

(11) Número de Publicação: **PT 1411982 E**

(51) Classificação Internacional:

A61K 39/395 (2007.10) **C07K 16/28** (2007.10)
A61P 37/06 (2007.10) **A61P 37/08** (2007.10)
A61P 35/02 (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2002.03.13**

(30) Prioridade(s): **2001.08.03 US 310196 P**
2002.01.18 US 51497

(43) Data de publicação do pedido: **2004.04.28**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.10.15**
250/2008

(73) Titular(es):

ABGENOMICS CORPORATION
2F, NO. 32, LN. 358, JUIKUANG RD. NEIHU,
TAIPEI, TAIWAN 114 TW

(72) Inventor(es):

RONG-HWA LIN US
CHUNG-HSIUN WU TW
PEI-LING HSU US

(74) Mandatário:

MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA
RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **MODULADORES DO LIGANDO 1 GLICOPROTEICO DA P-SELECTINA**

(57) Resumo:

RESUMO

"MODULADORES DO LIGANDO 1 GLICOPROTEICO DA P-SELECTINA"

Compostos que se ligam à Glicoproteína 1 da P-Selectina (PSGL-1) na superfície de células T ou células assassinas naturais (NK) podem ser utilizados para induzir depleção de células T ou células NK e/ou para induzir apoptose de células T ou células NK. Os compostos e métodos da invenção podem ser utilizados para controlar respostas imunológicas indesejadas mediadas por células T ou células NK em estados como doenças autoimunes, rejeição de transplantes e doenças alérgicas.

DESCRIÇÃO

"MODULADORES DO LIGANDO 1 GLICOPROTEICO DA P-SELECTINA"

Área da Invenção

A invenção refere-se a composições e métodos para controlar respostas imunológicas.

Contexto da Invenção

O controlo de respostas imunológicas indesejadas é uma questão crítica no tratamento de doenças como doenças autoimunes, rejeição de transplantes, doenças alérgicas e alguns cancros. A actividade de células T demasiado agressivas pode ser controlada por imunossupressão ou pela indução de tolerância imunológica. A tolerância é definida como um estado em que o sistema imunológico deixa de responder a um antigene, ao passo que a imunossupressão, que diminui a resposta imunológica a antigenes, requer habitualmente a utilização continuada de medicação. Na transplantação de órgãos, as células T desempenham um papel essencial na resposta imunológica a aloantigenes. Os regimes imunossupressores correntes envolvem habitualmente a utilização de corticosteróides, ciclosporina ou rapamicina, que bloqueiam a transcrição da IL-2, um factor de crescimento chave para células T, ou inibem a proliferação dependente da IL-2. Todavia, alguns anticorpos monoclonais que actuam como agentes de depleção de células T (por exemplo, CD3, CD4, CD8) ou como inibidores da sinalização de citoquinas ou das vias de co-estimulação de células T (por exemplo, CD25, B7-1, B7-2, CD152, CTLA4) demonstraram ter eficácia na redução da incidência de rejeição, com efeitos secundários ou toxicidade limitados. Foi mostrado que alguns destes agentes têm algum grau de

êxito no tratamento de doenças autoimunes e no prolongamento da sobrevivência de enxertos.

Crê-se amplamente que a apoptose tem uma importância vital para manter a função apropriada do sistema imunológico e é um mecanismo importante para remover células indesejadas (Kabelitz *et al.* *Immunol. Today* 14: 338-340 (1993); Raff, *Nature*: 356: 397-399 (1992)). Vários sinais originários do interior ou do exterior de uma célula influenciam a vida e a morte da célula. Anticorpos contra moléculas da superfície de células T, como Fas (ou CD95, PM = 43 kD), TNFR2 (PM = 75 kD), CD2 (PM = 45 kD) e CTLA-4 (PM = 33 kD) induzem a apoptose de células T (Osborne, *Curr. Opin. Immunol.* 8: 245-248 (1996); Lin *et al.* *J. Immunol.* 158: 598-603 (1997); Zhang *et al.* *Nature* 377: 348-350 (1995); Lai *et al.* *Eur. J. Immunol.* 25: 3243-3248 (1995); Mollereau *et al.* *J. Immunol.* 156: 3184-3190 (1996); Gribben *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 811-815 (1995)). Tentativas para utilizar moléculas de Fas e TNFR2 para controlar células T indesejadas foram obstadas pelo facto destas duas moléculas serem expressas não só em células imunológicas mas também em vários outros sistemas de órgãos importantes, como o fígado. Este padrão de expressão limita potencialmente a aplicação terapêutica destes dois anticorpos (Ogasawara *et al.* *Nature* 364: 806-809 (1993); Pfeffer *et al.* *Cell* 73: 457-467 (1993); Engelmann *et al.* *J. Biological Chemistry* 265: 4497-14504 (1990)).

Conhecem-se Anticorpos Monoclonais para o Ligando-1 Glicoproteico da P-Selectina (Snapp *et al.* *Blood* 91(1): 154-64 (1998)).

Diacovo *et al.* *J. Exp. Med.* 183: 1193-1203 (1996) revelam que linfócitos T α/β e γ/δ formam adesões rotativas em substratos de E- e P-selectina.

É conhecido que um mAb CD2 anti-humano de rato inibe a proliferação de células T *in vitro* induzida por activação alogeneica ou mediada por OKT3 (Nizet *et al.* *Transplantation* 69(7): 1420-8 (2000)).

Foi mostrado que a administração de mAbs para a4-integrinas e VACM previne a ocorrência de diabetes espontânea e transferida de forma adoptiva em ratinhos NOD (Tsukamoto *et al.* *Cell Immunol.* 165(2): 193-201 (1995)).

Resumo da Invenção

A invenção baseia-se na descoberta de que células T podem ser depletadas e/ou induzidas a sofrer apoptose pela indução do antígeno de superfície de células T Ligando-1 Glicoproteico da P-Selectina (PSGL-1). A depleção de células T pode ser particularmente útil para o tratamento de estados associados a uma resposta imunológica excessiva ou indesejada mediada por células T ou proliferação excessiva ou indesejada de células T. Por exemplo, a depleção de células T pode causar a redução ou eliminação da actividade ou proliferação indesejável de células T associada a doenças autoimunes, rejeição de transplantes, doenças alérgicas e/ou cancros derivados de células T. A invenção abrange métodos de utilização de moduladores da função da PSGL-1 para prevenir ou reduzir uma resposta imunológica mediada por células T, bem como métodos de rastreio de moduladores da função da PSGL-1.

Num aspecto, a invenção apresenta um anticorpo, ou respectivo fragmento de ligação de antigenes, que se liga especificamente ao Ligando-1 Glicoproteico da P-Selectina (PSGL-1) na superfície de uma célula T activada e induz a morte da célula T activada, para utilização como medicamento. Numa especificação preferida, o anticorpo é um anticorpo monoclonal.

Noutro aspecto, a invenção proporciona a utilização de um anticorpo, ou respectivo fragmento de ligação de antigenes, que se liga especificamente ao Ligando-1 Glicoproteico da P-Selectina (PSGL-1) na superfície de uma célula T activada e induz a morte da célula T activada, no fabrico de um medicamento destinado ao tratamento ou prevenção de uma doença autoimune mediada por células T. Numa especificação, a doença autoimune mediada por células T é diabetes autoimune. Numa especificação, a doença autoimune mediada por células T é artrite reumatóide. Numa especificação, a doença autoimune mediada por células T é psoriase. Numa especificação, a doença autoimune mediada por células T é esclerose múltipla.

Noutro aspecto, a invenção proporciona a utilização de um anticorpo, ou respectivo fragmento de ligação de antigenes, que se liga especificamente ao Ligando-1 Glicoproteico da P-Selectina (PSGL-1) na superfície de uma célula T activada e induz a morte da célula T activada, no fabrico de um medicamento destinado ao tratamento ou prevenção de rejeição de transplantes alogeneicos ou xenogeneicos.

Noutro aspecto, a invenção proporciona a utilização de um anticorpo, ou respectivo fragmento de ligação de

antigenes, que se liga especificamente ao Ligando-1 Glicoproteico da P-Selectina (PSGL-1) na superfície de uma célula T activada e induz a morte da célula T activada, no fabrico de um medicamento destinado ao tratamento ou prevenção de doença de enxerto-*versus*-hospedeiro.

Numa especificação, o medicamento também comprehende um agente que se liga ao anticorpo monoclonal e induz a ligação cruzada de uma pluralidade de antigenes PSGL-1 na superfície da célula T, para administração em combinação ao referido indivíduo.

Numa especificação, a célula T é uma célula T activada. Num exemplo, a célula T é uma célula T CD4+. Noutro exemplo, a célula T é uma célula T CD8+.

A descrição também revela um método para induzir a morte de uma célula T ou uma célula assassina natural (NK). O método inclui os passos seguintes: proporcionar uma célula T ou célula NK que expressa PSGL- na sua superfície celular, e contactar a célula T ou célula NK com um composto que se liga à PSGL- na superfície da célula T ou célula NK, em que a ligação do composto à PSGL-1 na superfície da célula T ou célula NK induz uma via de transdução do sinal que tem como resultado a morte da célula T ou célula NK.

O composto utilizado nesse método pode incluir um anticorpo, ou respectivo fragmento de ligação de antigenes, que se liga especificamente à PSGL-1. Num exemplo da revelação, o composto é um anticorpo monoclonal que se liga especificamente à PSGL-1. Numa especificação da revelação, o método inclui um passo que consiste em contactar o

anticorpo monoclonal com um agente que se liga ao anticorpo monoclonal e induz a ligação cruzada de uma pluralidade de antigenes PSGL-1 na superfície da célula T ou célula NK.

Numa especificação da revelação, o método inclui um passo que consiste em induzir a ligação cruzada de uma pluralidade de antigenes PSGL-1 na superfície da célula T ou célula NK, em que a ligação cruzada induz a via de transdução do sinal que tem como resultado a morte da célula T ou célula NK.

Numa especificação da revelação, a célula T é uma célula T activada. Num exemplo, a célula T é uma célula T CD4+. Noutro exemplo, a célula T é uma célula T CD8+.

Numa especificação da revelação, o método inclui um passo que consiste em avaliar a viabilidade da célula T ou célula NK após o contacto com o composto.

Numa especificação da revelação, o método inclui um passo que consiste em avaliar uma actividade biológica da célula T ou célula NK após o contacto com o composto.

Noutro aspecto, a invenção apresenta um método de rastreio de um anticorpo, ou respectivo fragmento de ligação de antigenes, que se liga especificamente à PSGL-1 que induz a morte de uma célula T activada. O método inclui os passos seguintes: proporcionar uma célula T activada que expressa a PSGL-1 na superfície da célula; contactar a célula T activada com um anticorpo, ou respectivo fragmento de ligação de antigenes, que se liga especificamente à PSGL-1, e medir a viabilidade da célula após o contacto da célula com a substância de teste, para desse modo

determinar se a substância de teste é um modulador da função da PSGL-1.

Num exemplo, o anticorpo é um anticorpo monoclonal que se liga especificamente à PSGL-1. Numa especificação, o método inclui o passo que consiste em contactar o anticorpo monoclonal com um agente que se liga ao anticorpo monoclonal e induz a ligação cruzada de uma pluralidade de抗igenes PSGL-1 na superfície da célula.

Numa especificação, o método inclui o passo que consiste em induzir a ligação cruzada de uma pluralidade de抗igenes PSGL-1 na superfície da célula, em que a ligação cruzada induz a via de transdução do sinal que tem como resultado a morte da célula.

Numa especificação, a célula T é uma célula T activada. Num exemplo, a célula T é uma célula T CD4+. Noutro exemplo, a célula T é uma célula T CD8+.

Numa especificação, o método inclui o passo que consiste em preparar grandes quantidades da substância de teste e formular a substância de teste num transportador farmaceuticamente aceitável.

Noutro aspecto, a revelação apresenta um estojo que contém: um composto que se liga à PSGL-1 na superfície de uma célula T, em que a ligação do composto à PSGL-1 na superfície da célula T induz uma via de transdução do sinal que tem como resultado a morte da célula T, e instruções de utilização do composto para tratar autoimunidade, rejeição de transplantes, um estado alérgico ou um cancro derivado de células T. Noutras especificações, o estojo inclui

instruções de utilização para tratar qualquer doença ou perturbação aqui descrita.

Uma vantagem da invenção é o facto de permitir a depleção de células T e/ou a indução de apoptose em células T sem causar uma resposta imunológica associada indesejada ou nociva. Por exemplo, a administração de um anticorpo anti-PSGL-1 a um indivíduo não origina um aumento indesejado dos níveis de citoquinas inflamatórias, como IL-2 ou TNF- α .

Outra vantagem da invenção é o facto de permitir a abordagem selectiva de uma proteína da superfície celular, PSGL-1, cuja expressão está maioritariamente limitada a leucócitos e, em particular, células T e células NK. Em consequência, os compostos descritos aqui não induzem níveis significativos de apoptose de outros tipos de células, como células do fígado. A abordagem selectiva de células T e células NK (um importante tipo de células CD3⁺ envolvido na rejeição de transplantes) para se obter depleção selectiva, sem induzir de forma significativa respostas de citoquinas sistémicas letais nem danificar outros sistemas de órgãos, é uma característica indesejada de um agente imunossupressor.

A menos que definido em contrário, todos os termos técnicos e científicos utilizados aqui têm o significado correntemente tomado pelo habitualmente experimentado na área à qual pertence esta invenção. Apesar de métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos descritos aqui poderem ser utilizados na prática ou teste da invenção, descrevem-se abaixo métodos e materiais adequados. Todas as publicações, candidaturas de patentes, patentes e outras

referências mencionadas aqui são incorporadas por referência na sua totalidade. No caso de um conflito de terminologia, a presente especificação prevalece. Adicionalmente, os materiais e métodos descritos são apenas ilustrativos, não se pretendendo que sejam limitadores.

Outras características e vantagens da invenção tornar-se-ão claras a partir da seguinte descrição pormenorizada e das reivindicações.

Descrição Breve das Figuras

A Fig. 1 ilustra os resultados de uma experiência temporal pela qual se investigou quando é que células T activadas adquirem sensibilidade a sinais apoptóticos mediados por TAB4 (um anticorpo monoclonal anti-PSGL-1).

A Fig. 2 ilustra os resultados da biotinilação da superfície celular e imunoprecipitação do antigene reconhecido pelo anticorpo TAB4.

A Fig. 3 ilustra a expressão do antigene PSGL-1 em células T CD4+, células T CD8+, células B CD19+ e células NK do baço.

A Fig. 4 ilustra a expressão do antigene PSGL-1 em timócitos CD4+, CD8+ e CD4+8+ e CD4-8-.

A Fig. 5 ilustra os níveis de IL-2 produzidos numa cultura de linfócitos misturados utilizando células do baço isoladas de ratinhos Balb/c tratados com TAB4 (ou Ig de hamster) como respondedores e células de baço C3H não correspondentes de H2 como estimulador.

A Fig. 6 ilustra análises de coloração "Western" que demonstram que (A) proteínas imunoprecipitadas com o anticorpo TAB4 podem ser reconhecidas por um anticorpo anti-PSGL-1 comercialmente disponível, e (B) A pré-

limpeza do lisato de células T com um anticorpo anti-PSGL-1 pode proceder à depleção das proteínas reconhecidas pelo TAB4.

A Fig. 7 ilustra a percentagem de enxertos sobreviventes em ratinhos C57BL/6 que receberam um enxerto de pele de ratinhos Balb/c e que foram tratados com um anticorpo anti-PSGL-1 (losango preto) ou um anticorpo de controlo (quadrado branco).

A Fig. 8 ilustra o decurso temporal da percentagem de células T apoptóticas após o tratamento de células mononucleares do sangue periférico humano activadas com um anticorpo anti-PSGL-1 humano.

A Fig. 9 ilustra a incidência de diabetes em ratinhos machos não obesos diabéticos (NOD) autoimunes que foram tratados com um anticorpo anti-PSGL-1 (quadrado preto) ou um anticorpo de controlo (quadrado branco).

Descrição Pormenorizada

A invenção é dirigida a métodos para modular a actividade de células T modulando a função de moléculas PSGL-1 que residem na superfície de uma célula T. A indução de PSGL-1 com composições descritas aqui pode originar a depleção de células T e/ou induzir células T a sofrerem apoptose. Em consequência, estas composições são úteis como agentes terapêuticos para controlar estados relacionados com o sistema imunológico, como doenças autoimunes, rejeição de transplantes, doenças alérgicas e/ou cancros derivados de células T. As composições também são úteis para originar a depleção de células T de qualquer amostra biológica onde não seja desejada a presença ou actividade de células T.

Proteína PSGL-1

A PSGL-1 é uma molécula de adesão da superfície celular que é expressa em neutrófilos, linfócitos T e B, células NK, monócitos, células dendríticas e células progenitoras hematopoiéticas CD34 humanas primitivas. Através da sua capacidade para interagir com selectinas, a PSGL-1 medeia a rotação de leucócitos no endotélio e o extravasamento de leucócitos para tecidos inflamados. A ligação de células T, mediada por PSGL-1, a E- e P-selectina, ou migração, é regulada de modo diferencial. Por exemplo, pensa-se que o aparecimento do epítopo de CLA (antigene de linfócitos cutâneos) seja induzido em células T submetidas a transição de nativas para memória. Apenas células T activadas auxiliadoras 1, mas não auxiliadoras 2, expressam a PSGL-1 funcional e são capazes de migrar para a área inflamada da pele.

A PSGL-1 é uma sialomucina que deve ser especificamente sialilada, fucosilada e sulfatada para se ligar à P-selectina. A molécula PSGL-1 existe em isoformas caracterizadas por diferentes graus de glicosilação e sítios de sulfatação nos seus terminais N. Células T e B do sangue periférico em repouso, linhas de células linfóides e células T do sangue periférico activadas *in vitro* expressam um nível semelhante de PSGL-1. Ainda assim, apenas células T activadas exibem uma forma funcional da PSGL-1 e ligam-se avidamente à P-selectina. Essa actividade de ligação dependente da activação parece resultar de modificação pós-tradução diferencial, como sugerido por níveis elevados de actividades de alfa (1,3) fucosiltransferases em células T activadas. As isoformas da PSGL-1 também exibem actividade diferencial para L-selectina e E-selectina. Por exemplo, células T humanas com a isoforma positiva para CLA podem prender-se e rolar em E- e P-selectina, ao passo que

células T que expressam PSGL-1 sem o epítopo de CLA se ligam apenas à P-selectina. Além disso, a ligação de PSGL-1 à P-selectina depende da presença do decapéptido terminal que contém três resíduos tirosina para sulfatação e um resíduo treonina para glicosilação.

Uma proteína PSGL-1 pode ser preparada por métodos recombinantes e/ou isolando uma proteína PSGL-1 nativa de material biológico. Uma proteína PSGL-1 recombinante pode ser produzida em células procarióticas ou eucarióticas, *in vitro* ou *in vivo*. Ácidos nucleicos que codificam a PSGL-1 podem ser utilizados para a produção recombinante da proteína (ver, por exemplo, Acesso da GenBank NM_003006 para um exemplo de um ácido nucleico que codifica um polipéptido PSGL-1). Anticorpos dirigidos para a PSGL-1 também são bem conhecidos e podem ser utilizados para a purificação do antígeno (ver, por exemplo, Herron *et al.* (2000) *Science* 2 de Junho; 288(5471): 1653-56; WO 00/25808) e/ou utilizados em métodos descritos aqui. A PSGL-1 é suplementarmente descrita em referências que incluem mas não se limitam a Sako *et al.* (1993) *Cell* 75: 1179; Vachino *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 21966, e Veldman *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 16470.

Para a produção recombinante da PSGL-1, a expressão simultânea da PSGL-1 e da sua alfa-(1,3) fucosil-transferase modificadora, Fuc-TVII, pode ser necessária para a expressão funcional da PSGL-1. Adicionalmente ou alternativamente, a produção recombinante da PSGL-1 pode ser acompanhada de co-transfecção com um ácido nucleico que codifica a PACE para remover o pró-péptido e/ou um ácido nucleico que codifica a tirosina sulfotransferase.

Pode utilizar-se um anticorpo anti-PSGL-1 para isolar e purificar um antigene PSGL-1 de material biológico. Qualquer tipo de célula que expresse uma proteína PSGL-1, por exemplo, células T derivadas de um indivíduo ou uma linha de células T, pode ser utilizado como fonte da proteína. Depois de purificada, a proteína pode ser utilizada numa variedade de métodos como descrito aqui. Por exemplo, a proteína PSGL-1 purificada pode ser utilizada num rastreio *in vitro* de moduladores da função da PSGL-1 em células T ou como imunogene para preparar anticorpos dirigidos contra a proteína.

Adicionalmente, um antigene PSGL-1 pode ser purificado utilizando uma fusão selectina-Fc, por exemplo, uma fusão P-selectina-Fc.

Anticorpos Anti-PSGL-1

Polipéptidos PSGL-1 (ou respectivos fragmentos ou análogos imunogénicos) podem ser utilizados para gerar anticorpos úteis nos métodos da invenção. Como descrito acima, polipéptidos PSGL-1, ou respectivos fragmentos peptídicos, podem ser produzidos por técnicas recombinantes ou sintetizados utilizando métodos de síntese em fase sólida. Os polipéptidos PSGL-1 recombinantes, ou respetivo fragmento peptídico, podem ser utilizados como imunogene para produzir anticorpos anti-PSGL-1. Adicionalmente, um anticorpo anti-PSGL-1, como o anticorpo monoclonal TAB4, pode ser utilizado para purificar um polipéptido PSGL-1, por exemplo, um polipéptido PSGL-1 na sua conformação natural, que então pode ser utilizado como imunogene para produzir anticorpos anti-PSGL-1 adicionais.

Um anticorpo da invenção pode ser um anticorpo monoclonal, policlonal ou manipulado que se liga especificamente a um polipéptido PSGL-1. Um anticorpo que se "liga especificamente" a um antigene particular, por exemplo, um polipéptido PSGL-1, não reconhecerá nem se ligará de forma substancial a outras moléculas presentes numa amostra. Assim, a invenção também apresenta métodos para identificar um composto de teste (por exemplo, um anticorpo) que se liga a um polipéptido da invenção fazendo contactar o polipéptido com um composto de teste e determinando se o polipéptido se liga ao composto de teste (por exemplo, por detecção directa da ligação, detecção de uma molécula competidora que destrói a ligação do composto de teste ao polipéptido e/ou detecção da ligação utilizando um ensaio quanto à actividade indutora de apoptose).

Em geral, polipéptidos PSGL-1 podem ser acoplados a uma proteína transportadora, como KLH, misturados com um adjuvante e injectados num mamífero hospedeiro. Em seguida, anticorpos produzidos nesse animal podem ser purificados por cromatografia de afinidade com antigenos peptídicos.

Em particular, vários animais hospedeiros podem ser imunizados por injeção com um polipéptido PSGL-1, ou respetivo fragmento antigénico. Animais hospedeiros habitualmente empregues incluem coelhos, ratinhos, porquinhos-da-índia e ratos. Vários adjuvantes que podem ser utilizados para aumentar a resposta imunológica dependem da espécie do hospedeiro e incluem adjuvante de Freund (completo e incompleto), géis minerais, como hidróxido de alumínio, substâncias com actividade de superfície, como lisolecitina, polióis Pluronic, polianiões, péptidos, emulsões em óleo, hemocianina de lapa

californiana e dinitrofenol. Adjuvantes humanos potencialmente úteis incluem BCG (bacilo Calmette-Guerin) e *Corynebacterium parvum*. Anticorpos policlonais são populações heterogéneas de moléculas de anticorpos que estão contidas nos soros dos animais imunizados.

Em consequência, anticorpos no âmbito da invenção incluem anticorpos policlonais e, adicionalmente, anticorpos monoclonais, anticorpos humanizados ou quiméricos, anticorpos de cadeia simples, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')2 e moléculas produzidas utilizando uma biblioteca de expressão de Fab.

Anticorpos monoclonais, que são populações homogéneas de anticorpos para um antígeno particular, podem ser preparados utilizando os polipeptídos PSGL-1 descritos acima e tecnologia comum de hibridomas (ver, por exemplo, Kohler et al., *Nature* 256: 495 [1975]; Kohler et al., *Eur. J. Immunol.* 6: 511 [1976]; Kohler et al., *Eur. J. Immunol.* 6: 292 [1976]; Hammerling et al., "Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas", Elsevier, N.Y. [1981]).

Em particular, anticorpos monoclonais podem ser obtidos por qualquer técnica que proporcione a produção de moléculas de anticorpos por linhas de células contínuas em cultura, como descrito em Kohler et al., *Nature* 256: 495 (1975), e Patente U.S. N° 4 376 110; a técnica de hibridoma de células B humanas (Kosbor et al., *Immunology Today* 4: 72 [1983]; Cole et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2026 [1983]), e a técnica de hibridoma de EBV (Cole et al., "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss, Inc., páginas 77-96 [1983]). Esses anticorpos podem pertencer a qualquer classe de imunoglobulinas, incluindo

IgG, IgM, IgE, IgA, IgD e qualquer subclasse destas. O hibridoma que produz o mAb desta invenção pode ser cultivado *in vitro* ou *in vivo*. A capacidade para produzir títulos elevados de mAbs *in vivo* torna-o num método de produção particularmente útil.

Depois de produzidos, os anticorpos policlonais ou monoclonais são testados quanto ao reconhecimento específico de PSGL-1 por coloração "Western" ou análise de imunoprecipitação por métodos comuns, por exemplo, como descrito em Ausubel *et al.*, *supra*. Anticorpos que reconhecem e se ligam especificamente à PSGL-1 são úteis na invenção. São particularmente úteis anticorpos anti-PSGL-1 que se ligam ao antígeno PSGL-1 na superfície de uma célula T, por exemplo, uma célula CD3+, e induzem a depleção e/ou apoptose de células T num indivíduo.

Os anticorpos podem ser utilizados, por exemplo, como parte de um regime terapêutico (por exemplo, para reduzir ou eliminar uma resposta imunológica indesejável, como uma resposta imunológica mediada por células T, associada a estados tais como doenças autoimunes, rejeição de transplantes, doenças alérgicas e cancros derivados de células T). Os anticorpos também podem ser utilizados num ensaio de rastreio para medir a capacidade de um composto candidato para se ligar à PSGL-1.

Adicionalmente, podem utilizar-se técnicas desenvolvidas para a produção de "anticorpos quiméricos" (Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851 [1984]; Neuberger *et al.*, *Nature* 312: 604 [1984]; Takeda *et al.*, *Nature* 314: 452 [1984]) por processamento dos genes de uma molécula de anticorpo de rato com especificidade

apropriada para antigenes juntamente com genes de uma molécula de anticorpo humano com actividade biológica apropriada. Um anticorpo quimérico é uma molécula na qual diferentes porções são derivadas de diferentes espécies de animais, como o que tem uma região variável derivada de um anticorpo monoclonal murino e uma região constante de uma imunoglobulina humana.

Alternativamente, técnicas descritas para a produção de anticorpos de cadeia simples (Patentes U.S. N°s 4 946 778, 4 946 778 e 4 704 692) podem ser adaptadas à produção de anticorpos de cadeia simples contra um polipéptido PSGL-1, ou respectivo fragmento. Os anticorpos de cadeia simples são formados ligando os fragmentos das cadeias pesada e leve da região Fv via uma ponte de aminoácido, originando um polipéptido de cadeia simples.

Fragmentos de anticorpos que reconhecem e se ligam a epítopos específicos podem ser gerados por técnicas conhecidas. Por exemplo, esses fragmentos incluem mas não se limitam aos fragmentos $F(ab')_2$, que podem ser produzidos por digestão da molécula de anticorpo com pepsina, e fragmentos Fab, que podem ser gerados por redução das pontes dissulfureto de fragmentos $F(ab')_2$. Alternativamente, podem construir-se bibliotecas de expressão de Fab (Huse et al., *Science* 246: 1275 [1989]) para permitir a identificação rápida e fácil de fragmentos Fab monoclonais com a especificidade desejada.

Os anticorpos podem ser humanizados por métodos conhecidos na área. Por exemplo, anticorpos monoclonais com uma especificidade de ligação desejada podem ser comercialmente humanizados (Scotgene, Escócia; Oxford

Molecular, Palo Alto, Califórnia). Anticorpos completamente humanos, como os expressos em animais transgénicos, também são características da invenção (Green et al., *Nature Genetics* 7: 13 [1994], e Patentes U.S. N°s 5 545 806 e 5 569 825).

Ensaios de Rastreio Quanto a Compostos que Modulam a Função da PSGL-

A invenção também abrange métodos para identificar compostos que interagem com a PSGL-1 (ou um domínio da PSGL-1) incluindo, mas não se limitando a estes, compostos que induzem a depleção de células T e/ou apoptose de células T por ligação à PSGL-1. Também estão incluídos compostos que modulam a interacção da PSGL-1 com proteínas transmembranares, extracelulares ou intracelulares que regulam a actividade da PSGL-1 e compostos que modulam a actividade da PSGL-1.

Os compostos que podem ser rastreados de acordo com a invenção incluem mas não se limitam a péptidos, anticorpos e respectivos fragmentos e outros compostos orgânicos que se ligam à PSGL-1 e modulam uma função biológica mediada pela PSGL-1, como descrito aqui.

Esses compostos podem incluir mas não se limitam a péptidos, tais como, por exemplo, péptidos solúveis, incluindo mas não se limitando a membros de bibliotecas de péptidos aleatórios (Lam et al., *Nature* 354: 82 [1991]; Houghten et al., *Nature* 354: 84 [1991]) e bibliotecas moleculares derivadas de química combinatorial constituídas por aminoácidos de configuração D e/ou L, fosfopéptidos (incluindo mas não se limitando a membros de bibliotecas de fosfopéptidos dirigidos aleatória ou parcialmente

degenerados; Songyang et al., *Cell* 72: 767 [1993]), anticorpos (incluindo mas não se limitando a anticorpos policlonais, monoclonais, humanizados, anti-idiotípicos, quiméricos ou de cadeia simples, e Fab, F(ab')2 e fragmentos de bibliotecas de expressão Fab, e respectivos fragmentos de ligação a epítopos) e pequenas moléculas orgânicas ou inorgânicas.

Outros compostos que podem ser rastreados de acordo com a invenção incluem mas não se limitam a pequenas moléculas orgânicas que afectam uma actividade da proteína PSGL-1, como aqui descrito.

Tecnologias de modelação e pesquisa computacionais permitem identificar compostos, ou aperfeiçoar compostos já identificados, que podem modular a expressão ou actividade da PSGL-1. Depois de identificado um desses compostos ou composições, identificam-se os sítios ou regiões activas. Esses sítios activos poderão consistir, tipicamente, num sítio de ligação para um modulador natural da actividade. O sítio activo pode ser identificado utilizando métodos conhecidos na área, incluindo, por exemplo, a partir das sequências de aminoácidos de péptidos, a partir das sequências de nucleótidos de ácidos nucleicos ou a partir do estudo de complexos do composto ou composição relevante com o seu ligando natural. No último caso podem utilizar-se métodos químicos ou de cristalografia de raios X para encontrar o sítio activo descobrindo onde se encontra o modulador (ou ligando) no factor.

Apesar de descrito acima relativamente à concepção e geração de compostos que podem alterar a ligação, também é possível rastrear bibliotecas de compostos conhecidos,

incluindo produtos naturais ou compostos químicos sintéticos, e materiais biologicamente activos, incluindo proteínas, quanto a compostos que se ligam a uma proteína PSGL-1 e originam depleção de células T e/ou induzem apoptose de células T.

Podem conceber-se sistemas *in vitro* para identificar compostos capazes de interagir com a PSGL-1 (ou um domínio da PSGL-1). Os compostos identificados podem ser úteis, por exemplo, na modulação da actividade de células T, como descrito aqui, e, assim, podem ser úteis para o tratamento de estados tais como doenças autoimunes, rejeição de transplantes, doenças alérgicas e cancros derivados de células T.

O princípio dos ensaios utilizados para identificar compostos que se ligam à PSGL-1 envolve preparar uma mistura reacional de PSGL-1 (ou respectivo domínio) e o composto de teste em condições e durante um período de tempo suficiente para permitir que os dois componentes interajam e se liguem, desse modo formando um complexo que pode ser removido e/ou detectado na mistura reacional. A espécie de PSGL-1 utilizada pode variar, dependendo do objectivo do ensaio de rastreio. Nalgumas situações é preferível empregar um péptido correspondente a um domínio da PSGL-1 fundido a uma proteína ou polipéptido heterólogo que confere vantagens ao sistema de ensaio (por exemplo, etiquetagem, isolamento do complexo resultante, etc.) que pode ser utilizado.

Os ensaios de rastreio podem ser conduzidos numa variedade de modos. Por exemplo, um método para conduzir um desses ensaios envolve a ancoragem da proteína,

polipéptido, péptido ou proteína de fusão da PSGL-1 ou da substância de teste numa fase sólida e detectar complexos de PSGL-1/composto de teste ancorados na fase sólida no final da reacção. Numa especificação de um desses métodos, o reagente PSGL-1 pode ser ancorado numa superfície sólida e o composto de teste, que não está ancorado, pode ser etiquetado, directa ou indirectamente.

Na prática, placas de microtítulo podem ser convenientemente utilizadas como fase sólida. O componente ancorado pode ser imobilizado por ligações não covalentes ou covalentes. Pode obter-se ligação não covalente simplesmente revestindo a superfície sólida com uma solução da proteína e secagem. Alternativamente, um anticorpo imobilizado, preferivelmente um anticorpo monoclonal, específico para a proteína a ser imobilizada pode ser utilizado para a ancoragem da proteína à superfície sólida. As superfícies podem ser preparadas antecipadamente e ser armazenadas.

Para conduzir o ensaio, o componente não imobilizado é adicionado à superfície revestida que contém o componente ancorado. Depois de completada a reacção removem-se os componentes que não reagiram (por exemplo, por lavagem) em condições tais que quaisquer complexos formados permanecerão imobilizados na superfície sólida. Podem detectar-se os complexos ancorados na superfície sólida por alguns modos. Quando o componente previamente não imobilizado é pré-etiquetado, a detecção da etiqueta imobilizada na superfície indica que se formaram complexos. Quando o componente previamente não imobilizado não é pré-etiquetado, pode utilizar-se uma etiqueta indirecta para detectar complexos ancorados na superfície, por exemplo,

utilizando um anticorpo etiquetado específico para o componente previamente não immobilizado (o anticorpo, por sua vez, pode ser etiquetado directamente ou etiquetado indirectamente com um anticorpo anti-Ig etiquetado).

Alternativamente, pode conduzir-se uma reacção numa fase líquida, separam-se os produtos reaccionais dos componentes que não reagiram e detectam-se complexos; por exemplo, utilizando um anticorpo immobilizado específico para a proteína, polipeptído, péptido ou proteína de fusão de PSLG-1 ou composto de teste para a ancoragem de quaisquer complexos formados em solução, e um anticorpo etiquetado específico para o outro componente do possível complexo para detectar complexos ancorados.

Alternativamente podem utilizar-se ensaios à base de células para identificar compostos que interagem com a PSLG-1. Para esta finalidade podem utilizar-se linhas de células que expressam a PSLG-1 ou linhas de células que foram geneticamente manipuladas para expressar a PSLG-1. Ensaios à base de células são particularmente úteis para avaliar os efeitos funcionais de um composto identificado por um rastreio descrito aqui. Por exemplo, depois de identificado um composto com base na sua capacidade para se ligar a uma proteína PSLG-1, o composto pode então ser testado quanto à sua capacidade, por exemplo, para induzir apoptose de células T *in vitro* ou *in vivo* ou para proceder à depleção de células T *in vitro* ou *in vivo*.

Composições Farmacêuticas

Uma vez que um objectivo da presente invenção é alterar uma resposta imunológica num indivíduo, uma composição farmacêutica que contém, por exemplo,

anticorpos, moléculas pequenas ou outros compostos que se ligam especificamente a polipéptidos PSGL-1 também é uma característica da invenção. Num exemplo preferido, o composto funciona como agonista da PSGL-1.

Composições farmacêuticas para utilização de acordo com a presente invenção podem ser formuladas de um modo convencional utilizando um ou mais transportadores ou excipientes fisiologicamente aceitáveis. Assim, os compostos e os seus sais e solvatos fisiologicamente aceitáveis podem ser formulados para administração por uma variedade de vias de administração.

Os compostos podem ser formulados para administração parentérica por injecção, por exemplo, por injecção de bolus ou infusão contínua. As formulações para injecção podem ser apresentadas em forma galénica unitária, por exemplo, em ampolas ou em recipientes de múltiplas doses, com um conservante adicionado. As composições podem tomar formas tais como suspensões, soluções ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos, e podem conter agentes de formulação, como agentes de suspensão, estabilizadores e/ou dispersantes. Alternativamente, o ingrediente activo pode estar na forma de pó para reconstituição com um veículo adequado, por exemplo, água esterilizada sem pirogénios, antes da utilização.

Métodos de Controlo de uma Resposta Imunológica Mediada por Células T e Depleção de Populações de Células T

Compostos como os pormenorizados nos ensaios de rastreio descritos aqui podem ser úteis, por exemplo, na modulação de uma função biológica mediada por um polipéptido PSGL-1 e/ou para o tratamento de perturbações

associadas a uma resposta imunológica excessiva ou indesejada, por exemplo, uma resposta imunológica mediada por células T. Estes compostos incluem mas não se limitam a péptidos, anticorpos e respectivos fragmentos e outros compostos orgânicos que se ligam à PSGL-1 na superfície de uma célula T e induzem uma via de transdução do sinal que origina a morte da célula T. Os métodos da invenção incluem opcionalmente a adição de um agente de formação de ligações cruzadas que induz a ligação cruzada da PSGL-1 na superfície de uma célula. Os compostos descritos aqui podem ser utilizados em qualquer caso em que se deseje a depleção ou eliminação da actividade de células T. Estados particularmente úteis que podem ser tratados com os compostos da invenção incluem doenças autoimunes, rejeição de transplantes, doenças alérgicas e cancros derivados de células T.

Exemplos de estados que podem ser tratados com os compostos anti-PSGL-1 descritos aqui incluem, mas não se limitam a estes, diabetes *mellitus*, artrite (incluindo artrite reumatóide, artrite reumatóide juvenil, osteoartrite e artrite psoriática), esclerose múltipla, encefalomielite, miastenia *gravis*, lúpus eritematoso sistémico, tiroidite autoimune, dermatite (incluindo dermatite atópica e dermatite eczematosa), psoriase, Síndroma de Sjögren, doença de Crohn, úlcera aftosa, irite, conjuntivite, queratoconjuntivite, diabetes de tipo I, doenças inflamatórias do intestino, colite ulcerativa, asma, asma alérgica, lúpus eritematoso cutâneo, escleroderma, vaginite, proctite, erupções cutâneas devidas a fármacos, reacções de reversão de lepra, eritema nodoso lepromatoso, uveíte autoimune, encefalomielite alérgica, encefalopatia hemorrágica necrotizante aguda, perda de

audição sensório-neural progressiva bilateral idiopática, anemia aplástica, anemia pura dos glóbulos vermelhos, trombocitopenia idiopática, policondrite, granulomatose de Wegener, hepatite activa crónica, síndroma de Stevens-Johnson, doença celiaca idiopática, líquen plano, doença de Grave, sarcoidose, cirrose biliar primária, uveíte posterior, fibrose pulmonar intersticial, doença de enxerto-*versus*-hospedeiro, casos de transplantação (incluindo transplantação utilizando tecidos alógenicos ou xenógenicos), como transplantação de medula óssea, transplantação do fígado ou a transplantação de qualquer órgão ou tecido, alergias, como alergia atópica, SIDA e neoplasmas de células T, como leucemias e/ou linfomas.

Os métodos da invenção podem ser utilizados para a depleção de células T de uma população de células, *in vitro* ou *in vivo*. Por exemplo, uma amostra biológica derivada de um indivíduo pode ser submetida a depleção de células T *in vitro* contactando a amostra com um composto anti-PSGL-1 descrito aqui, opcionalmente em conjunto com um agente de formação de ligações cruzadas. Este método pode ser útil, por exemplo, por permitir o enriquecimento de células não T numa população de células, bem como por reduzir ou eliminar a actividade de células T de uma população de células.

Apresentam-se a seguir exemplos da prática da invenção.

Exemplos

Exemplo 1: Preparação de um Anticorpo Monoclonal Anti-Proteína Indutora de Apoptose de Células T ("PIAT")

Gerou-se um anticorpo monoclonal específico para a PIAT aplicando os métodos de fusão celular bem conhecidos de Kohler e Milstein ((1976) *European Journal of Immunology* 6: 511-519) para produzir um hibridoma que segregava anticorpos desejados. Células produtoras de anticorpos de um hamster injectado com células T de baço de Balb/c activadas com Concanavalina A (Con A) foram fundidas a uma linha de células de mieloma para formar um hibridoma que segregava anticorpos. As duas populações de células foram fundidas com polietilenoglicol, e as células resultantes produtoras de anticorpos foram clonadas e propagadas por métodos comuns de cultura de tecidos. Um hibridoma gerado de acordo com estes métodos segregou um anticorpo monoclonal, designado TAB4, que conseguiu induzir a apoptose de células T *in vitro* e proceder à depleção de células T *in vivo*. A proteína reconhecida pelo TAB4 foi designada proteína indutora de apoptose de células T (PIAT).

Adquiriram-se ratinhos C57BL/6J e BALB/c ao Jackson Lab (Bar Harbor, ME). Adquiriram-se hamsters Sírios à Animal Core Facility, National Taiwan University Medical College.

O sobrenadante de cultura concentrado do hibridoma de TAB4 foi submetido a rotação a 20 000 x g durante 10 minutos e o sobrenadante foi diluído, numa razão 1:1, com o tampão de ligação (acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0). Uma coluna de proteína G (volume do leito aproximadamente 1 mL) foi lavada três vezes com 3 - 5 mL do tampão de ligação. Carregou-se a coluna de proteína G com o sobrenadante de cultura límpido e o fluxo que passou foi recolhido e novamente carregado na coluna. Lavou-se a coluna com 6 - 10

mL do tampão de ligação e o anticorpo ligado eluiu da coluna com 5 mL do tampão de eluição (glicina-HCl 0,1 M, pH 2,8). Cada fracção continha 1 mL do anticorpo eluído e ajustou-se a fracção eluída para pH neutro misturando cada fracção de 1 mL com 50 microlitros de Tris-HCl 1 M, pH 7,5. As fracções que continham o anticorpo foram reunidas e dialisadas contra 2 litros de PBS, pH 7,4, três vezes durante três horas para cada diálise. Determinou-se a concentração de proteínas nas amostras de anticorpo pelo procedimento descrito por Bradford utilizando o Ensaio de Proteínas Bio-Rad (BIO-RAD, Hercules, CA).

Exemplo 2: Preparação de Uma Suspensão de Células de Baço de Ratinho e Activação e Enriquecimento de Células T

Baço de ratinho foi imerso em 8 mL de solução salina equilibrada de Hank (HBSS), foi suavemente cortado em tiras com uma lamela esterilizada, transferido para um tubo centrífuga de 15 mL (Costar) e submetido a rotação a 200 x g durante 5 minutos. Deitou-se fora o sobrenadante e o grânulo celular foi novamente suspenso no tampão residual dando pequenas pancadinhas suaves na parede. Os glóbulos vermelhos (GV) contaminadores foram submetidos a lise por adição de 1 mL de tampão de lise de GV (NH₄Cl 0,6 M, Tris-base 0,17 M, pH 7,65), seguido de uma incubação durante 2 minutos à temperatura ambiente e arrefecimento rápido com 9 mL de HBSS. As células foram transformadas em grânulos a 200 x g durante 5 minutos, foram lavadas duas vezes e novamente suspensas em meio RPMI. A concentração e viabilidade de células na mistura foram determinadas com um hemocitómetro (Cambridge Scientific Inc.) e exclusão com Azul de Tripano.

Ajustou-se a concentração das células do baço com meio RPMI para um valor final de 3×10^6 /mL e adicionou-se Concanavalina A para uma concentração final de 2 microgramas/mL, para activar as células T. A suspensão de células foi transferida para uma placa de cultura de 6 cavidades (5 mL/cavidade) ou para uma placa de cultura de 10 cm (10 mL/placa) e foi incubada a 37°C, 5% de CO₂ durante 48 horas antes de ser recolhida. As células do baço activadas, incluindo células T activadas, foram novamente suspensas em 5 mL de HBSS e foram cuidadosamente colocadas sobre uma almofada de 5 mL de solução Percoll a 55% num tubo centrífuga. Teve-se o cuidado de não destruir a separação das camadas. As células foram submetidas a rotação a 1 900 x g durante 13 minutos a 25°C sem travagem. As células T enriquecidas foram recolhidas da interface das duas camadas, foram lavadas duas vezes com HBSS e ficaram prontas para as experiências.

Exemplo 3: Apoptose de Células T Activadas

Células T activadas (ver Exemplo 2) foram novamente suspensas para uma concentração final de 5×10^5 células/mL em meio RPMI que continha 5 ng/mL de IL-2 e foram tratadas com Ig de controlo, TAB4 ou anti-CD3 de acordo com as condições apresentadas na Tabela 1.

TABELA 1

Grupos da experiência	Tratamento*
Controle negativo	3 ug/mL de Ig de hamster 5 ng/mL de IL-2 3 ug/mL de anticorpo de formação de ligações cruzadas (Ig anti-hamster)
TAB4	3 ug/mL de mAb de hamster TUB4 5 ng/mL de IL-2 3 ug/mL de anticorpo de formação de ligações cruzadas (Ig anti-hamster)
Controle positivo	1 ug/mL de mAb anti-CD3 5 ng/mL de IL-2 1 ug/mL de anticorpo de formação de ligações cruzadas (Ig anti-ratinho)

*: Concentração final dos reagentes designados no meio.

Após um período de incubação de 18 - 24 horas determinou-se a extensão da apoptose em cada cultura utilizando o ensaio de apoptose 7-AAD. As células tratadas foram transferidas para tubos de FACS (Falcon), foram lavadas duas vezes com solução de FACS gelada (soro fetal de bovino 1%, azida de sódio 0,05% em PBS) e transformadas em grânulos a 200 x g a 4°C. As células foram novamente suspensas em solução de FACS gelada para uma concentração final de 1 - 2 x 10⁷ células/mL. Para a coloração misturaram-se 0,1 mL das células novamente suspensas com 7-AAD, para uma concentração final de 2 ug/mL, tendo sido incubados a 4°C no escuro durante 20 minutos. Por fim, as células coradas foram lavadas duas vezes com solução de FACS gelada, foram novamente suspensas em 0,5 mL de solução de FACS e analisadas com o citómetro de fluxo BD LSR (Becton Dickinson).

A Fig. 1 ilustra os resultados de uma experiência temporal representativa pela qual se investigou quando é que células T activadas adquirem sensibilidade a sinais apoptóticos mediados por TAB4 (anti-PIAT). Esplenócitos de ratinho foram activados com Con-A e mantidos em meio que continha IL-2. Células T activadas foram recolhidas, novamente suspensas e provocadas com o anticorpo monoclonal TAB4 ou IgG de hamster de controlo, na presença de anticorpo IgG anti-hamster como agente de formação de ligações cruzadas. A capacidade de ligações cruzadas de PEAT para induzir um nível baixo (6,5%) de morte apoptótica de células foi evidente no dia um. Todavia, a extensão da apoptose induzida pelo TAB4 aumentou de 17% no dia 2, atingiu o máximo de 52% no dia 4 e diminuiu para 44% no dia 6. A IgG de hamster de controlo não induziu morte apoptótica específica de células T em comparação com as culturas que receberam apenas IL-2. Anti-CD3 (como controlo positivo) induziu apoptose em 38% das células T após 48 horas de activação (dados não mostrados).

Exemplo 4: Expressão do Antigene PIAT em Diferentes Tecidos

As células foram lavadas duas vezes com solução de FACS gelada (soro fetal de bovino 1%, azida de sódio 0,05% em PBS) e foram submetidas a rotação a 200 x g a 4°C num tubo de FACS (Falcon). As células foram novamente suspensas em solução de FACS gelada para uma concentração final de 1×10^7 células/mL, e utilizou-se para cada ensaio uma alíquota de 0,1 mL das células novamente suspensas num tubo de FACS (Falcon). Para a coloração de superfície, o anticorpo monoclonal TAB4 ou uma Ig de hamster de controlo, a uma concentração final de 2 ug/mL, foi adicionado às células e incubaram-se as misturas a 4°C durante 30 minutos no escuro. As células foram lavadas uma vez com FACS gelada

e depois foram coradas com: (1) para células do baço, anticorpo anti-CD3 conjugado com CyChrome (2 ug/mL), Ig anti-hamster conjugado com FITC e anticorpo anti-CD8/CD4/CD19/CD11b/pan-NK/I-A/I-E/Mac-3 conjugado com PE (2 ug/mL) em 100 uL de solução de FACS gelada, e (2) para células do timo, Ig anti-hamster conjugado com FITC, anticorpos anti-CD8 conjugado com PE e anti-CD4 conjugado com CyChrome (2 ug/mL) em 100 uL de solução de FACS gelada. A reacção foi conduzida a 4°C durante 30 minutos no escuro. Por fim, as células coradas foram lavadas duas vezes com solução de FACS gelada, foram novamente suspensas em 1 mL de solução de FACS e analisadas com o citómetro de fluxo BD LSR (Becton Dickinson).

As Figs. 3 e 4 demonstram, por análise de FACS, a distribuição do antígeno PIAT nas várias subpopulações de esplenócitos e timócitos. Como mostrado na Fig. 3, células B CD19⁺ expressaram quantidades pequenas, mas detectáveis, de proteínas PIAT na superfície. Detectaram-se quantidades significativamente maiores de proteínas PIAT em células T CD3⁺ e numa fracção de células NK. A maior parte das células T do timo CD4⁺, CD8⁺ e CD4⁺8⁺ expressou quantidades significativas de proteínas PIAT. Em contraste, as proteínas PIAT foram expressas apenas numa pequena população de células T do timo CD4⁻8⁻ (Fig. 4).

Tecidos de ratinhos B6 e BALB/c, incluindo cérebro, timo, coração, pulmão, fígado, estômago, rim, baço e pele, foram recolhidos, fixados em formaldeído 10% durante a noite à temperatura ambiente e embutidos em blocos de parafina. Do bloco de parafina prepararam-se secções de tecidos, com 4 um de espessura, com um micrótomo Leica RM2135, tendo sido espalhadas em água a 45°C e colocadas

numa lâmina revestida. As lâminas foram secas a 37°C e ficaram prontas para experiências subsequentes.

As lâminas que continham as secções de parafina com tecido foram desparafinadas e secas com uma série de xilenos - etanol a 100% de acordo com o protocolo padrão e finalmente foram mantidas em etanol a 100%. As secções foram re-hidratadas com uma incubação em série de etanol a 100% - etanol a 90% - etanol a 85% - etanol a 70% - PBS, de acordo com o protocolo padrão, até uma solução final de PBS. Todas as reacções seguintes foram realizadas numa caixa humidificada. Bloqueou-se a ligação inespecífica incubando as secções de tecido em tampão de bloqueio (soro normal de cabra 1%) durante 1 hora à temperatura ambiente (ou 4°C durante a noite). Removeu-se o tampão de bloqueio, adicionou-se às secções TAB4 ou Ig de hamster normal (diluição 1:200) e continuou-se a incubação durante mais uma hora à temperatura ambiente (ou 4°C durante a noite). As secções foram lavadas duas vezes em PBS, durante 5 minutos cada, para remover o anticorpo primário, reagiram com Ig de cabra anti-hamster conjugado com fosfatase alcalina diluído 1:250 e foram incubadas à temperatura ambiente durante 1 hora. As secções foram novamente lavadas duas vezes com PBS, 5 minutos cada, para remover o conjugado anticorpo-enzima, e a reacção colorida foi desenvolvida com solução de substrato BCIP/NBT à temperatura ambiente durante 30 minutos no escuro. As secções foram novamente lavadas com PBS, para remover o substrato de enzima em excesso, foram desidratadas pela série de PBS-etanol-xilenos e montadas para microscopia.

Os resultados indicaram que a expressão de proteínas PIAT foi detectada apenas em tecidos derivados da medula óssea, mas não nos restantes tecidos testados.

Exemplo 5: Biotinilação da Superfície Celular e Imunoprecipitação do Antígeno PIAT

A superfície de 5×10^7 células RL61 ou NIH-3T3 foi biotinilada em 1 mL de PBS que continha 0,5 mg/mL de Sulfo-NHS-biotina (Pierce) durante 30 minutos em gelo. Terminou-se a reacção incubando as células com 0,5 mL de meio de Eagle modificado de Dulbecco (Life Technologies, Inc.) durante 10 minutos em gelo. As células foram lavadas uma vez com 1 mL de meio de Eagle modificado de Dulbecco e duas vezes com 1 mL de solução salina tamponada com fosfato.

As células etiquetadas foram submetidas a lise durante 15 minutos, a uma densidade de $5,0 \times 10^7$ células/mL, em tampão de lise frio (Triton X-100 1%, Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 160 mM, CaCl₂ 1 mM) que continha o "cocktail" completo de inibidores de proteases (Roche) e o material insolúvel foi transformado em grânulos a 10 000 x g durante 10 minutos; estes e todos os passos subsequentes foram realizados a 4°C. Para a imunoprecipitação, o lisato foi pré-incubado durante 30 minutos com 50 µL de proteína empacotada G-Sefarose (Amersham Pharmacia Biotech), para remover proteínas que se ligaram de forma inespecífica. As esférulas foram transformadas em grânulos, e alíquotas do sobrenadante (rotineiramente correspondentes a $5,0 \times 10^7$ células) foram incubadas com 20 µL de proteína G-Sefarose pré-carregada com 10 µg de mAb TBA4 ou IgG de soro de hamster normal. Após incubação durante 4 horas a 4°C, a resina foi lavada quatro vezes com tampão de lavagem

(Triton X-100 0,05%, Tris-HCl 50 mM, pH 8,5, NaCl 400 mM, CaCl₂ 1 mM, 1 mg/mL de ovalbumina), duas vezes com um tampão de lavagem semelhante que continha NaCl 250 mM em vez de 400 mM. As proteínas especificamente ligadas ao TAB4 foram eluídas com 50 µL de tampão de amostras 1 x SDS. As proteínas eluídas foram separadas por SDS-PAGE 8% e foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Millipore). Os filtros foram analisados quanto a proteínas biotiniladas com Avidina conjugada com peroxidase (PharMingen) e foram desenvolvidos com o reagente de Quimioluminescência (NENTM Life Science Products).

Como mostrado na Fig. 2, uma proteína de superfície biotinilada com um peso molecular aproximadamente de 120 kD foi identificada pelo TAB4 em células RL^{cl} (células T PIAT⁺) mas não em células 3T3 (células PIAT⁻). Em contraste a proteína G sefarose revestida com soro normal de hamster não conseguiu recolher esta proteína de 120 kDa. Estes resultados sugerem que esta proteína de 120 kDa é o antígeno reconhecido pelo anticorpo monoclonal TAB4 na superfície celular de células T.

Exemplo 6: Depleção de Células T *in vivo*

Para examinar os efeitos do TAB4 em populações de células T e outras células *in vivo*, ratinhos foram injectados intraperitonealmente com 300 µg de TAB4 ou Ig de hamster de controlo; no dia 4 recolheram-se esplenócitos, timócitos e células mononucleares do sangue periférico para a contagem do total de células e para as análises de marcadores da superfície celular por FACS.

Para os ensaios de FACS, as células foram fixadas com paraformaldeído a 2% a 4°C durante 20 minutos, foram

lavadas duas vezes e novamente suspensas em solução de FACS gelada para uma concentração final de 1×10^7 células/mL. Para cada ensaio utilizou-se uma aliquota de 100 μL das células novamente suspensas num tubo de FACS (Falcon). Adicionou-se às células TAB4 ou Ig de hamster de controlo, a uma concentração final de 2 $\mu\text{g/mL}$, e incubaram-se as misturas a 4°C durante 30 minutos no escuro. As células foram lavadas uma vez com FACS gelada e reagiram com: (1) para células do baço, anticorpo anti-CD3 conjugado com CyChrome (2 $\mu\text{g/mL}$), Ig anti-hamster conjugado com FITC e anticorpo anti-CD8/CD4/CD19/CD11b/pan-NK/I-A/I-E/Mac-3 conjugado com PE (2 $\mu\text{g/mL}$) em 100 μL de solução de FACS gelada, e (2) para células do timo, Ig anti-hamster conjugado com FITC, anticorpos anti-CD8 conjugado com PE e anti-CD4 conjugado com CyChrome (2 $\mu\text{g/mL}$) em 100 μL de solução de FACS gelada. A reacção foi conduzida a 4°C durante 30 minutos no escuro. Por fim, as células coradas foram lavadas duas vezes com solução de FACS gelada, foram novamente suspensas em 1 000 μL de solução de FACS e analisadas com o citómetro de fluxo BD LSR (Becton Dickinson).

Quatro dias após a injecção, as percentagens de células T CD3⁺ em leucócitos do sangue periférico (PBL) diminuíram de 36,7% em ratinhos de controlo para 4,1% em ratinhos tratados com TAB4 (Tabela 2). O tratamento com TAB4 causou uma redução ligeira do número total de esplenócitos. No entanto, em ratinhos tratados com TAB4 ocorreu um decréscimo de 62% do número de células T CD3⁺, um decréscimo de 50% do número de células NK e um aumento ligeiro do número total de células B CD19⁺. O número total de timócitos recuperados de ratinhos tratados com TAB4 foi apenas 48% do nível observado no controlo (reduzido em

52%). Além disso, exceptuando células T CD4+, todas as outras células T CD8+, CD4+CD8+ e CD4-CD8- foram reduzidas, em que a subpopulação de CD4+CD8+ foi a mais profundamente afectada (redução de 64,7%).

TABELA 2

Baço				
$\times 10^6$	Sem Tratamento	Ig de Hamster Normal	Tratados com TAB4	Depleção (%)
Total de Esplenócitos	123	93,3	105	14,6
Células T CD3 ⁺	32,8	28,4	12,4	62,2
CD3 ⁺ CD 19 ⁺	72,2	53,4	72,9	-0,8
CD3 ⁺ NK ⁺	3,6	2,4	1,80	50
Leucócitos do Sangue Periférico				
	Sem Tratamento	Ig de Hamster Normal	Tratados com TAB4	Depleção (%)
Células T CD3 ⁺	36,7%	36%	4,1%	88,8%
Timo				
$\times 10^6$	Sem Tratamento	Ig de Hamster Normal	Tratados com TAB4	Depleção (%)
Total de Timócitos	94	229	45	52,1
CD4 ⁺	9,3	28,4	10,9	-16,6
CD8 ⁺	5,2	7,7	3,6	30,3
CD4 ⁺ CD8 ⁺	73,8	182	26	64,7
CD4 ⁻ CD8 ⁻	5,6	10,5	4,5	19,3
(dados representativos de três experiências)				

Exemplo 7: Anticorpo Anti-PIAT Não Induz Secreção de IL-2 nem TNF- α

Ratinhos Balb/c (H-2d) foram injectados intraperitonealmente com 300 microgramas de TAB4 ou Ig de hamster de controlo. Isolaram-se esplenócitos 7 dias após a injecção, tendo sido utilizados como respondedores em cultura com esplenócitos C3H tratados com mitomicina C (H-2k) (como estimuladores). Três dias depois recolheram-se os sobrenadantes da cultura e mediu-se o teor de IL-2 com um conjunto de ELISA (PharMingen). Como mostrado na Fig. 5, a produção de IL-2 foi suprimida em células respondedoras derivadas de ratinhos tratados com TAB4 em comparação com os ratinhos de controlo. Também se analisaram os níveis no plasma de IL-2 e TNF- α , não se tendo notado diferenças significativas nos níveis de IL-2 (ou TNF- α) nos soros dos ratinhos de controlo e tratados com TAB4. Uma vez que a produção de IL-2 é central para a actividade de células T, os resultados mostram que um anticorpo específico para PIAT, como TAB4, pode ser utilizado *in vivo* para manipular células T e controlar respostas imunológicas indesejadas mediadas por células T, como as associadas a doenças autoimunes e rejeição de transplantações.

Exemplo 8: Utilização de um Anticorpo Anti-PIAT para Prevenir a Rejeição de Transplantes

Ratinhos (obtidos do Jackson Laboratory) com 8 até 12 semanas de idade foram anestesiados com Maleato de acepromazina (Fermenta Animal Health Co., Kansas City, MO). Antes do enxerto de pele, ratinhos C57BL/6 receptores não timectomizados (H-2^b) foram injectados intraperitonealmente com 500 ug de TAB4 ou anticorpos de controlo do isotipo sete dias antes da cirurgia de transplante da pele. Sete

dias depois, um flanco lateral de pele de ratinhos Balb/cj não correspondentes completamente alogeneicos (H-2^d) foi enxertado no flanco lateral dos ratinhos C57BL/6 pré-tratados com anticorpo. Sete dias pós-transplantação, os ratinhos foram novamente injectados com 500 ug de TAB4 ou anticorpo de controlo do isotipo. Os ratinhos foram monitorizados todos os dias após a transplantação do enxerto. Os enxertos foram considerados rejeitados quando 50% da pele dadora estava necrótica. Apresenta-se na Fig. 7 a percentagem de sobrevivência dos enxertos (n = 8). Os dados mostram que tratamentos com anticorpo TAB4 prolongaram a sobrevivência dos enxertos de pele alogeneicos.

Exemplo 9: Identificação de PIAT com PSGL-1

O ligando-1 glicoproteico da P-selectina (PSGL-1), também denominado CD162, é o principal ligando da P-selectina expresso em leucócitos, incluindo células T (Sako *et al.* (1993) *Cell* 75: 1179; Vachino *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 21966; Veldman *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 16470). As características bioquímicas da PIAT, como o seu peso molecular e a sua tendência para dimerização, sugeriram a possibilidade da PIAT poder ser análoga à PSGL-1. Para investigar a relação entre estes dois抗ígenos testou-se o seguinte: 1) se o抗ígeno precipitado pelo TAB4 pode ser reconhecido por um anticorpo anti-PSGL-1 comercialmente disponível, e 2) se um anticorpo anti-PSGL-1 pode proceder à depleção de PIAT do lisato celular.

Células RL⁶¹ foram submetidas a lise, a uma densidade de 1,0 × 10⁸ células/mL, em tampão de lise (Triton X-100 1%, Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 160 mM, CaCl₂ 1 mM) que continha o "cocktail" completo de inibidores de proteases

durante 1 hora, e o material insolúvel foi transformado em grânulos a 10 000 x g durante 10 minutos. Estes e todos os passos subsequentes foram realizados a 4°C. O lisato correspondente a $5,0 \times 10^7$ células foi incubado com 20 uL de proteína G-Sefarose novamente carregada com 10 ug de mAb anti-PSGL-1 (clone 2P-1, PharMingen, San Diego, CA), mAb anti-PIAT, TAB4 ou IgG de soro de hamster normal. Após incubação durante 4 horas a 4°C, as esférulas foram lavadas cinco vezes com tampão de lavagem (Triton X-100 0,05%, Tris-HCl 50 mM, pH 8,5, NaCl 400 mM, CaCl₂ 1 mM, 1 mg/mL de ovalbumina) e duas vezes com um tampão de lavagem semelhante que continha NaCl 250 mM em vez de 400 mM. As proteínas ligadas foram eluídas com 40 uL de tampão de amostras 1 x SDS. As proteínas eluídas foram separadas por SDS-PAGE 6% e foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. As membranas foram submetidas a imunocoloração com mAb anti-PSGL-1 e foram reveladas com IgG de cabra anti-rato conjugado com peroxidase (H+L) seguida de quimioluminescência (Renaissance, NEN).

As células T RL⁶1 biotiniladas na superfície foram submetidas a lise a uma densidade de $1,0 \times 10^8$ células/mL em tampão de lise. O extracto celular foi incubado com 20 ug de anticorpo ligado a 40 uL de proteína G-Sefarose a 4°C durante a noite. Efectuaram-se depleções com mAb anti-PSGL-1 (2PH1) ou IgG de rato de controlo, com TAB4 ou soro de hamster normal de controlo. Os lisatos depletados foram suplementarmente submetidos a imunoprecipitação com TAB4 ou mAb anti-PSGL-1, respectivamente. Os imunoprecipitados foram separados em gel de SDS-poliacrilamida 6% e detectados por fluorografia. Como mostrado na Fig. 6, o anticorpo anti-PSGL-1 consegue proceder à depleção da proteína PIAT de lisatos de células T. Adicionalmente,

proteínas imunoprecipitadas com anticorpo anti-PIAT (TAB4) podem ser reconhecidas pelo anticorpo anti-PSGL-1 por análise "Western".

Exemplo 10: Indução de Apoptose em Células T Humanas por um Anticorpo Anti-PSGL-1

Para determinar o papel desempenhado pela PSGL-1 na apoptose de células T humanas realizaram-se experiências temporais para investigar quando é que células T humanas activadas adquirem sensibilidade a sinais apoptóticos mediados pela PSGL-1. Células T humanas foram estimuladas com o mitogene fito-hemaglutinina (PHA) e foram suplementarmente expandidas em meio que continha IL-2. Células T activadas foram recolhidas e depois provocadas com anti-PSGL-1 na presença de IL-2 e anticorpos de formação de ligações cruzadas.

Sangue periférico humano foi recolhido de adultos saudáveis, foi heparinizado e enriquecido em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) com base na densidade diferencial utilizando Ficoll-Paque Plus (Pharmacia Biotech). As PBMC's foram activadas com PHA 1% (Life Technologies, GibcoBRL) durante 48 horas e subsequentemente foram mantidas em IL-2 humana recombinante (5 ng/mL) ao longo do período do ensaio. Para avaliar a capacidade indutora de apoptose de um anticorpo anti-PSGL-1 humano, as células activadas foram tratadas com: (1) 1 ug/mL do clone KPL-1 do anticorpo anti-PSGL-1 (BD PharMingen) mais Ig de coelho anti-ratinho formador de ligações cruzadas (0,5 ug/mL) (Jackson ImmunoResearch Laboratories); (2) Ig de ratinho purificado de controlo do isótipo mais Ig de coelho anti-ratinho formador de ligações cruzadas, ou (3) Ig de coelho anti-ratinho formador de

ligações cruzadas isoladamente. Após seis horas de tratamento determinou-se a percentagem de células apoptóticas precoces por FACS, coloração com anti-Anexina V (BD PharMingen) e PI (Sigma).

Como mostrado na Fig. 8, a sinalização desencadeada pela PSGL-1 utilizando um anticorpo anti-PSGL-1 mais o agente de formação de ligações cruzadas desencadeou um nível significativo de apoptose em PBMC's humanas activadas com PHA (maioritariamente células T). A percentagem de células apoptóticas aumentou de 8,5% no dia 3 para 24% no dia 8 em culturas tratadas com anti-PSGL-1. Nem o controlo de isotipo correspondente nem os anticorpos formadores de ligações cruzadas isoladamente tiveram qualquer efeito nestas células.

Exemplo 11: Utilização de um Anticorpo Agonista Anti-PSGL-1 para Tratar Doença Autoimune

Ratinhos não obesos diabéticos (NOD), um animal de diabetes autoimune bem aceite, foram criados em condições padrão. Desenvolveu-se diabetes espontânea nos ratinhos NOD às cerca de 20 semanas de idade. No grupo experimental, os ratinhos receberam três doses de anticorpo anti-PSGL-1 (TAB4) intraperitonealmente, a 300 µg por rato, às 14, 15 e 17 semanas de idade. Administraram-se duas injecções adicionais com a mesma dose às 24 e 26 semanas de idade. O grupo de controlo recebeu Ig de hamster na mesma dose. Os ratinhos foram monitorizados quanto a glucosúria com tiras de Glucose Medi-Test (Macherey-Nagel, Alemanha) duas vezes por semana após as 15 semanas de idade. Níveis de glucose na urina em desjejum superiores a 300 mg/dL em duas medições consecutivas foram considerados diabéticos.

Como mostrado na Fig. 9, o tratamento com o anticorpo TAB4 (anti-PSGL-1) conferiu protecção significativa em comparação com o tratamento com o anticorpo de controlo. Assim, um tratamento com um anticorpo anti-PSGL-1 pode amortecer a actividade de células T autoimunes e retardar o aparecimento de diabetes do tipo I.

Lisboa, 12 de Dezembro de 2008

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo, ou respectivo fragmento de ligação de antigenes, que se liga especificamente ao Ligando-1 Glicoproteico da P-Selectina (PSGL-1) na superfície de uma célula T activada e induz a morte da célula T activada, para utilização como medicamento.
2. Utilização de um anticorpo, ou respectivo fragmento de ligação de antigenes, que se liga especificamente ao Ligando-1 Glicoproteico da P-Selectina (PSGL-1) na superfície de uma célula T activada e induz a morte da célula T activada, no fabrico de um medicamento destinado ao tratamento ou prevenção de uma doença autoimune mediada por células T.
3. Anticorpo da Reivindicação 1 ou utilização da Reivindicação 2, em que o anticorpo é um anticorpo monoclonal.
4. Utilização da Reivindicação 3, em que o medicamento também comprehende um agente que se liga ao anticorpo monoclonal e induz ligação cruzada de uma pluralidade de antigenes PSGL-1 na superfície da célula T activada, para administração em combinação.
5. Utilização da Reivindicação 2, em que a doença autoimune mediada por células T é diabetes autoimune.
6. Utilização da Reivindicação 2, em que a doença autoimune mediada por células T é artrite reumatóide.

7. Utilização da Reivindicação 2, em que a doença autoimune mediada por células T é psoriase.
8. Utilização da Reivindicação 2, em que a doença autoimune mediada por células T é esclerose múltipla.
9. Utilização de um anticorpo, ou respectivo fragmento de ligação de抗原, que se liga especificamente ao Ligando-1 Glicoproteico da P-Selectina (PSGL-1) na superfície de uma célula T activada e induz a morte da célula T activada, no fabrico de um medicamento destinado ao tratamento ou prevenção de rejeição de transplantes alogeneicos ou xenogeneicos.
10. Utilização de um anticorpo, ou respectivo fragmento de ligação de抗原, que se liga especificamente ao Ligando-1 Glicoproteico da P-Selectina (PSGL-1) na superfície de uma célula T activada e induz a morte da célula T activada, no fabrico de um medicamento destinado ao tratamento ou prevenção de doença de enxerto-versus-hospedeiro.
11. Anticorpo da Reivindicação 1 ou utilização da Reivindicação 2, em que a célula T activada é uma célula T CD4+.
12. Anticorpo da Reivindicação 1 ou utilização da Reivindicação 2, em que a célula T activada é uma célula T CD8+.
13. Método de rastreio *in vitro* quanto a um anticorpo, ou respectivo fragmento de ligação de抗原, que se

liga especificamente à PSGL-1 que induz a morte de uma célula T activada, em que o método compreende:

proporcionar uma célula T activada que expressa a PSGL-1 na superfície da célula T activada; contactar a célula T activada *in vitro* com um anticorpo, ou respetivo fragmento de ligação de antigenes, que se liga especificamente à PSGL-1, e medir a viabilidade da célula T activada após o contacto da célula T activada com o anticorpo, ou respetivo fragmento de ligação de antigenes, para desse modo determinar se o anticorpo, ou respetivo fragmento de ligação de antigenes, é um anticorpo anti-PSGL-1 que induz a morte de uma célula T activada.

14. Método da Reivindicação 13, em que o anticorpo é um anticorpo monoclonal.
15. Método da Reivindicação 14 que também compreende contactar o anticorpo monoclonal com um anticorpo que se liga ao anticorpo monoclonal e induz a ligação cruzada de uma pluralidade de antigenes PSGL-1 na superfície da célula T activada.
16. Método da Reivindicação 13, em que a célula T activada é uma célula T CD4+.
17. Método da Reivindicação 13, em que a célula T activada é uma célula T CD8+.

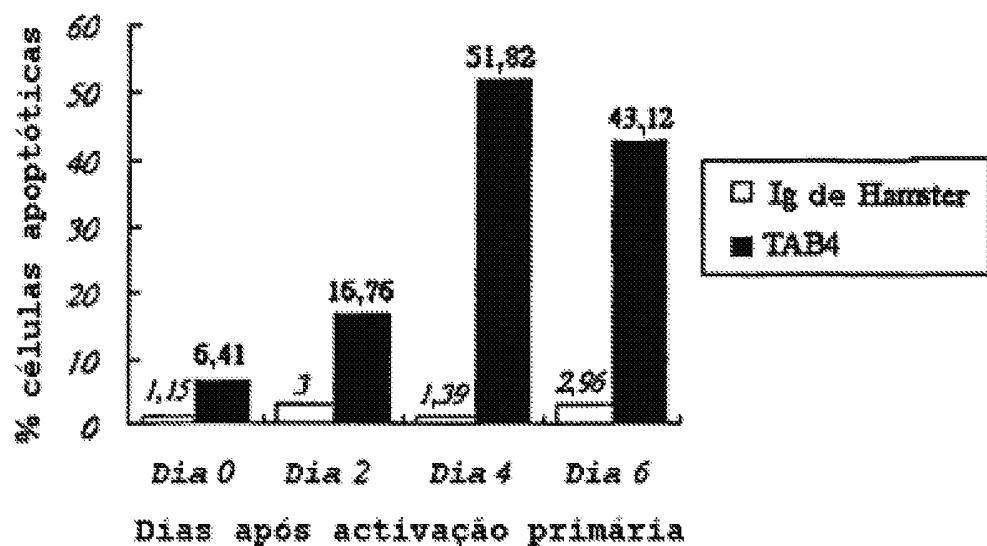
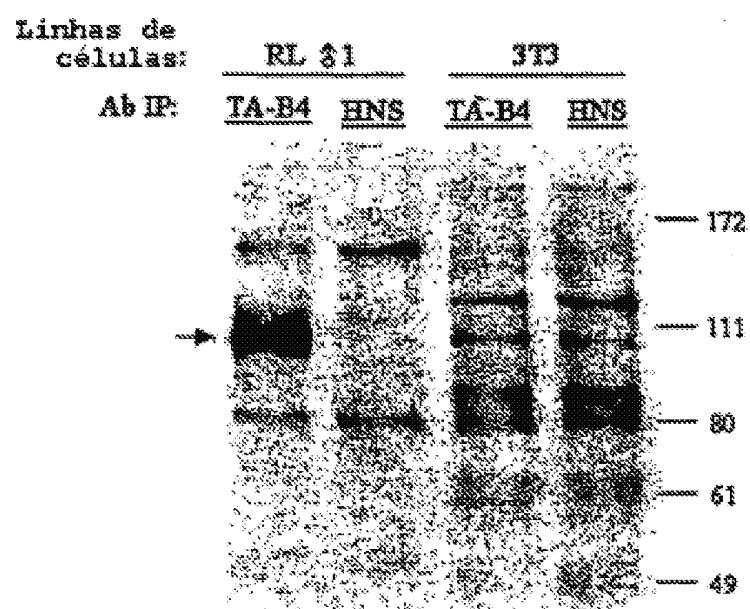


Fig. 1



Ab IP: Anticorpo utilizado para imunoprecipitação
TA-B4: Anticorpo monoclonal TA-B4
HNS: Soro normal de hamster

Fig. 2

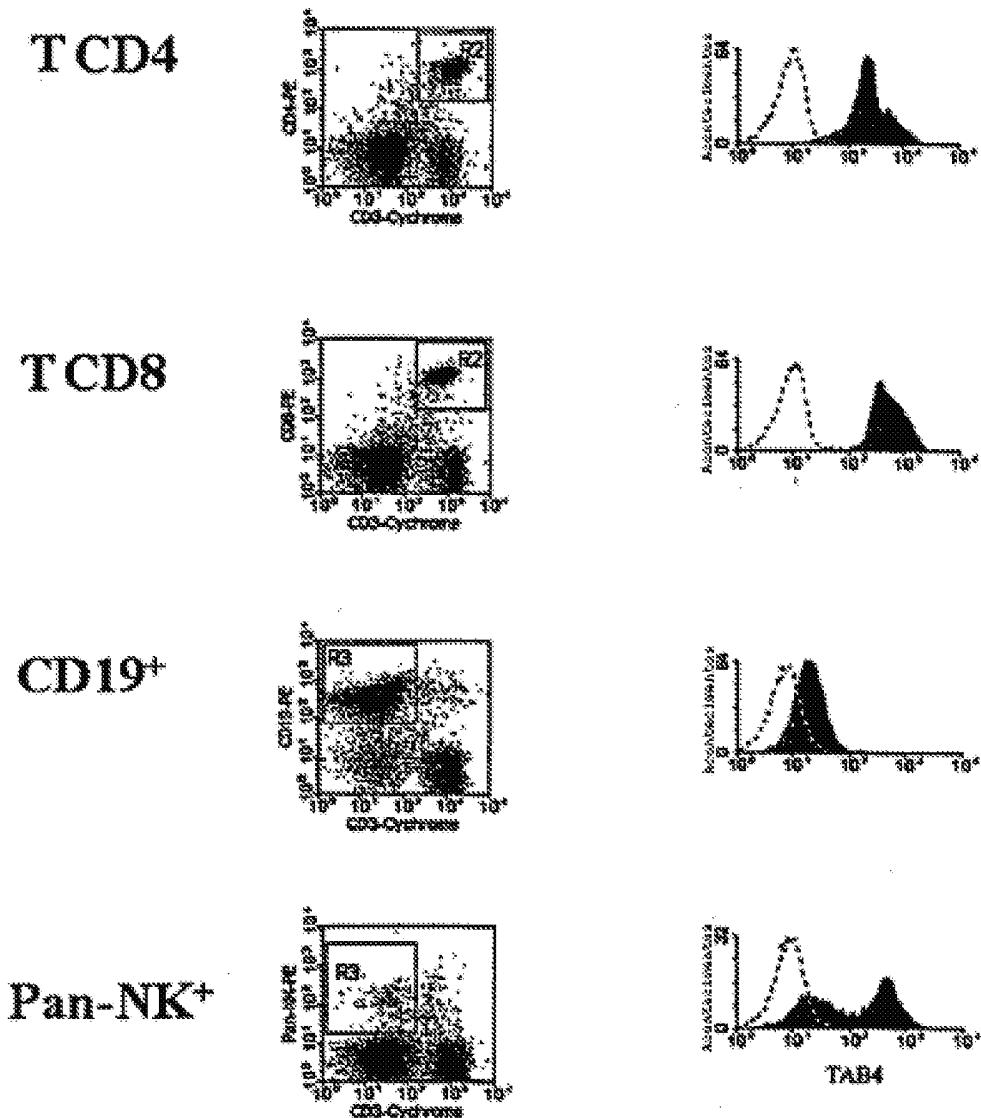


Fig. 3

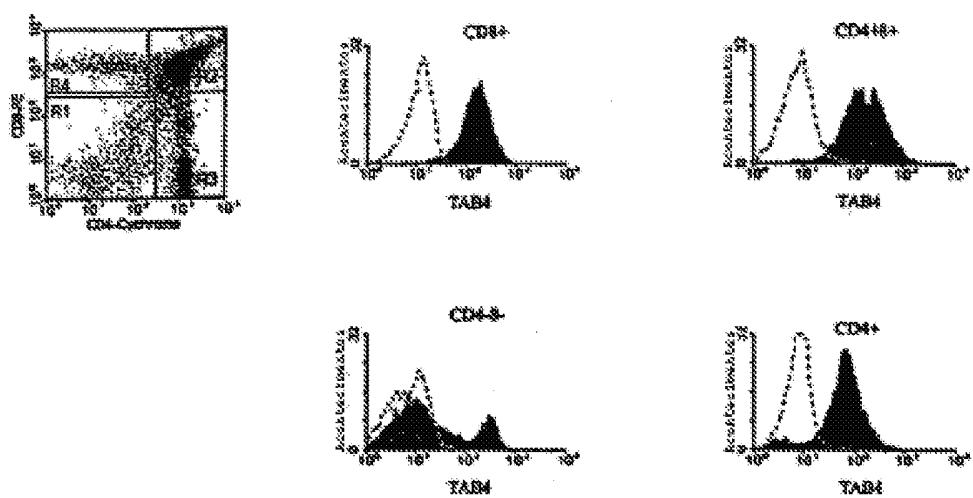


Fig. 4

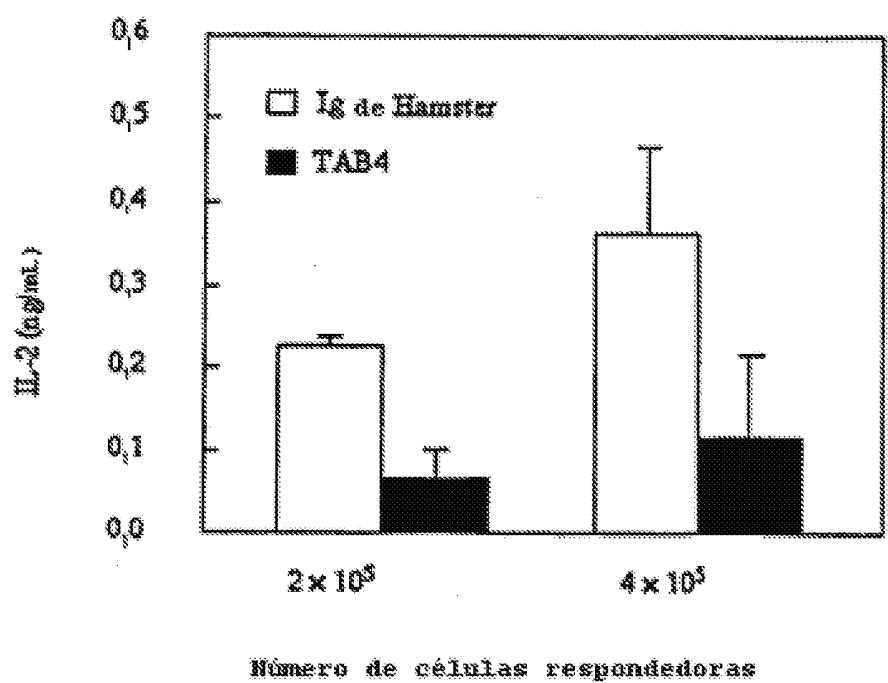


Fig. 5

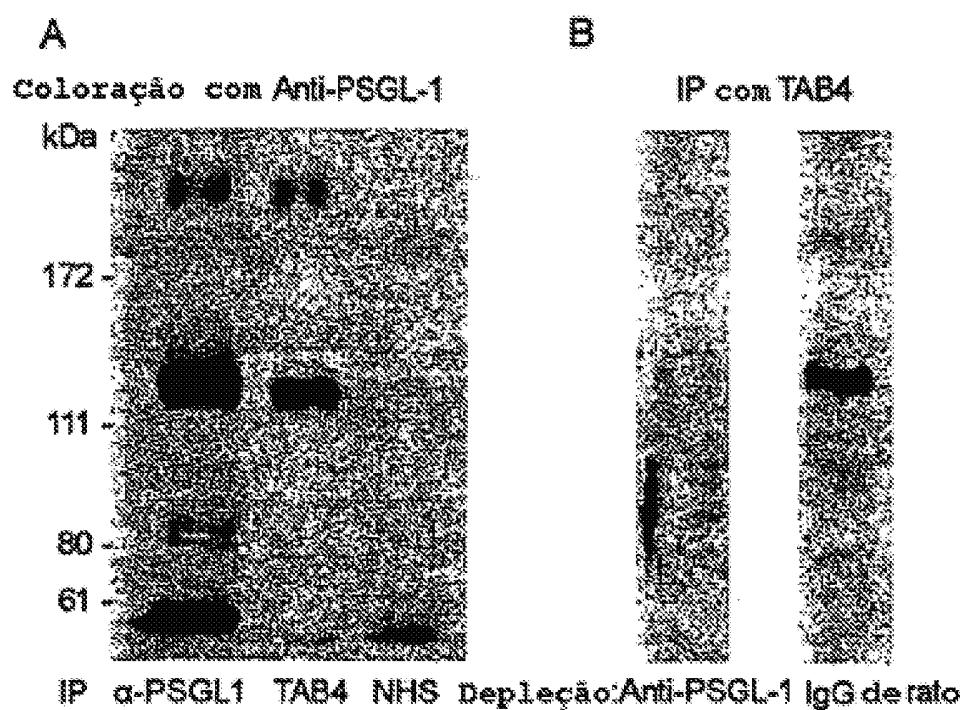


Fig. 6

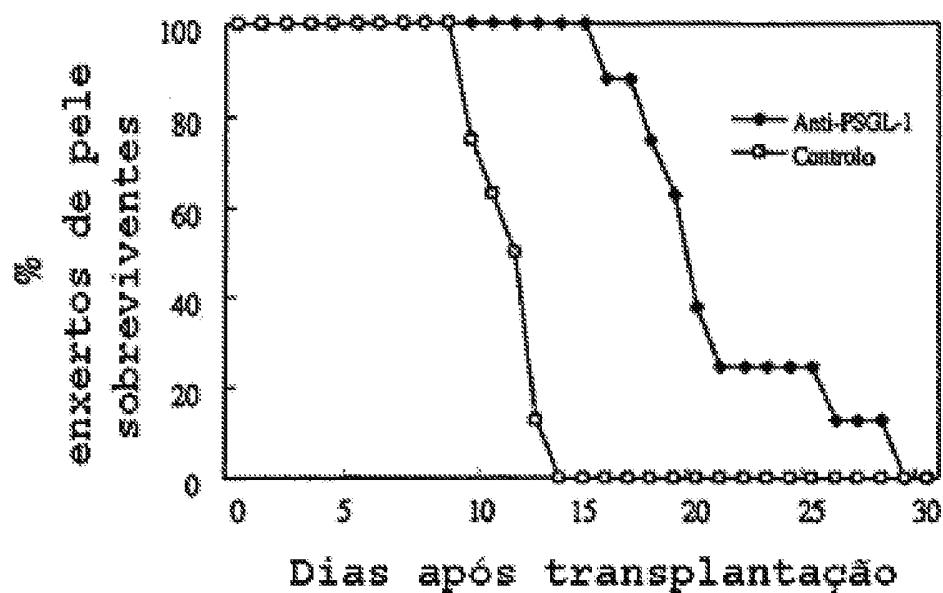


Fig. 7

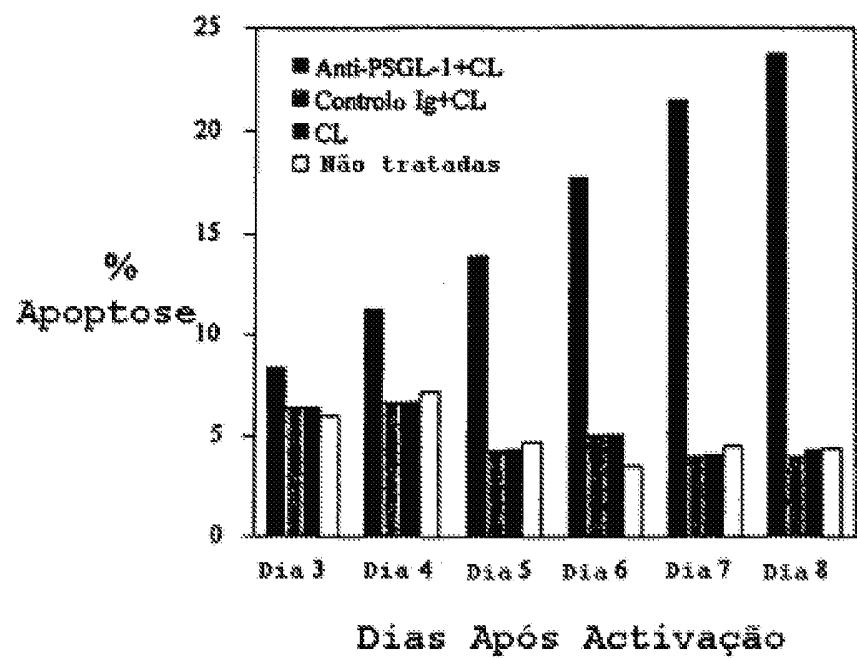


Fig. 8

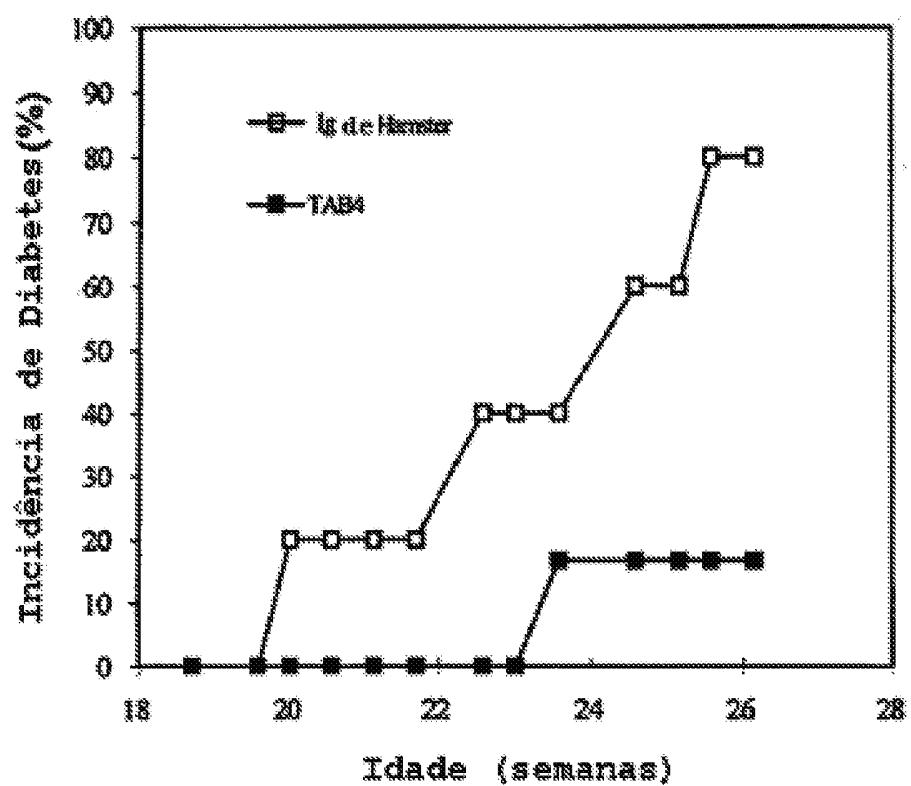


Fig. 9