

MEMÓRIA DESCRITIVA
DA
PATENTE DE INVENÇÃO
Nº 95 180

NOME: ELIZABETH WAYNER, norte-americana, com sede em 2108 Sea
Village Circle, Cardiff, CA 92007, E.U.A.

EPÍGRAFE: "Processo de preparação de composições farmacêuticas
para a inibição da aderência de linfócitos às
células endoteliais"

INVENTORES:

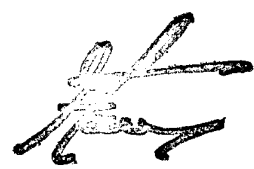
Reivindicação do direito de prioridade (ao abrigo do artigo
4º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883):

E.U.A, em 1 de Setembro de 1989 sob o nº 07/402.389

71 487

0624-07e-118

PATENTE Nº 93 180



"Processo de preparação de composições farmacêuticas para a inibição da aderência de linfócitos às células endoteliais"

para que
ELIZABETH WAYNER, pretende obter privilégio de invenção em Portugal.

R E S U M O

O presente invento refere-se ao processo de preparação de uma composição farmacêutica para a inibição da aderência de linfócitos às células endoteliais, o qual compreende associar uma quantidade eficaz de anticorpo, fragmento de anticorpo ou seu derivado, que inibe a aderência de um receptor da matriz extracelular dos linfócitos às células endoteliais, ou de um peptídeo que inibe a aderência de linfócitos às células endoteliais, com um veículo farmacologicamente aceitável.

MEMÓRIA DESCRITIVA

1. INTRODUÇÃO

O presente invento diz respeito a um processo para a inibição da adesão de uma célula a outra. Baseia-se na determinação de que o receptor da matriz extracelular $\alpha 4 \beta 1$ promove a adesão de linfócitos a células endoteliais, por meio de ligação a uma cadeia peptídica definida. Em concretizações particulares do invento, podem usar-se peptídeos ou anticorpos monoclonais para inibir a ligação de linfócitos a células endoteliais, impedindo desse modo a entrada de linfócitos no tecido e suprimindo a resposta imunológica.

2. ANTECEDENTES DO INVENTO

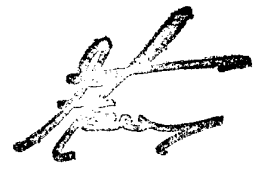
2.1. RECEPTORES DA MATRIZ EXTRACELULAR

Têm sido descritos receptores (R) da superfície celular específicos de componentes da matriz extracelular (ECM), tais como colagénio, fibronectina e laminina (revisão de Hynes, 1987, Cell, 48:545-554; Hemler, 1988, Immunol. Today, 9:109). As funções dos receptores da matriz extracelular (ECMRs I, II e VI) foram definidas por cromatografia de afinidade (Wayner and Carter, 1987, J. Cell Biol., 105:1873-1884; Staats *et al.*, 1989, J. Cell Biol., 198:1917-1924) e através da preparação de anticorpos monoclonais que inibissem especificamente a interacção de células com ligandos purificados (Wayner and Carter, 1987, J. Cell Biol., 105:1873-1884) ou ECM (Wayner *et al.*, 1988, J. Cell Biol., 107:1881-1891).

Identificou-se uma diversidade de ECMRs, utilizando estas técnicas. Utilizando anticorpos monoclonais, Wayner e Carter (1987, J. Cell Biol., 105:1873-1884) identificaram duas classes de receptores da superfície celular para o colagénio nativo, em células de fibrossarcoma humano; a classe I estava envolvida na adesão das células ao colagénio, fibronectina e laminina, enquanto a classe II estava envolvida na adesão das células apenas a colagénio nativo. Wayner *et al.* (1988, J. Cell Biol., 107:1881-1891) identificaram anticorpos monoclonais que inibiam

a adesão de células humanas ao colagénio (P1H5), fibronectina (P1F8 ou P1D6) e a ambos, colagénio e fibronectina (P1B5); determinou-se que o P1F8 e o P1D6 reagiam com um receptor de superfície, de 140 kDa, conhecido por ECMR VI. Kunicki et al (1988, J. Biol. Chem., 263:4516-4519), relataram que o P1H5 (supra) também inibia especificamente a adesão de plaquetas humanas inactivadas ao colagénio das I e III, mas não a fibronectina. Isolou-se um complexo, que compreendia pelo menos três glicoproteínas, a partir de fibroblastos de embrião de galinha, utilizando anticorpos monoclonais que bloqueavam a adesão das células à fibronectina (Knudsen et al, 1985, Exp. Cell Res., 157:218-226; Chem et al, 1985, J. Cell Biol., 100:1103-1114), ao passo que a partir de células de mamíferos se isolou um complexo de duas glicoproteínas, utilizando cromatografia de afinidade à vitronectina (Pytela et al, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:5766-5770; Pytela et al, 1986, Science, 231:1559-1562). Determinou-se que as glicoproteínas mais importantes IIb e IIIa, da superfície das plaquetas, existiam na forma de um complexo 1:1 não-covalente, na membrana da plaqueta (Jennings and Phillips, 1982, J. Biol. Chem., 257:10458-10463), e que serviam de ECMR para fibrinogénio (Bennett et al, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80:2417-2421; Marguerie et al, 1984, Eur. J. Biochem., 139:5-11), fibronectina (Gardner and Hynes, 1985, Cell, 42:439-448; Plow et al, 1985, Blood, 66:724-727), factor de von Willebrand (Ruggeri et al, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79:6038-6041) e vitronectina (Pytela et al, 1986, Science, 231:1559-1562).

O imenso conjunto de receptores da matriz extracelular partilha homologia estrutural. Os ECMRs são membros da família da integrina de moléculas que aderem às células e possuem subunidades α únicas complexadas com a subunidade $\beta 1$ da integrina (Hynes, 1987, Cell, 48:549-554; Wayner and Carter, 1987, J. Cell Biol., 106:1873-1884; Wayner et al, 1988, J. Cell Biol., 107:1881-1891). Outros membros da família de receptores da integrina, incluem proteínas de adesão de leucócitos e os antígenos de VLA. As proteínas de adesão de leucócitos incluem



LFA-1, Mac-1 e P150/95 e são glicoproteínas dimericas compostas por diferentes cadeias α e uma cadeia β , com 95 kDa, comum (Kishimoto *et al.*, 1987, *Cell*, 48:681-690). Os antígenos de VLA são designados a partir do seu aparecimento muito tardio em linfócitos T cultivados (Hemler *et al.*, 1983, *J. Immunol.*, 131:334-340; Hemler *et al.*, 1984, *J. Immunol.*, 132:3011-3018; Hemler *et al.*, 1985, *Eur. J. Immunol.*, 15:502-508). Determinou-se que antissoros da subunidade VLA- β bloqueavam a adesão de células a fibronectina ou à laminina (Takada *et al.*, 1987, *Nature*, 326:607-610).

Identificaram-se inter-relações entre esses ECMRs. O ECMR VI é idêntico ao receptor de fibronectina protótipo (Pytela *et al.*, 1985, *Cell*, 40:191-198), $\alpha 5 \beta 1$, glicoproteína (gp) Ic/IIa das plaquetas e VLA5, o ECMR II é idêntico a $\alpha 2 \beta 1$, glicoproteína Ia/IIa das plaquetas e VLA 2 (Hemler *et al.*, 1987, *J. Biol. Chem.*, 262:11478-11485) e o ECMR I é idêntico ao $\alpha 3 \beta 1$ e VLA 3 (Kunicki *et al.*, 1988, *J. Biol. Chem.*, 263:4516-4519; Takada *et al.*, 1988, *J. Cellular Biochem.*, 37:385-393; Wayner *et al.*, 1988, *J. Cell Biol.*, 107:1881-1891). Anticorpos monoclonais de $\alpha 2 \beta 1$, $\alpha 3 \beta 1$ e $\alpha 5 \beta 1$ (F1H5, F1D6 e F1B5), inibem a adesão de fibroblastos ou plaquetas a colágeno, fibronectina e superfícies revestidas com laminina (Kunicki *et al.*, 1988, *J. Cell Biol.*, 107:1881-1891; Wayner *et al.*, 1988, *supra*). A Tabela I lista alguns dos membros da família da integrina descrita acima e a Tabela II lista um conjunto de anticorpos monoclonais que reconhecem diversos ECMRs.

Tabela I: Família do Receptor da Integrina

Receptor	Composição das Subunidades	Ligandos Conhecidos	Funções Conhecidas
Complexo de integrina de galinha	$\alpha_0\beta_1$ $\alpha_3\beta_1$	FN, LM, VN	Adesão de células, migração de células, conexão citoesquelética
Receptor da fibronectina	$\alpha_5\beta_1$	FN	Adesão a Fibronectina
Receptor da vitronectina	$\alpha_5\beta_1$	VN	Adesão a Vitronectina
Glicoproteína 11b/111a	$\alpha_{II}\beta_3$	FN, FB, VN, VWF	Adesão e agregação de plaquetas
LFA-1	$\alpha_1\beta_2$	ICAM-1, ICAM-2	Adesão de leucócitos ao Endotélio
MAC-1	$\alpha_M\beta_2$	C3bi	Adesão de monócitos e leucócitos ao receptor C3b
p150/95	$\alpha_{1-6}\beta_1$	C3bi	Adesão de neutrófilos
VLA's 1-6	$\alpha_{1-6}\beta_1$	FN, COL, LAM	Adesão de células, migração e conexão citoesquelética
Epitelial	$\alpha_6\beta_4$	LAM	Adesão epitelial
Epitelial	$\alpha_V\beta_5$	VN, FN	Adesão de células epiteliais a VN, FN



Tabela 1 (continuação)

Receptor	Composição das Subunidades	Ligandos Conhecidos	Funções Conhecidas
ECMRs I, II, VI, V	$\alpha_2\beta_1$	COL, IAM	Adesão a COL, LM
	$\alpha_3\beta_1$	COL, LM, FN	Adesão a COL, LM, FN
	$\alpha_4\beta_1$		Anteriormente desconhecidas
	$\alpha_5\beta_1$	FN	Adesão a FN

71 489

5624-076-113



-7-

TABELA II

Anticorpos anti-ECMR

<u>Anticorpo</u>	<u>Receptor</u>	<u>Ligando</u>	<u>Referência</u>
P1H3	$\alpha_2\beta_1$	Colagénio Laminina	(Wayner <u>et al.</u> , 1987, J Cell Biol., <u>105</u> :1873-1884; Wayner <u>et al.</u> , 1988, J. Cell Biol., <u>107</u> :1881-1891)
P1B5	$\alpha_3\beta_1$	Colagénio Fibronectina	(Wayner <u>et al.</u> , 1987 J. Cell Biol., <u>105</u> :1873-1884
P4C2	$\alpha_4\beta_1$	Fibronectina (CS-1)	
Celula P1D6	$\alpha_5\beta_1$	Fibronectina (Arg-Gli-Asp- -Ser)	(Wayner <u>et al.</u> , 1988, J. Cell Biol., <u>105</u> :1873-1884
P4C10	β_1	FN, COL, LAM	
P4119	β_2 (Cd18)		



As integrinas $\beta 1$ são expressas diferencialmente em tecido e células cultivados e demonstram diferenças claras na expressão dependente de activação. Por exemplo, a expressão de $\alpha 5 \beta 1$ em células hematopoéticas restringe-se a subpopulações de timócitos e linfócitos do sangue periférico, monócitos, leucemias agudas linfocíticas ou mielógenosas, células T activadas, células precursoras hematopoéticas migradoras e a algumas linhagens de células T, B ou eritroleucémicas (Bernardi *et al.*, 1987, J. Cell Biol., 105:489-498; Cardarelli *et al.*, 1988, J. Cell Biol., 106:2183-2190; Garcia-Pardo *et al.*, 1989 Garcia-Pardo *et al.*, 1989, Exp. Cell Res., 181:420-431; Giancotti *et al.*, 1986, J. Cell. Biol., 103:429-437; Liao *et al.*, 1987, Exp. Cell Res., 171:306-320; Wayne *et al.*, 1988, J. Cell Biol. 107:1881-1891.

2.2. FIBRONECTINA

A fibronectina é uma proteína detectada na matriz extracelular bem como no plasma e na superfície de certos tipos de células (Akiyama and Yamada, 1987, Adv. Enzymol., 59:1-57). No plasma, a fibronectina existe na forma de um heterodímero glicoproteico, que consiste de duas subunidades similares (designadas cadeias A e B), cada uma delas com uma massa molecular de 220 kDa, aproximadamente (Akiyama and Yamada, 1987, Adv. Enzymol., 59:1-57; Erickson *et al.*, 1981, J. Cell Biol., 91:673-678). Podem cindir-se múltiplos domínios intramoleculares especializados (Ruoslahti *et al.*, 1981, J. Biol. Chem. 256:7277-7281) da molécula de fibronectina, com fragmentos, os quais, por seu turno, são capazes de interagir com colagénio, fibrina, heparina e superfícies de células, de uma maneira análoga à da molécula intacta (Hynes and Yamada, 1982, J. Cell Biol., 95:369-377).

Os heterodímeros da fibronectina celular e do plasma compreendem polipeptídeos similares mas não idênticos. A variabilidade da estrutura das subunidades da fibronectina deriva de variações na sequência primária do mRNA da fibronectina devido a entrelaçamentos ^{"splicing"} / alternativos em pelo menos 2 regiões do mRNA da pre-fibronectina (as regiões ED e IIICS).



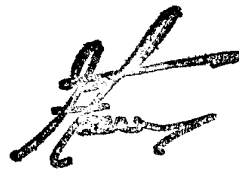
A fibronectina é capaz de promover a adesão de uma diversidade de tipos de células, tais como fibroblastos (Grinnell *et al.*, 1977, *Exp. Cell Res.*, 110:175-210), macrófagos (Devilacque *et al.*, 1981, *J. Exp. Med.*, 153:42-60), leucócitos polimorfonucleares (Marino *et al.*, 1985, *J. Lab. Clin. Med.*, 105:725-730), plaquetas (Koteliansky *et al.*, 1981, *Fed. Euro. Biochem. Soc.*, 123:59-62) e queratinócitos (Clark *et al.*, 1985, *J. Invest. Dermatol.*, 84:375-383), para nomear apenas alguns (Liao *et al.*, 1989, *Exp. Cell Res.*, 183:348-361). Observou-se interação entre fibronectina e uma proteína da superfície celular com uma massa molecular de 140 kDa, aproximadamente, em fibroblastos (Brown e Juliano, 1985, *Science*, 228:1448-1451; Akiyama *et al.*, 1986, *J. Cell Biol.*, 102:442-448; Brown e Juliano, 1986, *J. Cell Biol.*, 103:1595-1603; Wylie *et al.*, 1979, *J. Cell Biol.*, 80:385-402), células endoteliais (Plow *et al.*, 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83:6002-6006), células linfóides (Brown and Juliano, 1986, *J. Cell Biol.*, 103:1595-1603), plaquetas (Pytela *et al.*, 1986, *Science*, 228:1559-1562; Gardner e Hynes, 1985, *Cell*, 42:439-448), células musculares (Horowitz *et al.*, 1985, *J. Cell Biol.*, 101:2134-2144; Damsky *et al.*, 1985, *J. Cell Biol.*, 100:1528-1539; Chapman, 1984, *J. Cell Biochem.*, 25:109-121), e células de osteossarcoma (Pytela *et al.*, 1985, *Cell*, 40:191-198).

A ligação da fibronectina às superfícies celulares pode ser competitivamente inibida por fragmentos de fibronectina (Akiyama *et al.*, 1985, *J. Biol. Chem.*, 260:13256-13260). Utilizando peptídeos de síntese, identificou-se uma sequência do que se pensou ser o único sítio mínimo de reconhecimento da célula, como sendo o tetrapeptídeo Arg-Gli-Asp-Ser (RGDS) (Pierschbacher e Ruoslahti, 1984, *Nature*, 309:30-33; Pierschbacher *et al.*, 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:1224-1227; Pierschbacher *et al.*, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81:5985-5988; Akiyama *et al.*, 1985, *J. Cell Biol.*, 102:442-448). A sequência RGDS presente no domínio "de ligação de células" da fibronectina, é o ligando para o protótipo do receptor de fibronectina descrito por Pytela *et al.* (1985, *Cell* 40:191-198).

Diversas observações sugeriram que regiões que não a RGDS

podiam actuar na ligação da fibronectina (Humphries *et al.*, 1986, J. Cell Biol., 103:2637-2647). Por exemplo, determinou-se que a afinidade dos péptidos de síntese, para se ligarem, era substancialmente mais baixa do que a afinidade de ligação associada a fragmentos maiores ou à fibronectina intacta (Akiyama *et al.*, 1985, J. Biol. Chem., 260:10402-10405; Akiyama *et al.*, 1985, J. Biol. Chem., 260:13256-13260). McCarthy *et al.* (1986, J. Cell Biol., 102:179-188) relataram afinidade de ligação entre um fragmento de fibronectina do plasma, com 33 kDa e células tumorais de melanoma B16-F10. Bernardi *et al.* (1987, J. Cell Biol., 105:489-498), relataram que células linfóides precursoras aderem a dois sítios diferentes na fibronectina; a linhagem de células BaF3 interagiu com o domínio RGD de ligação, enquanto a linhagem de células PD31 parecia interagir com um domínio diferente, localizado no segmento do terminal carboxilo e associado com um sítio de ligação de elevada afinidade em relação a heparina.

Humphries *et al.* (1986, J. Cell Biol., 103:2637-2647) compararam a capacidade dos fragmentos da fibronectina para formarem interações adesivas com melanoma *versus* células fibroblásticas. Observou-se que as células fibroblásticas BHK se expandiam rapidamente sobre um fragmento com 75 kDa, que representava o domínio de ligação de células que continha RGDs, ao passo que as células de melanoma B16-F10 não pareciam expandir-se sobre o fragmento com 75 kDa, observando-se, em vez disso, que se expandiam sobre um fragmento com 113 kDa derivado da porção de fibronectina que contém a região de diferenciação, do segmento de conexão (CS) do tipo III, ou região V (na qual pode ocorrer entrelaçamento alternado do mRNA). Nessa região III/CS, localizada perto do terminus carboxilo da fibronectina, a sequência Arg-Glu-Asp-Val (REDV) parece ter significância funcional. Humphries *et al.* (1987, J. Biol. Chem., 262:6686-6692), estudaram uma série de péptidos de síntese parcialmente sobreponíveis que abarcavam a região III/CS. Determinou-se que dois péptidos não adjacentes, CS1 e CS5, eram competitivamente inibidores da adesão da fibronectina a células de melanoma, nas



não a células fibroblásticas, mostrando o CSI numa actividade inibidora maior do que a do CS5. Liao *et al.* (1989, Exp. Cell Res., 181:348-361), relataram que as células linfóides MOPC 315, segregadoras de IgA, para além de se ligarem ao domínio de ligação de células, por meio de uma interacção RGD, se ligavam preferencialmente ao domínio de ligação de heparina do terminal carboxilo, através de um mecanismo independente de RGD. No entanto, não foram identificadas a(s) sequência(s) de adesão presente(s) nas regiões do terminal carboxilo da fibronectina, nem o(s) receptor(es) da superfície celular responsáveis pela adesão de células a essas sequências de adesão.

2.3. FUNÇÕES BIOLÓGICAS DE MOLÉCULAS DE ADESAO DE CÉLULAS

Determinou-se que ocorriam interacções adesivas entre células durante muitas ocorrências biológicas importantes, incluindo diferenciação, crescimento e desenvolvimento de tecidos, também parecendo desempenhar um papel crítico na patogénese de diversas doenças (Humphries *et al.*, 1986, J. Cell Biol., 103:2637-2647; Grinnell, 1984, J. Cell Biochem., 26:107-116; Hynes, 1986, Sci. Am. 254:42-51).

Por exemplo, sabe-se que as interacções adesivas são extremamente importantes no sistema imunológico; no qual a localização de células mediadoras imunológicas parece ser devida pelo menos em parte, a interacções adesivas entre as células. A recirculação de células linfóides não é aleatória (Male *et al.*, in "Advanced Immunology", J. B. Lippincott Co., Philadelphia, p. 14.4 - 14.5); os linfócitos demonstram uma preferência pelo tipo de órgão linfóide secundário no qual se vão introduzir. Ao deslocarem-se através de um órgão linfóide secundário, os linfócitos têm de se ligar, primeiro ao endotélio vascular de vénulas pós-capilares apropriadas, depois, têm de abrir as junções estreitas entre as células endoteliais e, por fim, têm de migrar para o tecido subjacente. Associou-se a migração de linfócitos em recirculação, do sangue para tecidos linfóides específicos, designada por "regresso a casa", com moléculas de adesão complementar, da superfície dos linfócitos e sobre as

células endoteliais das vénulas endoteliais superiores.

Do mesmo modo, pensa-se que a aderência de leucócitos polimorfonucleares ao endotélio vascular seja uma ocorrência chave no desenvolvimento de uma resposta inflamatória aguda, e parece ser requerida para uma resposta quimiotóxica eficaz, bem como em certos tipos de lesões vasculares mediadas por neutrófilos (Zimmerman e McIntyre, 1988, J. Clin. Invest., 81:531-537; Harlan et al., 1987, no "Leukocyte Emigration and its Sequelae", Movat, ed. S. Karger AG, Basel, pp. 94-104, Zimmerman et al., ibid., pp. 105-118). Quando estimulados por substâncias antagonistas específicas, os leucócitos polimorfonucleares (Tonnensen et al., 1984, J. Clin. Invest., 74:1581-1592), as células endoteliais (Zimmerman et al., 1985, J. Clin. Invest., 76:2235-2246; Bevilacqua et al., J. Clin. Invest., 76:2003-2011) ou ambos (Gamble et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:8667-8671) tornam-se adesivos; como resultado, os leucócitos polimorfonucleares acumulam-se sobre a superfície das células endoteliais.

Além disso, estudos com anticorpos específicos antiglicoproteínas, em pacientes com deficiências imunológicas, indicaram que são precisos um ou mais componentes do complexo CD18 para a eficácia da quimiotaxia neutrofílica e de outras funções relacionadas com a adesão (Zimmerman e McIntyre, 1988, J. Clin. Invest., 81:531-537). O complexo CD18 é idêntico à subfamília da β_2 integrina (supra).

Durante a maturação e a diferenciação, as subpopulações de linfócitos localizam-se em diferentes sítios anatómicos; por exemplo, as células T imaturas localizam-se no timo. Similarmente, observou-se que as células B produtoras de IgA, se localizavam na mucosa intestinal (Parrott, 1976, Clin. Gastroenterol., 5:211-228). Em contraste, as células B produtoras de IgG localizam-se, fundamentalmente, nos gânglios linfáticos, dos quais é segregado IgG para a circulação sistêmica (Parrott e deSouza, 1966, Nature, 212:1316-1317). As células T parecem ser mais abundantes na epiderme da pele do que nas mucosas de

revestimento (Cahill et al, 1977, J. Exp. Med. 145:420-428).

A importância fisiológica das proteínas da adesão de leucócitos (supra) é sublinhada pela existência de uma doença genética humana, a deficiência da adesão leucocitária ("LAD"; Anderson et al, 1985, J. Infect. Dis., 152:668; Arnaut et al, 1983, Fed. Proc., 44:2664). Diversos estudos têm indicado que o defeito molecular associado à LAD resulta ou da falta da síntese da cadeia β comum, ou numa velocidade de síntese normal seguida por degradação rápida (Liowska-Grospierre et al, 1986, Eur. J. Immunol., 16:205; Diamanche et al, 1987, Eur. J. Immunol., 17:417). Na forma grave de LAD, nem LFA-1, nem Mac-1, nem p150/95 são expressos na membrana do leucócito; observaram-se níveis baixos de expressão na membrana leucocitária, em pacientes que sofriam da forma moderada da doença. Isto leva a uma mobilização incompleta dos monócitos e dos leucócitos polimorfonucleares, da vasculatura para os tecidos, durante a resposta inflamatória, com as consequentes infecções bacterianas recorrentes (Anderson et al, J. Infect. Dis., 152:668; Arnaut et al, 1985, Fed Proc., 44:2664).

Também se observou que os ECMRs estão associados a funções exteriores ao sistema imunológico. A perda do complexo glicoproteico IIb/IIIa da superfície das plaquetas, parece resultar em funcionamento deficiente das plaquetas, numa doença genética conhecida por trombastenia do Glanzmann (Hynes, 1987, Cell, 48:549-554). Humphries et al (1988, J. Cell Biol., 106:1289-1297), observaram que os neurónios do sistema nervoso periférico eram capazes de estender nevrites a substratos contendo o domínio central de ligação de células e a região IIIc3 da fibronectina. Para além disso, mostramos recentemente que a formação de nevrites sobre laminina ou fibronectina, pode ser inibida por anticorpos dos ECMRs.

3. RESUMO DO INVENTO

O presente invento diz respeito a um processo para a inibição da adesão de uma célula a outra, compreendendo a interferência na interacção entre o receptor da matriz



extracelular e o seu ligando.

O invento baseia-se na determinação de que o receptor $\alpha 4 \beta 1$ da matriz extracelular promove a adesão de linfócitos a células endoteliais, por via de ligação a uma sequência peptídica definida. Antes do presente invento, o ligando do receptor $\alpha 4 \beta 1$ não tinha sido identificado, nem era, também, conhecida a função do receptor $\alpha 4 \beta 1$ na ligação dos linfócitos. Ao impedir a interacção entre o receptor $\alpha 4 \beta 1$ e os seus ligandos, usando anticorpos ou sequências peptídicas definidas, o presente invento possibilita, pela primeira vez, uma intervenção específica na migração dos linfócitos, através do endotélio vascular para os tecidos. Portanto, o presente invento possui uma utilidade clínica particular, na supressão da resposta imunológica; em diversas concretizações específicas do invento, pode-se inibir sistematicamente a aderência dos linfócitos ao endotélio, ou pode-se, alternativamente, localizar em tecidos particulares ou áreas circunscritas. Em conformidade, o presente invento proporciona o tratamento de doenças que envolvam respostas auto-imunológicas, bem como outras activações crónicas ou recorrentes do sistema imunológico, incluindo alergia, asma e estados inflamatórios crónicos da pele.

3.1. ABREVIATURAS

As sequências de péptidos aqui definidas representam-se pelos símbolos dos resíduos de aminoácidos, com uma letra, como se segue:

A (alamina), R (arginina), N (asparagina), D (ácido aspártico), C (cisteína), Q (glutamina), E (ácido glutâmico), G (glicina), H (histidina), I (isoleucina), L (leucina), K (lisina), M (metionina), F (fenilamina), P (prolina), S (serina), T (treonina), W (triptofano), Y (tirosina), V (valina).

4. DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1: Adesão de linfócitos T (Molt 4), células K562-1, RD ou HT1080, à fibronectina do plasma, inibição com anticorpos monoclonais P1D4 e expressão de $\alpha 5 \beta 1$ na superfície celular.



Incubaram-se células marcadas com ^{51}Cr (10^5 células/ml), com anticorpo monoclonal P1D6 (50 $\mu\text{g/ml}$), durante 60 minutos a 4°C , e permitir-se que se ligassem a superfícies plásticas revestidas com fibronectina (20 $\mu\text{g/ml}$), na presença de P1D6 (barras a cheio) ou IgG de ratinho (barras em branco), durante 30 min (HT 1080 ou RD) ou 4 h (Molt 4 ou K562), a 37°C . A adesão a fibronectina do plasma (pFN) exprime-se na forma das cpm de ^{51}Cr ligados às superfícies plásticas. A expressão de $\alpha 5\beta 1$ na superfície celular foi determinada por citometria de fluxo, corando as células em suspensão com anticorpo monoclonal P1D6. O log da fluorescência do P1D6 (barras a tracejado) é expresso na forma do número médio de canais (0-255) acima do fundo.

Figura 2: Precipitação imunológica do receptor da fibronectina de linfócitos a partir de extractos detergentes de células HT 10890, Molt 4 ou T (Lak) CD8+, cronicamente activadas.

Extraíram-se células Molt 4, LAK ou HT1080, marcadas com ^{125}I , com Triton X-100 a 1%, na presença de fluoreto de fenilmetilsulfonilo (1 mM), N-etilmaleimida (1 mM), leupeptina (1 $\mu\text{g/ml}$) e fluorofosfato de di-isopropilo (1 mM), como inibidores da protease. Precipitaram-se imunologicamente aliquotas desses extractos, com anticorpos monoclonais dirigidos contra $\alpha 3\beta 1$ (P1B5), $\alpha 2\beta 1$ (P1H5) e $\alpha 4\beta 1$ (P3E30). Os antígenos imunologicamente precipitados, foram submetidos a géis SDS-PAGE (dodecilsulfato de sódio-electroforese em gel de poliacrilamida) a 7,5%, na ausência de 2-ME, e foram visualizados por autorradiografia. Indicam-se as três bandas imunologicamente precipitadas com P3E3 de linfócitos T (setas).

Figura 3: Identificação do receptor específico da fibronectina de linfócitos como sendo o Integrina $\alpha 4\beta 1$.

Extraíram-se células de Jurkat marcadas na superfície com ^{125}I , com CHAPS a 0,3%, na presença de CaCl_2 1mM, fluorofosfato de di-isopropilo 1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonilo 1 mM, N-etilmaleimida 1 mM, 1 $\mu\text{g/ml}$ de leupeptina e 2 $\mu\text{g/ml}$ de inibidor tripsina de soja. A seguir, imunoprecipitaram-se aliquotas dos extractos, com sobrenadante de cultura de mieloma (SP2) ou com

anticorpos monoclonais P3E3, P4C2, P4G9 ou com P1D6 (anti- $\alpha 5 \beta 1$). Submeteram-se os precipitados imunológicos a geles SDS-PAGE a 8%, na ausência de agentes redutores e visualizaram-se por autorradiografia. Do lado esquerdo, mostram-se marcadores de massas moleculares. Indicam-se as subunidades $\alpha 5$ e $\beta 1$ bem como as bandas presentes em imuno-precipitados preparados com P3E3, P4C2 e P4G9 (setas).

Figura 4: Localização de $\alpha 4 \beta 1$ e $\alpha 5 \beta 1$ em adesões focais sobre superfícies revestidas com fibronectina.

Tripsinaram-se células RD e deixaram-se aderir a lamelas, de vidro, silanadas e revestidas com fibronectina (20 $\mu\text{g/ml}$), na ausência de soro, durante 1 hora, a 37°C. No final desse período, prepararam-se as células para a localização de receptores em adesões focais, como se descreve (Procedimentos Experimentais). As imagens A e C mostram adesões focais (setas), visualizadas por microscopia de interferência de reflexo, quando células RD estão aderentes à fibronectina. A imagem B mostra a reorganização do receptor $\alpha 5 \beta 1$ do protótipo RGD de fibronectina, corado com anticorpo AB33 para as adesões focais (setas). A imagem D, mostra a reorganização de $\alpha 4 \beta 1$, corada com P4G9 (FITC), também para as adesões focais, quando as células RD estão aderentes à fibronectina (setas). As imagens A e B, são do mesmo campo e as imagens C e D são do mesmo campo.

Figura 5A: Estrutura dos domínios da fibronectina do plasma humano (pFN), mostrando a origem dos fragmentos utilizados neste estudo. B: Análise em gel SDS-PAGE (10% de acrilanida), demonstrando a pureza dos fragmentos.

O fragmento com 80 kDa tinha a sequência de amino-ácidos no terminal N, SD(V)SPR(L)QF e, portanto, começa na posição 874 da molécula da fibronectina (Kornblihtt *et al*, 1983, EMBO J., 4:1755-1759). Esse fragmento contém o domínio da ligação a células (célula) e a sequência RGD da fibronectina (*). Os fragmentos com 58 kDa e 38 kDa tinham a sequência de amino-ácidos do terminal N, TAGPDQTEMTIEGLQ. Ambos os fragmentos contêm o domínio de ligação a Heparina, do terminal C, (Hep II) e resultam

de cisões diferentes das duas cadeias da fibronectina, pela tripsina. O fragmento com 38 kDa compreende os primeiros 67 resíduos de aminoácido do segmento de conexão alternativamente entrelaçado (spliced) da fibronectina (III CS) (Garcia-Pardo, 1987, Biochem. J., 241:923-928) e deriva, portanto, da cadeia A. O fragmento com 38 kDa não contém o sítio de adesão REDV, reconhecido por células de melanoma B16-F10 (Humphries *et al.*, 1986, *supra*; Humphries *et al.*, 1987, *supra*). O fragmento com 58 kDa também deriva da cadeia B da fibronectina, faltando-lhe a região IIICS (Garcia-Pardo *et al.*, 1989, EMBO J., submetido a apreciação). O fragmento com 58 kDa também contém o domínio de ligação à fibrina do terminal C da fibronectina (Fib II) e é similar aos fragmentos, relatados anteriormente, desta região da fibronectina do plasma (Click, E.M., e Balian, G., 1985, Biochem., 24:6685-6696). As bandas foram visualizadas através de mancha com prata.

Figura 6: Adesão de células hematopoiéticas à fibronectina do plasma e aos fragmentos tripticos purificados, com 38 kDa e 80 kDa, da fibronectina do plasma.

Deixaram-se aderir células K562 (eritroleucemia), Jurkat (linfócito T CD3+) e YT (linfócito T CD3-), (10^5 /alvéolo), às superfícies de plástico que tinham sido revestidas com fibronectina de plasma (pFN) intacta ou com os fragmentos tripticos purificados com 80 kDa e 38 kDa, com as concentrações indicadas, durante 2 horas, a 37°C. No final desse tempo, removeram-se as células não-aderentes, por lavagem, e solubilizaram-se as células ligadas, em SDS/NaOH e contaram-se. Os resultados exprimem-se na forma de cpm de ^{51}Cr ligado.

Figura 7: Efeito dos anticorpos monoclonais P1D6 e P4C2 contra os receptores $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha 4\beta 1$ da integrina (respectivamente), na adesão de linfócitos T à fibronectina de plasma (pFN) intacta ou aos fragmentos tripticos purificados com 80 kDa e 38 kDa.

Incubaram-se células Molt marcadas com ^{51}Cr , com anticorpos monoclonais P1D6 e P4C2 purificados (50 $\mu\text{g/ml}$) ou IgG de ratinho purificada (50 $\mu\text{g/ml}$), durante 1 hora, a 4°C. A seguir,

deixaram-se aderir a superfícies de plástico que tinham sido revestidas com fibronectina de plasma intacta ou com os fragmentos tripticos de 80 kDa e 38 kDa, com as concentrações indicadas, durante 1 hora. No final desse tempo, removeram-se as células não aderentes, por lavagem, e solubilizaram-se as células aderentes e contaram-se os cpm de ^{51}Cr ligado, num contador gama. Exprimiram-se os resultados na forma de cpm ligados.

Figura 8: Efeito do péptido B12 da CS-1 sobre a adesão de linfócitos T a células HUVE activadas com IL-1 β .

Figura 9:

(a) Diagrama das regiões III CS e CS-1.

(b) Sequência de aminoácidos das CS-1, A13 e B12.

5. DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

Observou-se, em experiências concebidas para examinar a função de $\alpha 5 \beta 1$ em linfócitos, que os linfócitos T de sangue periférico em repouso e cultivados (Molt 4 ou Jurkat), expressavam uma afinidade para a fibronectina independente do receptor protótipo da fibronectina $\alpha 5 \beta 1$. Apesar de essas células se fixarem a superfícies revestidas com fibronectina, expressavam níveis baixos ou indetectáveis de $\alpha 5 \beta 1$, reconhecida pelo anticorpo monoclonal funcionalmente definido, F1D6 (Wayner *et al.*, 1988, J. Cell Biol., 107:1881-1891). Para além disso, a adesão de linfócitos T à fibronectina apenas pode ser parcialmente inibida por péptidos que continham F1D6 ou RGD, o que sugere o envolvimento de outros receptores da fibronectina no processo de adesão. Em alternativa, a adesão de outras células à fibronectina, tais como fibroblastos malignos ou transformados e linfócitos T activados (células LAK) pôde ser completamente inibida por F1D6. Isto sugeria que os linfócitos T do sangue periférico, em repouso, e células T de leucemia cultivadas, expressavam múltiplos receptores da fibronectina independentes e funcionais.

De acordo com o presente invento, identificou-se um receptor da fibronectina alternativo, preparando anticorpos monoclonais

que inibiam especificamente a adesão de linfócitos T, mas não de outras células à fibronectina. Esse receptor era idêntico ao receptor $\alpha 4 \beta 1$ da integrina e mediava a ligação de linfócitos de sangue periférico, linhas de células T cultivadas e células RD à fibronectina do plasma. Para além disso, os linfócitos T expressavam uma preferência nítida por um fragmento triptico, com 38 kDa, de fibronectina do plasma (Garcia Pardo *et al.*, 1987, *Biochem. J.*, 241:923-928) que continha o domínio de Heparina II e 67 resíduos de aminoácido do segmento de conexão do tipo III (IIICS), abrangendo as regiões CS-1, CS-2 e CS-3 (definidas por Humphries *et al.*, 1986, *J. Cell. Biol.*, 103:2637-2647 Humphries *et al.*, 1987, *J. Biol. Chem.*, 262:6886-6892). De acordo com o presente invento, determinou-se que os linfócitos T se fixavam apenas ao CS-1 e que anticorpos monoclonais contra $\alpha 4 \beta 1$ (P3E3, P4C2, P4G9) inibiam completamente a adesão de linfócitos T ao fragmento com 38 kDa e ao CS-1. Também se determinou que os linfócitos T se fixavam (com muito menor afinidade) a um sítio presente no domínio da Heparina II e que os anticorpos monoclonais contra $\alpha 4 \beta 1$ também inibiam essa interação. Os anticorpos monoclonais funcionalmente definidos contra o $\alpha 4 \beta 1$ não inibiam a adesão de linfócitos T a um fragmento triptico com 80 kDa, de fibronectina do plasma, que continha a sequência RGD, ao passo que anticorpos contra $\alpha 5 \beta 1$ (o receptor protótipo da fibronectina) inibiam completamente essa interação.

Além disso, o presente invento diz respeito à verificação de que o receptor $\alpha 4 \beta 1$ media a interação entre linfócitos e as células endoteliais. De acordo com o invento, podem-se usar anticorpos ou péptidos para bloquear a adesão de linfócitos a células endoteliais.

Para efeitos de clareza da descrição, e não como limitação, o presente invento será descrito nas subsecções seguintes:

- (i) Preparação de anticorpos contra receptores da matriz extracelular (ECMRs);
- (ii) Caracterização da interação ECMR-ligando;
- (iii) Processos de intervenção na adesão de células;

(iv) Utilidade do invento; e

(v) Péptidos e anticorpos do invento.

5.1. PREPARAÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA RECEPTORES DA MATRIZ EXTRACELULAR

Pode-se executar a preparação de anticorpos contra receptores da matriz extracelular usando qualquer um dos processos de geração de anticorpos conhecido na arte. Como imunogénio, podem utilizar-se células intactas ou receptor da matriz extracelular purificado (ECMR). Preferivelmente, a imunização de um hospedeiro executa-se utilizando imunogénio obtido de uma fonte xenogénica.

Os anticorpos podem ser policlonais ou monoclonais.

Para a produção de anticorpos policlonais contra epítomos de um dado ECMR, podem utilizar-se diversos processos conhecidos na arte. Para a produção de anticorpos, podem imunizar-se diversos animais hospedeiros, através de injeção de uma proteína de ECMR ou de uma proteína de síntese ou de um seu fragmento ou, alternativamente, podem utilizar-se células intactas. Podem-se utilizar diversos adjuvantes, para aumentar a resposta imunológica, dependendo da espécie hospedeira, incluindo, mas não se lhes limitando, os de Freund (completo e incompleto), geles minerais, tal como hidróxido de alumínio, substâncias tensioactivas, tais como lisolecitina, polióis plurónicos, polianíões, péptidos emulsões oleosas, hemocianinas de lapa (*Fissurella*), dinitrofenol e adjuvantes humanos potencialmente úteis, tais como BCG (bacilo Calmette-Guerin) e Corynebacterium parvum.

Pode-se preparar um anticorpo monoclonal para um epítopo de um ECMR, utilizando qualquer técnica que proporcione a produção de moléculas de anticorpo por linhas de células, contínuas, em cultura. Estão incluídas mas não se lhes limitam, as técnicas de hibridoma, descritas originalmente por Kohler e Milstein (1975 *Nature*, 256:495-497) e Taggart e Samloff (1983, *Science*, 219:1228-1230) e a técnica, mais recente, do hibridoma da célula B

humana (Kozbor et al, 1983, Immunology Today, 4:72) e a técnica EBV-híbrida (Cole et al, 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96).

Os anticorpos monoclonais para utilização terapêutica podem ser anticorpos monoclonais humanos ou anticorpos monoclonais quiméricos humano-ratinho (ou de outra espécie). Os anticorpos monoclonais humanos podem ser produzidos por qualquer das numerosas técnicas conhecidas na arte (e.g. Teng et al, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80:7308:7312; Kozbor et al, 1983, Immunology Today, 4:72-79; Olsson et al, 1982, Meth. Enzymol. 92:3-16). Podem-se preparar moléculas de anticorpo quiméricas, que contenham um domínio de ligação ao antígeno de ratinho com regiões humanas constantes (Morrison et al, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81-6851; Takeda et al, 1985, Nature, 314:452).

Pode-se preparar um clone molecular de um anticorpo contra um epítipo de EDHR, através de técnicas conhecidas. Para construir sequências de ácido nucleico que codificam uma molécula de anticorpo monoclonal, ou uma sua região de ligação do antígeno, pode usar-se o processo do ADN recombinante (veja-se, e.g., Maniatis et al, 1982, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York).

As moléculas de anticorpo podem ser purificadas por técnicas conhecidas, e.g., cromatografia de imunoabsorção ou imunoafinidade, métodos cromatográficos, tal como HPLC (cromatografia líquida de elevada resolução), ou uma sua combinação, etc.

Podem-se gerar fragmentos de anticorpo que contenham o idótipo da molécula, através de técnicas conhecidas. Por exemplo, esses fragmentos incluem, mas não se lhes limitam: o fragmento $F(ab')_2$, que pode ser produzido por digestão da molécula ^{de} anticorpo com pepsina; os fragmentos Fab' que podem ser gerados reduzindo as pontes dissulfureto do fragmento $F(ab')_2$, e os fragmentos 2 Fab ou Fab, que podem ser gerados tratando a molécula de anticorpo com papaina e com um agente redutor.

-22-

De igual modo, podem-se identificar e seleccionar anticorpos, que sejam reactivos com ECMRs produzidos pelos métodos supra, através de qualquer técnica conhecida na arte. Por exemplo, anticorpos que mostrem ligar-se a e/ou imunoprecipitem um ECMR conhecido, que tenha sido purificado ou separado de outras proteínas, por outra forma como num gel de poliacrilamida. Alternativamente, podem-se identificar anticorpos contra ECMRs pela sua capacidade para competirem com anticorpos contra ECMR, conhecidos anteriormente por se ligarem aos ECMRs. Os anticorpos que se ligam a ECMRs também podem ser identificados pela sua capacidade para bloquearem uma interacção ECMR/ligando. Por exemplo, e não como limitação, pode-se verificar que as células que contenham um receptor para ECMR que se ligam à fibronectina (que não precisa de ter sido, ele próprio, identificado ou caracterizado, mas meramente definido funcionalmente), aderem a um substrato revestido com fibronectina. Se antissoros ou um sobrenadante de hibridoma mostrar que ^{inibe} a aderência de células ao substrato, os anticorpos contidos nos antissoros ou sobrenadante devem reconhecer o receptor do ECMR.

De acordo com o invento, podem-se preparar os anticorpos que reconheçam o receptor $\alpha 4 \beta 1$ pelos métodos delineados supra. Numa das concretizações preferidas do invento, podem-se produzir anticorpos monoclonais dirigidos contra o $\alpha 4 \beta 1$ tal como se segue: devem-se imunizar ratinhos, obtidos de ratinhos RBF/DN, com cerca de 100 μ l de linfócitos T empacotados; subsequentemente, devem-se remover os seus baços e fundi-los com células de mieloma, por exemplo, células de mieloma NS-1/FOX-NY, como é descrito por Oi e Herzenberg (1980, no "Selected Methods In Cellular Immunology", Mishell and Shiigi, eds., Freeman and Co., San Francisco, pp.351-373) e por Taggart e Samloff (1983, Science, 219:1229-1230). A seguir, podem-se seleccionar heterocariões viáveis em meio RPMI 1640 suplementado com adenina/aminopterina/timidina. Os hibridomas que produzem anticorpos dirigidos contra ECMRs de linfócitos, podem ser rastreados através da adesão a superfície revestidas com fibronectina e clonados por diluição limitante. Em particular, podem-se identificar anticorpos dirigidos contra



$\alpha 4\beta 1$, por exemplo, pela capacidade em bloquearem a aderência de linfócitos a substrato revestido com péptido CS-1, ou seus derivados, ou a células endoteliais. No entanto, os anticorpos que reconheçam o $\alpha 4\beta 1$ não inibirão a ligação de células que contenham o receptor $\alpha 5\beta 1$, a um substrato revestido com péptido RGD. Alternativamente, podem-se identificar anticorpos dirigidos contra o $\alpha 4\beta 1$, pela sua capacidade para i) inibirem competitivamente a ligação de anticorpos anti- $\alpha 4\beta 1$ conhecidos (tais como P4C2 ou P4C10), ou ii) se ligarem à mesma proteína que os anticorpos anti- $\alpha 4\beta 1$ conhecidos (e.g., num gel de proteínas, mancha de Western, ou em experiências de imunoprecipitação sequencial).

5.2. CARACTERIZAÇÃO DA INTERACÇÃO ECMR/LIGANDO

A interacção com um receptor da membrana extracelular pode ser caracterizada, por exemplo, e não como limitação, pelos processos seguintes:

- i) Determinação da distribuição e da função do receptor;
- ii) Intervenção na ligação receptor/ligando;
- iii) Isolamento e caracterização química de receptor e/ou ligando.

Estes métodos serão descritos mais completamente nas três subsecções seguintes.

5.2.1. DETERMINAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO E DA FUNÇÃO DO RECEPTOR

De acordo com os processos do invento, pode ser determinada a distribuição do receptor utilizando qualquer um dos processos conhecidos na arte. Por exemplo, e não como limitação, podem-se identificar populações de células que contenham o ECRM, utilizando anticorpos monoclonais dirigidos contra o ECRM de interesse. Pode-se detectar a ligação do anticorpo ao ECRM utilizando técnicas imuno-histoquímicas, tais como imunofluorescência e coloração imunoperoxidásica. Alternativamente, podem recolher-se populações de células que contenham o ECRM de interesse, utilizando técnicas de separação de células activadas por fluorescência.

-24-

Porque parece haver uma reorganização específica dos receptores de adesão da superfície das células, em relação às adesões focais, quando se cultivam células sobre os ligandos apropriados (Burridge *et al.*, 1988, *Ann. Rev. Cell Biol.*, 4:487-525), um processo para caracterizar a interação funcional entre um dado receptor e um ligando potencial, envolve a determinação da maneira como o ECMR de interesse se distribui nas adesões focais formadas entre a célula e o substrato do ligando. Por exemplo, e não como limitação, pode mostrar-se que o $\alpha 4 \beta 1$ interage com a fibronectina, com uma relação receptor/ligando, através do processo seguinte (veja-se também a secção 6.2.3., *infra*).

Devem deixar-se os linfócitos aderir a um substrato de fibronectina e, por microscopia de interferência de reflexão, podem visualizar-se as adesões focais entre células e substrato (Izzard *et al.*, 1976, *J. Cell Sci.*, 21:129-159). Para mostrar que, na ausência de soro, o $\alpha 4 \beta 1$ se redistribui nas adesões focais, podem usar-se anticorpos que reconheçam o $\alpha 4 \beta 1$, tais como P469 ou P4C10, utilizando técnicas imuno-histoquímicas padrão, *e.g.* fluoro-isotiocianato.

A interação entre o ECMR e o ligando também pode ser caracterizada testando a capacidade do ECMR para aderir a uma diversidade de substratos diferentes. Por exemplo, pode testar-se um tipo de célula com interesse ou um ECMR com interesse, quanto à capacidade de se ligarem a substratos que consistam de componentes da matriz extracelular purificados, tais como fibronectina, cologénio, vitronectina ou laminina. Numa concretização específica do invento, pode mostrar-se que células que contêm o $\alpha 4 \beta 1$ aderem à fibronectina, mas não a substratos de cologénio ou laminina, como resultado da interação $\alpha 4 \beta 1$ /fibronectina.

Noutras concretizações do invento, nas quais se mostra que um ECMR de interesse se liga a um ligando proteico particular, podem testar-se substratos, que contêm subfragmentos do ligando proteico, quanto à capacidade de se ligarem a um ECMR da

-25-

superfície da célula, permitindo, desse modo, a localização do sítio da ligação entre o ECMR e o ligando. Numa concretização específica do invento, na qual o receptor é o $\alpha 4 \beta 1$, que se verificou ligar-se à fibronectina (supra), podem testar-se substratos que contenham subfragmentos de fibronectina quanto à sua capacidade para ligarem células que contenham $\alpha 4 \beta 1$, como é exemplificado na Secção 6, infra. Apesar de os linfócitos T se fixarem ao domínio de ligação de células, com 80 kDa, da fibronectina contendo receptor $\alpha 4 \beta 1$ (Figura 5A), aqueles demonstraram uma clara preferência por uma região que não continha RGD, localizada num fragmento triptico, com 38 kDa, derivado da cadeia A (ou pesada) da fibronectina do plasma. Os linfócitos T também reconheceram e ligaram-se a um outro fragmento com 58 kDa que continha Hep II. No entanto o sítio de ligação a linfócitos com elevada afinidade, localizava-se no fragmento com 38 kDa. Numa base molar, o fragmento com 38 kDa foi três vezes mais eficiente do que o fragmento com 58 kDa, na mediação da adesão de linfócitos T. Como se mostra na Figura 5A, derivaram-se os fragmentos com 38 kDa e 58 kDa, das cadeias A e B de fibronectina do plasma, respectivamente. Portanto, diferem na presença ou ausência de IIICS (Kornblihtt et al, 1985, supra; Garcia-Pardo, 1987, supra). Assim, é possível que os fragmentos com 38 kDa e 58 kDa, aqui usados, partilhem um sítio de ligação comum com uma baixa afinidade para os linfócitos T localizado no domínio Hep II, e que estejam presentes outros sítios de adesão com elevada afinidade para linfócitos T, na única região IIICS do fragmento com 38 kDa. De facto, os linfócitos T parecem reconhecer e ligar-se especificamente a CS-1, o qual tem sido definido como um sítio de adesão com elevada afinidade para células de melanoma B16 e células da crista neural das aves (Humphries et al, 1987, supra; Humphries et al, 1988, J. Cell Biol., 106:1287-1297; Dufour et al, 1988, EMBO J., 7:2661-2671). O CS-1 é uma região com heterogeneidade molecular (gerada por entrelaçamento alternativo), presente no domínio CS do tipo III da cadeia A da fibronectina do plasma.

3.2.2. INTERVENÇÃO NA LIGAÇÃO RECEPTOR/LIGANDO

Pode caracterizar-se melhor a relação ECMR/ligando identificando e avaliando agentes que interfiram na ligação receptor/ligando.

Podem usar-se, por exemplo, anticorpos dirigidos contra um ECMR de interesse, para inibir a ligação receptor/ligando. Dada a observação de que um tipo particular de célula adere a um dado ligando ou substrato celular, pode ser interessante identificar o ECMR envolvido na interação. Pode testar-se um painel de anticorpos monoclonais, cada um deles dirigido contra um ECMR diferente, quanto à capacidade para bloquear a aderência de células ao substrato. A inibição da ligação por um anticorpo particular sugeriria que o ECMR reconhecido pelo anticorpo estaria envolvido na interação adesiva. Numa concretização específica do invento, pode inibir-se a aderência de linfócitos a células endoteliais em cultura, através de anticorpos dirigidos contra o $\alpha 4\beta 1$, mas não através de anticorpos dirigidos contra uma diversidade de outros ECMRs (veja-se a Secção 7, abaixo), o que indica que o $\alpha 4\beta 1$ é necessário na adesão de linfócitos a células endoteliais. Adicionalmente, podem usar-se anticorpos monoclonais para determinar a relação entre o ECMR e o substrato do ligando.

Como se exemplifica na secção 6, infra, a adesão de linfócitos T aos fragmentos com 38 e 58 kDa pode ser completamente inibida por anticorpos monoclonais, funcionalmente definidos, contra o $\alpha 4\beta 1$. Para além disso, a adesão de linfócitos T às superfícies revestidas com CS-1 (conjugado com IgG), também pode ser completamente inibida por P4C2, P3E3 ou P4G9. Estes dados, mostram claramente que o $\alpha 4\beta 1$ é, nos linfócitos T, o receptor do CS-1. Em contraste, estes anticorpos não conseguem inibir a adesão de células T ao fragmento com 80 kDa que contém a sequência protótipo de adesão arg-gli-asn (RGD). A adesão de células T ao fragmento com 80 kDa pode ser completamente inibida por um anticorpo monoclonal contra $\alpha 5\beta 1$ (P1D6) ou por RGD8. O P1D6 e o RGD8 não conseguem inibir a adesão de linfócitos T aos fragmentos com 38 e 58 kDa ou ao CS-1. Em conjunto, estes dados mostram que o $\alpha 4\beta 1$ funciona como receptor do domínio de adesão do terminal carboxilo, do receptor da fibronectina do plasma, para

-27-

sequências de adesão alternativas em IIICS (CS-1) e, possivelmente, em Hep II.

Noutras concretizações do invento, pode caracterizar-se a relação ECMR/ligando por determinação da estrutura do ligando. Em particular, pode avaliar-se a capacidade de agentes para competirem com o ligando na interacção ECMR/ligando. Por exemplo, quando o ligando for uma proteína, podem ser testados diversos fragmentos da proteína quanto à sua capacidade para inibirem competitivamente a ligação receptor/ligando. Numa concretização particular do invento, na qual se observa que os linfócitos se ligam quer a células endoteliais, quer à fibronectina, podem testar-se fragmentos peptídicos de fibronectina quanto à capacidade para inibirem competitivamente a ligação de linfócitos ao substrato de células endoteliais. Como se exemplifica na Secção 7, *infra*, o péptido CS-1 e, em particular, o péptido EILDVPST, é capaz de inibir competitivamente a ligação de linfócitos à fibronectina e às células endoteliais, localizando-se, desse modo, o sítio de ligação do ligando numa região idêntica ou homóloga a EILDVPST.

5.3. PROCESSOS DE INTERVENÇÃO NA ADESAO CÉLULAR

De acordo com o invento, a adesão de uma célula a outra pode ser inibida intervindo sobre a interacção ECMR/ligando. Numa concretização particular do invento, pode inibir-se a ligação de linfócitos a células endoteliais, interferindo na ligação do $\alpha 4 \beta 1$ ao seu ligando. Isto pode conseguir-se utilizando anticorpos dirigidos contra o ECMR ou, alternativamente, contra o seu ligando (podem gerar-se anticorpos contra o ligando de uma maneira análoga à que se descreveu na Secção 5.1). Em outras concretizações do invento, podem usar-se péptidos que inibam a ligação do $\alpha 4 \beta 1$ ao seu ligando que por sua vez, inibem a aderência de linfócitos às células endoteliais.

Numa concretização específica do invento, pode usar-se um anticorpo anti- $\alpha 4 \beta 1$ ou um seu fragmento ou derivado, para inibir a ligação de linfócitos, que contenham receptores $\alpha 4 \beta 1$, às células vasculares endoteliais. Em concretizações preferidas, o



anticorpo é um anticorpo monoclonal, em particular o anticorpo P4C2 ($\alpha 4\beta 1$) ou P4C10 ($\beta 1$), ou os seus fragmentos ou derivados, incluindo anticorpos quiméricos com as mesmas especificidades de ligação.

Noutras concretizações do invento, podem usar-se péptidos para inibir a ligação do linfócitos, que contenham receptores $\alpha 4\beta 1$, às células vasculares endoteliais. Numa concretização preferida, o péptido compreende pelo menos uma porção da sequência da região variável IIIICS da fibronectina. Numa concretização mais preferida, o péptido compreende pelo menos uma porção do péptido CS-1, como é definido por Humphries *et al* (1987, J. Biol. Chem., 262:6886-6892), que é aqui incorporado na sua totalidade por referência, ou um péptido que lhe é substancialmente homólogo. Numa concretização ainda mais preferida, o péptido compreende pelo menos uma porção da sequência EILDVPST, ou uma sequência que lhe é substancialmente homóloga.

5.4. UTILIDADE DO INVENTO

De acordo com o invento, pode inibir-se a aderência de uma célula a outra interferindo na ligação entre o ECMR e o seu ligando. Em concretizações particulares do invento, pode inibir-se a aderência de linfócitos a células endoteliais, interferindo na ligação do $\alpha 4\beta 1$ dos linfócitos ao seu ligando, na superfície da célula endotelial. De acordo com o invento, prevê-se a interacção de outros ECMRs com ligandos de células endoteliais, e a inibição da adesão dessas células ao endotélio, interferindo na interacção ECMR/célula endotelial. Por exemplo, a adesão de macrófagos ao endotélio também pode ser inibida através de intervenção na interacção do ECMR do macrófago/célula endotelial. Do mesmo modo, as células de melanoma, que também reconhecem o péptido CS-1, podem ser inibidas de se metastizarem e de entrarem nos tecidos, usando os péptidos ou anticorpos do invento.

Portanto, o processo do invento é útil no impedimento do egresso de linfócitos, através do endotélio vascular e para os tecidos. Em conformidade, o presente invento proporciona um



processo de suprimir a resposta imunológica, em pacientes numerosos que necessitem de tal tratamento. Em concretizações particulares, o presente invento proporciona processos de tratamento de doenças associadas com activação crónica ou recorrente do sistema imunológico, incluindo doenças vasculares do colagénio e outras doenças auto-imunológicas (tais como lúpus eritematoso sistémico e artrite reumatóide), esclerose múltipla, asma e alergia, para nomear apenas algumas. O presente invento também proporciona processos de tratamento de activaões relativamente agudas do sistema imunológico, em pacientes que necessitem de tal tratamento, incluindo, por exemplo e não como limitação, enxerto ^{doença} versus/hospedeiro, rejeição de aloenxertos e reacção a transfusões.

Dependendo da natureza do distúrbio do paciente, pode ser desejável inibir sistemicamente a migração de linfócitos para os tecidos ou, em alternativa, localmente. Por exemplo, em doenças que envolvam sistemas de órgãos múltiplos, tal como no lúpus eritematoso sistémico, pode ser desejável inibir sistemicamente a adesão de linfócitos, durante um agravamento clínico. No entanto, numa dermatite de contacto localizada, pode ser preferível restringir a migração de linfócitos apenas aos tecidos afectados.

O controlo da utilização sistémica versus localizada dos processos do presente invento, pode conseguir-se modificando as composições dos anticorpos ou dos péptidos administrados, ou alterando a estrutura desses agentes ou as suas composições farmacológicas. Por exemplo, os anticorpos ou péptidos do invento podem ser administrados por qualquer via, incluindo a subcutânea, a intramuscular, a intravascular, a intravenosa, a intra-arterial, a intranasal, a oral, a intraperitoneal, a rectal, a intratraqueal ou a intratecal. Contudo, para se obter inibição local da adesão de linfócitos ao endotélio, pode ser desejável administrar os anticorpos ou péptidos do invento subcutaneamente ou intramuscularmente, em quantidades terapêuticas e num veículo farmacológico adequado. Em alternativa, para se obter a inibição sistémica da adesão de linfócitos, pode ser desejável

-30-

administrar os anticorpos ou péptidos intravenosamente.

Em diversas concretizações do invento, é vantajoso utilizar um veículo farmacológico que facilite a disseminação dos anticorpos, péptidos, etc. do invento. Por exemplo, quando os anticorpos, péptidos, etc. são para ser disseminados na pele (e.g., no tratamento de situações inflamatórias crônicas dermatológicas), pode ser vantajoso um veículo farmacológico que ajude a penetração na cutícula, epiderme e derme.

A disseminação dos péptidos ou anticorpos do invento também pode ser controlada alterando a semi-vida do péptido ou anticorpo ou a sua semi-vida eficaz. Por exemplo, os péptidos do invento podem ter uma semi-vida relativamente curta; se se administrarem esses péptidos num implante de libertação sustida, a área de tecido adjacente ao implante será exposta ao péptido (e.g., uma articulação num paciente com artrite reumatóide), embora o péptido possa degradar-se antes de atingir tecidos mais distantes.

Alternativamente, se se modificar o péptido para se obter uma semi-vida mais longa, através de modificações químicas que produzam derivados, incluindo, mas não se lhes limitando, substituições de aminoácidos, glicosiações, substituição de variantes enantioméricas (i.e., enantiómeros D de aminoácidos constituintes), adições, etc., é mais provável que o péptido seja totalmente distribuído com níveis mantidos. Como exemplos adicionais, pode modificar-se o terminal N ou o terminal C dos péptidos, resultando em maior estabilidade.

Noutras concretizações, podem conjugar-se os anticorpos ou péptidos do invento com anticorpos ou outros ligandos que possam dirigir os anticorpos ou péptidos a tecidos específicos. Por exemplo, e não como limitação, podem conjugar-se péptidos do invento com anticorpos que têm por alvo células endoteliais. Para além disso, podem produzir-se anticorpos que imitam o ECMR e que, por isso, se prendam aos ligandos das células endoteliais, bloqueando a adesão de linfócitos.

5.5. PEPTÍDOS E ANTICORPOS DO INVENTO

Os peptídeos do invento incluem todos os peptídeos que sejam capazes de interagir com o ECMR de interesse. Numa concretização específica do invento, podem usar-se todos os peptídeos que sejam capazes de interagir com o receptor $\alpha 4 \beta 1$, para iniciar a ligação de linfócitos ao endotélio. De preferência, esses peptídeos devem mostrar que inibem a adesão de linfócitos ao endotélio, in vitro, antes da utilização in vivo. Numa concretização preferida do invento, os peptídeos compreendem pelo menos uma porção da região IIIIC5 da fibronectina. Numa concretização mais preferida, os peptídeos compreendem pelo menos uma porção da sequência peptídica do CS-1, ou uma sequência substancialmente homóloga à sequência do CS-1, como se apresenta na Figura 9(a) e (b). Numa concretização ainda mais preferida, os peptídeos do invento compreendem pelo menos uma porção da sequência EILVDPST ou uma sequência peptídica que lhe seja substancialmente homóloga. "Substancialmente homólogo" deve ser interpretado como significando que os peptídeos do invento podem ser alterações da sequência especificada, tais que um ou mais aminoácidos seja substituído por um aminoácido funcionamento equivalente na sequência peptídica, produzindo assim uma alteração silenciosa. Por exemplo, podem substituir-se um ou mais resíduos ^{de} aminoácido, dentro da sequência, por outro aminoácido de polaridade similar, que actua como equivalente funcional. Os substitutos de um aminoácido dentro da sequência, podem seleccionar-se de outros membros da classe à qual pertence o aminoácido. Por exemplo, os aminoácidos não-polares (hidrofóbicos), incluem a alanina, a leucina, a isoleucina, a valina, a prolina, a fenilalanina, o triptofano e a metionina. Os aminoácidos polares neutros, incluem a glicina, a serina, a treonina, a cisteína, a tirosina, a asparagina e a glutamina. Os aminoácidos carregados positivamente (básicos) incluem a arginina, a lisina e a histidina. Os aminoácidos carregados negativamente (ácidos) incluem o ácido aspártico e o ácido glutâmico. Além disso, como se discutiu na Secção 5.3, o presente invento também diz respeito a derivados dos peptídeos supramencionados.

Os anticorpos do invento, produzidos e definidos como as descrevem supra, incluem anticorpos monoclonais, bem como policlonais, e seus fragmentos e derivados, incluindo os fragmentos $F(ab')_2$, Fab' e Fab .

6. EXEMPLO: IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO RECEPTOR DA ADESAO DE LINFÓCITOS, PARA UM DOMÍNIO ALTERNATIVO DE FIXAÇÃO DE CÉLULAS, DA FIBRONECTINA DO PLASMA

As experiências seguintes descrevem um novo receptor da fibronectina que parece ser idêntico ao receptor de integrina $\alpha 4 \beta 1$ (Hemier et al, 1987, supra), expresso preferencialmente por células hematopoieticas nucleadas. A identificação do $\alpha 4 \beta 1$ como um receptor específico da fibronectina baseou-se (i) na inibição da adesão de células à fibronectina, por anticorpos monoclonais (P4C2, P3E3 e P4G9), e (ii) na reorganização e concentração específicas de $\alpha 4 \beta 1$ em adesões focais dependentes da fibronectina. Estas verificações, sugerem que o $\alpha 4 \beta 1$ e o $\alpha 5 \beta 1$, o receptor protótipo da fibronectina, funcionam em conjunto como mediadores primários da adesão de células à fibronectina.

6.1. MATERIAIS E PROCESSOS

6.1.1. REAGENTES

O fluoreto de fenilmetilsulfonilo, a n-etilmaleimida, a leupeptina, o fluorofofato di-isopropílico, o 2-mercaptoetanol, a albumina do soro bovino ("BSA"), o Triton X-100, a A-agarose para proteínas, o inibidor tripsina de soja e a V8 protease (de Staphylococcus aureus, estirpe V8, tipo XVII de protease), foram adquiridas à Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). A lactoperoxidase e a glucose-oxidase foram adquiridas à Calbiochem (San Diego, CA). A TPCK-tripsina foi adquirida à Cooper Biomedical, Malvern, PA. As IgG e IgM anti-ratinho (cabra) conjugadas com fluoresceína (cadeias H e L) ou as IgG e IgM anti-coelho (cabra) conjugados com rodamina (cadeias H e L) foram obtidas na Tago, Inc. (Burlingame, CA). Adquiriu-se a estreptavidina conjugada com R-ficoeritrina na Biomeda (Foster City, CA). Obteve-se o antissoro IgG (H+L) anti-ratinho de

-33-

coelho, na Cappel (Cooper Biomedical, Malvern, PA). Adquiriu-se o cromato de sódio- ^{51}Cr na New England Nuclear. O ^{125}I foi adquirido na Amersham (Arlington Hts., IL). A interleuquina-2 recombinante humana (IL-2) foi oferta generosa do Dr. D. Urdal (Immunex Corp., Seattle, WA). Adquiriu-se a laminina à Collaborative Research, Inc. (Bedford, MA) e a fibronectina de plasma purificada e o cologénio dos tipos I e III, foram preparados como descrito anteriormente (Wayner, E. A. e Carter, W. G., 1987, supra e Wayner et al., 1988, supra).

6.1.2. CÉLULAS E CULTURA DE CÉLULAS

As células RD (rabdmiossarcoma humano) e HT1080 (fibrossarcoma humano), obtiveram-se da American Type Culture Collection (Rockville, MD). As células mononucleares do sangue periférico (PBMC), as plaquetas e populações de granulócitos de doadores humanos normais, foram preparadas como descrito (Kunicki et al., 1988, supra; Wayner et al., 1988, supra). As células de sangue periférico de pacientes com leucemia linfocítica aguda, de linfócitos granulares grandes (LGL) ou mielogénica, foram obtidas no Dr. I. Bernstein e no Dr. T. Loughran (Fred Hutchinson Cancer Research Center). As células assassinas humanas activadas pela linfoquina (LAK), (500 U/ml IL-2) e a linha de células de linfócitos T monoclonais citotóxicos (CTL) humanos específicas de HLA B7, C1C4, foram preparadas de acordo (CTL) com protocolos padrão (Grimm et al.., 1982, J. Exp. Med., 155:1923-1941; Glassbrook, A. L. e Fitch, F. W., 1980, J. Exp. Med., 151:876-895; Brooks, 1983, Nature, 305:155-158; Wayner, E. A. e Brooks, C. G., 1984, J. Immunol., 132:2135-2142; Wayner, E. A. e Carter, W. G., 1987, J. Cell Biol., 105:1873-1884). A linha de células de linfócitos B (BLCL), transformados por EBV, ST-1, procedeu do baço do dador utilizado na produção da linha C1C4 dos CTL. Todas as outras linhas de células e condições de cultura de células foram conforme anteriormente descritas (Wayner, E. A. e Carter, W. G., 1987, supra; Wayner et al., 1988, supra).

6.1.3. ANTICORPOS

Usou-se um anticorpo policlonal de coelho, AB33, preparado



contra o domínio citoplasmático do receptor $\alpha 5 \beta 1$ da fibronectina, para detectar $\alpha 5 \beta 1$ em adesões focais. Os anticorpos monoclonais A1A5, contra a subunidade $\beta 1$ da integrina comum (Hynes, R. O., 1987, supra) da família VLA de receptores (Hemler, M. E., 1988, supra), e B5-B10 contra a subunidade α da VLA 4 (Hemler et al., 1987, supra), foram obtidos do Dr. Martin Hemler, do Dana-Farber Cancer Inst., Boston, MA. Os anticorpos monoclonais contra receptores $\alpha 3 \beta 1$ (P1B5), $\alpha 2 \beta 1$ (P1H5) e $\alpha 5 \beta 1$ (P1D6), da integrina, já foram descritos e foram desenvolvidos neste laboratório. O P1H5 e o P1D6 inibem a adesão de fibroblastos e de plaquetas ao colôgênio e a substratos revestidos com fibronectina, respectivamente (Wayner, E.A. e Carter, W. G., 1987, supra; Kunicki et al., 1988, supra; Wayner et al., 1988, supra).

Os anticorpos monoclonais contra os receptores da adesão de linfócitos, foram produzidos pelos métodos de Oi e Herzenberg (Oi, V.T. e Herzenberg, L.A., 1980, Immunoglobulin producing hybrid cell lines. No: Selected Methods in Cellular Immunology, Ed. por B.B. Mishell e S.M. Shilgi, W.H. Freeman e Co., San Francisco, pp. 331-373) e Taggart e Samloff (Taggart, R.T. e Samloff, I.M., 1983, Science, 219, 1228-1230) como descrito (Wayner e Carter, 1987; Wayner et al., 1988). Removeram-se baços de ratinhos RBF/DN imunizados com 100 μ l de linfócitos T empacotados, e fundiram-se com células de mieloma NS-1/FOX-NY. Seleccionaram-se heterocariões viáveis em meio RPMI 1640 suplementado com adenina/aminopterina/timidina (Taggart e Samloff, 1983). Rastrearam-se os hibridomas produtores de um anticorpo dirigido contra receptores da adesão de linfócitos, através de inibição específica da adesão de linfócitos as superfícies revestidas com fibronectina e clonaram-se por diluição limitante.

Apesar de o A1A5 (Hemler et al., 1987, J. Biol. Chem., 262:3300-3309) reagir especificamente com a subunidade $\beta 1$ dos receptores de integrina, e de ter sido relatado que inibe a adesão de células (Takeda et al., 1988, J. Cell. Biochem, 37:383-393), nunca foi observado que esse reagente inibisse a

-35-

adesão de linfócitos a nenhuma superfície. Portanto, produziu-se um anticorpo monoclonal funcionalmente definido anti- $\beta 1$, P4C10, utilizando as técnicas anteriormente descritas (supra) e rastreando a inibição da adesão de células a múltiplos ligandos. mostrou-se que o P4C10 inibe a adesão de células às superfícies revertidas com fibronectina, CS-1, cologénio e laminina, e que reage com $\beta 1$, através de critérios bioquímicos padrão.

6.1.4. INIBIÇÃO DA ADESÃO DE CÉLULAS A FIBRONECTINA INTACTA E A FRAGMENTOS DE FIBRONECTINA

Identificaram-se anticorpos que alterariam a adesão de células à fibronectina do plasma purificado, fragmentos trópticos e peptídeos CS, como descrito anteriormente (Wayner e Carter, 1987). Resumidamente, revestiram-se placas de estireno virgens com 48 alvéolos, com fibronectina de plasma humano (5 μ l/ml). Bloquearam-se as placas, com PBS suplementado com 10 mg/ml de BSA desnaturado por aquecimento (HBSA). Marcaram-se os linfócitos T ou as células HT1080 com $\text{Na}_2 \text{}^{51}\text{CrO}_4$ (50 μ Ci/ml, durante 2-4 horas), lavaram-se, e incubaram-se 5×10^4 células HT1080 ou células T cultivadas ou 5×10^{10} PBL/alvéolo, com sobrenadantes de cultura de hibridoma (diluição 1:2 em PBS suplementado com 1 mg/ml de BSA desnaturado por aquecimento), ou com sobrenadante de cultura de células de mieloma, de controlo, durante 15 minutos, a temperatura ambiente. Deixaram-se as células aderir as superfícies revestidas com proteína, na presença dos sobrenadantes de hibridoma, durante 15-30 minutos (HT1080), ou durante 2-4 horas (linfócitos), a 37°C. Removeram-se as células não aderentes, lavando com PBS, e dissolveram-se as células aderentes em SDS/NaOH, contando-se os cpm de ^{51}Cr ligado num contador gama.

6.1.5. INUNOPRECIPITAÇÃO E INUNOPRECIPITAÇÃO SEQUENCIAL. MAPEAMENTO PEPTÍDICO DA V8 PROTEASE E ELECTROFOR- ESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Marcou-se a superfície de células viáveis com iodo 125, como descrito (Wayner e Carter, 1987), seguindo-se extracção com detergente Triton X-100 a 1%, v/v, ou detergente CHAPS a 0,3%, em



-36-

solução salina tamponada com fosfato 50 mM, pH 7,2. Em alguns casos, adicionou-se CaCl_2 1 mM ao tampão de lise. Como inibidores da protease, utilizaram-se fluoreto de venilmetilsulfonal 1 mM, N-etilmaleímida 1mM leupeptina 1 $\mu\text{l/ml}$ e inibidor de tripsina da soja 1 $\mu\text{g/ml}$. Executou-se a imunoprecipitação e as imunoprecipitações sequenciais exactamente conforme descrito anteriormente (Wayner e Carter, 1987, *supra*). A análise peptídica seguiu-se aos procedimentos básicos de Cleveland *et al* (1977, J. Biol Chem., 252:1102-1106), com modificações conforme descrito (Wayner e Carter, 1987). Prepararam-se placas de gel de poliacrilamida, contendo dodecilsulfato de sódio (geles SDS-PAGE), seguindo o sistema básico de preparação de geles de Laemmli (1970, Nature, 227:680-685).

6.1.6. PREPARAÇÃO DE FRAGMENTOS TRIPTICOS DE FIBRONECTINA DE PLASMA HUMANO E SÍNTESE DE PEPTÍDOS CS

A fibronectina de plasma humano foi uma oferta generosa dos Drs. Horowitz e R. Schulman (New York Blood Center, NY). Digeriu-se fibronectina com tripsina TPCK, durante 90 min, a 37°C, e fraccionou-se o digerido por cromatografia de afinidade e permuta iónica, como descrito anteriormente (Garcia-Pardo *et al.*, 1987, Biochem. J., 241:923-928; Garcia-Pardo *et al.*, 1989, Exp. Cell Res, 161:426-431). Sintetizaram-se dois peptídeos parcialmente sobreponíveis, que abrangiam os 48 resíduos iniciais da região IIIIS da fibronectina humana (CS-1 e CS-2 e acoplaram-se a IgG de coelho, como descrito (Humphries *et al.*, 1986, e Humphries *et al.*, 1987, J. Biol Chem. 262:6886-6892).

6.1.7. ANÁLISE POR FLUORESCÊNCIA DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR

Analisou-se a expressão de ECMRs em células em suspensão, através de citometria de fluxo de uma ou duas cores, num separador de células de duplo laser (Coulter, Hialeah, FL). Determinou-se a fluorescência numa escala logarítmica de 3 "décadas" (decade) e exprimiu-se a intensidade da fluorescência (log IF) na forma do número de canais médio (0-255). Determinou-se a fluorescência do fundo para um controlo não-imune, negativo a IgG de rato, em cada população de células, e subtraiu-se.

-37-

Tripsinaram-se as células aderentes e deixaram-se recuperar durante 15 minutos, a 37°C, na presença de soro, antes da utilização na citometria de fluxo. Para as medições de fluorescência de uma ou duas cores, incubaram-se 10^6 células em suspensão, durante 30 minutos, com IgG de cabra purificada em G-Sepharose para proteínas (20 µg/ml) e, a seguir, com anticorpos de primeira fase, a 4°C, durante 60 minutos, lavaram-se em solução salina equilibrada de Hanks ("Hanks' Balanced Salt solution"), contendo 10 mg/ml de HBSA e 0,02% de azida de sódio ("Hanks/BSA/SA"), e incubaram-se com IgG de coelho anti-ratinho conjugada com FITC, durante 60 minutos, a 4°C, em Hanks/BSA/SA. Lavaram-se e fixaram-se em paraformaldeído frio, a 2%, (preparado de fresco) em PBS. Para a fluorescência de duas cores, adicionou-se anticorpo monoclonal biotinado às células coradas com FITC e fixadas, até uma concentração final de 1 µg/ml em Hanks/BSA/SA, e incubou-se durante 60 min a 4°C. A fixação prévia com paraformaldeído a 2% teve um efeito pequeno na expressão dos receptores de integrina de linfócitos. Lavaram-se as células fixadas e incubaram-se em 0,5 ml de Hanks/BSA/SA contendo estreptavidina conjugada com ficoeritrina (Bionetics), numa diluição de 1/50, durante 30 min., a 4°C. Por fim, lavaram-se as células coradas e fixaram-se de novo em paraformaldeído a 2%, em PBS, mantendo-se depois a 4°C, no escuro, para análise no citômetro de fluxo EPICS.

6.1.8. LOCALIZAÇÃO DE RECEPTORES EM ADESSÕES FOCAIS

Tripsinaram-se células aderentes, lavaram-se em RPMI suplementado com 1 µg/ml de BSA mais 100 µg/ml de inibidor tripsina de soja e deixaram-se aderir a lamelas de cobertura, de vidro, lavadas com ácido e silanadas, revestidas com fibronectina, laminina ou colagénio (20 µg/ml), na ausência de soro, durante 1-4 horas, como descrito (Carter e Wayner, artigo em preparação). No final da incubação, removeram-se as células não aderentes e fixaram-se as células aderentes em cacodilato de sódio 100 mM, sacarose 100 mM, CaCl_2 4,5 mM, formaldeído a 2%, durante 20 min. Permeabilizaram-se com Triton X-100 a 0,5%, durante 5 minutos e, a seguir lavaram-se e bloquearam-se com soro de cabra, a 25%, em

PBS. Coraram-se as células permeabilizadas, com anticorpos de receptores específicos (60 minutos, à temperatura ambiente), lavaram-se e incubaram-se, ou com IgG anti-ratinho de cabra conjugado com FITC ou com IgG anti-coelho de cabra conjugado com rodamina (45 minutos, à temperatura ambiente) e lavaram-se de novo. Inverteram-se as lamelas de cobertura sobre lâminas de vidro para microscópio, para microscopia de fluorescência e de interferência de reflexão ("IRM") como descrito (Izzard, S.C. e Lochner, L.R., 1976, J. Cell. Sci., 21, 129-159).

6.1.9 COLORAÇÃO DO TECIDO

Determinou-se a distribuição dos receptores de integrina em tecidos, por microscopia de fluorescência de secções criostáticas. Prepararam-se secções criostáticas (6 μ m) de amostras de pele, amígdalas ou tumores, humanas embebidas em meio OCT, depois da congelação rápida em isopentano/azoto líquido. Fixaram-se todas as secções em paraformaldeído a 4%, em PBS, antes de se incubarem com anticorpos primários e anticorpos secundários fluorescentes, conforme descrito (Carter e Wayner, 1988, J. Biol. Chem., 263:4193-4201). Nas experiências de controlo não se detectou nenhuma fluorescência da rodamina, utilizando os filtros da fluoresceína, ou vice-versa.

6.2. RESULTADOS

6.2.1. IDENTIFICAÇÃO DE UM RECEPTOR DE FIBRONECTINA ALTERNATIVO.

Células de linfócitos T (Molt 4), de X562, de RD (rhabdomiossarcoma) e de HT1080 (fibrossarcoma) cultivadas e PBL derivados de fresco (não apresentados), aderiram a superfícies revestidas com fibronectina (Figura 1: barras a branco). No entanto, as células Molt 4 e RD expressaram níveis baixos ou indetectáveis do receptor protótipo de fibronectina ($\alpha 5 \beta 1$ da integrina), reconhecido pelo anticorpo monoclonal F1D6 (Figura 1: barras a tracejado). Consistente com isto, a adesão de células Molt 4 e RD a fibronectina não pôde ser completamente inibida pelo F1D6 (Figura 1: barras a cheio). Alternativamente, a adesão de células, à fibronectina, que expressaram $\alpha 5 \beta 1$ em qualidade (HT



-39-

1080 e K562), pôde ser inibida eficazmente pelo P1D6. Para além disso, o péptido RGD5, de síntese, não inibiu completamente a adesão de linfócitos T à fibronectina do plasma (50-70% para as células Molt 4 ou Jurkat versus 80-90% para fibroblastos e 100% para células K562-1). Em conjunto, estes dados sugeriam que algumas células, tal como os linfócitos T, expressavam outros receptores da adesão à fibronectina, que não o $\alpha 5 \beta 1$.

Tentámos identificar outros receptores de fibronectina putativos preparando anticorpos monoclonais contra linfócitos T cultivados, e rastreando-os quanto à sua capacidade de inibirem especificamente a adesão de linfócitos, mas não de fibroblastos, a superfícies revestidas com fibronectina. Usando este protocolo, identificaram-se diversos anticorpos monoclonais (P4C2, P3E3, P469), que inibiam a adesão de linfócitos T cultivados mas não de células HT1080, à fibronectina (Tabela 3).

71 489

3624-076-118



-40-

TABELA III

INIBIÇÃO ESPECÍFICA DA ADESAO DE LINFÓCITOS A
FIBRONECTINA DO PLASMA, PELOS ANTICORPOS MONOCLONAIS
P3E3, P4C2 DE PP649

CELULAS	ADESAO DE FIBRONECTINA (% DO CONTROLO)				
	SP2	P1D6 ($\alpha_5\beta_1$)	P3E3	P4C2	P4B7
PBL	100%	43%	38%	10%	52%
Jurkat	100%	22%	33%	12%	48%
Molt 4	100%	18%	12%	8%	39%
HT1080	100%	5%	98%	93%	104%

-41-

A imuno-precipitação a partir de lisados com detergente Triton X-100, preparados com células PBL, (não apresentadas), Molt 4 ou HT1080 (Figura 2), marcadas à superfície com ^{125}I , revelou que os anticorpos monoclonais inibidores (dados apresentados para o P3E3) reagiam com uma única proteína presente em extractos de linfócitos, que migrava a M 150.000 (p150), na presença (não apresentado) ou na ausência (Figura 2) de agente redutor. Sob estas condições de precipitação imunológica, a p150 carecia de uma estrutura subunitária α - β autêntica e não migrou nem com a subunidade α nem com a subunidade β dos receptores $\alpha 2\beta 1$ ou $\alpha 3\beta 1$ da integrina (Figura 2). O antígeno imuno-precipitado de extractos em detergente Triton X-100, preparados com CTL (não apresentado) ou linfócitos T assassinos (LAK) CD8+, cronicamente activados, continha, para além da p150, quantidades relativamente grandes de duas proteínas mais pequenas que migraram a M 60.000 e M 70.000, na presença (não apresentado) ou na ausência de agente redutor. A sequenciação peptídica com protease VS, revelou que as p80 e p70 eram fragmentos proteolíticos da p150 (não apresentado). Estas formas, com massas moleculares mais baixas, puderam ser imuno-precipitadas a partir de células T cronicamente activadas, mesmo quando os extractos em detergente foram preparados na presença de múltiplos inibidores da protease (legenda da Figura 2). A p80 e a p70 estavam virtualmente ausentes de extractos preparados com PBL em repouso, leucemias cultivadas de células T (Molt 4, Jurkat) ou B e células RD.

As características bioquímicas da p150 sugeriam que podia estar relacionada com o antígeno da VLA 4 descrito por Hemler (Hemler *et al.*, 1987). Isto foi confirmado por imuno-precipitação sequencial (não apresentada) com um anticorpo monoclonal específico da VLA 4, o B5-B10. Provou-se que a p150 era uma subunidade α da super-família da integrina, através da sua associação com $\beta 1$, quando se levaram a cabo imuno-precipitações de linfócitos T, marcados à superfície com ^{125}I , após solubilização com detergente CHAPS (0,3%), na presença de Ca^{++} 1 mM (Figura 3). Sob estas condições, o $\alpha 4$ foi precipitado com $\beta 1$, na forma de um heterodímero. A identidade de $\beta 1$ foi confirmada

por sequencição peptídica com V8 protease (não apresentada). Mostrou-se que o heterodímero $\alpha 4 \beta 1$, imuno-precipitado a partir de linfócitos T com os anticorpos monoclonais inibidores (P3E3, P4C2 e P4G9), era distinto do receptor protótipo da fibronectina, $\alpha 5 \beta 1$, imuno-precipitado com P1D6, por três critérios. 1) As quantidades relativas de $\alpha 4 \beta 1$ e $\alpha 5 \beta 1$, presentes em extractos de linfócitos T em detergente, eram distintas, estando presentes níveis mais elevados de $\alpha 4 \beta 1$ (Figura 3). Isto estava em acordo com os dados que obtivemos usando citometria de fluxo (Figura 1). 2) Em experiências de imuno-precipitação sequencial, os anticorpos monoclonais contra $\alpha 4 \beta 1$ não pré-anularam o $\alpha 5 \beta 1$ (não apresentado). 3) Os mapas de péptidos da V8 protease, obtidos a partir das subunidades $\alpha 4$ e $\alpha 5$, precipitadas com anticorpos monoclonais P3E3 e P1D6, eram claramente discerníveis (não apresentado). Para além disso, sob as condições (CHAPS a 0,3% e CaCl_2 1 mM) utilizadas para solubilizar o conjugado de $\alpha 4 \beta 1$, a partir de células Jurkat (Figura 3), uma outra proteína, com maior massa molecular ($p180$), também reagiu com os anticorpos monoclonais ou co-precipitou-se com $\alpha 4 \beta 1$. A $p180$ estava ausente dos extractos preparados com o anticorpo monoclonal P1D6 (Figura 3), células não-linfóides ou extractos em detergente Triton X-100 preparados na ausência de Ca^{++} . Não é conhecida a relação da $p180$ com outras integrinas. Uma vez que a $\alpha 4$ pôde ser imuno-precipitada sem $\beta 1$, após solubilização de células T com Triton X-100, na ausência de Ca^{++} , isto revelou que os anticorpos monoclonais inibidores reconheciam epítomos presentes na subunidade $\alpha 4$ (Figura 2).

6.2.2. DISTRIBUIÇÃO DE $\alpha 4 \beta 1$ E $\alpha 5 \beta 1$ EM CÉLULAS E TECIDO CULTIVADOS

Tal como foi relatado anteriormente (Hamler, *supra*), o $\alpha 4 \beta 1$ distribui-se amplamente em células hematopoiéticas nucleadas (Tabela IV).

71 489

5624-076-118



-43-

TABELA IV

DISTRIBUIÇÃO DOS RECEPTORES $\alpha 4\beta 1$ E $\alpha 5\beta 1$ DA
FIBRONECTINA EM CÉLULAS HUMANAS

Células	$\alpha 4\beta 1$	Intensidade de Fluorescência Relativa
		$\alpha 5\beta 1$
<u>Células Hematopoiéticas</u>		
FBL	+++	+/- ou -
LGL (CD3-, CD16+)	+++	+/- ou -
Monócitos (CD16+)	++	++
Granulócitos	-	+
Plaquetas	-	+
Baço	+++	+
Amígdala	+++	+
ALL (T ou B)	+++	++
LGL Leucemia (CD3+, CD4+)	+++	+/-
AML	+++	++
BLCL	++	+
Molt 4 (CD3+, CD4+)	+++	+
Jurka (CD3+, CD4+)	+++	++
YT (CD3-)	++	-
Blastos PHA (CD4+)	++++	++
CTL (CD3+, CD8+)	++++	+++
LAK (CD3+, CD8+)	++++	+++
HL-60	++	+
U937	++	+

71 457

5824-075-118

-44-

Células	Intensidade de Fluorescência Relativa	
	Q481	Q581
K562-1	-	++
<u>Fibroblastos</u>		
HFF (p5)	+	+
HT1080	+	++
MD	++	+
VA13	+	++
<u>Células Epiteliais</u>		
UC-1	-	-
OVCA8-47	-	-
T47D	-	+
Q636	-	+



-45-

A citometria de fluxo a duas cores, revelou que todas as subpopulações de linfócitos derivados de baço, amígdalas e sangue periférico expressavam, em quantidade, $\alpha 4\beta 1$. Além disso, os monócitos de sangue periférico, as leucemias linfocíticas (T ou B) agudas, derivadas de fresco, todas as leucemias mielocíticas e linfocíticas granulares grandes (LGL) e as linhas de células de linfócitos T e B cultivados que examinamos, expressavam $\alpha 4\beta 1$ em quantidade (Tabela IV). As plaquetas e os granulócitos normais de sangue humano foram negativos quanto a $\alpha 4\beta 1$ (Tabela IV). Em contraste, as únicas populações de células hematopoiéticas que expressaram $\alpha 5\beta 1$ foram plaquetas, monócitos, granulócitos e células T activadas, leucemias linfocíticas (T ou B) e mielocíticas agudas e células K562, HL-60 e U937 cultivadas. Algumas linhas de células T (Molt 4 ou Jurkat) e B (BT-1) cultivadas, expressaram baixos níveis de $\alpha 5\beta 1$, como se detectou através do anticorpo monoclonal PiD6. Em alguns indivíduos normais, uma subpopulação de FBL foi positiva quanto a fluorescência de PiD6, detectada por citometria de fluxo. Estamos a investigar a natureza dessa subpopulação de FBL que expressa $\alpha 5\beta 1$. As células TV, um linfoma de células CD3 T, foram completamente negativas quanto a PiD6, por citometria de fluxo. Estes resultados mostram que o principal receptor de fibronectina expresso constitutivamente por linfócitos T em repouso, é o $\alpha 4\beta 1$ e, como relatámos anteriormente (Wayner *et al.*, 1989), a expressão de $\alpha 5\beta 1$ em linfócitos T restringe-se a células cultivadas activadas ou leucémicas. É interessante que a maior parte das linhas de células fibroblásticas tenha expressado níveis baixos de $\alpha 4\beta 1$, enquanto células endoteliais de grandes artérias (HUVEs) e células epiteliais cultivadas foram negativas quanto a $\alpha 4\beta 1$, por citometria de fluxo.

Em tecidos, o $\alpha 4\beta 1$ estava presente em gânglios linfáticos, amígdalas, e baço de adultos, e estava praticamente ausente de todos os outros tecidos que examinamos. Além disso, as quantidades relativas dos receptores de adesão à fibronectina expressos por células em domínios de tecido específicos, variaram extraordinariamente. Por exemplo, as FBL e os linfócitos

expressaram grandes quantidades de $\alpha 4 \beta 1$ mas praticamente nenhum $\alpha 5 \beta 1$ em amígdalas, no córtex e em áreas centrais germinais também se encontrou $\alpha 4 \beta 1$ em regiões epiteliais de tecido linfático de adulto, mas não ficou claro se isso foi resultado da infiltração de linfócitos nessas áreas, se da expressão de $\alpha 4 \beta 1$ por células linfáticas epiteliais.

5.2.3. O $\alpha 4 \beta 1$ LOCALIZA-SE EM ADEESÕES FOCAIS DEPENDENTES DA FIBRONECTINA

Há uma reorganização específica dos receptores de adesão da superfície das células às adesões focais, quando se cultivam células sobre os ligandos apropriados, na ausência de soro (revisão de Burridge *et al.*, 1988, *Ann. Rev. Cell Biol.*, 4, 487-525). Uma vez que alguns fibroblastos expressam $\alpha 4 \beta 1$, investigamos se esse receptor se distribuiria nas adesões focais quando se usasse fibronectina como substrato da adesão. Como se pode ver na Figura 4(A e C), os sítios de contacto focal primário ou adesões focais, puderam visualizar-se, por microscopia de interferência de reflexão (Izzard, S.C. e Lochner, L.R., 1976, *J. Cell. Sci.*, 21, 129-159), quando se cultivaram células RD em fibronectina. Tal como nós e outros relatámos (Roman, J., LaChance, R., Broekelmann, T.J., Roberts, C.J., Wayner, E.A., Carter, W.G., e Macdonald, J., 1988, *J. Cell Biol.*, 108:2529-2543), na ausência de soro, o $\alpha 5 \beta 1$ concentrou-se nas adesões focais, quando se cultivaram células RD sobre superfícies revestidas com fibronectina (Figura 4B, setas), mas não com laminina. Do mesmo modo, a coloração com anticorpo monoclonal P469 (Figura 4D, setas), revelou que o $\alpha 4 \beta 1$ também se concentrara nas adesões focais, quando se cultivaram as células sobre superfícies revestidas com fibronectina, mas não com laminina (não apresentado). Estes resultados demonstram uma interacção específica de $\alpha 4 \beta 1$ com fibronectina presente em adesões focais, a estrutura de adesão primária de células cultivadas.

A presença de ambos os receptores em contactos focais superiu a possibilidade de que o $\alpha 4 \beta 1$ e o $\alpha 5 \beta 1$ se ligassem a sequências de adesão distintas, na fibronectina. De facto,

71 489

5624-076-118

-47-

coteve-se evidência disto, quando se usaram P402 e P106, simultaneamente, para inibir a adesão de células à fibronectina de plasma intacta. Quando usados em conjunto, o P106 e o P402 inibiram completamente a adesão de linfócitos T à fibronectina do plasma intacta, inibindo parcialmente a adesão de células RD (Tabela V).

71 489

5624-076-118

-48-

TABELA V

EFEITO COMBINADO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS P1D6 E P4C2
NA ADESAO DE LINFÓCITOS T E CÉLULAS RD A FIBRONECTINA

CÉLULAS	ANTICORPO	ESPECIFICIDADE	ADESAO
			(% DO CONTROLO $\pm$ DP)
RD	IGG	-	100%
	P1D6	α 5B1	81 ± 11
	P4C2	α 4B1	99 ± 7
	P1D6 + P4C2		36 ± 8
Jurkat	IGG	-	100%
	P1D6	α 5B1	26 ± 9
	P4C2	α 4B1	38 ± 14
	P1D6 + P4C2		0

é interessante que, ao contrário dos linfócitos T, nem o P1D6 nem o P4C2, isolados, foram bons inibidores da adesão de células RD à fibronectina do plasma intacta. A adesão de células RD à fibronectina apenas pôde ser eficazmente inibida por P1D6 e P4C2 quando usados em conjunto.

6.2.4. O $\alpha 4\beta 1$ FUNCIONA COMO RECEPTOR DE UM SÍTIO DE LIGAÇÃO ALTERNATIVO, INDEPENDENTE DE RGD, DA FIBRONECTINA

Os resultados precedentes (Tabela III, Tabela V, Figura 1, Figura 4) indicam, claramente, que a ligação de algumas células à fibronectina do plasma era mediada por dois receptores independentes da superfície celular, o $\alpha 4\beta 1$ e o $\alpha 5\beta 1$. Foi bem documentado que o ligando para o $\alpha 5\beta 1$, na fibronectina, é o domínio de ligação de células com 80 kDa, que contém a sequência RGD (Pytela, R., Pierschbacher, M.D., e Ruoslahti, E., 1985, Cell, 40:191-198). Para determinar qual a região da fibronectina que interagia com o $\alpha 4\beta 1$, examinamos a adesão de linfócitos T cultivados a diversos fragmentos proteolíticos de fibronectina do plasma (veja-se as Figuras 5A e 5B), bem como o efeito dos anticorpos monoclonais P1D6 e P4C2 sobre a adesão de linfócitos a esses fragmentos. Como se mostra na Figura 6, as células Jurkat, Y1 e Molt 4 ligam-se muito mais eficientemente a um fragmento com 38 kDa, que contém o domínio Heparina (Hep) II, do que a um fragmento que contenha RGD (80 kDa). As células Jurkat e Molt 4 também se ligam, de um modo dependente da dose, a um outro fragmento de 58 kDa, que contém o domínio Hep II. Contudo, o máximo da ligação de células ao fragmento com 58 kDa atingiu apenas 30% do que se atingiu com o fragmento da fibronectina com 38 kDa. Isto sugere que o fragmento com 38 kDa contém um sítio de ligação com elevada afinidade para linfócitos T. Os linfócitos T não aderiram ao fragmento com 29 kDa do terminal N da fibronectina de plasma, que continha o domínio Hep I. Em geral, PBL derivadas de fresco revelaram um padrão de ligação similar ao das células Jurkat ou Molt 4, e a capacidade de PBL derivadas de fresco se ligarem ao fragmento com 80 kDa correlacionava-se com a expressão de $\alpha 5\beta 1$. Outras linhas de células hematopoiéticas,

-50-

tais como células K562 (Figura 6), exibiram uma preferência nítida pelo fragmento da fibronectina do plasma com 80 kDa, enquanto as células RD manifestaram adesão indiscriminada a todos os fragmentos de fibronectina do plasma testados, excepto ao fragmento do terminal N com 29 kDa. RGD5 (1 mg/ml) inibiu parcialmente (50%) a adesão de células Jurkat à fibronectina intacta, tendo inibido completamente (100%) a sua adesão ao fragmento com 80 kDa. A adesão de células Jurkat ao fragmento com 38 kDa não foi afectada por RGD5 (até 1 mg/ml).

Tal como mostrámos anteriormente (Tabela 3 e Figura 1), os anticorpos monoclonais contra $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 5\beta 1$ inibiram parcialmente a adesão de linfócitos T à fibronectina do plasma intacta (Figura 7, topo). Como se esperava, o P1D6 inibiu completamente a adesão de células T ao fragmento com 80 kDa que continha a sequência RGD de adesão (Figura 7, meio). O P1D6 não inibiu a adesão de linfócitos T aos fragmentos com 38 kDa (Figura 7, base) ou 55 kDa. Pelo contrário, o P4C2 inibiu completamente a adesão de linfócitos T ao fragmento com 38 kDa e não teve nenhum efeito sobre a adesão ao fragmento com 80 kDa (Figura 7). Para além disso, a adesão de linfócitos T ao fragmento com 38 kDa que também continha Hep II, pôde ser inibida por P4C2. Em todos os casos, outras linhas de células de linfócitos T que expressam ambos, o $\alpha 4\beta 1$ e o $\alpha 5\beta 1$ (tal como células Jurkat), comportam-se exactamente como as células Molt 4 (Figura 7). Como se viu na Tabela 4, as células K562 apenas expressam o $\alpha 5\beta 1$. A adesão de células K562 aos fragmentos com 38 kDa (Figura 6) e 55 kDa, foi grandemente reduzida, quando comparada com a sua adesão ao fragmento com 80 kDa (Figura 6). A adesão destas células a fibronectina de plasma intacta (Figura 1) ou ao fragmento com 80 kDa, pôde ser completamente inibida por P1D6. Por outro lado, as células YT, que não expressam $\alpha 5\beta 1$ (Tabela IV), aderem deficientemente à fibronectina de plasma intacta e ao fragmento com 80 kDa (Figura 6). Estas células requerem 2-3 vezes mais tempo, para aderirem a superfícies revestidas com fibronectina de plasma, do que as células Jurkat ou Molt 4. Contudo, as células YT aderem eficazmente e de um modo dependente da quantidade, ao

fragmento com 38 kDa (Figura 5) e a adesão dessas células ao fragmento com 38 kDa pôde ser completamente inibida com F402. Estes dados indicam uma correlação directa entre a expressão de $\alpha 4 \beta 1$ e a capacidade de ligação a fragmentos de fibronectina de plasma que contenham as regiões Hep II e III C5. Para além disso, estes dados mostram inequivocamente que o $\alpha 4 \beta 1$ funciona como o receptor para este domínio alternativo de adesão de células.

6.2.5. O $\alpha 4 \beta 1$ É O RECEPTOR DOS LINFÓCITOS PARA O CS-1

A região III C5 presente na cadeia A da fibronectina de plasma (Figura 5), contém pelo menos dois sítios responsáveis pela mediação da adesão de células a fibronectina (Humphries *et al.*, 1986, J. Cell Biol., 103:2637-2647; Humphries *et al.*, 1987, J. Biol. Chem., 262:6886-6892; Humphries *et al.*, 1988, J. Cell Biol., 106:1289-1297). Utilizando uma série de péptidos de síntese, parcialmente sobreponíveis, que abrangiam toda a região III C5 (péptidos CS), Humphries e colaboradores mostraram que os péptidos CS-1 (terminal N) continham sequências de adesão reconhecidas por células de melanoma de ratinho (Humphries *et al.*, 1986, 1987). Aqui, mostramos que o fragmento com 38 kDa contém um sítio de adesão com elevada afinidade, reconhecido por linfócitos T humanos e que o $\alpha 4 \beta 1$ é o receptor que medeia a adesão de linfócitos T ao fragmento com 38 kDa. Este fragmento não contém o sítio CS-3 mas contém, de facto, toda a região CS-1 (Garcia-Parco *et al.*, 1987, Biochem. J., 241:923-928), que foi definida como um sítio de adesão com elevada afinidade para células de melanoma (Humphries *et al.*, 1987, J. Biol. Chem., 262:6886-6892). Portanto, era interessante determinar se os linfócitos T reconheceriam o CS-1 e se se lhe ligariam, e se o $\alpha 4 \beta 1$ seria o receptor envolvido nesta interacção.

Os linfócitos T (células Jurkat ou Molt 4) reconhecem superfícies plásticas revestidas com CS-1 (conjugado com IgG de coelho) e ligam-se-lhes (Tabela VI). Os linfócitos T (Jurkat) não se ligam a superfícies revestidas com CS-2 (conjugado com IgG de coelho) ou a superfícies plásticas revestidas apenas com IgG de coelho. Para além disso, anticorpos monoclonais do $\alpha 4 \beta 1$ (F402)

71 459

0424-076-118



-32-

inibiram completamente a adesão de linfócitos T a C6-1, enquanto anticorpos do $\alpha 5\beta 1$ (P1D6) não tiveram efeito absolutamente nenhum (Tabela VI). Tal como mostramos anteriormente, anticorpos do $\alpha 4\beta 1$ inibiram completa e especificamente a adesão de linfócitos T ao fragmento com 38 kDa (Tabela VI), enquanto anticorpos do $\alpha 5\beta 1$ inibiram especificamente a adesão ao fragmento com 20 kDa que continha RGD.

71 487

5524-076-116

-53-

TABELA VI

INIBIÇÃO DA ADESAO DE LINFÓCITOS T AO PEPTÍDO
CS-1, COM ANTICORPOS MONOCLONAIS DO $\alpha 4\beta 1$

LIGANDO	IgG	ANTICORPO ¹	
		P4C2	F106
50 kDa	8560 $\pm$ 214	7154 $\pm$ 398	202 $\pm$ 108
36 kDa	22680 $\pm$ 1014	114 $\pm$ 78	24917 $\pm$ 352
CS-1	44339 $\pm$ 513	841 $\pm$ 585	42897 $\pm$ 725
CS-2	2576 $\pm$ 214	535 $\pm$ 258	435 $\pm$ 168

6.3 DISCUSSÃO

Utilizando tecnologia de anticorpos monoclonais (Wayner, E.A., Carter, W.G., Piotrowicz, R. e T.J. Kunicki, 1988, J. Cell Biol., 10: 1881-1891) identificamos um novo receptor $\alpha 4 \beta 1$ da fibronectina. Os anticorpos monoclonais P3E3, P4C2 e P4B9 reconheceram epítopos na subunidade $\alpha 4$ e inibiram completamente a adesão de linfócitos T cultivados e de sangue periférico a um fragmento triptico com 38 kDa da fibronectina de plasma, que continha o domínio Heparina II do terminal carboxi e parte do segmento de conexão do tipo III (IIIIC5). O ligando para o $\alpha 4 \beta 1$ no IIIIC5 era a região C8-1, anteriormente definida como sítio de adesão para células de melanoma. Os anticorpos monoclonais funcionalmente definidos para a $\alpha 4$, inibiram parcialmente a adesão de linfócitos T a fibronectina de plasma intacta e não tiveram nenhum efeito sobre a sua ligação a um fragmento triptico com 80 kDa que continha a sequência RGD de adesão. Anticorpos monoclonais (P1D6 e P1F8) do receptor da fibronectina, descrito anteriormente, inibiram completamente a adesão de linfócitos T ao fragmento com 80 kDa, mas não tiveram nenhum efeito na sua ligação ao fragmento com 38 kDa ou a C8-1. Ambos, $\alpha 4 \beta 1$ e $\alpha 5 \beta 1$, se localizaram para adesões focais quando se cultivaram fibroblastos, que expressavam esses receptores, sobre superfícies revestidas com fibronectina. Estas determinações demonstraram uma interação específica de ambos os receptores com fibronectina, nos contactos focais.

Recentemente, Bernardi *et al.*, 1987, *supra*; Liao *et al.*, 1987, Exp. Cell. Res., 171:306-320; Liao *et al.*, 1989, Exp. Cell Res., 181:348-361, relataram que algumas linhas de células de linfócitos B se ligavam a uma região da fibronectina de plasma localizada dentro do domínio Hap II do terminal carboxi. Liao *et al.*, 1987, *supra*, identificaram um receptor semelhante à integrina, em células B. Contudo, não está claro se a proteína que eles descreveram era $\alpha 4 \beta 1$, $\alpha 2 \beta 1$ ou $\alpha 5 \beta 1$. Bernardi *et al.*, 1987, *supra*, também identificou receptores da fibronectina expressos por linfócitos B. É interessante que, nesse estudo, as células B que se prendiam a fragmentos que continham Hap II,



expressassem um receptor semelhante ao $\alpha 4 \beta 1$, enquanto as células que se prendiam ao domínio de adesão de células que continha RGD, expressavam um receptor similar ao $\alpha 5 \beta 1$. Contudo, também não foi possível, a partir destes dados, identificar claramente o receptor envolvido na ligação. Em conjunto, os resultados desses relatórios anteriores e as presentes determinações, proporcionam indicações claras em apoio i) da existência de um domínio de adesão alternativo, presente na região do terminal carboxi da fibronectina de plasma e ii) de um papel para o $\alpha 4 \beta 1$, como receptor para este sítio de adesão alternativo. Será interessante determinar as sequências exactas de amino-ácidos que são responsáveis pela interacção do $\alpha 4 \beta 1$ com fibronectina. Uma vez que nem os fragmentos com 38 kDa e 58 kDa, nem o CS-1, contém uma sequência RGD (Kornblihtt *et al.*, 1985, supra; Garcia-Pardo, 1987, supra; Humphries *et al.*, 1986, supra; e Humphries *et al.*, 1987, supra), é evidente que a caracterização do ligando para o $\alpha 4 \beta 1$ identificará uma nova sequência de amino-ácidos, importante para a adesão de células a fibronectina. Uma vez que o fragmento com 38 kDa não contém CS-5 (Garcia-Pardo, 1987, supra), a sequência mínima de amino-ácidos responsável pela adesão de linfócitos T ao fragmento com 38 kDa e, portanto, o ligando para o $\alpha 4 \beta 1$, nessas células, não é arg-glu-asn-val ou RGDV (Humphries *et al.*, 1986, supra).

Tal como a $\alpha 2 \beta 1$, a subunidade $\alpha 4$ está fracamente associada com a subunidade $\beta 1$. Os dados aqui apresentados (Figura 2), e as nossas determinações anteriores (Wayner, E.A. e Carter, W.G., 1987, supra e Wayner *et al.*, 1988, supra) mostram que os anticorpos monoclonais funcionalmente definidos para o $\alpha 2 \beta 1$ e o $\alpha 4 \beta 1$ interactivam selectivamente com epítopos presentes nas subunidades α , baseadas em imuno-precipitados de $\alpha 2$ ou $\alpha 4$ sem $\beta 1$, após dissociação em subunidades. Estes resultados sugerem que a única subunidade α é responsável pela determinação da especificidade de ligação do ligando de cada complexo α - β . Este conceito é agora corroborado pelas observações aqui apresentadas, de que o $\alpha 5$ e o $\alpha 4$, que estão ambos complexados com $\beta 1$, medeiam a adesão a sítios distintos da fibronectina. Isto não pretende

-56-

sugerir que a subunidade β não é importante na ligação, mas que a especificidade das interações receptor-ligando é determinada por α ou um complexo (α único)- β .

É interessante que, embora as células LAK expressassem abundante $\alpha 4\beta 1$ na superfície celular, este não parecia ser um receptor funcional; 1 μ M PD6 inibia completamente a adesão de células LAK a fibronectina. A razão para isso podia ser que as células LAK expressassem uma forma degradada de $\alpha 4$ (veja-se a Figura 2). Além disso, porque estão activadas, as células LAK sobre-expressam o $\alpha 5\beta 1$, quando comparadas com células T leucémicas ou de sangue periférico (Tabela VIII). Em outras células, que expressem maiores quantidades de $\alpha 5\beta 1$, em relação a $\alpha 4\beta 1$ (K562-1 e HT1080), é dominante a adesão via $\alpha 5\beta 1$ ao domínio com 60 kDa que contém RGD (veja-se as células K562-1, Figura 4). Isto implica que a regulação da expressão de receptores determina a capacidade de uma célula para reconhecer e se ligar a diferentes sítios de fibronectina. Para além disso, também é possível que a co-expressão dos dois receptores para a fibronectina possa aumentar a "avidéz" de ligação das células; por exemplo, as células Jurkat e RD expressam adesão relativamente indiferenciada a fibronectina, quando comparadas com células YT, que expressam apenas o $\alpha 4\beta 1$.

A regulação da adesão de células, da fibronectina, é potencialmente complexa, mesmo sob as condições mais simples possíveis, que são assumir que o $\alpha 5\beta 1$ e o $\alpha 4\beta 1$ funcionam um independentemente do outro e que não se sobrepõem durante a interacção com os dois sítios de ligação da fibronectina. Variações a partir deste estado simples, proporcionam oportunidades para regulação extremamente sensível da adesão de células. Ao nível menos complexo, esta regulação pode ser grosseiramente categorizada em i) processos que controlam a síntese e/ou a exposição dos sítios de ligação no ligando e ii) regulação da expressão funcional dos receptores. Estão presentemente disponíveis exemplos de regulação a ambos os níveis e incluem a observação de que linfoquinas e o antígeno específico induzem a expressão de $\alpha 5\beta 1$ em linfócitos T, seguida de adesão

adesão de células à fibronectina (Wayner *et al.*, 1988, *supra*). Além disso, o controle do entrelaçamento do mRNA na região IIICS da fibronectina (Kornblihtt *et al.*, 1983, *supra*) durante a cura ou inflamação de ferimentos, pode ditar a especificidade da ligação receptor-ligando, em células T activadas ou em repouso. Variações a partir do estado simples são intrigantes mas requerem experimentação adicional, até mesmo para começar a identificar a multiplicidade de mecanismos potenciais.

Em conclusão, estas determinações mostram claramente que linfócitos T cultivados utilizam dois receptores independentes durante a ligação à fibronectina, e que i) o $\alpha 5 \beta 1$ é o receptor para o domínio de adesão de células que contém RGD, e que ii) o $\alpha 4 \beta 1$ é o receptor para uma região de adesão de células ao terminal carboxi, que contém os domínios Heparina II e IIICS. Para além disso, estes dados mostram que os linfócitos T manifestam uma preferência clara por uma região de heterogeneidade molecular, no IIICS (CS-1), gerada por entrelaçamento alternativo do pré-mRNA da fibronectina, e que o $\alpha 4 \beta 1$ é o receptor para esse sítio de adesão.

7. EXEMPLO: A ADIÇÃO DE LINFÓCITOS A ENDOTÉLIO ACTIVADO É MEDIADA PELA LIGAÇÃO DO RECEPTOR $\alpha 4 \beta 1$ DA INTEGRINA AO CS-1, NA REGIÃO IIICS ENTRELAÇADA ALTERNATIVAMENTE, DA FIBRONECTINA

Os experimentos seguintes demonstraram o papel do receptor $\alpha 4 \beta 1$ e do seu ligando, CS-1, na mediação da adesão de células T a células endoteliais, de vasos importantes, cultivadas, e a células endoteliais que tinham sido activadas com uma diversidade de citocinas associadas com a resposta inflamatória, incluindo IL-1, factor de necrose tumoral alfa (FNT α) e factor de necrose tumoral beta (FNT β). Além disso, demonstrou-se a capacidade de anticorpos monoclonais e de fragmentos peptídicos para bloquearem a aderência de linfócitos ao endotélio, através do receptor $\alpha 4 \beta 1$.

7.1. MATERIAIS E PROCESSOS

7.1.1. REAGENTES

Os reagentes utilizados foram tal como descritos na Secção

6.1.1., SUBF.

7.1.2. CELULAS E CULTURAS DE CELULAS

As Jurkat (leucemia de células T humanas) obtiveram-se do Dr. Paul Conlon (Immunex Corp., Seattle, WA) e as Ramos (leucemia de células B humanas) foram obtidas da American Type Culture Collection (Rockville, MD). As linhas de células B ST-1 e LAD (leucócitos de adesão deficiente), prepararam-se por transformação de linfócitos B humanos com vírus de Epstein-Barr. A linha de células LAD desenvolveu-se a partir de células B de um paciente com uma deficiência na família $\beta 2$ da integrina de receptores de adesão e foi obtida do Dr. John Harlan (Harborview Medical Center, Seattle, WA). As células endoteliais de veia umbilical humana (HUVes) foram adquiridas à Cell Systems, Seattle, WA. Mantiveram-se as HUVes em meio definido (isento de soro), também adquirido à Cell Systems (meio CS-100).

7.1.3. ATIVACÃO DE HUVes COM CITOCINAS INFLAMATÓRIAS

Incubaram-se HUVes com IL-1 β (1 mg/ml) ou, em alguns experimentos, com FNT α (10 mg/ml), durante 6-24 horas. No final dessa incubação, lavaram-se as monocamadas de HUVE e utilizaram-se no teste de adesão.

7.1.4. SÍNTESE DE PEPTIDOS CS

Sintetizaram-se peptídeos derivados da região CS-1 da fibronectina de plasma e purificaram-se por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, CLAE), de acordo com protocolos padrão do Dr. James Blake, da Oncogen Corp., Seattle, WA. Conjugou-se o peptído CS-1 com albumina de soro de coelho ou KLH, também de acordo com protocolos padrão do Dr. James Blake. O peptído RGDs de controle, obteve-se dos Peninsula Laboratories (Belmont, CA).

7.1.5. ANTICORPOS MONOCLONAIS

Os anticorpos seguintes foram desenvolvidos neste laboratório: P1H5, que reconhece o receptor $\alpha 2 \beta 1$ (Wayner et al., 1987, J. Cell Biol. 105:1873-11884; Wayner et al. 1988, J. Cell

biol., 107:1881-1891); P105, que reconhece o receptor $\alpha 5 \beta 1$ da fibronectina, descrito por Pytela et al (Cell, 40:191-196); P4U10, que reconhece a subunidade $\beta 1$; e P4X9, que reconhece a $\beta 2$ (CD18), utilizando processos totalmente descritos por Wayner et al (1967, J. Cell Biol., 105:1873-1884) e em Wayner et al, 1969, J. Cell Biol., 107:1881-1891, que são aqui incorporados, por referência, na sua totalidade, e se descrevem na Tabela II.

7.1.4. TESTE DE ADESAO DE CELULAS ENDOTELIAIS

Cultivaram-se células endoteliais de veia umbilical humana (HUVes) em placas de 48 alvéolos, como descrito (anexo). Para se medir a aderência de linfócitos a culturas de HUVe em monocamadas, marcaram-se linfócitos com $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (50 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$), durante 2-4 horas, lavaram-se e, a seguir, incubaram-se 10^5 linfócitos com monocamadas de HUVe, na presença ou ausência de anticorpos inibidores ou de peptídeos derivados do CS-1. Deixou-se que os linfócitos aderissem durante 30 minutos, a 37°C . Subsequentemente, removeram-se as células, não aderentes, lavando com "PBS", e dissolveram-se as células aderentes em $20\text{S}/\text{NaOH}$. Contaram-se os com do ^{51}Cr ligado, com um contador gama. Em alguns experimentos, activaram-se as células endoteliais antes do teste de adesão, incubando com IL-1 β (1 ng/ml) ou FNT-3 (10 ng/ml) (Cell Systems, Seattle, WA), durante 6-24 horas em meio definido CS-100.

7.2. RESULTADOS

7.2.1. FENÓTIPO DE SUPERFÍCIE DE LINFÓCITOS DE

PACIENTES DE LAD E NORMAIS

Para determinar qual o mecanismo que os linfócitos utilizaram durante o extravasamento, determinamos primeiro o fenotipo de superfície de linfócitos LAD e normais, em relação aos receptores de integrina. Estes dados estão na Tabela VII e mostram claramente que as células LAD possuem um fenotipo de superfície de célula normal, em relação às integrinas que contém $\beta 1$. Uma vez que como esperado, as células B derivadas do paciente com LAD foram negativas quanto a $\beta 2$, isto sugere fortemente que

71 487

0624-076-113

-60-

os linfócitos LAD usam as integrinas que contêm β_1 durante a sua
acesso ao endotélio e passagem através deste.

Tabela VII

Análise de fluorescência da expressão do Receptor
da Integrina por Linfócitos Normais e LAD

<u>Intensidade de Fluorescência^a</u>					
<u>Receptor</u>	<u>Anticorpo</u>	<u>Jurkat (T)</u>	<u>Ramos (B)</u>	<u>SI-1</u>	<u>LAD</u>
B ₂	P4H9	+	+	++	-
B ₁	P4D10	+++	++	+	+
α ₂	P1H5	++	+	++	+
α ₃	P185	-	-	-	-
α ₄	P459	+++	++	++	++
α ₅	P105	+	+/-	+/-	+/-

^a Determinou-se a intensidade da fluorescência numa escala logarítmica de três décadas e expressou-se em unidades arbitrárias, com cada mais a indicar 50 unidades desde 0-255 (números de canal). Um mais/menos indica um desvio definido e reproduzível acima do ruído de fundo (<50 unidades).

71 489

5524-076-115

-62-

Tabela VIII

Acesso de Linfócitos T e B e Monocanadas
de HUV em Repouso e Activadas

Linha	de Celulas	Acesso (cpm) ^a	
		Basal	IL-18
LRD (B)		29360	94850
ST-1 (B)		11572	143260
Ramos (B)		1088	11168
Jurkat (T)		74196	332023
YT (T)		43396	189384

^a cpm = contagens por minuto. Os dados são de um experimento representativo único.

7.2.2. CAPACIDADE DOS LINFÓCITOS PARA ADERIREM A CÉLULAS ENDOTELIAIS EM REPOUSO E ACTIVADAS

Testaram-se linfócitos marcados com crômio, de diversas linhas de células, quanto à sua capacidade para aderirem quer a células endoteliais em repouso, quer a células endoteliais activadas (Tabela VII). Apesar de se ter determinado que todas as linhas de células testadas aderiram, mais ou menos, a endotélio em repouso, determinou-se que a adesão de linfócitos T e B a endotélio activado por IL-1 ou FNT, era muito maior, por um factor tão grande como 10 vezes mais. Não se determinou que a adesão de linfócitos de pacientes de LAD a endotélio fosse significativamente diferente da que se observou para linhas de células ST-1, derivadas de células B normais (ST-1). Não se determinou nenhuma diferença entre as linhas de células, entre a adesão a endotélio activado por IL-1 versus FNT.

7.2.3. EFEITOS DE ANTICORPOS ANTI-RECEPTOR NA ADERÊNCIA DE LINFÓCITOS A ENDOTÉLIO

Quando se testou a capacidade de linfócitos marcados com crômio para aderirem a endotélio, na presença de sobrenadantes de nidoridoma, determinou-se que apenas os anticorpos monoclonais orientados para o $\alpha 4\beta 1$ ou $\beta 1$ inibiam a adesão; determinou-se que os anticorpos monoclonais orientados para outros receptores, tais como o receptor protótipo da fibronectina e o receptor $\alpha 3\beta 1$, não tinham praticamente nenhum efeito inibidor (Tabela 8). Na presença de anticorpos monoclonais P4C2 (orientado para o $\alpha 4\beta 1$) e P4C10 (orientado para o $\beta 1$), a adesão de linfócitos marcados a endotélio foi completamente anulada. É interessante que a adesão de células LAD também seja inibida pelo anticorpo anti- $\alpha 4\beta 1$ (P4C2), o que indica que o receptor CD18 não está envolvido nas propriedades de aderência determinadas. Além disso, apesar de os $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ (Tabela VIII) e $\beta 2$ (não apresentado) serem expressos por linfócitos, anticorpos desses receptores não inibiram a adesão de linfócitos a HUVEs basais ou activados (veja-se a Tabela IX). Estes dados mostram que a expressão na superfície de um receptor de integrina e a ligação de um anticorpo inibidor a

este não conduz necessariamente à inibição da ligação de linfócitos a endotélio. Isto implica um papel específico para o $\alpha 4 \beta 1$, na mediação da adesão de linfócitos ao endotélio, como primeiro passo do extravasamento. Para além disso e uma vez que os anticorpos do $\alpha 4 \beta 1$ inibiram a adesão de linfócitos a células endoteliais, isto sugeriu que o ligando para o $\alpha 4 \beta 1$, a sequência EILDVPSI de amino-ácidos (veja-se a Tabela XII), também pudesse estar envolvido na diapedese de linfócitos, por intermédio da ligação do $\alpha 4 \beta 1$ a esta sequência, presente num ligando expresso na superfície do endotélio.

Tabela IX

Efeito de Anticorpos Monoclonais Inibitórios Sobre o
Acesso de Linfócitos a Monocamadas de HUVE (Ativadas
por IL-18)

Linna de Células	Anticorpo	Especificidade	Acesso (cpm)	
			Basal	+IL-18
LHO (B)	SP2	-	19542	104672
	P1D6	$\alpha_5\beta_1$	15633	113696
	P1B5	$\alpha_2\beta_1$	19064	90912
	P4C2	$\alpha_4\beta_1$	6468	38132
	P4C10	β_1	6360	52552
Ramos (B)	SP2	-	972	12157
	P1D6	$\alpha_5\beta_1$	808	11176
	P1B5	$\alpha_2\beta_1$	124	10028
	P4C2	$\alpha_4\beta_1$	456	3698
	P4C10	β_1	604	3152
Jurkat (T)	SP2	-	63924	372159
	P1D6	$\alpha_5\beta_1$	63936	417586
	P1B5	$\alpha_2\beta_1$	66580	489952
	P4C2	$\alpha_4\beta_1$	23108	136632
	P4C10	β_1	36892	230416

7.2.4. PAPEL DO CS-1 COMO LIGANDO DO $\alpha 5 \beta 1$. NA ADESAO DE LINFÓCITOS A ENDOTÉLIO

Avaliou-se a capacidade do CS-1 de síntese e de peptídeos derivados para inibirem a aderência de linfócitos marcados com crômio a células endoteliais activadas, utilizando diversos peptídeos. O peptído CS-1 de síntese foi um forte inibidor da adesão de linfócitos T ou B a monocamadas de células endoteliais passais ou activadas (Tabelas X e XI). É interessante que a sequência EILDVPST tenha sido também o peptído mínimo, necessário para inibir a adesão de linfócitos a HUVEs em repouso ou activadas (Tabelas X e XI). Em alguns casos, tal como com a linha de células Ramos B, a adesão dessas células a HUVEs pôde ser completamente anulada com o peptído EILDVPST. Em experimentos de controlo (Tabela XI), a sequência RGDG, que é o ligando para o receptor protótipo $\alpha 5 \beta 1$ da fibronectina, não inibiu a adesão de linfócitos a HUVEs em repouso ou activadas.

Tabela X

Efeito do CS-1 e de Peptídeos Derivados do CS-1
na Adesão de Linfócitos a MUVES

Linha de Células	Nº do Peptídeo	Sequência	Adesão (cpm)	
			Basal	+IL-1 β
LAD	293A	Não relatada	20856	74096
	344	CS-1	17300	25172
	350	VPST	ND ^a	42728
	352	EILDVPST	ND	29484
	354	GPEILDVPST	ND	27219
RANOS (B)	293A	Não relatada	4836	11132
	344	CS-1	1660	2528
	350	VPST	ND	4568
	352	EILDVPST	ND	2584
	354	GPEILDVPST	ND	2265
Jurkat (T)	293(A)	Não relatada	58084	129864
	344	CS-1	29568	75772
	350	VPST	ND	127544
	352	EILDVPST	ND	93056
	354	GPEILDVPST	ND	89721

^aND=ND determinada

71 489

0624-076-118



-68-

Efeito do CS-1 ou de Peptídeos Derivados do CS-1
ou de RGDS na Adesão de Linfócitos a HUVEs

Linna de Células	Nº do Peptído	Sequência	Adesão (cpm)	
			Basal	+IL-18
JUPKAT (I)	-	-	161092	314848
	-	RGDS	298688	337616
	344	CS-1	82404	248976
	350	VPST	203716	322208
	351	LDVPST	166948	326260
	352	EILDVPST	84456	234796
LAD (B)	-	-	44860	71408
	-	RGDS	70652	102076
	344	CS-1	22976	51560
	350	VPST	38176	98860
	351	LDVPST	35700	92792
	352	EILDVPST	29964	38784
RAMOS (B)	-	-	2724	12936
	-	RGDS	16920	28104
	344	CS-1	1844	5160
	350	VPST	4168	15320
	351	LDVPST	3532	13092
	352	EILDVPST	1696	4964

71 489

3624-076-118

-69-

Tabela XII

INIBIÇÃO DA ADESAO DE LINFÓCITOS A FIBRONECTINA
COM PEPTÍDOS DERIVADOS DE CS-1-B12

PEPTÍDO	SEQUÊNCIA	INIBIÇÃO
CS-1		+++
A13	DELPQVTLPHFN	-
B13	LHGPEILDVPST	+++
350	VPST	-
351	LDVPST	-
352	EILDVPST	+++
354	GFEILDVPST	+++

-70-

7.3. DISCUSSÃO

As determinações experimentais (veja-se a seção 6, supra), sugeriram firmemente que o sítio de ligação com elevada afinidade para linfócitos T, da fibronectina de plasma, se localizava na região CS-1 do domínio IIIIC3. A região CS-1 compõe-se de 26 amino-ácidos (Figura 9). Portanto, era importante determinar a sequência peptídica mínima responsável pela ligação do receptor $\alpha 4 \beta 1$ de linfócitos a fibronectina. A etapa inicial que seguimos, foi dividir o péptido CS-1 em dois péptidos mais pequenos, A13 e B12 (Figura 9) e examinar se algum desses péptidos podia competir com a fibronectina quanto à adesão ao receptor $\alpha 4 \beta 1$ e, portanto, inibir a adesão de linfócitos a fibronectina. Os dados indicam claramente que a actividade inibidora reside no péptido B12, derivado da porção terminal carboxi do CS-1. A etapa seguinte que seguimos, foi investigar a capacidade de péptidos cada vez mais longos, derivados da porção terminal carboxi da B12, para inibirem a adesão de linfócitos a superfícies revestidas com fibronectina e CS-1 (conjugado com RSA). Quanto à adesão de linfócitos a fibronectina de plasma e CS-1, estes dados mostram que a sequência mínima de amino-ácidos exigida para a ligação de $\alpha 4 \beta 1$ é EILQVPST.

Os leucócitos polimorfonucleados (neutrófilos) de pacientes com deficiência na adesão de leucócitos (LAD), têm um defeito na expressão da subunidade $\beta 2$ da integrina e, portanto, não podem utilizar os receptores que contenham $\beta 2$ (LFA-1, Mac-1 ou p 150/95) na sua adesão ao endotélio vascular. Portanto, os neutrófilos desses pacientes não saem da corrente sanguínea para passarem para tecidos periféricos. No entanto, os linfócitos LAD experimentam de facto diapedese para passarem através do endotélio e podem ser encontrados em tecidos derivados de pacientes com esse desarranjo. Portanto, isto implica que os linfócitos utilizam um mecanismo distinto do das integrinas que contêm $\beta 2$, durante a sua passagem da corrente sanguínea para os tecidos periféricos. A série de experimentos seguinte abrange as nossas tentativas para compreender completamente os mecanismos utilizados pelos linfócitos de sangue periférico durante a

disposições.

Os experimentos descritos acima revelaram claramente o importante papel desempenhado pelo receptor $\alpha 4 \beta 1$ na adesão de linfócitos a células endoteliais vasculares.

Através de análise de fluorescência, todas as linhas de células testadas mostraram expressar o $\alpha 4 \beta 1$ e/ou o $\alpha 5 \beta 1$, tendo-se determinado que aderiam a células endoteliais cultivadas, de veia umbilical humana. Determinou-se que essa adesão é bloqueada apenas por anticorpos monoclonais orientados para o $\alpha 4 \beta 1$; determinou-se que anticorpos orientados para outros receptores não têm praticamente nenhum efeito inibidor, revelando a importância do receptor $\alpha 4 \beta 1$ na interacção adesiva entre linfócitos e endotélio.

Além disso, determinou-se que o C6-1 de síntese e peptídeos derivados (Tabelas 9, 10 e 11) inibem a adesão de linfócitos a endotélio. Determinou-se que a sequência EILDVPST de amino-ácidos é particularmente importante para a interacção. Tem que enfatizar-se que não se determinou se o receptor $\alpha 4 \beta 1$ de linfócitos interacciona, de facto, com fibronectina, sobre a superfície da célula endotelial. Também é possível que o $\alpha 4 \beta 1$ reconheça o peptído EILDVPST, ou uma sequência similar, no contexto de uma outra proteína, que não a fibronectina.

8. DEPOSITO DAS LINHAS DE CELULAS

As linhas de células seguintes foram depositadas na ATCC, Rockville, MD, e foram-lhes atribuídos os números de acesso seguintes:

Linhas de Células	Número de Acesso
F402	HB-10215
F489	HB-10213
F3E3	HB-10212
F4C10	HB-10214

O presente invento não será limitado em âmbito pelos genes e proteínas exemplificados ou microrganismos depositados que não se pretendem mais do que simples ilustrações de um aspecto do

71 484

5624-076-118



-72-

invento. Na realidade, a partir da descrição precedente e das figuras anexas, tornar-se-ão evidentes, aos peritos na arte, diversas modificações do invento, além daquelas que se mostraram e descreveram aqui.

Preende-se que tais modificações estejam incluídas no âmbito das reivindicações apensas.

REIVINDICAÇÕES

15. - Processo de preparação de uma composição farmacêutica para a inibição da aderência de linfócitos às células endoteliais, caracterizado por compreender associar uma quantidade eficaz de um anticorpo, fragmento de anticorpo, ou seu derivado, que inibe a aderência de um receptor da matriz extracelular dos linfócitos às células endoteliais, com um veículo farmacologicamente aceitável.

25. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o anticorpo, fragmento ou derivado se ligarem ao receptor $\alpha 4 \beta 1$.

35. - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por o anticorpo ser um anticorpo monoclonal.

45. - Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o anticorpo ser o P4C2 produzido pelo hibrídoma depositado no ATCC e que possui o número de acesso HB-10213.

55. - Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o anticorpo ser o P4C10 produzido pelo híbridoma depositado no ATCC e que possui o número de acesso HB-10214.

65. - Processo de preparação de uma composição farmacêutica para a inibição da aderência de linfócitos às células endoteliais, caracterizado por compreender associar uma quantidade eficaz de um péptido que inibe a aderência de linfócitos às células endoteliais, com um veículo farmacologicamente aceitável.

75. - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por o péptido se ligar a $\alpha 4 \beta 1$.

85. - Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por o péptido compreender pelo menos uma porção da região IIIIG da fibronectina, ou um seu derivado.

95. - Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por o péptido compreender pelo menos uma porção da



71 489

5624-076-118

-74-

região CS-1 da fibronectina, ou um seu derivado.

10a. - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por o péptido compreender pelo menos uma porção da sequência EILDVPST, um seu derivado ou uma sequência substancialmente homóloga.

11a. - Processo de preparação de uma composição farmacêutica para a inibição da aderência de linfócitos às células endoteliais, caracterizado por se conjugar uma quantidade eficaz de um péptido ou de um anticorpo que inibe a aderência de linfócitos às células endoteliais com anticorpo ou outros ligandos que dirijam os anticorpos ou péptidos para tecidos específicos.

12a. - Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por o referido péptido ser conjugado com um anticorpo dirigido às células endoteliais.

13a. - Processo de preparação de uma composição farmacêutica para a inibição da aderência de linfócitos a células endoteliais, caracterizado por se associar um anticorpo anti-idiotipo que mimetiza os receptores da matriz extracelular $\alpha 4 \beta 1$ em linfócitos activados, numa quantidade eficaz para bloquear a adesão de linfócitos activados aos ligandos de células endoteliais reconhecidos pelo anticorpo anti-idiotipo com veículos farmacologicamente aceitáveis.

14a. - Processo de acordo com as reivindicações 6-12, caracterizado por a dosagem de ingrediente activo na composição farmacêutica ser tal que forneça uma concentração de cerca de $10^{-3}M$ a $10^{-8}M$ de péptido no local da inflamação.

15a. - Processo de acordo com as reivindicações 6-12, caracterizado por a dosagem de ingrediente activo numa composição destinada a administração tópica estar na gama de 1 μg -1 mg/ml.

16a. - Processo de acordo com as reivindicações 6-12, caracterizado por a dosagem de ingrediente activo na composição destinada a administração intravenosa, ser tal que forneça 0,7-70 mg/kg de peso corporal, quando o ingrediente activo é um péptido com um peso molecular de 1 000 a 10 000 Dalton.

17a. - Processo de acordo com as reivindicações 1-5 e 11-13, caracterizado por a dosagem de anticorpo, numa composição destinada a administração intravenosa, ser tal que forneça uma dose de 0,5 mg-50 mg/kg.

18a. - Processo de acordo com as reivindicações 1-5 e 11-13, caracterizado por a dosagem de anticorpo, numa composição destinada a administração tópica, ser tal que forneça uma dose de 1 µg-1 mg/ml.

19a. - Processo para a preparação de um anticorpo que se liga a uma molécula de adesão celular, o qual compreende os passos de pôr o anticorpo em contacto com células que apresentam a molécula de adesão celular e detectar qualquer reacção de ligação entre o anticorpo e as células, caracterizado por se fazer contactar o anticorpo com linfócitos que apresentam $\alpha 4\beta 1$ e seleccionar as linhas de células que produzem anticorpos que se ligam ao $\alpha 4\beta 1$ nos linfócitos.

Lisboa, 31. AGO. 1990

Por ELIZABETH WAYNER

- O AGENTE OFICIAL -



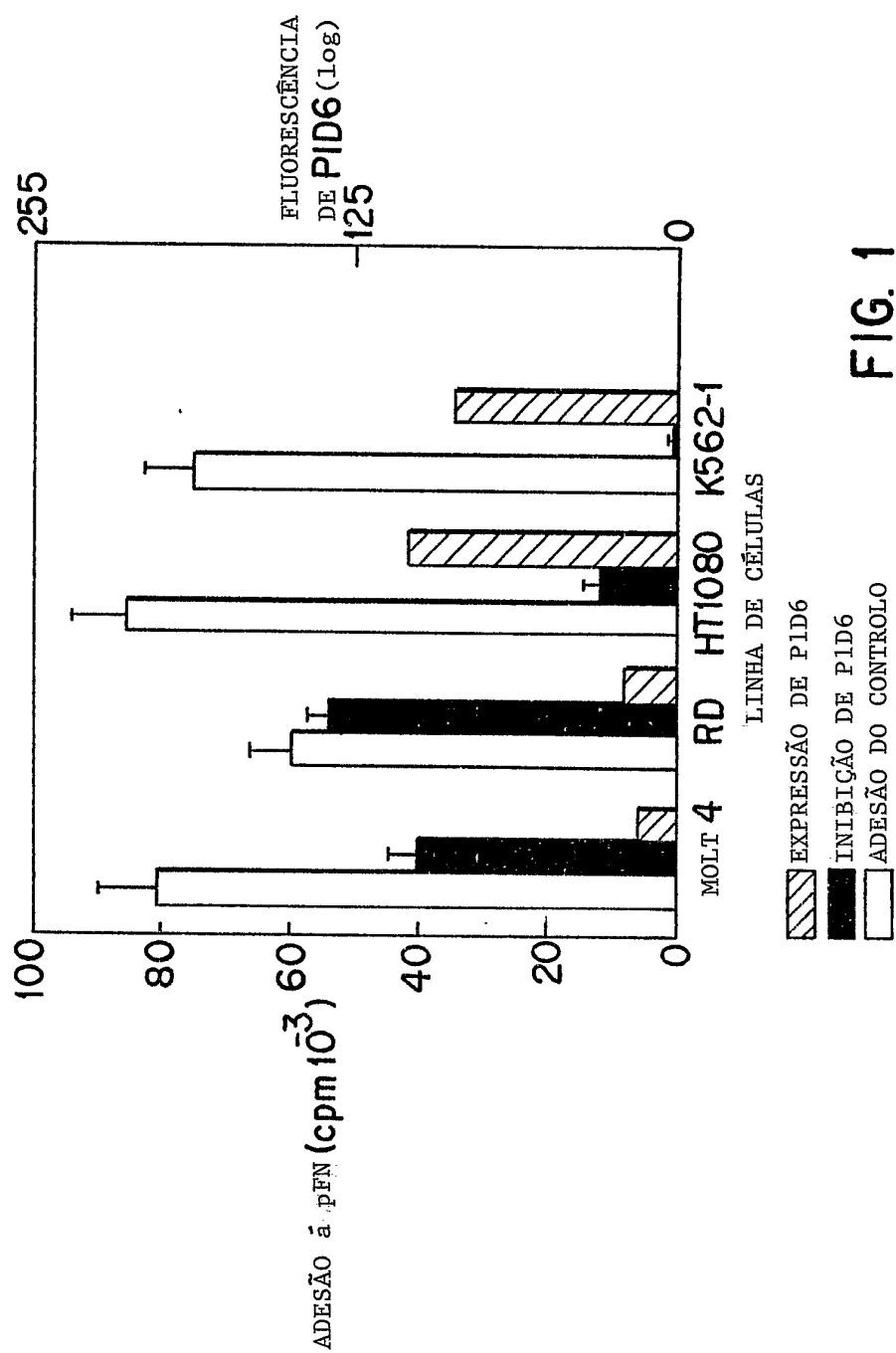
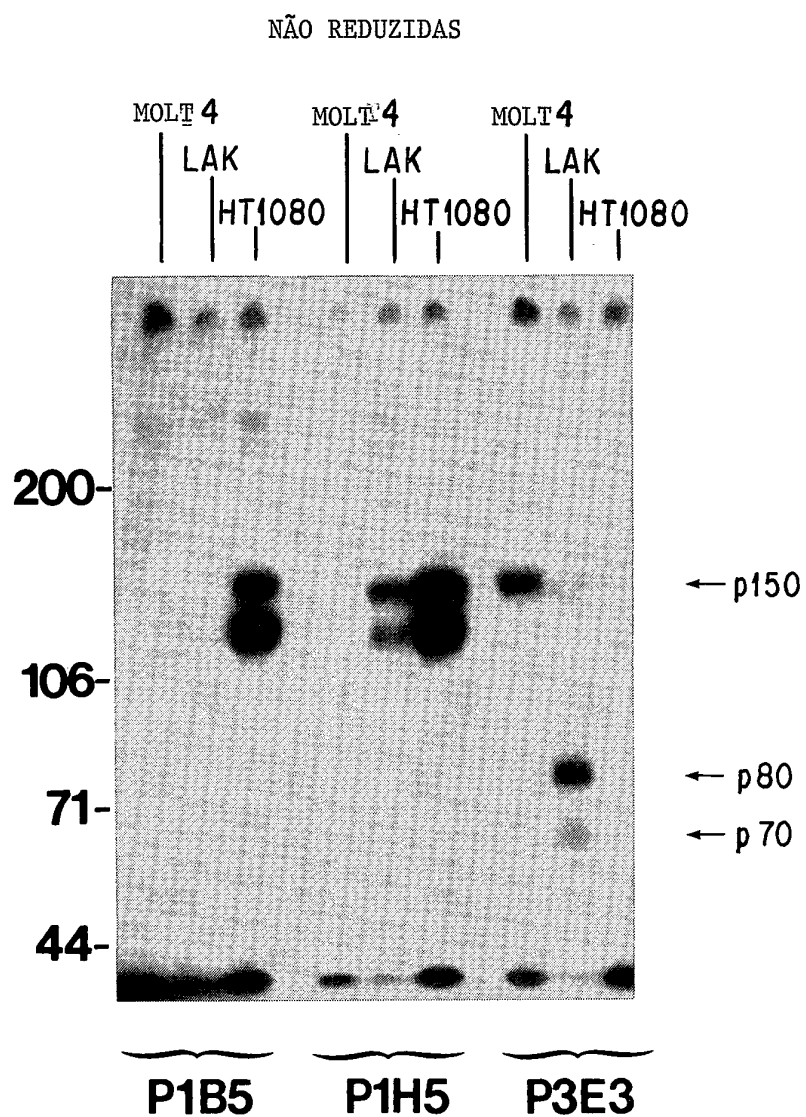


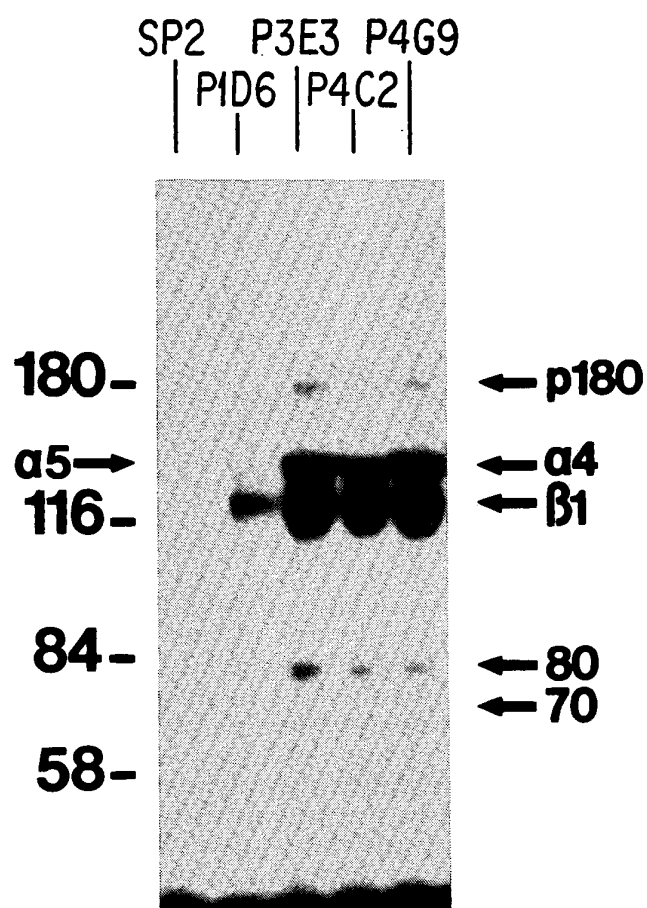
FIG. 1

FIG. 2



[Handwritten signature]

FIG. 3



[Handwritten signature]

FIG. 4A

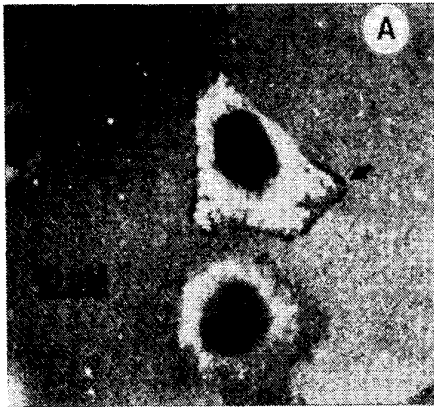


FIG. 4B

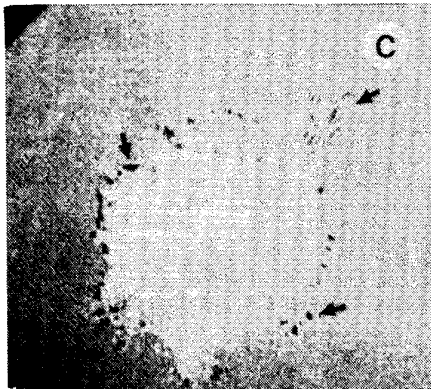
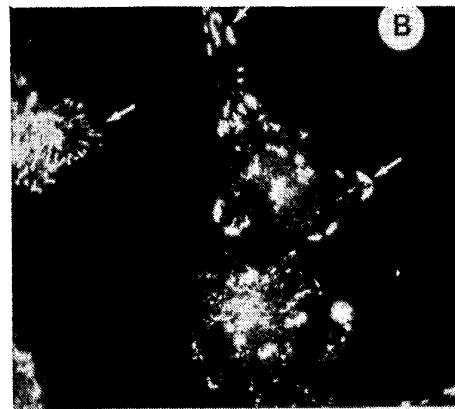


FIG. 4C

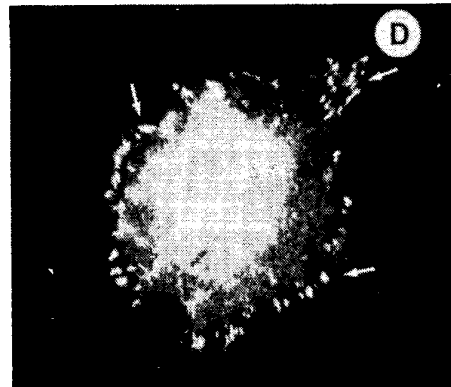
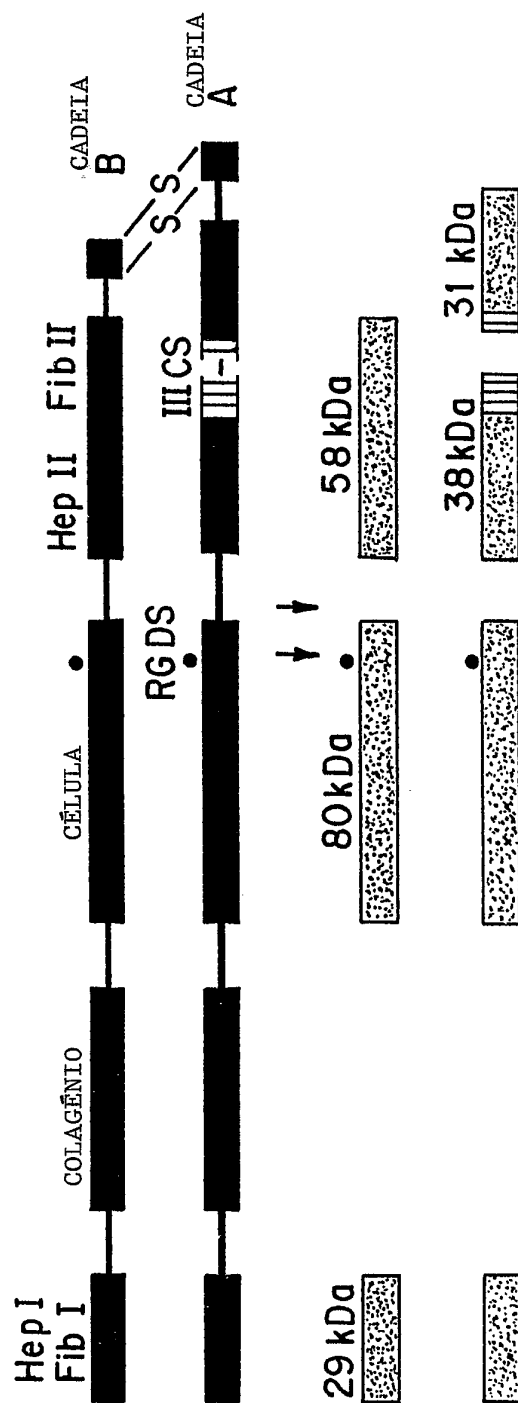


FIG. 4D



ESTRUTURA EM DOMÍNIOS DA FIBRONECTINA DE PLASMA

FIG. 5A

[Handwritten signature]

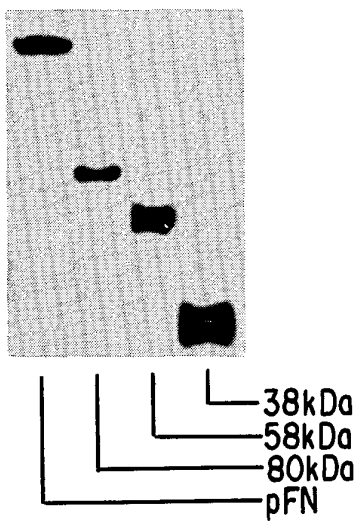


FIG. 5B

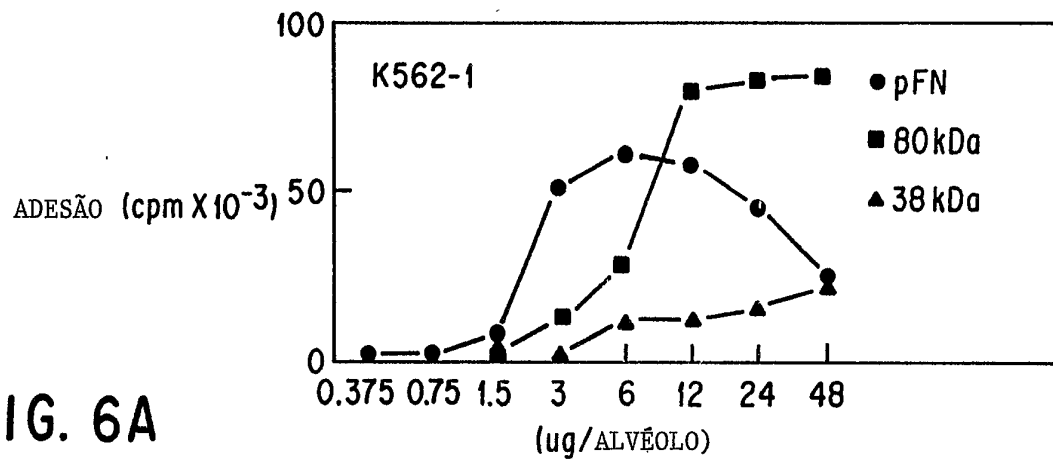


FIG. 6A

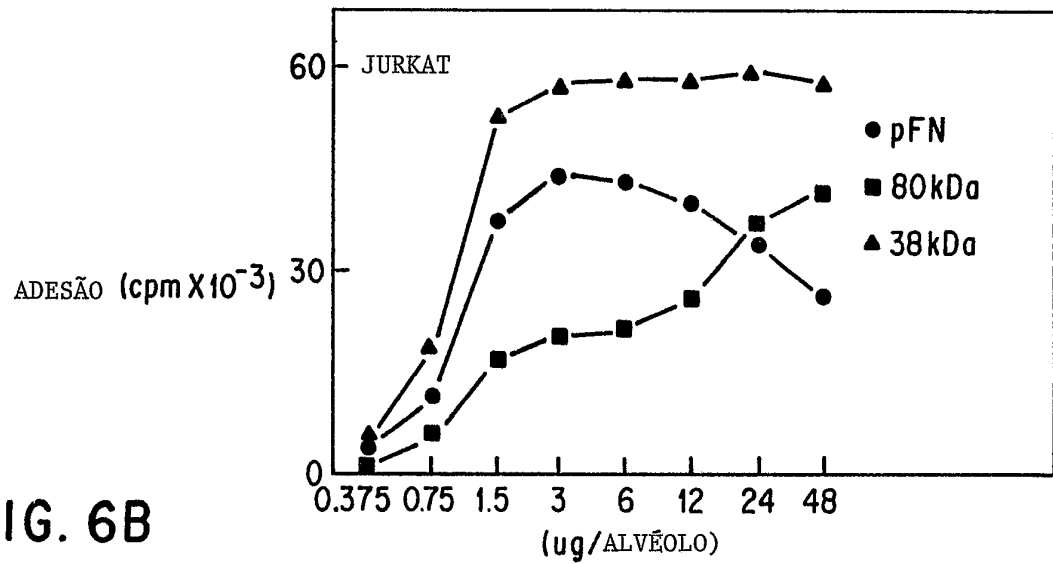


FIG. 6B

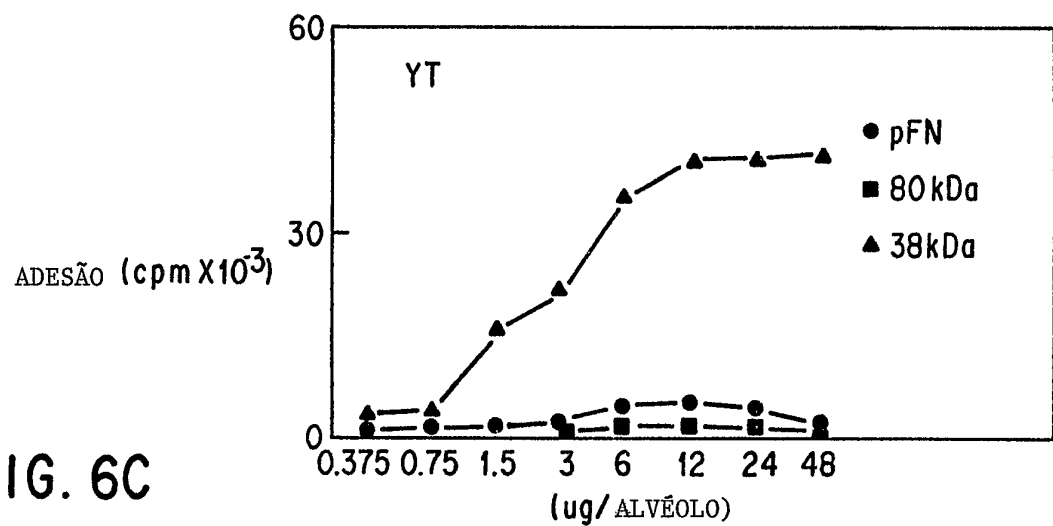
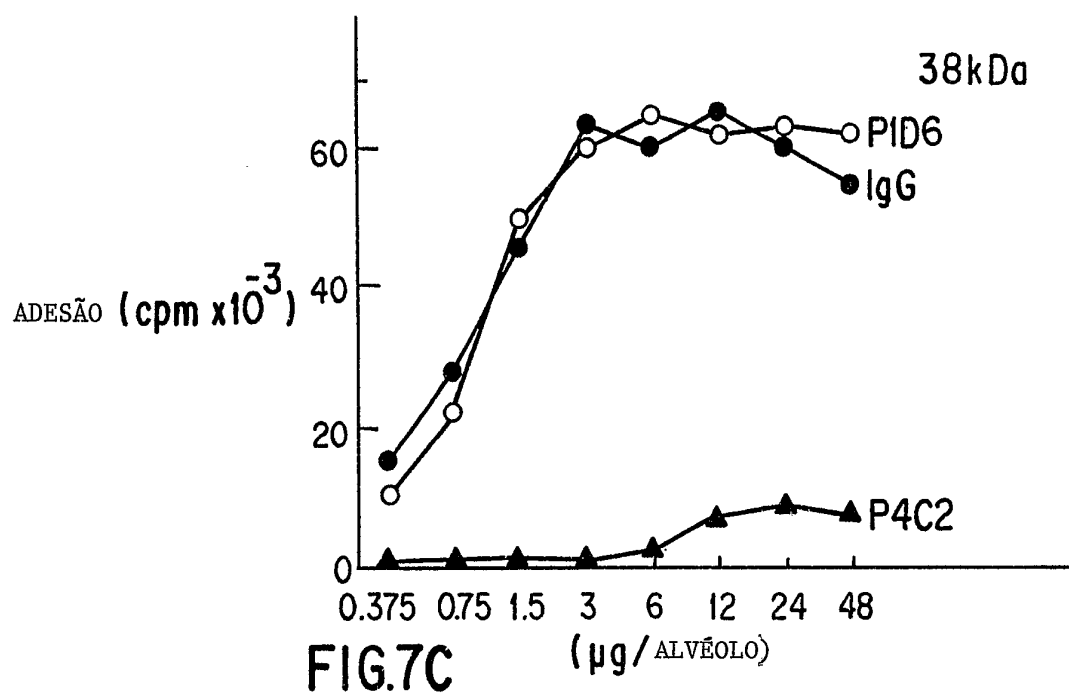
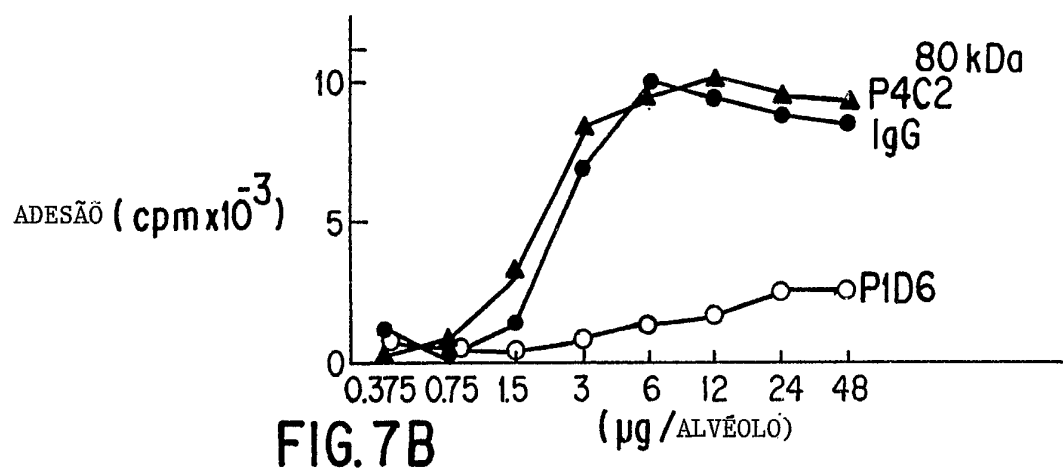
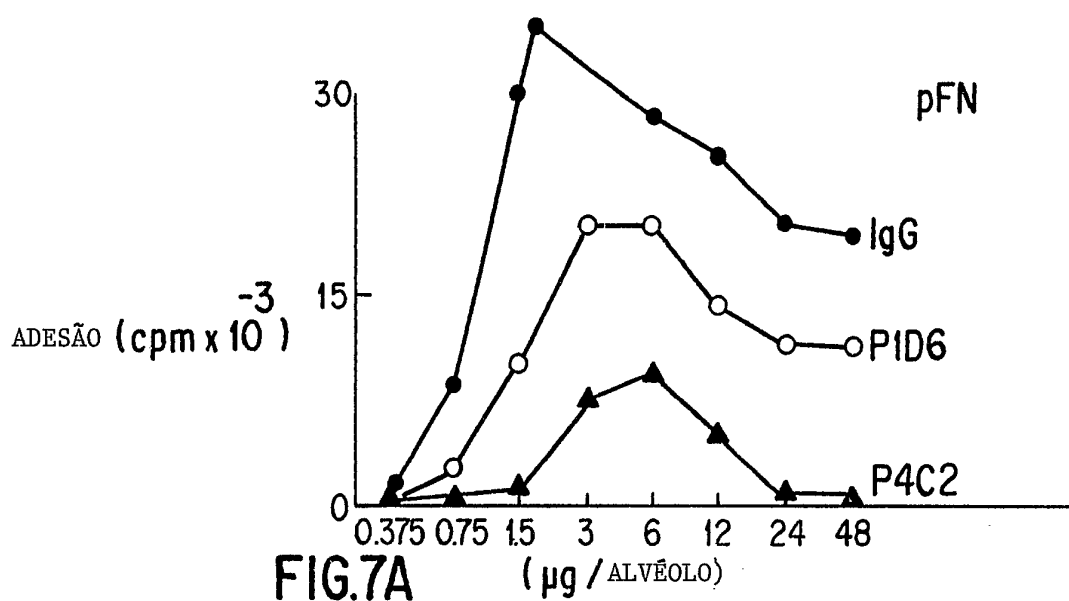


FIG. 6C



[Handwritten signature]

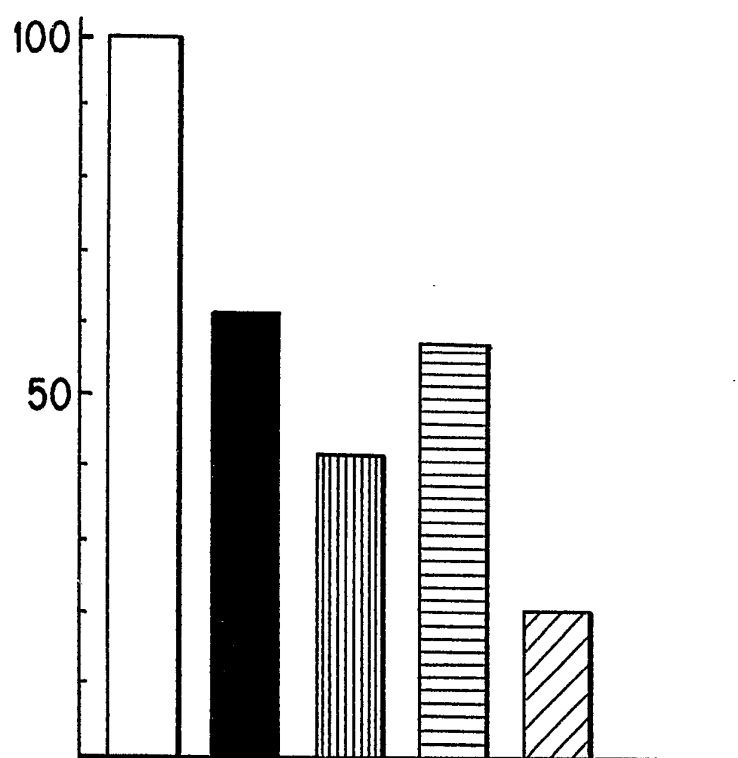


FIG. 8

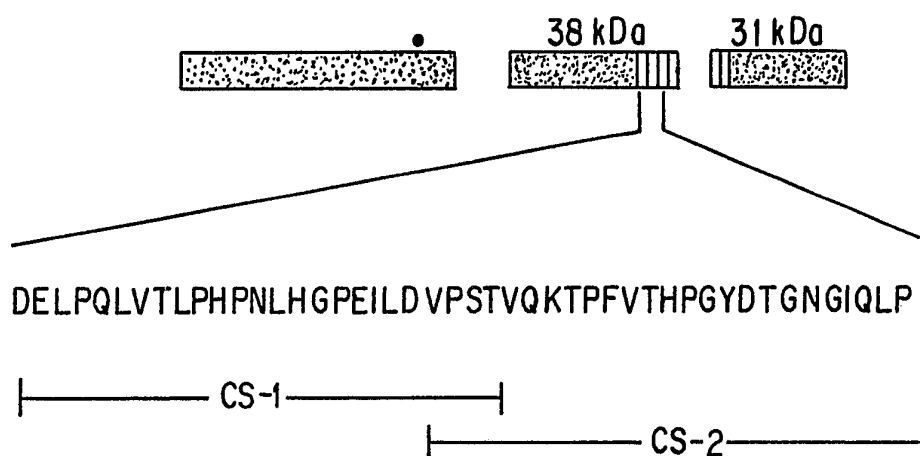


FIG. 9A

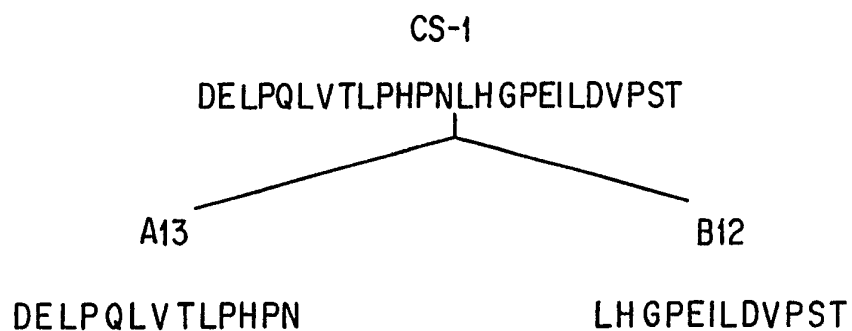


FIG. 9B