos monoclonais e coraram-se pelo método da imunoperoxidase em três fases (Stein, H., et al., Ad. Cancer Res. 42: 67-147, (1984)), usando um substrato de diaminobenzidina  $H_2O_2$ . Usaram-se amígdalas e gânglios para amostras de comparação positivas para coloração anti-ICAM-1 e HLA-DR. Para amostras de comparação negativas usaram-se tecidos corados na ausência de anticorpo primário.

Os anticorpos monoclonais contra HLA-DR foram adquiridos de Becton Dickinson (Mountainview, Califórnia). O anticorpo anti-ICAM-1 monoclonal era R6-5-D6. A Ig anti-rato de coelho conjugada com peroxidase e a Ig anti-coelho de suíno conjugada com peroxidase foram adquiridos de DAKAPATTS, Copenhaga, Dinamarca. O tetracloridrato de diaminobenzidina foi obtido de Sigma (St. Louis, Mo.).

Os resultados do estudo mostram que as células endoteliais em alguns vasos sanguíneos expressam ICAM-1 tanto em pele doente como em pele normal mas a intensidade de coloração e o número de vasos sanguíneos que expressam ICAM-1 aumentou nas lesões da pele de psoríase. Para além disso, o padrão de expressão de ICAM-1 em queratinócitos de lesões de psoríase não tratada dos cinco pacientes variava desde apenas pequenos conjuntos de células coradas até muitos queratinócitos corados. Durante o decurso do tratamento com PUVA, a expressão de ICAM-1 em 2 dos pacientes (paciente 2 e 3) mostrou uma redução considerável que procedeu ou coincidiu com a remissão clínica (Quadro



13). Os pacientes 1, 4 e 5 tiveram diminuições e aumentos da expressão de ICAM-1 durante o tratamento com PUVA, os quais coincidiram com remissões e recidivas clínicas, respectivamente. Não havia expressão de ICAM-1 em queratinócitos de pele normal antes ou depois do tratamento com puva. Este facto indica que o PUVA não induz ICAM-1 em queratinócitos de pele normal.

É de salientar a observação de que a densidade do infiltrado de células mononucleares estava em relação com a quantidade de expressão de ICAM-1 nos queratinócitos. Esta observação diz respeito tanto à diminuição do número de células mononucleares em lesões durante o tratamento com PUVA quando a expressão de ICAM-1 também diminuiu como ao aumento do número de células mononucleares durante o tratamento com PUVA quando a expressão de ICAM-1 nos queratinócitos era mais pronunciada. As células endoteliais e as células mononucleares da pele são também positivas em relação a ICAM-1. Em pele clinicamente normal, a expressão de ICAM-1 estava confinada às células endoteliais sem classificação de queratinócitos.

A expressão de HLA-DR em queratinócitos era variável. Não houve qualquer biópsia positiva para HLA-DR que fosse também positiva em relação a ICAM-1.

Em resumo, estes resultados mostram que antes do tratamento a expressão de ICAM-1 é pronunciada nos queratinócitos e está relacionada com um infiltrado denso de células mononucleares. Durante o tratamento com PUVA verifica-se uma diminuição pronunciada da coloração de ICAM-1 em paralelo com a melhoria clínica. Histologicamente o infiltrado dermal também diminuiu. Quando era óbvia uma recidiva clínica durante o tratamento, a expressão de ICAM-1 nos queratinócitos aumentava, bem como a densidade do infiltrado dérmico. Quando se verificava uma remissão clínica durante o tratamento, havia uma diminuição da coloração da ICAM-1 nos queratinócitos em concordância, bem como uma diminuição no infiltrado dérmico. Deste modo, a expressão de ICAM-1 nos queratinócitos correspondia à densidade do infiltrado de células mononucleares da derme. Estes dados mostram que a resposta clínica ao tratamento com PUVA tinha como resultado de uma diminuição pronunciada da expressão de ICAM-1 nos querati


nócitos paralelamente com um declínio mais moderado das células mononucleares. Este facto indica que a expressão de ICAM-1 nos queratinócitos é responsável pelo início e pela manutenção da infiltração dérmica e que o tratamento com PUVA provoca a redução da ICAM-1, a qual por seu turno reduz a infiltração dérmica e a resposta inflamatória. Os dados também indicam que havia uma expressão variável de HLA-DR nos queratinócitos durante o tratamento com PUVA.

A expressão de ICAM-1 nos queratinócitos de lesões de psoríase está em concordância com o grau de gravidade clínica da lesão bem como com a dimensão da infiltração dérmica. Deste modo a ICAM-1 desempenha um papel central na psoríase e a inibição da sua expressão e/ou a inibição da sua interação com o complexo CD 18 sobre as células mononucleares constituirá um tratamento efectivo da doença. Além disso, a monitorização da expressão de ICAM-1 nos queratinócitos constituirá um meio eficaz de diagnóstico e de prognóstico, bem como de avaliação do curso de terapia da psoríase.

### QUADRO 13

Expressão Sequencial por Queratinócitos em Lesões com Psoríase (PS) e em Pele clinicamente Normal (N) antes e durante o Tratamento com PUVA

Tempo antes e durante o tratamento com PUVA	Paciente nº									
	1		2		3		4		5	
	PS	PS	N	PS	N	PS	N	PS	N	
0	+	+	-	++	-	++	-	+++	-	
1 dia	+									
1 semana	+	+	-	-	-	++	-	+	-	
2 semanas	0			+	-	+	-	+	-	
3 semanas	++									
4 semanas	++	+	-	-	-	++	-			
5-6 semanas		- *	-					- *	-	
7 semanas						(++)	(+)	0	-	
10 semanas	*							+++ *	-	
	(++)							-	-	

- 
- +++ Muitos queratinócitos positivos
  - ++ Alguns queratinócitos positivos
  - + Queratinócitos positivos em focos
  - (+) Muito poucos queratinócitos positivos esporádicos
  - Ausência de coloração positiva
  - \* Remissão clínica
  - 0 Recidiva clínica
- 

#### EXEMPLO 25

##### Expressão de ICAM-1 e de HLA-DR em Doenças Cutâneas Malignas

Ao contrário das condições cutâneas benignas, a expressão de ICAM-1 com queratinócitos de lesões da pele malignas era muito mais variável (Quadro 13). Dos 23 linfomas de células T cutâneas estudados, foram identificados queratinócitos positivos para ICAM-1 em apenas 14 casos. Havia uma tendência para os queratinócitos de biópsias de lesões de micose fungóide perderem expressão de ICAM-1 com o progresso da doença para estádios mais avançados. No entanto, a expressão de ICAM-1 foi observada numa proporção variável dos infiltrados de células mononucleares da maior parte das lesões de linfoma de células T cutâneas. Entre os restantes linfomas estudados, quatro de entre oito tinham queratinócitos que expressavam ICAM-1. Dos 29 pacientes com doenças cutâneas malignas examinados, 5 tinham queratinócitos que expressavam HLA-DR sem expressarem ICAM-1 (Quadro 14).

QUADRO 14

Expressão de ICAM e de HLA-DR em Queratinócitos de Doenças Cutâneas Malignas

Diagnóstico	Nº de casos	Apenas ICAM-1	Apenas HLA-DR	ICAM-L + HLA-DR
CTCL, MFI	8	1 <sup>a</sup>	0	4
CTCL, MFII-III	10	1	2	5
CTCL, SS	3	1	0	2
CTCL, Células grandes	2	0	2	0
CBCL	2	0	0	1
Leucemia cutânea	3	1	1	1
Histiocitose X	1	0	0	0

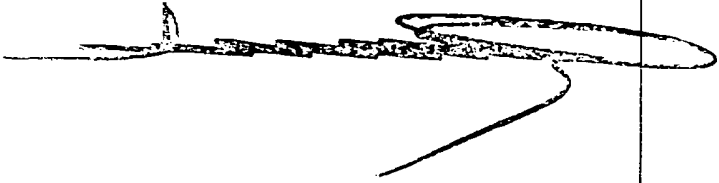
a) As amostras foram consideradas como positivas se pelo menos se coraram pequenos conjuntos de queratinócitos.

EXEMPLO 26

Efeito de Anticorpos Anti-ICAM-1 na Proliferação de Células Mononucleares no Sangue Periférico Humano

A proliferação das células mononucleares do sangue periférico humano é induzida pela presença e pelo reconhecimento de antígenos ou de mitógenos. Certas moléculas, como o mitógeno concanavalina A ou o anticorpo OKT3 de ligação de células T, causam a ocorrência de uma proliferação não específica de células mononucleares no sangue periférico.

As células mononucleares do sangue periférico são heterogêneas no sentido de que são compostas por sub-populações de células que são capazes de reconhecer antígenos específicos. Quando uma célula mononuclear do sangue periférico que é capaz de reconhecer um antígeno específico particular encontra o antígeno, induz-se a proliferação dessa sub-população de células mononucleares. O toxóide do tétano e a hemocianina da Megathura crenulata (Keyhole Limpet hemocyanin) são exemplos de



antigenes que são reconhecidos por sub-população de células mononucleares periféricas mas não são reconhecidos por todas as células mononucleares periféricas em indivíduos sensibilizados.


Ensaaiou-se a capacidade do anticorpo monoclonal anti-ICAM-1 R6-5-D6 para inibir as respostas proliferativas das células mononucleares do sangue periférico em sistemas conhecidos por necessitarem de adesões célula-célula.

Purificaram-se células mononucleares do sangue periférico em gradientes de Ficoll-Paque (Pharmacia), de acordo com as instruções do fornecedor. A seguir a uma concentração na interface, as células foram lavadas três vezes com meio RPMI 1640 e foram cultivadas em placas de microtitulação de 96 alvéolos de fundo plano a uma concentração de  $10^6$  células/ml em meio de RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal de bovino, glutamina 2 mM e gentamicina (50 µg/ml).

Adicionou-se o antigene às células, seja o mitogene de células T, concanavalina A (0,25 µg/ml); o anticorpo OKT3 de ligação de células T (0,001 µg/ml); hemocianina de Megathura crenulata (10 g/ml) ou toxóide de tétano (diluição a 1:100 da origem) e cultivaram-se as células como descrito acima na presença ou na ausência de anticorpo anti-ICAM (R6-5-D6); concentração final de 5 g/ml). Cultivaram-se as células durante 3,5 dias (experiência com concanavalina A), 2,5 dias (experiência com OKT3) ou 5,5 dias (experiências com hemocianina de Megathura crenulata e com toxóide de tétano) antes de terminar as experiências.

Dezoito horas antes de terminar a experiência adicionaram-se 2,5 µCi de  $^3\text{H}$ -timidina às culturas. Determinou-se a proliferação celular por medida da incorporação de timidina no ADN pelas células mononucleares do sangue periférico. A timidina incorporada foi reunida e contada num contador de cintilação líquida (Merluzzi et al., J. Immunol. 139: 166-168 (1987)). Os resultados dessas experiências são apresentados na Figura 16 (experiência com concanavalina A), Figura 17 (experiência com OKT3), Figura 18 (experiência com hemocianina de Megathura crenulata) e Figura 19 (experiência do toxóide de tétano).

Verificou-se que o anticorpo anti-



-ICAM-1 inibe as respostas proliferativas ao mitogene de células T não específicas, ConA; o antigene associado a células T não específicas, OKT-3; e os antigenes específicos, hemocianina de Me-gathura crenulata e toxóide de tétano, em células mononucleares. A inibição pelo anticorpo anti-ICAM-1 era comparável à do anticorpo anti-LFA-1 sugerindo que a ICAM-1 é um ligando funcional da LFA-1 e que este antagonismo da ICAM-1 inibirá as respostas específicas do sistema de defesa.


#### EXEMPLO 27

Efeito do Anticorpo Anti-ICAM-1 na Reacção de Linfócitos Mistos

Como discutido acima, a ICAM-1 é necessária para interacções celulares efectivas durante uma resposta imune mediada por meio de adesão celular dependente de LFA-1. A indução de ICAM-1 durante as respostas imunes ou as doenças inflamatórias permite a interacção de leucócitos entre si e com células endoteliais.

Quando se cultivam linfócitos de dois indivíduos não relacionados na presença uns dos outros, observou-se a transformação dos blastos e a proliferação celular dos linfócitos. Esta resposta de uma população de linfócitos à presença de uma segunda população de linfócitos é conhecida como uma reacção de linfócitos mistos (mixed lymphocyte reaction = MLR) e é análoga à resposta de linfócitos à adição de mitogénios (Immunology The Science of Self-Nonself Discrimination, Klein, J., John Wiley & Sons, NY (1982), pp. 453-458).

As experiências foram levadas a efeito para determinar o efeito dos anticorpos monoclonais anti-ICAM na MLR humana. Estas experiências foram conduzidas como se segue. O sangue periférico foi obtido de doadores normais saudáveis por venipunctura. O sangue foi colhido em tubos com heparina e foram diluídos 1:1 à temperatura ambiente com solução salina equilibrada G de Puck (GIBCO). A mistura de sangue (20 ml) foi depositada numa camada sobre 15 ml de um gradiente de densidade de Ficoll/Hypaque (Pharmacia, densidade = 1,078, temperatura ambiente) e foi centrifugada a 100 x g durante 20 minutos. A



interface foi então separada e lavada 3 x em solução G de Puck. As células foram contadas num hemacitômetro e ressuspensas em meio de cultura RPMI- 1640 (GIBCO) contendo 0,5% de gentamicina, L-glutamina 1 mM (GIBCO) e 5% de soro AB humano inactivo pelo calor (56º C, 30 min) (Flow Laboratories) (seguidamente referido por meio de cultura RPMI).

Usou-se nestas experiências anti-ICAM-1 de rato (R6-5-D6). Todos os anticorpos monoclonais (preparados a partir de ascites por Jackson Immuno Research Laboratories, Boston, MA) foram usados sob a forma de preparações de IgG purificadas.

As células mononucleares de sangue periférico (peripheral blood mononuclear cells = PBMC) foram cultivadas no meio a  $6,25 \times 10^5$  células/ml em placas de microtitulação de fundo redondo Limbro (nº 76-013-05). Irradiaram-se células estimuladoras de um dador separado a 1000 R e cultivaram-se com células receptivas à mesma concentração. O volume total por cultura era de 0,2 ml. As amostras de comparação incluíam apenas células receptivas bem como apenas células estimuladoras. As placas de cultura foram incubadas a 37º C numa atmosfera de ar humificado com 5% de CO<sub>2</sub> durante 5 dias. Os alvéolos de cultura foram agitados com 0,5 µCi de timidina tritiada (<sup>3</sup>HT) (New England Nuclear) durante as últimas 18 horas da cultura. Em alguns casos levou-se a efeito uma MLR de duas vias. O protocolo foi o mesmo exepcto que as células do segundo dador não foram activadas por irradiação.

As células foram colhidas em filtros de fibra de vidro usando um amostrador múltiplo automático (Skatron, Noruega), e foram enxaguadas com água e metanol. Os filtros foram secos numa estirpe e analisados num contador de cintilação líquida Beckman (LS-3810) em Aquasol. Os resultados foram calculados sob a forma de médias  $\pm$  desvio padrão em 6 culturas individuais.

O Quadro 16 mostra que os anticorpos monoclonais anti-ICAM-1 purificados inibem a MLR de um modo dependente da dose com supressão aparente significativa a 20 ng/ml. A IgG purificada tinha pouco ou nenhum efeito. A supressão

de MLR pelo anticorpo monoclonal anti-ICAM-1 ocorre quando o anticorpo é adicionado nas primeiras 24 horas de cultura (Quadro 17).

QUADRO 16

Efeito do Anticorpo Anti-ICAM-1 na Reacção de Linfócitos de uma Via

Incorporação de  $^3\text{HT}$  (CPM) do anticorpo <sup>c)</sup> em Células Receptivas <sup>a)</sup> e Células Estimuladoras <sup>b)</sup>

-	-	-	445 <sup>d</sup>	+ 143
-	+	-	148	+ 17
+	-	-	698	+ 72
<hr/>				
+	+	-	42,626	+ 1,579
<hr/>				
+	+ mIgG (10.0 µg)	36,882	+ 1,823	(14%)
+	+ mIgG ( 0.4 µg)	35,500	+ 1,383	(17%)
+	+ mIgG ( 0.02 µg)	42,815	+ 1,246	( 0%)
<hr/>				
+	+ R6-5-D6 (10.0 µg)	8,250	+ 520	(81%)
+	+ R6-5-D6 ( 0.4 µg)	16,142	+ 858	(62%)
+	+ R6-5-D6 ( 0.03 µg)	28,844	+ 1,780	(32%)

- a) Células Receptivas ( $6,25 \times 10^5/\text{ml}$ ).
- b) Células Estimuladoras ( $6,25 \times 10^5/\text{ml}$ , irradiadas a 1000 R)
- c) Anticorpo Monoclonal Purificado a ICAM-1 (R6-5-D6) ou IgG de rato purificada (mIgG) às concentrações finais ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).
- d) Média  $\pm$  DP das culturas 5 a 6, os números entre parêntesis indicam inibição em percentagem da MLR.

QUADRO 17

Tempo de Adição de Anti-ICAM-1

R <sup>a)</sup>	S <sup>b)</sup>	Adições <sup>c)</sup>	Incorporação de <sup>3</sup> HT (CPM)		
			Tempo de adição do meio ou do anticorpo		
			Dia 0	Dia 1	Dia 2
-	-	meio	205 <sup>d)</sup> ± 14	476 ± 132	247 ± 75
-	+	meio	189 ± 16	nd <sup>e)</sup>	nd
+	-	meio	1,860 ± 615	nd	nd
+	+	meio	41,063 ± 2,940	45,955 ± 2,947	50,943 ± 3,072
+	+	R6-5-D6	17,781 ± 1,293 (57%) <sup>f)</sup>	38,409 ± 1,681 (16%)	47,308 ± 2,089 (7%)

a) Células Receptivas ( $6,25 \times 10^5$ /ml)

b) Células Estimuladoras ( $6,25 \times 10^5$ /ml, irradiadas a 1000 R)

c) Adicionou-se meio de cultura ou anticorpo monoclonal purificado do anti-ICAM-1 (R6-5-D6) a  $10 \mu\text{g/ml}$  no dia 0 a 24 horas de intervalo.

d) Média  $\pm$  DP das culturas 4 a 6


e) nd = não efectuado

f) Percentagem de inibição

Em resumo, a capacidade do anticorpo contra ICAM-1 para inibir a MLR mostra que os anticorpos monoclonais anti-ICAM-1 têm utilidade terapêutica na rejeição aguda de enxertos. Os anticorpos monoclonais anti-ICAM-1 também têm utilidade terapêutica em afecções mediadas imunológicas relacionadas dependentes de células reguladas por LFA-1/ICAM-1 a interações celulares.

Estas experiências descritas mostram que a adição de anticorpos monoclonais anti-ICAM-1 inibe a reacção de linfócitos mistos (MLR) quando efectuada durante as primeiras 24 horas de reacção. Além disso a ICAM-1 é regulada com tendência a aumentar nos monócitos do sangue periférico humano durante a cultura in vitro.

Além disso, verificou-se que a ICAM-1 não é expressa em linfócitos ou em monócitos de sangue periférico humano. A ICAM-1 é regulada com tendência a aumentar nos mo



nócitos de células cultivadas isoladamente ou de células cultivadas em conjunto com células de dadores não relacionados numa reacção de linfócitos mistos usando análises citométricas de caudal normais (Figura 20). Esta regulação para o aumento da ICAM-1 nos monócitos pode ser usada como indicador de inflamação, particularmente se a ICAM-1 é expressa em monócitos frescos de indivíduos com inflamação aguda crónica.

A especificidade da ICAM-1 para monócitos activados e a capacidade do anticorpo contra ICAM-1 para inibir uma MLR sugerem que os anticorpos monoclonais contra ICAM-1 podem ter utilidade potencial para diagnóstico e para terapia na rejeição aguda de enxertos e nas afecções mediadas pelo sistema imune relacionadas que requerem interacções célula a célula.

#### EXEMPLO 28

##### Efeitos Sinérgicos da Administração Combinada de Anticorpos Anti-ICAM-1 e Anti-LFA-1

Conforme se apresenta no Exemplo 27, a MLR é inibida pelo anticorpo anti-ICAM-1. A MLR pode também ser inibida pelo anticorpo anti-LFA-1. A fim de determinar se a administração combinada dos anticorpos anti-ICAM-1 e anti-LFA-1 teria um efeito realçado ou sinérgico, levou-se a efeito uma análise de MLR (realizada conforme descrito no Exemplo 27) na presença de várias concentrações dos dois anticorpos.

Esta análise de MLR revelou que a combinação de anti-ICAM-1 com anti-LFA-1, a concentrações às quais nenhum dos anticorpos isoladamente inibe consideravelmente a MLR, é significativamente mais potente na inibição da resposta por MLR (Quadro 18). Este resultado indica que as terapias que envolvem a co-administração do anticorpo anti-ICAM-1 (ou de fragmentos deste) e de anticorpo anti-LFA-1 (ou de fragmentos deste) têm a capacidade de proporcionar uma terapia anti-inflamatória melhorada. Esta terapia melhorada permite a administração de doses inferiores do anticorpo em relação à que seria de outro modo terapêuticamente efectiva e tem importância em circunstâncias nas quais as altas concentrações de anticorpos individuais induzem

uma resposta anti-idiotípica.

#### QUADRO 18

Efeitos de várias Doses de Anti-ICAM-1 e de Anti-LFA-1 (R3-1) na Reacção de Linfócitos Mistos

Concentração (ug/ml)	% de Inibição					
	Anti-ICAM-1 (R6-5-D6)					
Anti-LFA-1	0	.004	.02	.1	.5	2.5
0.0	0	7	31	54	69	70
0.0008	1	7	28	48	62	71
0.004	0	13	30	50	64	72
0.02	29	38	64	75	84	86
0.1	92.5	90	91	92	92	92
0.5	93	90	90	92	93	91

#### EXEMPLO 29

Efeito do Anticorpo Anti-ICAM-1 na Supressão da Rejeição de Órgãos Alógenos Transplantados

A fim de demonstrar o efeito do anticorpo anti-ICAM-1 na supressão da rejeição de um órgão alógeno transplantado, fizeram-se transplantações alógenas de rins para macacos *Cynomolgus* de acordo com o método descrito por Cosimi et al., (Transplant. Proc. 13: 499-503 (1981)), com a modificação de que se usou Valium e cetamina para anestesia.

Deste modo, a transplantação do rim foi levada a efeito essencialmente como se segue: Levaram-se a efeito enxertos renais heterotrópicos em macacos *Cynomolgus* de 3 a 5 kg, essencialmente como descrito por Marquet (Marquet et al., Medical Primatology, Part II, Basileia, Karger, P. 125 (1972)) após indução de anestesia com Valium e cetamina. Construíram-se anastomoses extremidade-para-lado dos vasos renais do dador num retalho de aorta ou de veia cava usando sutura 7-0 de Prolene. O

ureter do dador foi retirado com uma espátula e implantado na bexiga por abordagem extravesical (Taguchi, Y., et al., em Dausset et al., (eds.), em: Advances in Transplantation, Baltimore, Williams & Wilkins, p. 393 (1968)). A função renal foi avaliada por determinações de creatinina do soro semanais ou bi-semanais. Além disso obtiveram-se biópsias frequentes do enxerto para exame histopatológicas e realizaram-se autópsias completas em todos os receptores não sobreviventes. Na maioria dos receptores, realizou-se nefrectomia bilateral na ocasião da transplantação e a morte urêmica subsequente foi considerada como o ponto final da sobrevivência do enxerto. Em alguns receptores efectuaram-se nefrectomia nativa unilateral e ligação ureteral contralateral na ocasião da transplantação. Quando ocorreu rejeição dos enxertos, a ligação do ureter autólogo foi então removida resultando a restauração da função renal normal e a oportunidade de continuar a monitorização imunológica do animal receptor.

Administrou-se o anticorpo monoclonal R6-5-D6 diariamente durante 12 dias antes do transplante a uma dose de 1 a 2 mg/kg dia. Os níveis de creatinina no soro foram determinadas periodicamente a fim de monitorizar a rejeição. O efeito do anticorpo anti-ICAM-1 na rejeição pelo sistema imune dos rins alógenos é apresentado no Quadro 15.


#### QUADRO 15

##### Tempo de Sobrevivência de Receptores de Rins Alógenos

Macaco de comparação n°	Tempo de Sobrevivência (dias)	Macaco n° tratado com R6-5-D6	Tempo de sobrevivência (dias) <sup>a)</sup>
1	8	1	20
2	11	2	8
3	11	3	30
4	10	4	31
5	9	5	11
6	10	6	23 <sup>b</sup>

a) Foi administrado aos animais 1 a 2 mg/kg. dia durante 12 dias com início nos 2 dias antes da transplantação.

b) Ainda vivendo em 8 de Abril de 1988.



Os resultados mostram que o anticorpo R6-5-D6 era eficaz no prolongamento das vidas dos macacos que receberam transplantações de rins alógenos.

A presente invenção foi descrita em relação com os respectivos modos específicos de concretização, mas deverá entender-se que poderá ser submetida a outras modificações e deverá entender-se que a presente invenção abrange quaisquer variações, usos ou adaptações da invenção seguindo, em geral, os princípios da invenção e incluindo as divergências da presente memória descritiva tal como decorrem de práticas conhecidas ou habituais da técnica à qual a invenção pertence e como podem ser aplicadas às características essenciais anteriormente apresentadas, conforme se segue de acordo com o âmbito das reivindicações anexas.

## REIVINDICAÇÕES

- 1<sup>a</sup> -

Processo para a preparação de ICAM-1 substancialmente livre de contaminantes naturais caracterizado por compreender as fases de:

- (a) solubilizar ICAM-1 a partir das membranas de células que expressam ICAM-1, de modo a que se obtenha um preparado de ICAM-1 solubilizado,
- (b) introduzir o referido preparado de ICAM-1 solubilizado numa matriz de afinidade que contém imobilizado um anticorpo com capacidade de se ligar a ICAM-1,
- (c) permitir ao referido ICAM-1 que se ligue ao referido anticorpo da referida matriz de afinidade,
- (d) remover da referida matriz todos os compostos que não tenham capacidade para estabelecerem ligação com o referido anticorpo e
- (e) recuperar o referido ICAM-1 sob a forma substancialmente pura por meio de eluição do referido ICAM-1 a partir da referida matriz.

- 2<sup>a</sup> -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender adicionalmente as seguintes fases:

- (f) purificar o referido ICAM-1 recuperado da fase (e) por meio de electroforese preparativa e gel e
- (g) eluir o referido ICAM-1 recuperado a partir do gel utilizado na fase (f).

- 3<sup>a</sup> -


Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 ou 2, caracterizado por o ICAM-1 referido possuir adicionalmente capacidade de ligação a uma molécula presente na superfície de um linfócito.

- 4<sup>a</sup> -

Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o referido ICAM-1 conter pelo menos um polipeptídeo seleccionado a partir de um grupo constituído por:

- (a) -V-T-C-S-T-S-C-D-Q-P-K;
- (b) -X-G-S-V-L-V-T-C-S-T-S-C-D-Q-P-K;
- (c) -L-L-G-I-E-T-P-L;
- (d) -F-L-T-V-Y-X-T;
- (e) -V-E-L-A-P-L-P;
- (f) -E-L-D-L-R-P-Q-G-L-E-L-F-E;
- (g) -L-N-P-T-V-T-Y-G-X-D-S-F-S-A-K;
- (h) -S-F-P-A-P-N-V;
- (i) -L-R-G-E-K-E-L;
- (j) -R-G-E-K-E-L-K-R-E-P;
- (k) -L-R-G-E-K-E-L-K-R-E-P-A-V-G-E-P-A-E;
- (l) -P-R-G-G-S;
- (m) -P-G-N-N-R-K;
- (n) -Q-E-D-S-Q-P-M;
- (o) -T-P-E-R-V-E-L-A-P-L-P-S;
- (p) -R-R-D-H-H-G-A-N-F-S; e
- (q) -D-L-R-P-Q-G-L-E.

- 5<sup>a</sup> -



- 5<sup>a</sup> -

Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por se obter um derivado funcional de ICAM-1 que é um fragmento de ICAM-1 com capacidade de ligação a uma molécula presente na superfície de um linfócito.

- 6<sup>a</sup> -

Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por se obter um derivado funcional de ICAM-1 que é um variante de ICAM-1 com capacidade de ligação a uma molécula presente na superfície de um linfócito.


- 7<sup>a</sup> -

Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por se obter um derivado funcional de ICAM-1 que é um análogo de ICAM-1 com capacidade de ligação a uma molécula presente na superfície de um linfócito.

- 8<sup>a</sup> -

Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por se obter um derivado funcional de ICAM-1 que é um derivado químico de ICAM-1 com capacidade de ligação a uma molécula presente na superfície de um linfócito.

- 9<sup>a</sup> -



- 9<sup>a</sup> -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8, caracterizado por a molécula do ICAM-1 referido ou do respectivo derivado funcional ser marcada de modo detectável.

- 10<sup>a</sup> -

Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por a referida marcação ser seleccionada de entre o grupo constituído por um radioisótopo, uma enzima, uma marca por afinidade, uma marca por fluorescência, uma marca para magnética e uma marca por um radical livre.

- 11<sup>a</sup> -

Processo para a preparação de uma molécula de ADN capaz de expressar ICAM-1 ou um seu derivado funcional caracterizado por se seleccionar um ADN contendo o gene de ICAM-1 ou um seu fragmento de entre um banco de vectores lançadeiras de inserções de ADNc ou por se sintetizar uma sequência de ADN que codifique para a sequência de ácidos aminados do ICAM-1 ou dum seu fragmento e por se clonar este ADN eventualmente após selecção por hibridação.

- 12<sup>a</sup> -

Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por o referido ICAM-1 ou o referido seu de

~~SECRET~~


rivado funcional ter a capacidade de codificar pelo menos um polipeptídeo seleccionado de entre o grupo constituído por:

- (a) -V-T-C-S-T-S-C-D-Q-P-K;
- (b) -X-G-S-V-L-V-T-C-S-T-S-C-D-Q-P-K;
- (c) -L-L-G-I-E-T-P-L;
- (d) -F-L-T-V-Y-X-T;
- (e) -V-E-L-A-P-L-P;
- (f) -E-L-D-L-R-P-Q-G-L-E-L-F-E;
- (g) -L-N-P-T-V-T-Y-G-X-D-S-F-S-A-K;
- (h) -S-F-P-A-P-N-V;
- (i) -L-R-G-E-K-E-L;
- (j) -R-G-E-K-E-L-K-R-E-P;
- (k) -L-R-G-E-K-E-L-K-R-E-P-A-V-G-E-P-A-E;
- (l) -P-R-G-G-S;
- (m) -P-G-N-N-R-K;
- (n) -Q-E-D-S-Q-P-M;
- (o) -T-P-E-R-V-E-L-A-P-L-P-S;
- (p) -R-R-D-H-H-G-A-N-F-S; e
- (q) -D-L-R-P-Q-G-L-E.

- 13<sup>a</sup> -

Processo para a preparação de um anticorpo com capacidade de ligação a uma molécula escolhida de entre o grupo constituído por ICAM-1 e por um derivado funcional de ICAM-1 caracterizado por compreender as fases de:

- (A) imunizar um animal com uma célula que expresse ICAM-1,
- (B) fundir as células do baço do referido animal com uma linha de células de mieloma,
- (C) permitir a formação de células de hibridomas que segregam anticorpos a partir das células fundidas de baço e de mieloma,
- (D) escrutinar as referidas células de hibridoma para isolamento das referidas células de hibridoma pretendidas que possuem a capacidade de produzir um anticorpo capaz de ligação a ICAM-1 ou a um derivado funcional de ICAM-1 e



(E) isolar o referido anticorpo a partir de uma cultura das referidas células.

- 14<sup>a</sup> -

Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por o referido anticorpo ser um anticorpo monoclonal.

- 15<sup>a</sup> -


Processo de acordo com a reivindicação 14, caracterizado por o anticorpo monoclonal ser R6-5-D6.

- 16<sup>a</sup> -

Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por a molécula referida possuir capacidade de ligação a um receptor presente na superfície de um linfócito e a ligação do referido anticorpo à referida molécula prejudicar a capacidade da referida molécula para se ligar à referida molécula receptora do referido linfócito.

- 17<sup>a</sup> -

Processo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado por o referido anticorpo ser um anticorpo monoclonal.



- 18<sup>a</sup> -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 13 a 17, caracterizado por o anticorpo ser marcado.

- 19<sup>a</sup> -


Processo para a preparação de uma célula de hibridoma com capacidade de produzir um anticorpo monoclonal de acordo com qualquer das reivindicações 14, 15 e 17, caracterizado por compreender as fases de:

- (A) imunizar um animal com uma célula que expresse ICAM-1,
- (B) fundir as células do baço do referido animal com uma linha de células de mieloma,
- (C) permitir a formação de células de hibridomas que segregam anticorpos a partir das células fundidas de baço e de mieloma,
- (D) escrutinar as referidas células de hibridoma para isolamento das referidas células de hibridoma pretendidas que possuem a capacidade de produzir um anticorpo capaz de ligação a ICAM-1 ou a um derivado funcional de ICAM-1.

- 20<sup>a</sup> -

Processo de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por a referida célula de hibridoma com capacidade para produzir o anticorpo monoclonal R6-5-D6 ser a célula ATCC HB 9580.

- 21<sup>a</sup> -



- 21<sup>a</sup> -

Processo para a preparação de um fragmento de anticorpo com capacidade de se ligar à referida molécula caracterizado por o referido fragmento ser obtido a partir de um anticorpo de acordo com qualquer das reivindicações 13 a 17.

- 22<sup>a</sup> -

Processo de acordo com a reivindicação 21, caracterizado por o referido fragmento se apresentar sob forma marcada.

- 23<sup>a</sup> -

Processo de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por na fase (A) o animal referido ser imunizado com uma célula que expressa ICAM-1 mas não expressa LFA-1 e por a fase (D) referida compreender as fases de:

- (1) incubar o anticorpo segregado de qualquer das referidas células de hibridoma com um preparado de linfócitos que contém uma pluralidade de células com capacidade de agregação,
- (2) examinar o referido anticorpo segregado no que respeita à respectiva capacidade para inibir a agregação das referidas células do referido preparado de linfócitos e
- (3) seleccionar para a referida célula de hibridoma pretendida uma célula de hibridoma que produz um anticorpo com capacidade de inibição da referida agregação das referidas células do referido preparado de linfócitos.

Processo de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por a fase (D) de escrutínio referida compreender as fases de:

- (1) incubar o anticorpo segregado de qualquer das referidas células de hibridoma com um preparado de linfócitos que contem uma pluralidade de células com as características de:
  - (a) serem aptas para se agregarem e
  - (b) não serem aptas para se agregarem na presença de um anticorpo com capacidade de se ligar a ICAM-1,
- (2) verificar que o referido anticorpo segregado da referida célula de hibridoma não se liga a um membro da família de moléculas LFA-1,
- (3) seleccionar para a referida célula de hibridoma pretendida uma célula de hibridoma que produz um anticorpo com capacidade de inibição da agregação espontânea das referidas células do referido preparado de linfócitos e
- (4) verificar que o referido anticorpo seleccionado da referida célula de hibridoma não se liga às moléculas da família de LFA-1.

Processo para a identificação de um antagonista de adesão intercelular que não é uma imunoglobulina caracterizado por compreender as fases de:

- (A) incubar um agente capaz de ser um antagonista de adesão intercelular que não é uma imunoglobulina com um preparado de linfócitos que contém uma pluralidade de células com capacidade de agregação,
- (B) examinar o referido preparado de linfócitos a fim de determinar se a presença do referido agente inibe a agregação das referidas células do referido preparado de linfócitos;

sendo que a inibição da referida agregação identifica o referido agente como um antagonista da adesão intercelular.

- 26<sup>a</sup> -

Processo para a preparação de um agente para o tratamento da inflamação resultante de uma resposta do sistema específico de defesa de um mamífero ou para a supressão de metástases de numa célula tumoral hematopoiética que requer um membro funcional da família LFA-1 para migração caracterizado por se incorporar como princípio activo uma quantidade adequada para o fim em vista dum agente seleccionado de entre o grupo constituído por: um anticorpo com capacidade de se ligar a ICAM-1; um fragmento de um anticorpo, tendo o referido fragmento a capacidade de se ligar a ICAM-1; ICAM-1; um derivado funcional de ICAM-1; e um antagonista de ICAM-1 que não seja uma imunoglobulina, quando os referidos agentes são obtidos de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 10, 13 a 18, 21 a 22 ou 25.

- 27<sup>a</sup> -

Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por o referido antagonista do ICAM-1 que não é uma imunoglobulina ser diferente de LFA-1.

- 28<sup>a</sup> -

Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por o referido agente anti-inflamatório ser um anticorpo com capacidade de ligação a ICAM-1.

- 29a -

Processo de acordo com a reivindicação 28, caracterizado por o referido anticorpo ser um anticorpo monoclonal.

- 30a -

Processo de acordo com a reivindicação 29, caracterizado por o referido anticorpo monoclonal ser o anticorpo monoclonal R6-5-D6.

- 31a -

Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por o referido agente anti-inflamatório ser um fragmento de um anticorpo com capacidade de ligação a ICAM-1.

- 32a -

Processo de acordo com a reivindicação 31, caracterizado por o referido fragmento ser um fragmento do anticorpo R6-5-D6.

- 33a -

Processo para a preparação de um agente para a supressão do crescimento de células tumorais que

- 111 -

expressam ICAM-1 caracterizado por se incorporar como princípio activo uma quantidade adequada para o fim em vista duma toxina seleccionada de entre o grupo constituído por um anticorpo derivatizado por uma toxina com capacidade de ligação a ICAM-1; um fragmento de anticorpo derivatizado por uma toxina com capacidade de ligação a ICAM-1; um membro da família de moléculas LFA-1 derivatizado por uma toxina e um derivado funcional de um membro da família de moléculas LFA-1 derivatizado por uma toxina.

- 34a -

Processo para a preparação de uma composição para o diagnóstico da presença e para a localização de uma inflamação resultante de uma resposta do sistema específico de defesa num mamífero caracterizado por se incorporar um ligante marcado de modo a ser detectável com capacidade de identificar uma célula que expresse ICAM-1.

- 35a -

Processo para a detecção e localização de uma inflamação resultante de uma resposta do sistema específico de defesa num mamífero que se suspeite ter a referida inflamação caracterizado por compreender as fases de:

- (a) incubar uma amostra de tecido do presumível paciente com uma composição contendo um ligante marcado detectável com capacidade de identificar uma célula que expressa ICAM-1 e
- (b) detectar o referido ligante.

- 36a -

Processo de acordo com qualquer das

- 112 -

reivindicações 34 e 35, caracterizado por o referido ligante estar ligado na referida amostra ao tecido referido.

- 37a -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 34 e 35, caracterizado por o referido ligante ter a capacidade de se ligar a ICAM-1 e ser seleccionado de entre o grupo constituído por um anticorpo e um fragmento de um anticorpo.

- 38a -

Processo de acordo com a reivindicação 37, caracterizado por o referido anticorpo ser um anticorpo monoclonal.

- 39a -

Processo de acordo com a reivindicação 38, caracterizado por o referido anticorpo monoclonal ser o anticorpo monoclonal R6-5-D6.

- 40a -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 34 e 35, caracterizado por o referido ligante ser uma molécula de ácido nucleico com capacidade de ligação a uma molécula seleccionada de entre o grupo constituído por uma sequência de ADN de ICAM-1 e uma sequência de ARNm de um gene

- 113 -

para ICAM-1.

- 41a -

Processo de acordo com a reivindicação 40, caracterizado por a referida molécula de ácido nucleico codificar para pelo menos um polipeptídeo seleccionado de entre o grupo constituído por:

- (a) -V-T-C-S-T-S-C-D-Q-P-K;
- (b) -X-G-S-V-L-V-T-C-S-T-S-C-D-Q-P-K;
- (c) -L-L-G-I-E-T-P-L;
- (d) -F-L-T-V-Y-X-T;
- (e) -V-E-L-A-P-L-P;
- (f) -E-L-D-L-R-P-Q-G-L-E-L-P-E;
- (g) -L-N-P-T-V-T-Y-G-X-D-S-P-S-A-K;
- (h) -S-F-P-A-P-N-V;
- (i) -L-R-G-E-K-E-L;
- (j) -R-G-E-K-E-L-K-R-E-P;
- (k) -L-R-G-E-K-E-L-K-R-E-P-A-V-G-E-P-A-E;
- (l) -P-R-G-G-S;
- (m) -P-G-N-N-R-K;
- (n) -Q-E-D-S-Q-P-M;
- (o) -T-P-E-R-V-E-L-A-P-L-P-S;
- (p) -R-R-D-H-H-G-A-N-F-S; e
- (q) -D-L-R-P-Q-G-L-E.

- 42a -

Processo para a preparação de uma composição para o diagnóstico da presença e para a localização de células tumorais que expressam ICAM-1 num mamífero caracterizado por se incorporar um ligante marcado de modo a ser detectável com capacidade de ligação a ICAM-1, sendo o referido ligante seleccionado de entre o grupo constituído por um anticorpo e

- 114 -

um fragmento de um anticorpo com capacidade de ligação a ICAM-1.

- 43a -

Processo para a detecção e localização de células tumorais que expressam ICAM-1 num mamífero que se suspeite ter as referidas células caracterizado por compreender as fases de:

- (a) incubar uma amostra de tecido do presumível paciente com uma composição contendo um ligante marcado detectável com capacidade de se ligar a ICAM-1 e
- (b) detectar o referido ligante.

- 44a -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 42 e 43, caracterizado por o referido ligante se ligar ao ICAM-1 presente na referida amostra de tecido.

- 45a -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 42 e 43, caracterizado por o referido ligante ser seleccionado de entre o grupo constituído por: um anticorpo monoclonal com capacidade de ligação de ICAM-1; e um fragmento do referido anticorpo monoclonal que possui capacidade de ligação de ICAM-1.

- 46a -

- 46a -

Processo de acordo com a reivindicação 45, caracterizado por o referido anticorpo monoclonal ser o anticorpo monoclonal R6-5-D6.

- 47a -

Processo para a preparação de uma composição para o diagnóstico da presença e para a localização de células tumorais que expressam um membro da família LFA-1 de moléculas num paciente que se suspeite possuir as referidas células caracterizado por se incorporar um ligante marcado de modo a ser detectável com capacidade de ligação a um membro da família LFA-1 de moléculas sendo o referido ligante seleccionado de entre o grupo constituído por ICAM-1 e por um derivado funcional de ICAM-1.

- 48a -

Processo para a detecção e localização de células tumorais que expressam um membro da família LFA-1 de moléculas num paciente que se suspeite ter as referidas células caracterizado por compreender as fases de:

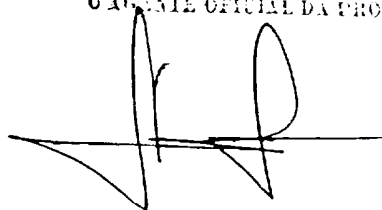
- (a) incubar uma amostra de tecido do presumível paciente na presença de uma composição contendo um ligante marcado detectável com capacidade de se ligar a um membro da família LFA-1 de moléculas, sendo o referido ligante seleccionado de entre o grupo constituído por ICAM-1 e um derivado funcional de ICAM-1
- (b) detectar o referido ligante que esteja ligado a um membro da família LFA-1 de moléculas presente na referida amostra ou tecido

- 116 -

A requerente declara que os primeiros pedidos desta patente foram apresentados nos Estados Unidos da América, em 4 de Maio de 1987, 1 de Novembro de 1987 e 16 de Fevereiro de 1988, sob os números de série 045,963, 115,798 e 155,943, respectivamente.

Lisboa, 3 de Maio de 1988.

AGÊNCIA OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a horizontal line at the bottom, positioned below the text of the agency.

RESUMO

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO INTERCELULAR E DE LIGANTES QUE PROMOVEM A LIGAÇÃO DESTAS MOLÉCULAS BEM COMO DE AGENTES TERAPÊUTICOS E DE DIAGNÓSTICO QUE OS CONTÊM"

A invenção refere-se a um processo para a preparação de ICAM-1, substancialmente livre de contaminantes naturais que compreende as fases de:

- (a) solubilizar ICAM-1 a partir das membranas de células que expressam ICAM-1, de modo a que se obtenha um preparado de ICAM-1 solubilizado,
- (b) introduzir o referido preparado de ICAM-1 solubilizado numa matriz de afinidade que contém imobilizado um anticorpo com capacidade de se ligar a ICAM-1,
- (c) permitir ao referido ICAM-1 que se ligue ao referido anticorpo da referida matriz de afinidade,
- (d) remover da referida matriz todos os compostos que não tenham capacidade para estabelecerem ligação com o referido anticorpo e
- (e) recuperar o referido ICAM-1 sob forma substancialmente pura por meio de eluição do referido ICAM-1 a partir da referida matriz.

Fig. 1

**FIG.1**

*Adesão das células normais deficientes em LFA 1*

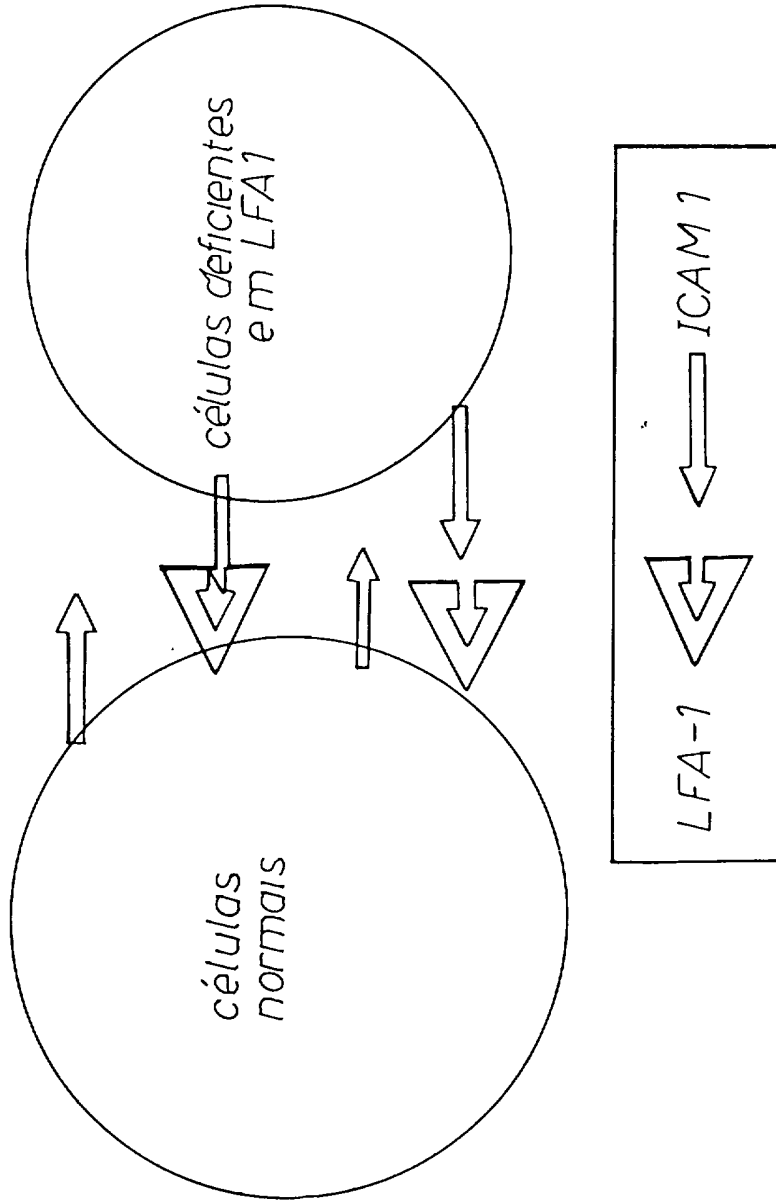


FIG. 2

*Adesão de células normal/normal*

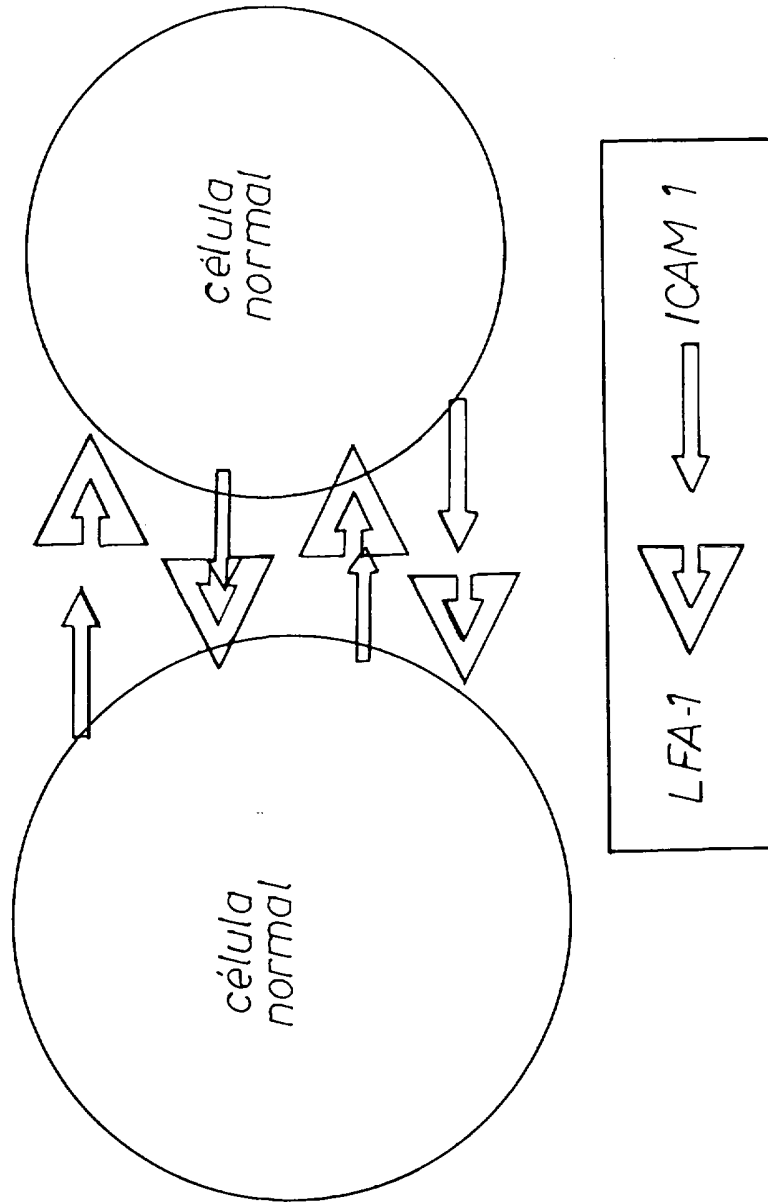


FIG. 3

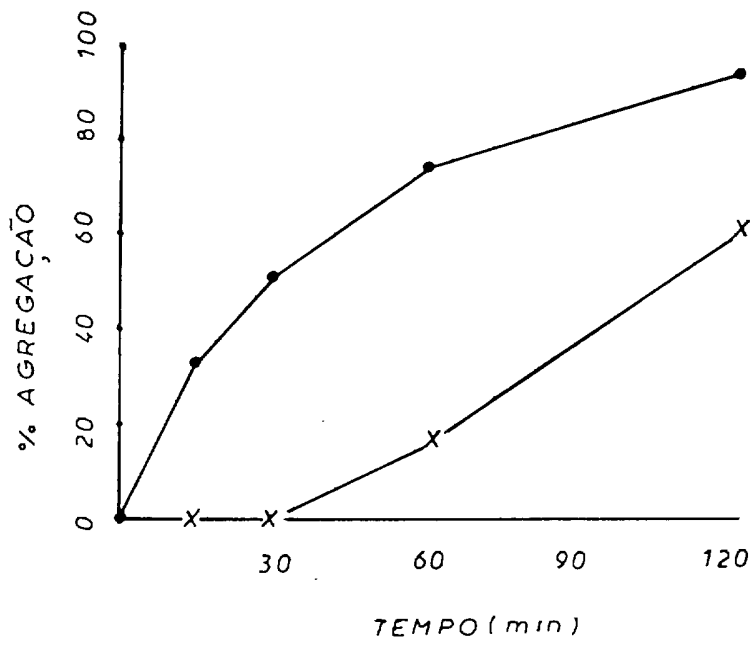


FIG. 4

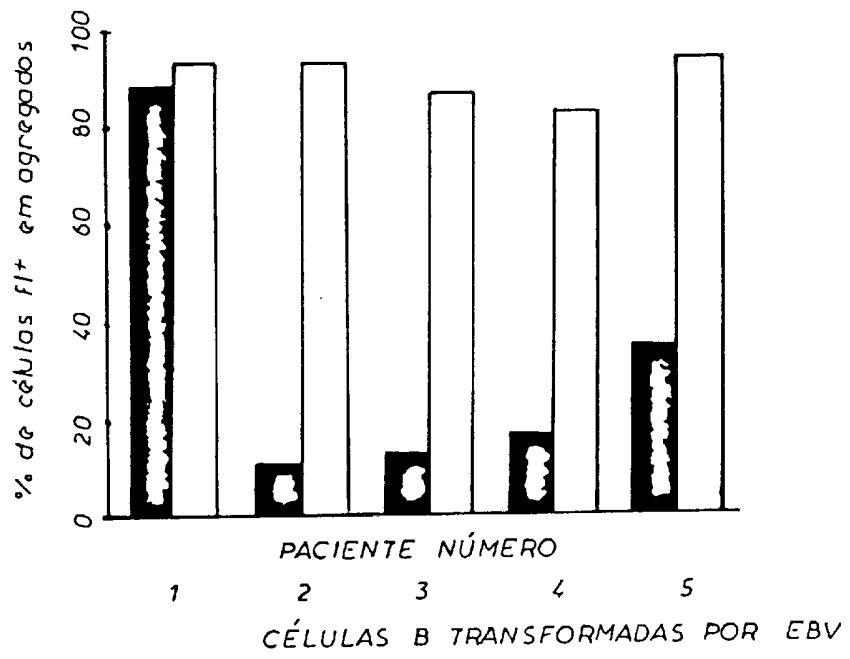


FIG 5

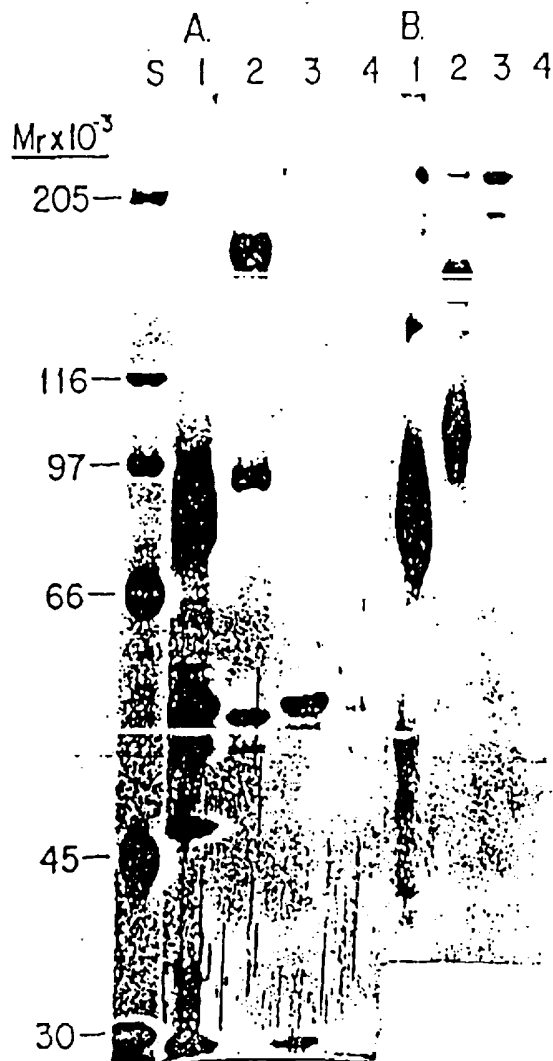


FIG.6

LIGAÇÃO ESPECÍFICA DE  $^{125}\text{I}$  (cpm  $\times 10$ )

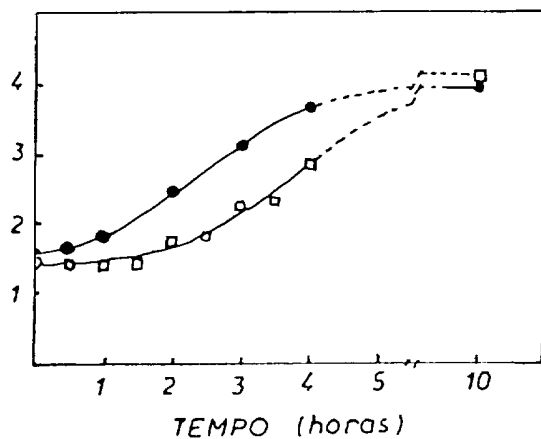


FIG.7

LIGAÇÃO ESPECÍFICA DE  $^{125}\text{I}$  (cpm  $\times 10^{-3}$ )

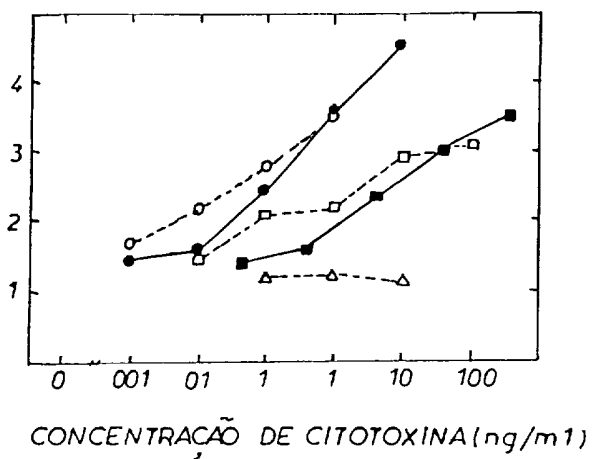
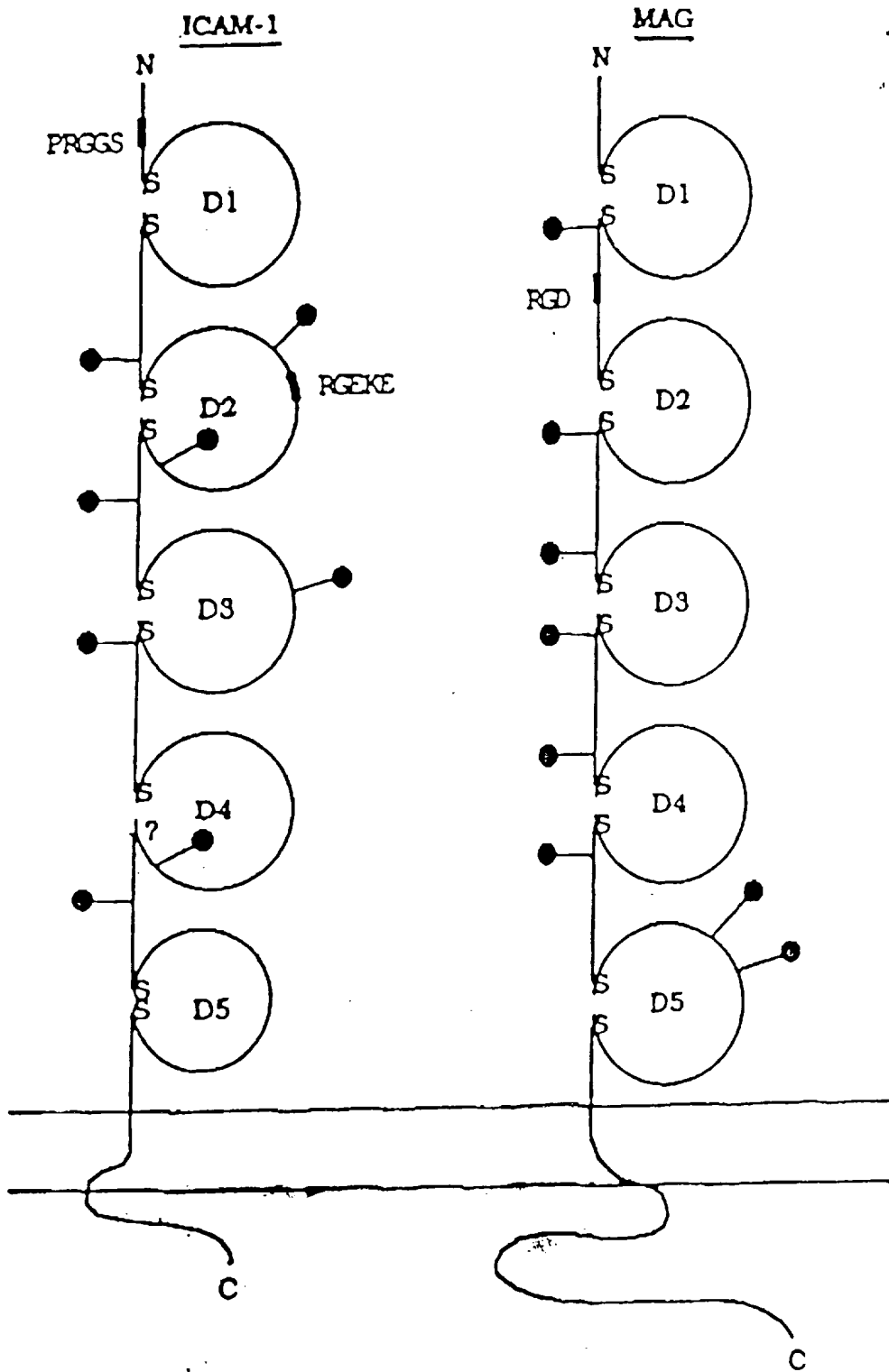






FIG 10



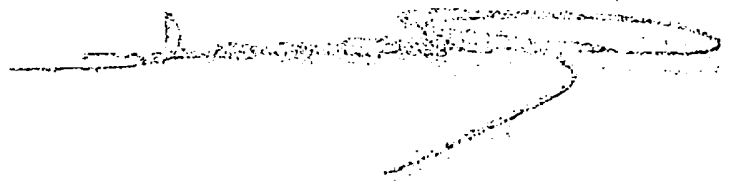
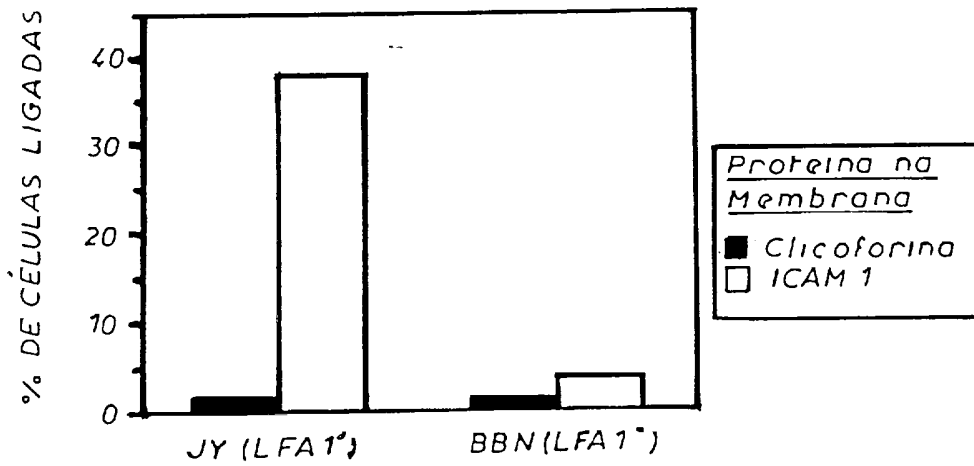
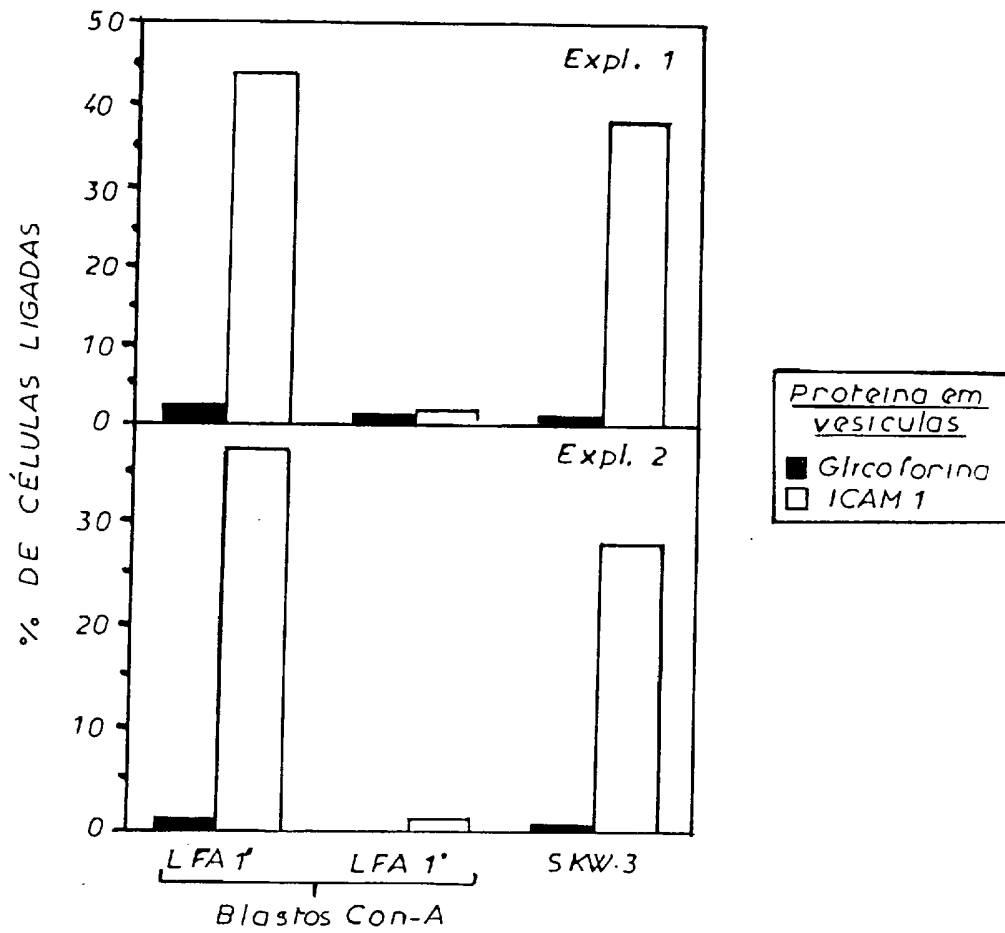


FIG. 11



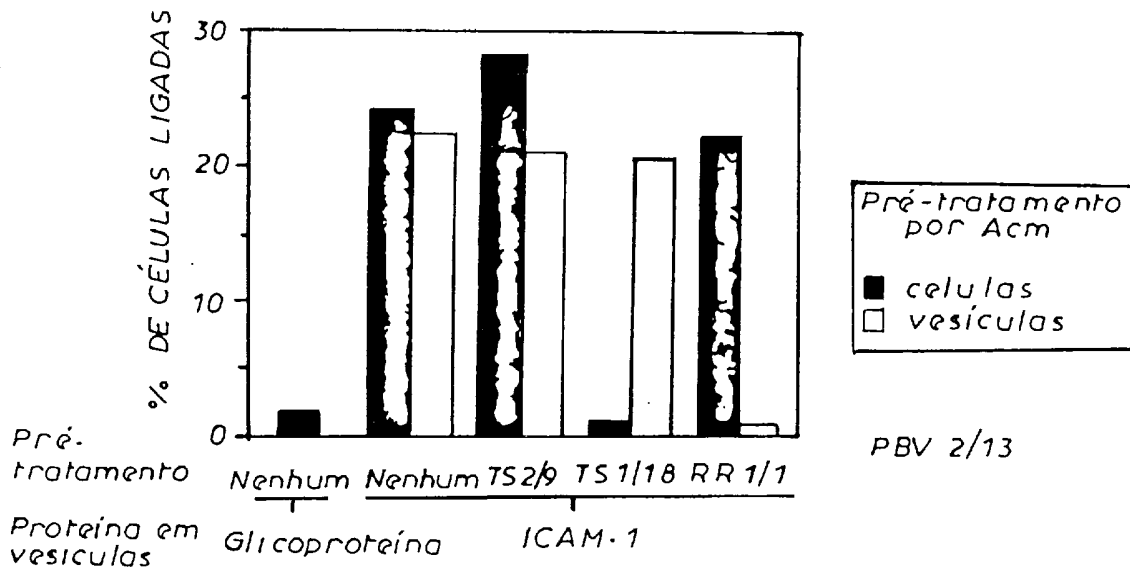
*Células linfoblásticas B LFA 1 positivas transformadas por EBV ligam-se a ICAM 1 em membranas planares*

FIG. 12



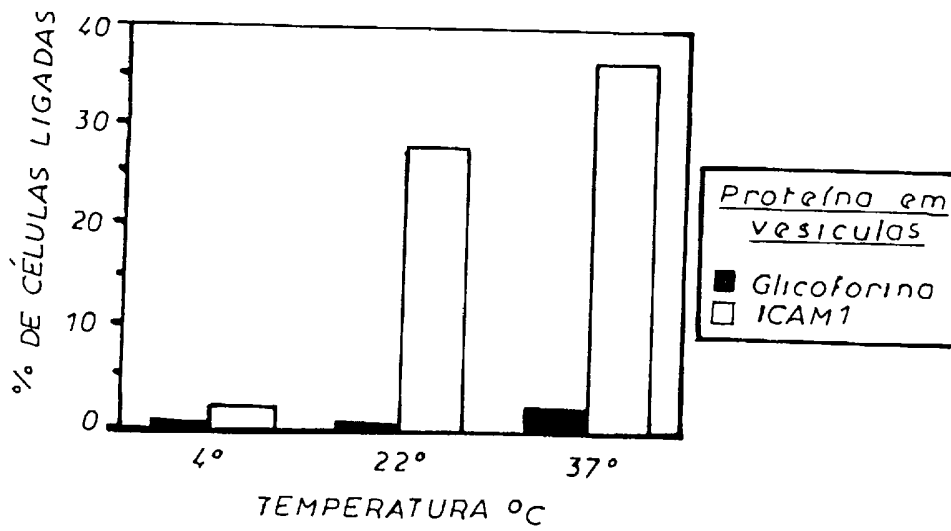
Linfoblastos T LFA 1 positivos e células T de linfoma ligam-se a ICAM 1 em vesículas a plástico

FIG. 13



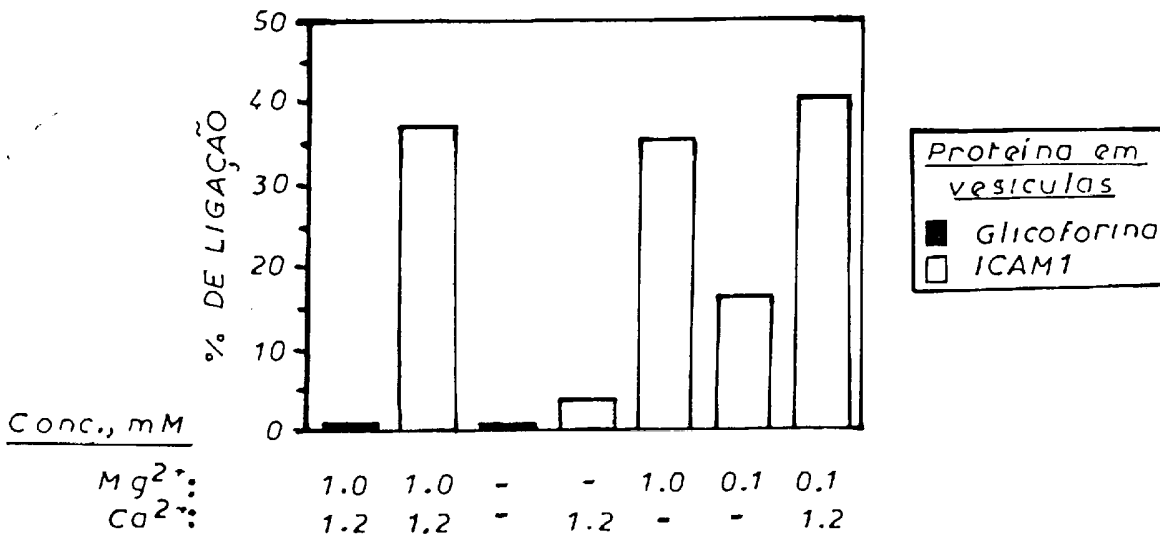
Inibição da ligação de células linfoblásticas B JY a ICAM 1 em vesículas ligadas a plástico por pré-tratamento das células ou das vesículas com anticorpos monoclonais

FIG 14



Efeito da temperatura na ligação de linfoblastos  
T a ICAM 1 em vesículas ligadas a plásticos

FIG. 15



Necessidade de cátions divalentes para a ligação de linfoblastos T a ICAM 1 em vesículas ligadas a plástico.

FIG. 16

Efeito de anticorpo antiadesão na proliferação de células mononucleares do sangue periférico humano induzida por OKT3

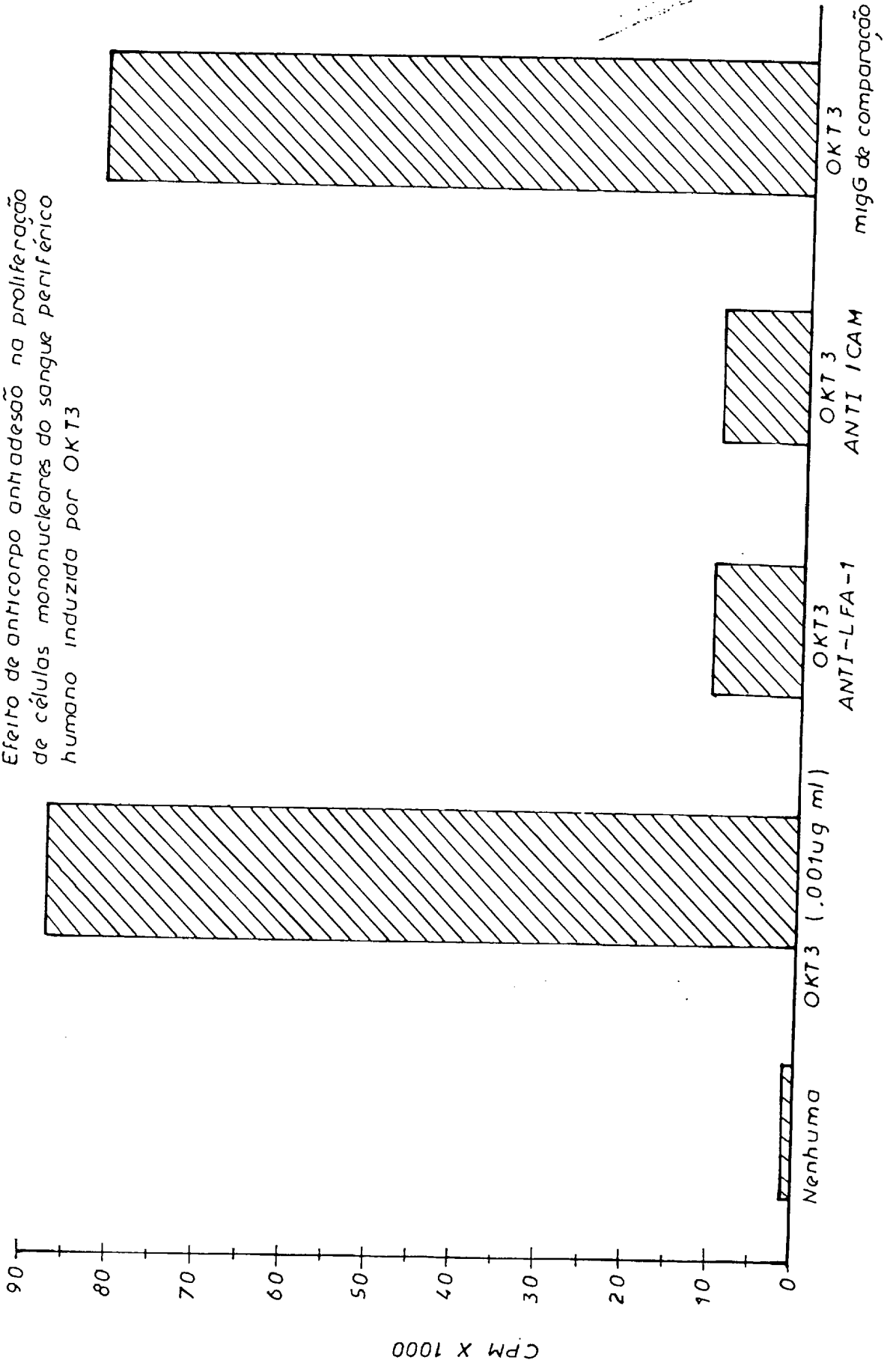


FIG.17

Efeito de anticorpo antiadesão na proliferação de células mononucleares de sangue periférico humano induzida por concanavalina A.

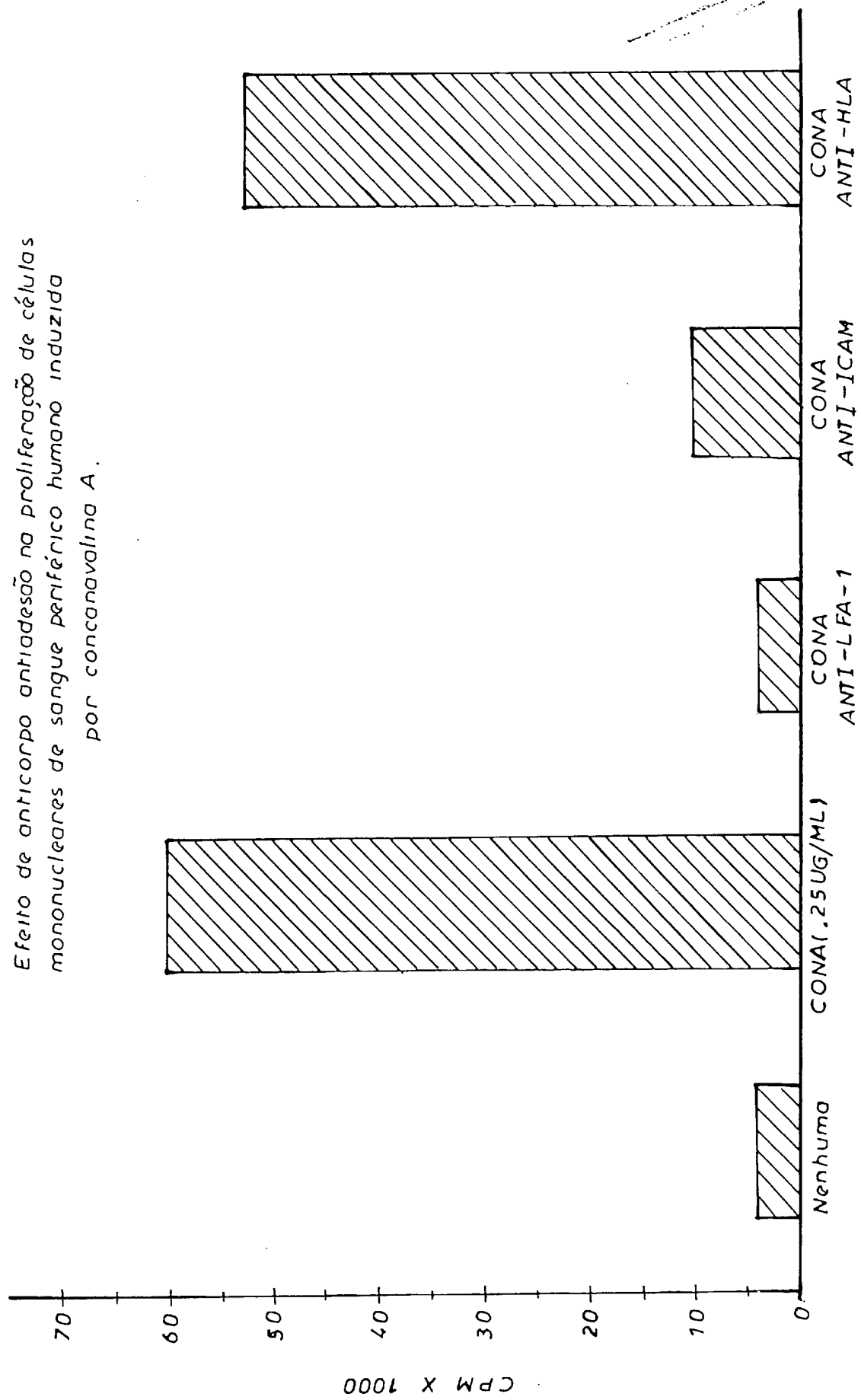


FIG. 18

Efeito de anticorpo antiadesão na proliferação de células mononucleares de sangue periférico humano induzida por KLH

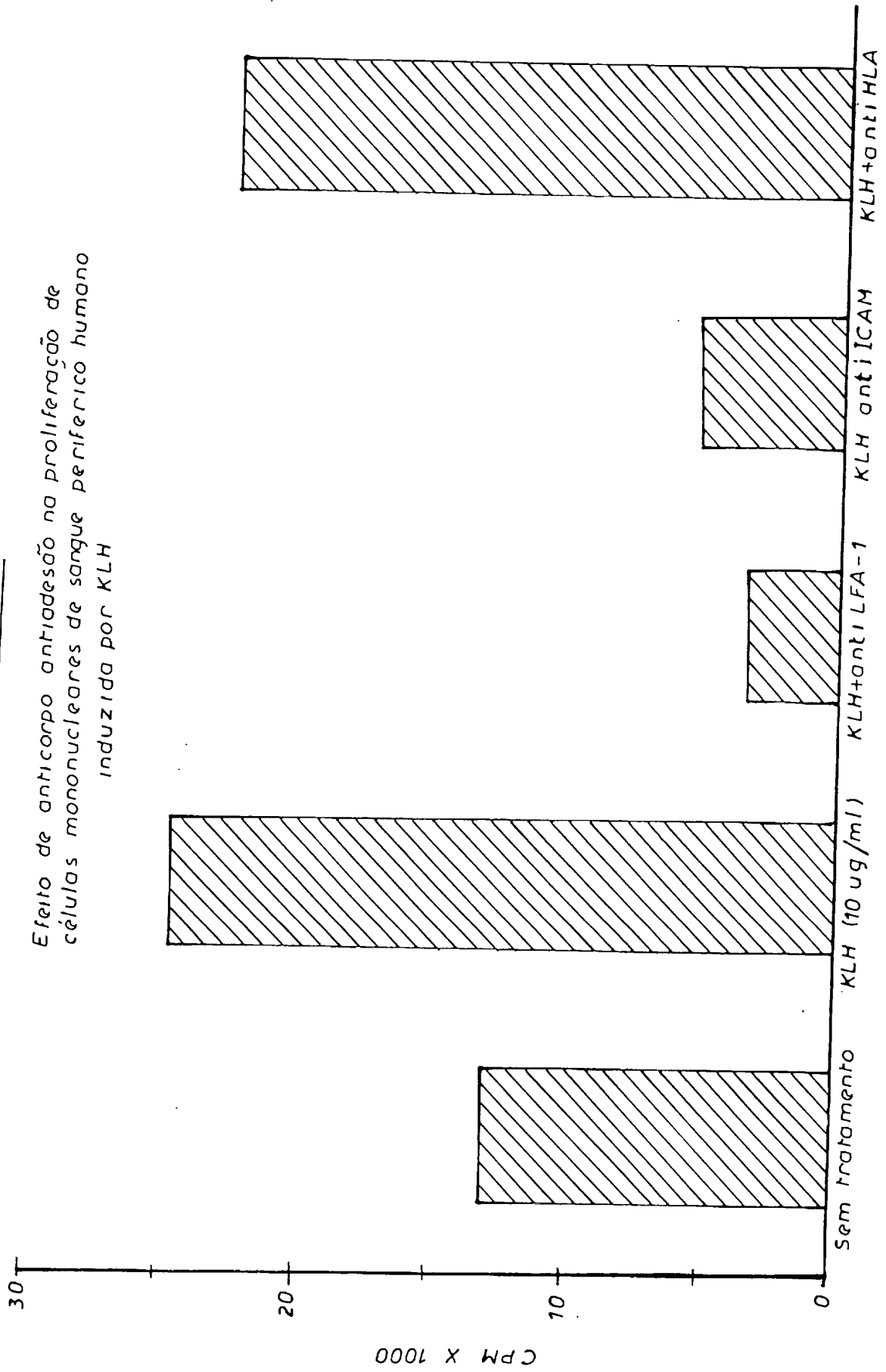


FIG. 19

Efeito de anticorpo antiadesão na proliferação de células mononucleares de sangue periférico humano induzida por toxóide de tétano

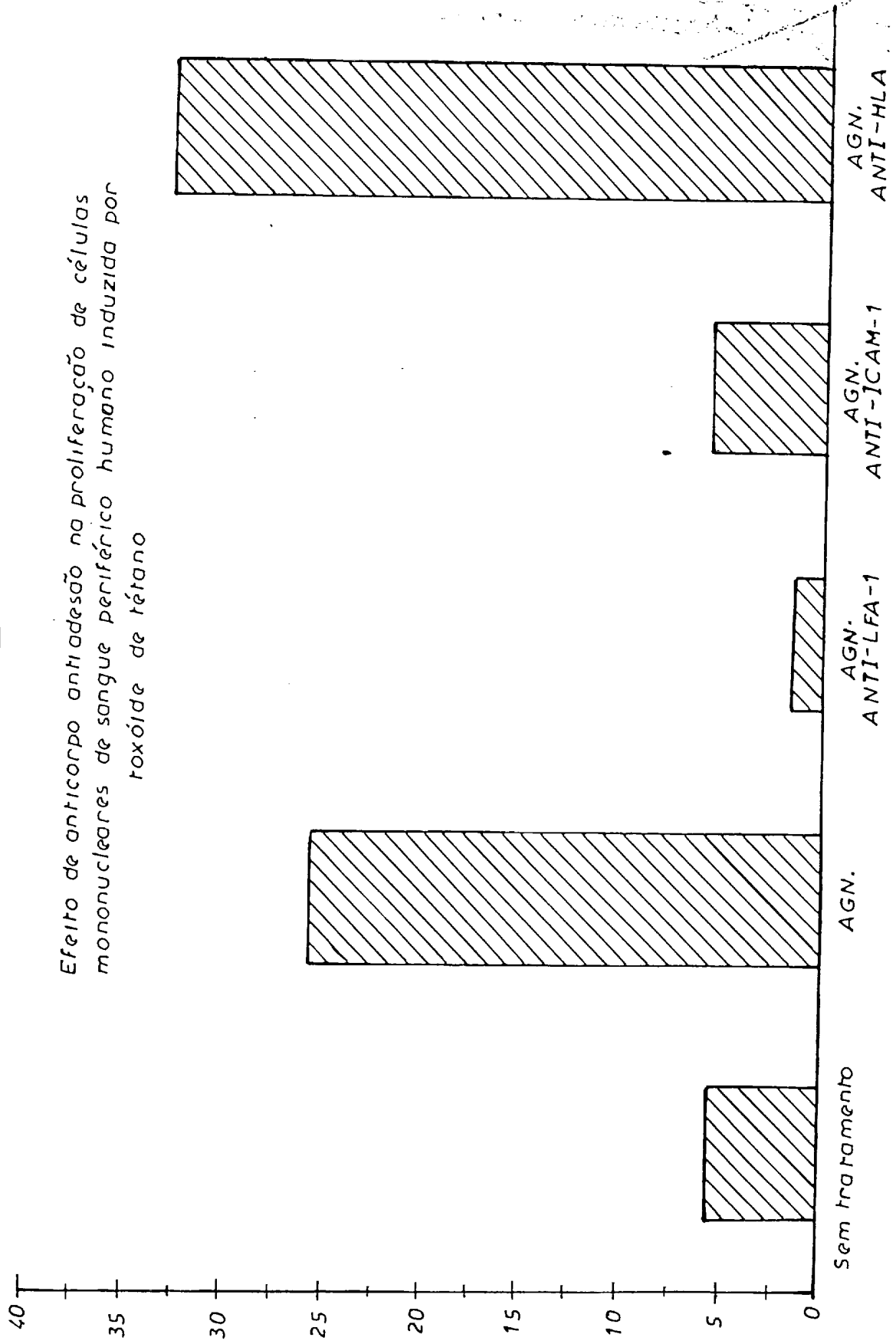


FIG 20

