

(11) *Número de Publicação:* PT 92920 B

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

C07K014/95 A	C07K014/085 B
C12N015/12 B	C12P021/08 B
C12N005/10 B	A61K038/15 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) *Data de depósito:* 1990.01.22

(30) *Prioridade:* 1989.01.24 US 301192
1989.12.13 US 445951

(43) *Data de publicação do pedido:*
1990.07.31

(45) *Data e BPI da concessão:*
09/95 1995.09.21

(73) *Titular(es):*

MOLECULAR THERAPEUTICS, INC.
400 MORGAN LANE WEST HAVEN, CONNECTICUT
US

(72) *Inventor(es):*

ALAN MCCLELLAND US
JEFFREY GREVE US

(74) *Mandatário(s):*

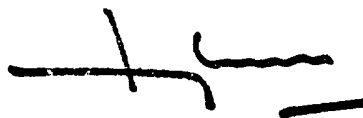
JORGE BARBOSA PEREIRA DA CRUZ
RUA DE VÍTOR CORDON 10-A 3/AND. 1200 LISBOA
PT

(54) *Epígrafe:* MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA MOLÉCULA SOLÚVEL RELACIONADA MAS DISTINTA DE ICAM-1

(57) *Resumo:*

[Fig.]

92.920



MEMORIA DESCRITIVA

Resumo

O presente invento está relacionado com o método para a produção de uma forma solúvel da molécula de adesão intercelular (sICAM-1) e sICAM-1 humana isolada e purificada. Este invento também está relacionado com o método para a obtenção de uma sequência de DNA isolada e

=====

MOLECULAR THERAPEUTICS INC.,

"METODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA MOLECULA SOLOVEL RELACIONADA
MAS DISTINTA DE ICAM-1"

purificada codificadora de sICAM-1. Os domínios extracelulares sICAM-1 e ICAM-1 insolúvel são substancialmente os mesmos. ICAM-1 está envolvida no processo pelo qual os linfócitos aderem a substratos celulares durante a inflamação e servem como principal receptor de rinovirus humano (HRR). sICAM-1 tem portanto a propriedade de reduzir a inflamação imune e inibir a infecção por rinovirus e virus Cocksackie A.

O método para a produção da referida molécula consiste em se recuperar a referida molécula através dos passos de remoção do sobrenadante das células não lisadas, introdução do sobrenadante numa matriz de afinidade contendo anticorpo imobilizado capaz de se ligar a sICAM-1, permissão que a referida sICAM-1 se ligue ao referido anticorpo, lavagem da referida matriz e recuperação da referida sICAM-1 numa forma substancialmente pura.

FUNDAMENTO DO INVENTO

O presente invento está relacionado com uma forma solúvel da molécula de adesão intercelular (sICAM-1) assim como com a sequência de DNA codificadora de sICAM-1. sICAM-1 e ICAM-1 são substancialmente semelhantes por partilharem os primeiros 442 aminoácidos NH₂-terminais do domínio extracelular. No entanto, sICAM-1 difere de ICAM-1 no extremo C e estas alterações conferem solubilidade a sICAM-1. Sabe-se que ICAM-1 medeia a adesão de muitos tipos celulares, incluindo células endoteliais, a linfócitos que expressam o antígeno-1 associado à função dos linfócitos (LFA-1). ICAM-1 tem a propriedade de se ligar directamente a LFA-1. Existe também evidência de que LFA-1 medeia adesão que não é via ICAM-1. Em adição, ICAM-1 tem capacidade para se ligar a LFA-1 e a rinovírus humano. Ele possui a propriedade de inibir a infecção dos vírus rinovírus e Coxsackie A. Ela pode ser usada para antagonizar a adesão de células mediada por ligação a ICAM-1 incluindo ligação ICAM-1/LFA-1 e torna-se assim útil no tratamento de inflamação, rejeição de enxertos, tumores que expressam LFA-1 e outros processos envolvendo a adesão de células. Com base na semelhança substancial dos domínios extracelulares de ICAM-1 e sICAM-1, sICAM-1 tem propriedades identificadas para ICAM-1.

O principal receptor de Rinovírus Humano (HRR) foi transfectado, identificado, purificado e reconstituído como descrito nos Pedidos de Patentes U.S. copendentes No.262570 e 262428 entregues em 25 de Outubro de 1988. Demonstrou-se que este receptor é idêntico a uma proteína da superfície celular previamente descrita, ICAM-1. O Pedido de Patente Europeia 0 289 949 descreve uma molécula de adesão celular associada a membranas (ICAM-1) que medeia a adesão de muitos tipos celulares incluindo células endoteliais a linfócitos que contêm LFA-1. Este pedido de patente

proporciona uma discussão da presente investigação no campo das moléculas de adesão intercelulares. É importante notar que os inventores procuraram especificamente um mRNA com "splicing" alternativo para ICAM-1 e não identificaram um. ICAM-1 foi originalmente identificado com base no seu papel na adesão de leucócitos a células T (Rothlein, R. et al., J. Immunol. 137:1270-1274(1986)) a qual se demonstrou ser mediado pela ligação heterotípica de ICAM-1 a LFA-1 (Marlin et al., Cell 51:813-819 (1987)). A estrutura primária de ICAM-1 revelou que ela é homóloga das moléculas de adesão celular. Neural Cell Adhesion Molecule (molécula de adesão de células neurais) (NCAM) e Myelin-Associated Glycoprotein (glicoproteína associada a mielina) (MAG) e levou à hipótese de ser um membro da família de supergenes das imunoglobulinas (Simmons et al., Nature 331:624-627(1988); Staunton et al., Cell 52: 925-933(1988)). A sequência de DNA dos clones de cDNA está descrita nos artigos atrás referenciados por Simmons et al., e Staunton et al., supra, a partir da qual pode ser deduzida a sequência de aminoácidos de ICAM-1. A molécula ICAM-1 tem uma região hidrofóbica típica que atravessa membranas contendo 24 aminoácidos e uma cauda citoplasmática curta contendo 28 aminoácidos. A ICAM-1 dos trabalhos anteriores é uma molécula insolúvel que é solubilizada a partir das membranas celulares por lise das células num detergente não iônico. A mistura de ICAM-1 solubilizada em detergente é então passada através do material da matrix de uma coluna e depois através de uma matrix de coluna consistindo em anticorpos monoclonais.

SUMARIO DO INVENTO

O presente invento proporciona uma espécie molecular de ICAM-1 endógena "spliced" de modo alternativo designada sICAM-1 que apresenta uma sequência de mRNA alternativa e que é solúvel sem a adição de um detergente.

O presente invento proporciona uma molécula de adesão intercelular, solúvel, humana (sICAM-1) ou um seu derivado funcional, essencialmente livre de contaminantes naturais. sICAM-1 pode ser obtido a partir de células HeLa, HE1 e suas células transfectantes primárias caracterizada por ser solúvel na ausência de detergentes não iônicos e por ser o produto de tradução definido por uma nova sequência de mRNA. Este produto natural de células humanas tem a vantagem de ser secretado a partir de células numa forma solúvel e por não ser imunogênico. O produto solúvel natural difere do produto insolúvel natural por o produto solúvel possuir uma nova sequência de 11 resíduos de aminoácidos no extremo C e não possuir os domínios que atravessam a membrana e citoplásmico presente na forma insolúvel.

O presente invento proporciona uma sequência de DNA isolada e purificada codificadora de sICAM-1 assim como uma célula hospedeira codificadora da referida sequência.

O presente invento proporciona um método de recuperação da molécula de adesão intercelular solúvel na forma substancialmente pura compreendendo os passos de:

- (a) remoção do sobrenadante de células não lisadas
- (b) introdução do sobrenadante numa matrix de

afinidade contendo anticorpo imobilizado capaz de se ligar a sICAM-1,

(c) ligação do referido sICAM-1 ao referido anticorpo da referida matrix,

(d) lavagem da referida matrix para remover os contaminantes não ligados e

(e) recuperação da referida sICAM-1 numa forma substancialmente pura por eluição da referida sICAM-1 a partir da referida matrix.

Posterior purificação poderá ser feita utilizando uma coluna de lectina de aglutinina de gérmen de trigo antes ou depois do passo da matrix de anticorpo. Outros passos de purificação poderão incluir cromatografia de fracionamento por tamanho, cromatografia iônica e electroforese em gel. Pode ser ainda usada purificação por sedimentação através de gradientes de sacarose. O anticorpo capaz de se ligar a sICAM-1 poderá incluir anticorpos contra ICAM-1 ou HRR.

O presente invento inclui anticorpos policlonais contra sICAM-1.

O presente invento inclui ainda um anticorpo específico para sICAM-1, capaz de se ligar à molécula de sICAM-1 e que não é capaz de se ligar a ICAM-1. Para um método para a produção de um anti-soro contra peptídeos ver Green et al., Cell 28: 477-487 (1982).

O invento também inclui uma linha celular de hibridoma capaz de produzir tal anticorpo.

Este invento ainda inclui o uso terapêutico de anticorpos especificamente dirigidos contra sICAM-1, para aumentar a adesão de células mediada por ICAM-1 e LFA-1.

O invento ainda inclui um método para a produção de um anticorpo que é capaz de se ligar a sICAM-1 e não a ICAM-1 caracterizado-se pelos passos de

(a) preparação de um conjugado peptideo-proteína, o referido conjugado peptideo-proteína específico para pelo menos uma porção da sequência única de 11 aminoácidos presente em sICAM-1,

(b) imunização de um animal com o referido conjugado peptideo-proteína,

(c) administração de injeções de reforço e

(d) obtenção de anti-soros.

Os anticorpos seriam capazes de se ligarem a sICAM-1 e incapazes de se ligarem a ICAM-1. O invento inclui a linha celular de hibridoma que produz um anticorpo da mesma especificidade, o anticorpo produzido pela linha celular de hibridoma e o método de produção.

O invento ainda inclui um método de inibição da interação do antigénio associado à função de linfócitos (LFA-1) e da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) compreendendo o passo de contacto das células contendo LFA-1 com sICAM-1 ou um seu derivado funcional. Este método de inibição da adesão de ICAM-1 tem aplicação em estados de doença tais como inflamação, rejeição de enxertos e para células tumorais expressando LFA-1.

Este invento ainda inclui um método de diagnóstico da presença e localização de uma célula tumoral que expresse LFA-1.

Este invento ainda inclui um método para reduzir substancialmente a infecção de rinovírus humanos do principal grupo de receptores compreendendo o passo do contacto do vírus com sICAM-1 ou um seu derivado funcional.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra a sequência de nucleotídeos e de aminoácidos de sICAM-1.

A Figura 2 é uma comparação das regiões C-terminais de sICAM-1 e ICAM-1. As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos de ICAM-1 e sICAM-1 estão apresentadas começando no residuo de aminoácido 435. Os traços na sequência de sICAM-1 indicou nucleotídeos que faltam. As posições dos codões de paragem em ambas as proteínas estão indicadas por um asterisco.

A Figura 3 é uma comparação da estrutura de sICAM-1 e ICAM-1. A região de ICAM-1 que atravessa a membrana está indicada pelo rectangulo a ponteados e o domínio citoplasmático pelo rectangulo a tracejado. O novo extremo C de sICAM-1 está indicado pelo rectangulo a cheio. Os cinco domínios previstos tendo homologia com imunoglobulina estão numerados I a V.

A Figura 4 mostra o gene ICAM-1 e a sua expressão em transfectantes HRR. A: transferência Southern de DNA de HeLa (Faixa 1), LTK (Faixa 2) e HE1 (Faixa 3)

cortado com EcoRI e despistado com o oligonucleotídeo ICAM-1; B: transferência Northern de RNA poli A+ de HeLa (Faixa 1), LKT⁻ (Faixa 2) e HE1 (Faixa 3) despistado com o oligonucleotídeo ICAM-1; C: amplificação PCR de cDNA preparado a partir de RNA poli A+ de HeLa (Faixa 1), LKT⁻ (Faixa 2) e HE1 (Faixa 3). Os iniciadores usados foram das regiões codificadoras N-terminal e C-terminal de ICAM-1 tendo a sequência ggaattcATGGCTCCCAGCAGCCCCGGCCC e ggaattcTCAGGGAGGCGTGGCTTGTGTGTT. No primeiro caso temos sequência de ICAM-1, no segundo caso adaptadores em sítios de restrição. Faixa 1 e 2, 72 h de exposição, Faixa 3, 90 minutos de exposição.

A Figura 5 é um gel mostrando a detecção dos mRNAs de ICAM-1 e de sICAM-1 em células HeLa e HE1. A amplificação de PCR foi efectuada em 100 ng de cDNA de cadeia simples usando os iniciadores PCR 5-4. (CTTGAGGGC ACCTACCTCTGTCTGG) e PCR 3.4 (AGTGATGATGACAATCTCATACCG). As extensões foram efectuadas a 72⁰C durante 25 ciclos e um décimo do produto foi analisado num gel de 1% de agarose/3% gel NuSieve. Faixa 1, cDNA de HeLa; faixa 2, cDNA de HE1; faixa 3, cDNA de LTK⁻; faixa 4, testemunha fago com ICAM-1; faixa 5, testemunha fago com sICAM-1; faixa 6, testemunha fagos com ICAM-1 + sICAM-1. Os produtos de amplificação específicos de 105 pb e 86pb estão indicados pelas setas.

A Figura 6 é uma transferência Western mostrando a síntese de uma forma solúvel da proteína ICAM-1 por células HeLa e HE1. Este demonstra a existência de uma proteína no sobrenadante de cultura de células HeLa e HE1 relacionada com ICAM-1. Amostras equivalentes de lisados celulares e sobrenadantes de cultura foram separadas por SDS-PAGE; transferidas para nitrocelulos e despistadas com um anti-soro policlonal de coelho contra ICAM-1 seguido de proteína A marcada com ¹²⁵I; nos sobrenadantes de cultura de HeLa e HE1 observa-se uma espécie proteica



que migra perto da posição de ICAM-1 ligada a membranas.

A Figura 7 é uma representação gráfica dos plasmídeos de sICAM-1 e ICAM-1 clonados.

7A. pHRR3 é um cDNA de tamanho completo codificador de sICAM-1 obtido por PCR. Os clones 19.1-3 e 4.5 são clones de cDNA parciais codificadores de sICAM-1 obtido a partir de uma biblioteca de cDNA de HE1 em lambda GT11. Por baixo dos clones está um esquema da molécula de sICAM-1. S indica o peptídeo sinal e I a V os domínios homólogos de IgG. Os rectângulos a cheio indicam o extremo C único de 11 aminoácidos.

7B. pHRR1 e pHRR2 são clones de cDNA de ICAM-1 com tamanho completo obtidos por PCR. Os restantes clones de ICAM-1 foram obtidos a partir de uma biblioteca de cDNA de HE1 em lambda GT11. Por baixo dos clones está um esquema da molécula de ICAM-1, mostrando o peptídeo sinal (S), os cinco domínios homólogos de IgG (I a V), a região transmembranar (TM) e o domínio citoplasmático (C).

DESCRIÇÃO DAS REALIZAÇÕES REFERIDAS

Um aspecto do presente invento relaciona-se com a descoberta de um ligando natural solúvel para o sítio de ligação ao receptor de Rinovírus Humano (HRV) e que também se liga LFA-1. Esta molécula natural solúvel está relacionada, sendo no entanto distinta, com a molécula designada "Molécula de Adesão Intercelular-1" ou "ICAM-1" que é insolúvel, ligada à membrana celular e possui uma região hidrofóbica típica que atravessa a membrana e uma cauda citoplasmática curta. A nova proteína do presente invento tem uma se-



quência de DNA que inclui uma diferença significativa da sequência de DNA publicada para ICA-1, sICAM-1 contem a maior parte do domínio extracelular de ICAM-1, que inclui os domínios funcionais para funções múltiplas incluindo ligação a HRV e LFA-1, mas não possui o domínio que atravessa a membrana e o domínio citoplásmico. sICAM-1 retém a capacidade de ligação a HRV e LFA-1 e é secretada numa forma solúvel. A sequência de DNA para sICAM-1 contem uma deleção de 19 pares de bases do nucleotídeo 1465 a 1483 de acordo com a numeração de Staunton et al, supra (1988). O restante do clone sICAM-1 está de acordo com a sequência de ICAM-1 com excepção de uma substituição de um G por A na posição de nucleotídeo 1462 que muda Glu 442 para Lis, como se mostra na Figura 1. A sequência de resíduos de aminoácidos num peptídeo é designada de acordo com a nomenclatura convencional como seja a do Lehninger's Biochemistry, Worth Publishers, New York, NY(1970). sICAM-1 é um produto natural de células HeLa e HE1 e de outras células humanas que tenham a propriedade de ligação nos vírus, rinovírus humano e Cocksackie A e inibição da infecção. Também possui a propriedade de ligação a LFA-1 e pode ser usada para antagonizar a adesão das células mediada pela ligação ICAM-1/LFA-1 e portanto ser útil como agente terapêutico no tratamento de inflamação, rejeição de enxertos, supressão de células tumorais que expressem LFA-1 e outros processos envolvendo adesão celular. A proteína sICAM-1 isolada e purificada como agente terapêutico não possuiria os problemas imunogénicos associados, às proteínas estranhas. A secreção de uma proteína natural solúvel elimina os problemas associados à produção e purificação de uma proteína insolúvel ligada à membrana celular, uma vez que não é necessária a lise celular e portanto pode ser empregue cultura contínua assim como processos simplificados para a purificação e isolamento de sICAM-1.

As linhas de células de mamíferos não humanos que expressam o gene do principal receptor do rinovírus humano foram anteriormente identificadas e são tema do Pedido de Patente copendente U.S. No. 262570 e 262428 entregues em 25 de Outubro de 1988 e incluem referências aos depósitos ATCC das linhas celulares. O principal receptor de rinovírus humano foi identificado com anticorpos monoclonais que inibem a infecção por rinovírus. Estes anticorpos monoclonais reconhecem uma glicoproteína da superfície celular de 95Kd em células humanas e nos transfectantes de ratinho expressando um fenótipo de ligação a rinovírus. A proteína de 95 Kd purificada liga-se ao rinovírus in vitro. A sequência proteica da proteína de 95 Kd mostrou uma identidade com a de ICAM-1; um clone de cDNA obtido a partir de transfectantes de ratinho expressando o receptor de rinovírus tinha a mesma sequência publicada para ICAM-1, excepto no que respeita à alteração de G para A previamente descrita. Assim foi determinado que o principal receptor de rinovírus humano e ICAM-1 eram a mesma proteína. Foi isolada uma linha de células L de ratinho transfectadas designada HE1 que continha e expressava o gene HRR ou o gene ICAM-1. A terminologia ICAM-1 foi usada se bem que seja agora reconhecido que HRR e ICAM-1 são permutáveis.

Preparou-se uma biblioteca de cDNA iniciada ao acaso de RNA poli A+ de HE1 em lambda GT11. A biblioteca foi despistada em duplicado usando dois nucleotídeos derivados da sequência publicada de ICAM-1. O oligonucleotídeo ICAM-1 tem a sequência GAGGTGTTCTCAAACAGCTCCAGCCCTTGGGGCCGCAGGTCCAGTTC e o oligonucleotídeo ICAM-3 tem a sequência CGTTGGCAGGACAAAGGTCTGGAGCTGGTAGGGGGCCGAGGTGTTCT.

Obtiveram-se oito clones positivos com um despiste e três foram seleccionados para posteriores estudos. A sequenciação de DNA de dois dos clones mostrou identidade com a sequência publicada de ICAM-1. A sequência



do terceiro clone, lambda 19.1-3 era significativamente diferente dos outros dois clones por haver uma deleção de 19 pb do nucleotídeo 1465 a 1483 de acordo com a numeração de Staunton et al., supra. A deleção de 19 pb estava presente num segundo cDNA, lambda HE1-4.5 e foi independentemente confirmado usando cDNA gerado por reação de cadeias com polimerase (PCR). A análise da sequência de DNA previu a existência de uma forma secretada de ICAM-1 que é gerada por um mecanismo de "splicing" alternativo. A identificação de sICAM-1 em transferências Western de sobrenadantes de cultura das linhas celulares HE1 e HeLa confirma que a sequência de mRNA de sICAM-1 codifica uma forma solúvel de ICAM-1 que não se associa com a superfície celular mas antes é libertado para o meio de cultura. Um mRNA "spliced" de modo alternativo gerador de uma forma secretada de uma outra molécula de adesão (NCAM) foi identificado (Glower et al., Cell 55:955-964 (1988), no entanto em NCAM foi incorporado um exão no mRNA enquanto que no presente invento foi eliminado um exão do mRNA. Nenhuma sequência de mRNA alternativa para ICAM-1 foi anteriormente identificada (Staunton et al.).

Clones de cDNA de sICAM-1

Uma biblioteca de cDNA iniciado ao acaso foi construída em lambda GT11 a partir de poliA+ de HE1 pelo Clontech Laboratories, Palo Alto, CA. A biblioteca foi despistada com duas sondas oligonucleotídicas de 47 meros derivadas do meio da sequência codificadora de ICAM-1. Isolou-se um clone positivo designado 19.1-3 que tinha uma inserção de 1,5Kb, isolou-se um segundo clone de cDNA designado 4.5 que possui uma inserção de 1,25 Kb; e obteve-se mais um clone de cDNA pH RR-3 por subclonagem dos produtos de amplificação por PCR, em Bluescript utilizando o Sistema de Amplificação de DNA Perkin Elmer/Cetus, Perkin

Elmer, Wellesley MA., como se mostra na figura 4C, faixa 3. Estes clones apresentaram uma diferença significativa relativamente à sequência ICAM-1 publicada. Todos eles possuem uma deleção de 19 pares de bases desde o nucleotídeo 1465 até 1485 de acordo com a numeração de Staunton *et al*, *supra*. Para demonstrar directamente que o mRNA de sICAM está presente em células HE1 e células HeLa, efectuou-se uma experiência PCR usando iniciadores que ~~læ~~iam a região de 19 pb ausente no mRNA de sICAM (Figura 8). Usando estes iniciadores o produto do mRNA de sICAM-é 105 pb enquanto o produto sICAM-1 tem menos 19 pb i.e. 86 pb. Esta experiência mostra que as células HE1 e as células HeLa contêm ambas as formas de mRNA de ICAM-1 enquanto as células L testemunhas não contêm. Um oligonucleotídeo sintético designado PCR3.2 tendo a seguinte sequência:

ggaattcTCACTCATACCGGGGGGAGAGCACATT

foi usado para distinguir os clones de cDNA contendo a deleção de 19 pb de entre os clones não contendo a deleção de 19 pb. O oligonucleotídeo sintético não se liga a clones de cDNA que contêm a deleção de 19 pb. Em adição, a sequência parcial do cDNA 19.1-3 e PHRR-3 confirmaram a deleção de 19 pb. Estes resultados indicam que existe pelo menos duas espécies diferentes e distintas de ICAM-1 nas células HE1, a ICAM-1 insolúvel de trabalhos anteriores e a nova forma solúvel como descrito no presente invento.

As sequências das formas com deleção (sICAM-1) e sem deleção (ICAM-1) do mRNA da Molécula de Adesão Intercelular-1 representados pelos clones de cDNA estão apresentadas na Figura 2. A sequência no ponto de deleção é AGGT consistente com uma junção de "splicing" de RNA. A remoção de 19 bases do mRNA desloca a grelha de leitura e faz com que as sequências dos dois polipeptídeos diverjam no resíduo de aminoácido 443. A forma com deleção (sICAM-1) contém mais 11 resíduos de aminoácidos seguido de um códon de terminação na mesma grelha de leitura. Esta molé-



cula consiste assim em 453 aminoácidos comparado com os 505 aminoácidos da forma sem deleção. Começando com o extremo N de ICAM-1, sICAM-1 tem 442 aminoácidos em comum com ICAM-1. A forma com deleção (sICAM-1) contém um extremo C único de 11 aminoácidos mas não possui o domínio que atravessa a membrana (24 aminoácidos) e o domínio da cauda citoplasmática (28 aminoácidos) de ICAM-1, como se mostra na Figura 3.

Clones de cDNA de ICAM-1

Para clonar genes pode-se usar uma pluralidade de métodos. Um método consiste em usar duas sondas oligonucleotídicas de 47 meros parcialmente sobreponíveis. Estas duas sondas designadas oligonucleotídeo ICAM-1 e oligonucleotídeo ICAM-3 foram sintetizadas a partir da sequência publicada para ICAM-1. O oligonucleotídeo ICAM-1 foi marcado com actividade altamente específica e hibridado com uma transferência Southern em condições muito estritas. Como se mostra na figura 4A, detectou-se uma única banda de 4,4 Kb em HeLa, HE1 e duas linhas celulares transfectantes primários HRR contendo o gene humano ICAM-1. O tamanho do fragmento está de acordo com Simmons *et al.*, mas difere de Staunton *et al.*, provavelmente reflectindo um polimorfismo de sítios de restrição.

O oligonucleotídeo ICAM-1 foi usado no despiste de uma transferência Northern de RNA poli A+ das mesmas linhas celulares. Como se mostra na figura 4B, um mRNA de 3,3 Kb foi detectado em HeLa, HE1 e linhas celulares transfectantes primários mas não em células LTK⁻. O sinal nas células HE1 era muitas vezes mais forte do que nas outras linhas celulares indicando um nível muito mais elevado de mRNA em células HE1. Isto está de acordo com o nível elevado da expressão de HRR (ICAM-1) em células



HE1. Um segundo RNA de 2,4Kb foi também detectado em células HE1. Estes resultados confirmam que o mRNA de ICAM-1 humano é expresso em transfectantes HRR. Ver Figura 4B.

O gene ICAM-1 humano foi isolado a partir de transfectante HE1 usando amplificação por reacção de cadeias com polimerase (PCR) utilizando o Sistema de Amplificação de DNA, Perkin-Elmer/Seals, Perkin Elmer, Wellesley MA. A amplificação por PCR foi efectuada em cDNA de cadeia simples feito a partir de RNA de HeLa, Ltk⁻ e HE1. Os iniciadores foram feitos a partir das regiões codificadoras 5' e 3' da sequência ICAM-1 publicada. Os produtos específicos da amplificação de ICAM-1 foram detectados por hibridação de uma transferência Southern das reacções PCR usando o oligonucleotídeo ICAM-1. Como se mostra na figura 4C, uma única banda de aproximadamente 1600 pb que condiz com o tamanho previsto foi amplificado a partir de células HeLa e de células HE1 mas estava ausente nas células LTK⁻. O produto de amplificação foi clonado em Bluescript (Stratagene, San Diego, CA) e obtiveram-se dois clones independentes designados PHRR1 e PHRR2. A sequência completa de PHRR2 mostrou 100% de identidade com a sequência codificadora de ICAM-1 com excepção de uma única alteração de G para A previamente descrita.

Uma biblioteca em lambda GT11 feita a partir de cDNA de HE1 iniciado ao acaso foi despistada com as sondas ICAM-1 e ICAM-3 e isolaram-se oito clones positivos. Como se mostra na figura 7 seleccionaram-se seis clones ao acaso para estudos posteriores e foram analisados por sequenciação parcial do DNA. Um total de aproximadamente 1000 nucleotídeos da sequência derivada destes clones apresentou identidade de com a sequência de ICAM-1.



Purificação e isolamento de proteína solúvel

As células HeLa e HEI foram cultivadas em condições convencionais em DMEM (Meio Essencial Modificação de Dulbecco) com 10% de Soro Fetal Bovino. O meio condicionado destas células foi colhido e centrifugado ou filtrado para remover células ou detritos celulares. A ICAM-1 ligada a membranas não está presente no sobrenadante. Este meio foi então adsorvido a uma resina de anticorpo monoclonal-sefarose (sendo um exemplo o anticorpo monoclonal (78.4A) em que o anticorpo monoclonal é dirigido contra ICAM-1 ou sICAM-1 e as proteínas não adsorvidas são removidas da resina por lavagem com um tampão fisiológico salino, como seja tampão de fosfatos salino. A sICAM-1 ligada foi então eluída em condições que prescrevam a conformação nativa da proteína, como descrito no pedido copendente No. de Série 262428 entregue em 25 de Outubro de 1988. A sICAM-1 pode ser ainda purificada por cromatografia de afinidade com lectinas, cromatografia de permuta iônica ou filtração em gel.

O mRNA transcrito in vitro a partir de cDNA codificador de sICAM no vector Bluescript (Stratagene) foi traduzido in vitro. Na ausência de membranas microssomais obteve-se uma proteína não glicosilada com um PM aparente de 52 000 daltons; na presença de membranas microssomais obteve-se uma espécie glicosilada de 72 000 daltons que estava sequestrada dentro da membrana microssomal indicando que o polipeptídeo sICAM é correctamente translocado, processado e glicosilado pelas membranas microssomais.

cDNA codificador de tmICAM e sICAM no vector CDM8 (Ver, B. e Aruffo, A. PNAS 84:3365(1987)) foi transfectado para células COS e células L de ratinho usando a técnica de DEAE-dextran. As 72 h as células foram anali-

sadas por dois métodos: (1) análise FACS com um Mab anti-ICAM (C78.4) para a expressão em membranas celulares de espécies de ICAM e (2) marcação metabólica seguido de imuno-adsorção com Mab anti-ICAM de sobrenadantes celulares e lisados celulares. Os resultados da marcação metabólica indicaram acumulação intracelular de uma espécie de 68 000 daltons nas células transfectadas com sICAM mas não secreção detectável de sICAM no sobrenadante. Estes dados são consistentes com sICAM sendo secretada através da via secretora "Regulada" (R.B. Kelly, Science 230:25 (1985)).

Prepararam-se sondas de anticorpos específicos para sICAM e para ICAM-1. Os peptideos sintéticos S-PEP,

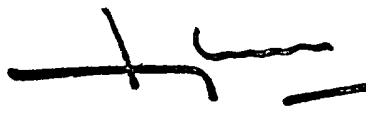
P P G M R L S S S L W (C)

derivado de uma sequência única de 11 aminoácidos no extremo C de sICAM e P002, derivado do extremo C de ICAM-1.

G T P M K P N T Q A T P P (C)

foram feitos e purificados; os resíduos C do extremo C entre parêntesis foram adicionados para facilitar o acoplamento dos peptideos a veiculos proteicos. Os peptideos sintéticos (foram acoplados a KLH (Hemocianina de lapa) por processos convencionais e o conjugado infectado em coelhos para produzir anti-soro anti-peptideo e observou-se ligarem especificamente aos respectivos imunogénios peptídicos.

Em ligação com o presente pedido de patente, foram depositados os seguintes microorganismos da American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852, USA:



Uma linha celular de Mamífero, HEI
tendo a designação ATCC CRL 9592,

Uma linha celular de Mamífero, HRVRI
(HRRI) tendo a designação ATCC CKL 9593 e

Uma linha celular de hibridoma, CIII
92.1 A tendo a designação ATCC HB 9594.

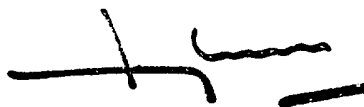
R E I V I N D I C A C Ã O

1ª. - Método para a recuperação da molécula de adesão intercelular-1, (sICAM-1), na forma substancialmente pura, caracterizado pelos passos de:

- (A) remoção do sobrenadante das células não lisadas,
- (B) introdução do sobrenadante numa matriz de afinidade contendo anticorpo imobilizado capaz de se ligar a sICAM-1, de preferencia anticorpos contra ICAM-1 e sICAM-1 ou seus derivados,
- (C) permitir que a referida sICAM-1 se ligue ao referido anticorpo da referida matriz.
- (D) lavagem da referida matriz de afinidade para remover os contaminantes não ligados e
- (E) recuperação da referida sICAM-1 na forma substancialmente pura através da eluição da referida sICAM-1 da referida matriz.

2ª. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado ainda pela introdução do sobrenadante numa coluna de lectina ou de gérmen de trigo antes ou depois do sobrenadante ser introduzido na referida coluna de anticorpo.

3ª. - Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado por se obter uma molécula de adesão intercelular-1 solúvel humana, isolada e purificada ou um seu derivado funcional.



4ª. - Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por se obter uma molécula de adesão intercelular obtida a partir de HeLa, He1 e seus transfectantes primários que apresenta as seguintes características:

(A) solúvel na ausência de detergente e

(B) ser o produto da tradução das sequências de mRNA apresentadas na Figura 1:

58 ATGGCTCCCAGCAGCCCCCGGCCGCGCTGCCCGCACTCCTGGTCTGCTCGGGGCTCTG 117
M A P S S P R P A L P A L L V L L G A L

118 TTCCCAGGACCTGGCAATGCCAGACATCTGTGTCCCCCTCAAAGTCATCCTGCCCCGG 177
F P G P G N A Q T S V S P S K V I L P R 13

178 GGAGGCTCCGTGCTGGTGACATGCAGCACCTCCTGTGACCAGCCCAAGTTGTTGGGCATA 237
G G S V L V T C S T S C D Q P K L L G I 33

238 GAGACCCCGTTGCCTAAAAAGGAGTTGCTCCTGCCTGGGAACAACCGGAAGGTGTATGAA 297
E T P L P K K E L L L P G N N R K V Y E 53

298 CTGAGCAATGTGCAAGAAGATAGCCAACCAATGTGCTATTCAAAGTGCCTGATGGGCAG 357
L S N V Q E D S Q P M C Y S N C P D G Q 73

358 TCAACAGCTAAAACCTTCCTCACCGTGTAAGTCCAGAACGGGTGGAAGTGGCACCC 417
S T A K T F L T V Y W T P E R V E L A P 93

418 CTCCCCCTTTGGCAGCCAGTGGGCAAGAACCTTACCTACGCTGCCAGGTGGAGGGTGGG 477
L P S W Q P V G K N L T L R C Q V E G G 113

478 GCACCCCGGGCCAACTCACCGTGGTGCTGCTCCGTGGGGAGAAGGAGCTGAAACGGGAG 537
A P R A N L T V V L L R G E K E L K R E 133

538 CCAGCTGTGGGGGAGCCCGCTGAGGTACGACCACGGTGCTGGTGAGGAGAGATCACCAT 597
P A V G E P A E V T T T V L V R R D H H 153

598 GGAGCCAATTTCTCGTGCCGCACTGAACTGGACCTGCGGCCCCAAGGGCTGGAGCTGTTT 657
G A N F S C R T E L D L R P Q G L E L F 173

658 GAGAACACCTCGGCCCCCTACCAGCTCCAGACCTTTGTCCTGCCAGCGACTCCCCCACA 717
E N T S A P Y Q L Q T F V L P A T P P Q 193

718 CTTGTGAGCCCCCGGGTCTAGAGGTGGACACGCAGGGGACCGTGGTCTGTTCCCTGGAC 777
L V S P R V L E V D T Q G T V V C S L D 213

778 GGGCTGTTCCAGTCTCGGAGGCCAGGTCCACCTGGCACTGGGGGACCAGAGGTTGAAC 837
G L F P V S E A Q V H L A L G D Q R L N 233

FIG.1a

838 CCCACAGTCACCTATGGCAACGACTCCTTCTCGGCCAAGGCCTCAGTCAGTGTGACCGCA 897
P T V T Y G N D S F S A K A S V S V T A 253

898 GAGGACGAGGGCACCCAGCGGCTGACGTGTGCAGTAATACTGGGGAACCAGAGCCAGGAG 957
E D E G T Q R L T C A V I L G N Q S Q E 273

958 ACACTGCAGACAGTGACCATCTACAGCTTTCCGGCGCCCAACGTGATTCTGACGAAGCCA 1017
T L Q T V T I Y S F P A P N V I L T K P 293

1018 GAGGTCTCAGAAGGGACCGAGGTGACAGTGAAGTGTGAGGCCACCCCTAGAGCCAAGGTG 1077
E V S E G T E V T V K C E A H P R A K V 313

1078 ACGCTGAATGGGGTTCCAGCCCAGCCACTGGGCCCCGAGGGCCCAGCTCCTGCTGAAGGCC 1137
T L N G V P A Q P L G P R A Q L L L K A 333

1138 ACCCCAGAGGACAACGGGCGCAGCTTCTCCTGCTCTGCAACCCTGGAGGTGGCCGGGCCAG 1197
T P E D N G R S F S C S A T L E V A G Q 353

1198 CTTATACACAAGAACCAGACCCGGGAGCTTCGTGTCTGTATGGCCCCGACTGGACGAG 1257
L I H K N Q T R E L R V L Y G P R L D E 373

1258 AGGGATTGTCCGGGAAACTGGACGTGGCCAGAAAATTCCCAGCAGACTCCAATGTGCCAG 1317
R D C P G N W T W P E N S Q Q T P M C Q 393

1318 GCTTGGGGGAACCCATTGCCCCGAGCTCAAGTGTCTAAAGGATGGCACTTTCCCACTGCCC 1377
A W G N P L P E L K C L K D G T F P L P 413

1378 ATCGGGGAATCAGTGACTGTCACTCGAGATCTTGAGGGCACCTACCTCTGTGGGCCAGG 1437
I G E S V T V T R D L E G T Y L C R A R 433

1438 AGCACTCAAGGGGAGGTACCCCGCAAGCCCCCGGTATGAGATTGTCATCATCACTGTGG 1497
S T Q G E V T R K P P G M R L S S S L W 453

1498 TAG 1500

FIG.1b



5ª. - Método para a obtenção de uma sequência de DNA isolada e purificada, caracterizado por se incorporar na referida sequência a sequência de DNA que codifica a molécula de adesão intercelular-1 solúvel e humana, de preferência como descrito na Figura 1, anteriormente referida.

6ª. - Célula hospedeira, caracterizada por conter a sequência de DNA da reivindicação 3.

7ª. - Anticorpo de preferência monoclonal caracterizado por ser capaz de se ligar a sICAM-1 e incapaz de se ligar a ICAM-1 insolúvel, de preferência capaz de se ligar à sequência de 11 aminoácidos do extremo C como se mostra na Figura 1, anteriormente referida.

8ª. - Processo para a preparação de uma composição farmacêutica para redução da infecção por rinovírus humano, caracterizado por se incluir na referida composição a proteína das reivindicações 3 ou 4.

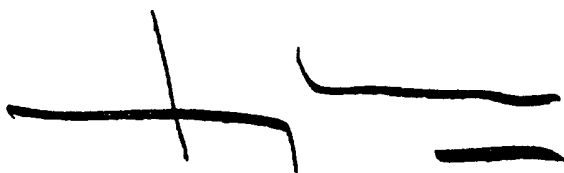
9ª. - Processo para a preparação de uma composição farmacêutica para reverter o mau funcionamento do sistema imune causada por excesso de sICAM-1, caracterizado por se incluir na referida composição anticorpos monoclonais contra sICAM-1 e/ou ICAM-1 e/ou suas misturas.

10ª. - Processo para a preparação de uma composição farmacêutica para reverter o mau funciona-



mento do sistema imune causado por excesso de sICAM-1, caracterizado por se incluir na referida composição LFA-1, purificado ou seus derivados funcionais.

Lisboa, 22 de Janeiro de 1990



J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial de Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10-A, 1.º
1200 LISBOA

58 ATGGCTCCCAGCAGCCCCGGCCGCGCTGCCCCGCACTCCTGGTCCTGCTCGGGGCTCTG 117
M A P S S P R P A L P A L L V L L G A L

118 TTCCCAGGACCTGGCAATGCCAGACATCTGTGTCCCCCTCAAAAGTCATCCTGCCCCGG 177
F P G P G N A Q T S V S P S K V I L P R 13

178 GGAGGCTCCGTGCTGGTGACATGCAGCACCTCCTGTGACCAGCCCAAGTTGTTGGGCATA 237
G G S V L V T C S T S C D Q P K L L G I 33

238 GAGACCCCGTTGCCTAAAAAGGAGTTGCTCCTGCCTGGGAACAACCGGAAGGTGTATGAA 297
E T P L P K K E L L L P G N N R K V Y E 53

298 CTGAGCAATGTGCAAGAAGATAGCCAACCAATGTGCTATTCAAAGTGCCTGATGGGCAG 357
L S N V Q E D S Q P M C Y S N C P D G Q 73

358 TCAACAGCTAAACCTTCCTCACCGTGTACTGGACTCCAGAACGGGTGGAAGTGGCACCC 417
S T A K T F L T V Y W T P E R V E L A P 93

418 CTCCCCTCTTGGCAGCCAGTGGGCAAGAACCTTACCCTACGCTGCCAGGTGGAGGGTGGG 477
L P S W Q P V G K N L T L R C Q V E G G 113

478 GCACCCCGGGCCAAACCTCACCGTGGTGCTGCTCCGTGGGGAGAAGGAGCTGAAACGGGAG 537
A P R A N L T V V L L R G E K E L K R E 133

538 CCAGCTGTGGGGGAGCCCGCTGAGGTCACGACCACGGTGCTGGTGAGGAGAGATCACCAT 597
P A V G E P A E V T T T V L V R R D H H 153

598 GGAGCCAATTTCTCGTGCCGCACTGAACTGGACCTGCGGCCCAAGGGCTGGAGCTGTTT 657
G A N F S C R T E L D L R P Q G L E L F 173

658 GAGAACACCTCGGCCCCCTACCAGCTCCAGACCTTTGTCTGCCAGCGACTCCCCCACA 717
E N T S A P Y Q L Q T F V L P A T P P Q 193

718 CTTGTGAGCCCCCGGGTCCTAGAGGTGGACACGCAGGGGACCGTGGTCTGTTCCTGGAC 777
L V S P R V L E V D T Q G T V V C S L D 213

778 GGGCTGTTCCAGTCTCGGAGGCCAGGTCCACCTGGCACTGGGGGACCAGAGGTTGAAC 837
G L F P V S E A Q V H L A L G D Q R L N 233

FIG.1a



838	CCCACAGTCACCTATGGCAACGACTCCTTCTCGGCCAAGGCCTCAGTCAGTGTGACCGCA	897
	P T V T Y G N D S F S A K A S V S V T A	253
898	GAGGACGAGGGCAGCCAGCGGCTGACGTGTGCAGTAATACTGGGGAACCAGAGCCAGGAG	957
	E D E G T Q R L T C A V I L G N Q S Q E	273
958	ACACTGCAGACAGTGACCATCTACAGCTTTCGGGGCCCAACGTGATTCTGACGAAGCCA	1017
	T L Q T V T I Y S F P A P N V I L T K P	293
1018	GAGGTCTCAGAAGGGACCGAGGTGACAGTGAAGTGTGAGGCCCCACCTAGAGCCAAGGTG	1077
	E V S E G T E V T V K C E A H P R A K V	313
1078	ACGCTGAATGGGGTTCCAGCCCAGCCACTGGGCCCCGAGGGCCCCAGCTCCTGCTGAAGGCC	1137
	T L N G V P A Q P L G P R A Q L L L K A	333
1138	ACCCCAGAGGACAACGGGGCGCAGCTTCTCCTGCTCTGCAACCCTGGAGGTGGCCGGCCAG	1197
	T P E D N G R S F S C S A T L E V A G Q	353
1198	CTTATACACAAGAACCAGACCCGGGAGCTTCGTGTCTGTATGGCCCCCGACTGGACGAG	1257
	L I H K N Q T R E L R V L Y G P R L D E	373
1258	AGGGATTGTCCGGGAAACTGGACGTGGCCAGAAAATTCCCAGCAGACTCCAATGTGCCAG	1317
	R D C P G N W T W P E N S Q Q T P M C Q	393
1318	GCTTGGGGGAACCCATTGCCCCGAGCTCAAGTGTCTAAAGGATGGCACTTTCCCACTGCCC	1377
	A W G N P L P E L K C L K D G T F P L P	413
1378	ATCGGGGAATCAGTGACTGTCACTCGAGATCTTGAGGGCACCTACCTCTGTGCGGGCCAGG	1437
	I G E S V T V T R D L E G T Y L C R A R	433
1438	AGCACTCAAGGGGAGGTACCCGCAAGCCCCCGGTATGAGATTGTCATCATCACTGTGG	1497
	S T Q G E V T R K P P G M R L S S S L W	453
1498	TAG 1500	

FIG.1b

COMPARISON OF C-TERMINAL REGIONS OF ICAM-1 AND sICAM-1

```
1441 ACTCAAGGGGAGGTCACCCGCAAGGTGACCGTGAATGTGCTCTCCCCCGGTATGAGATT
435 T Q G E V T R K V T V N V L S P R Y E I

1441 ACTCAAGGGGAGGTCACCCGCAAG-----CCCCCGGTATGAGATT
435 T Q G E V T R K P P G M R L

1501 GTCATCATCACTGTGGTAGCAGCCGCGAGTCATAATGGGCACTGCAGGCCTCAGCACGTAC
455 V I I T V V A A A V I M G T A G L S T Y

1482 GTCATCATCACTGTGGTAGCAGCCGCGAGTCATAATGGGCACTGCAGGCCTCAGCACGTAC
449 S S S L W *

1561 CTCTATAACCGCCAGCGGAAGATCAAGAAATACAGACTACAACAGGCCCAAAAAGGGACC
475 L Y N R Q R K I K K Y R L Q Q A Q K G T

1542 CTCTATAACCGCCAGCGGAAGATCAAGAAATACAGACTACAACAGGCCCAAAAAGGGACC

1621 CCCATGAAACCGAACACACAAGCCACGCCTCCCTGAACCTATCCCGGGACAGGGCCTCTT
495 P M K P N T Q A T P P *

1602 CCCATGAAACCGAACACACAAGCCACGCCTCCCTGAACCTATCCCGGGACAGGGCCTCTT
```

UPPER LINES: ICAM-1 cDNA SEQUENCE AND TRANSLATION

LOWER LINES: sICAM-1 cDNA SEQUENCE AND TRANSLATION

FIG.2

Handwritten signature

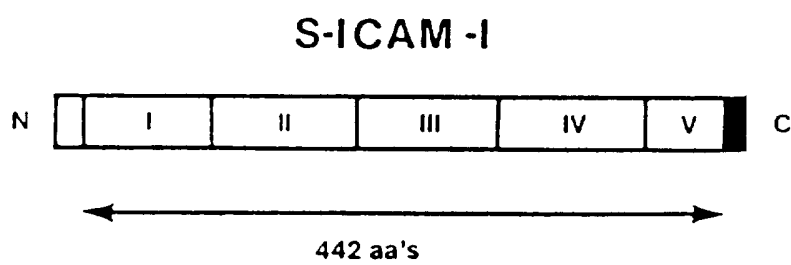
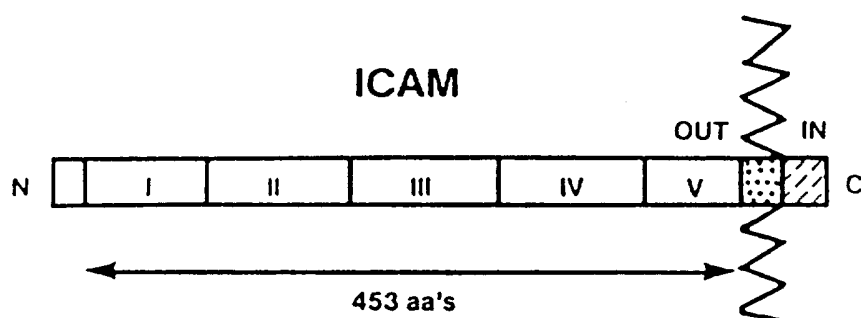


FIG.3

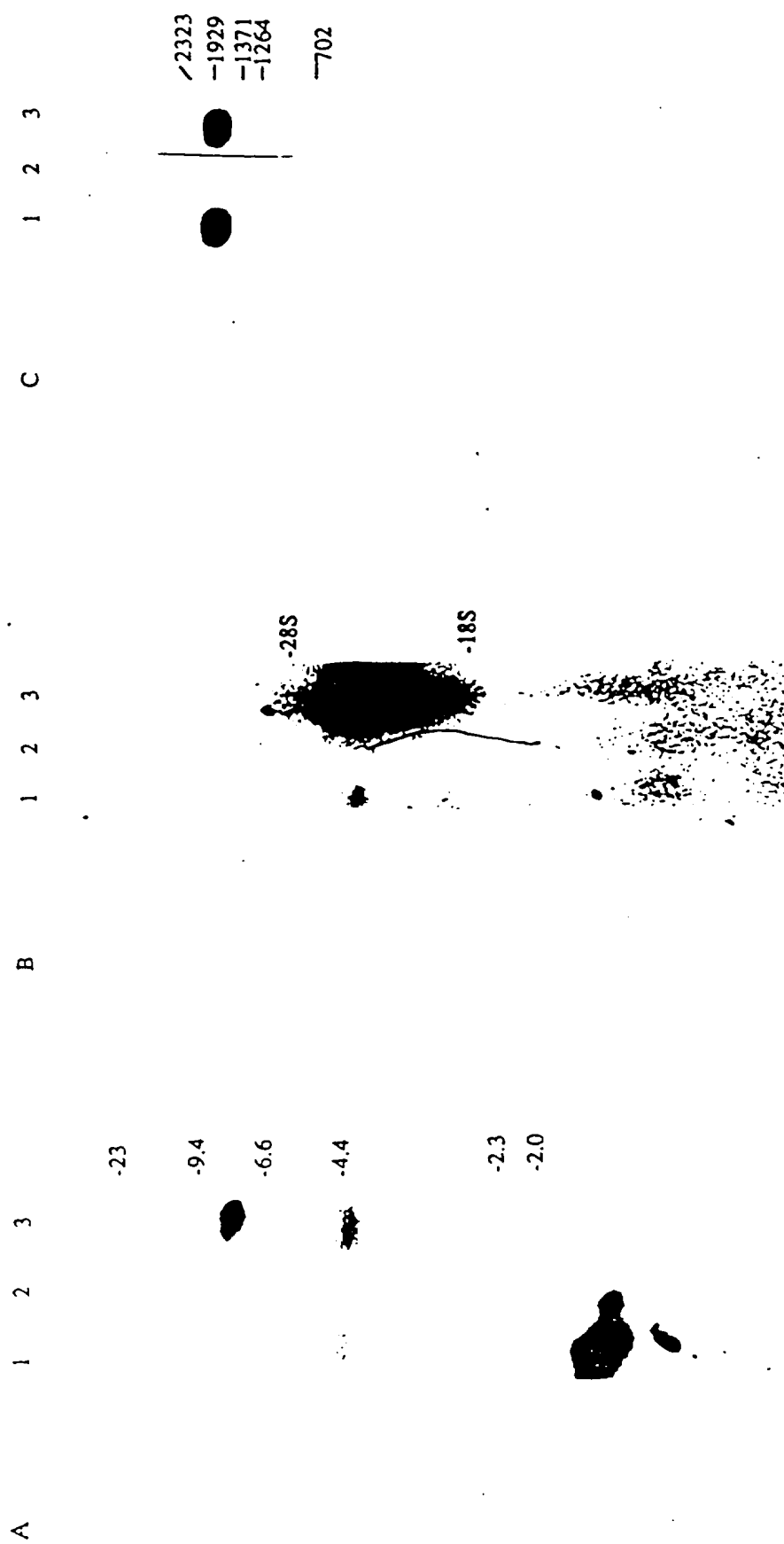


FIG. 4

[Handwritten signature]

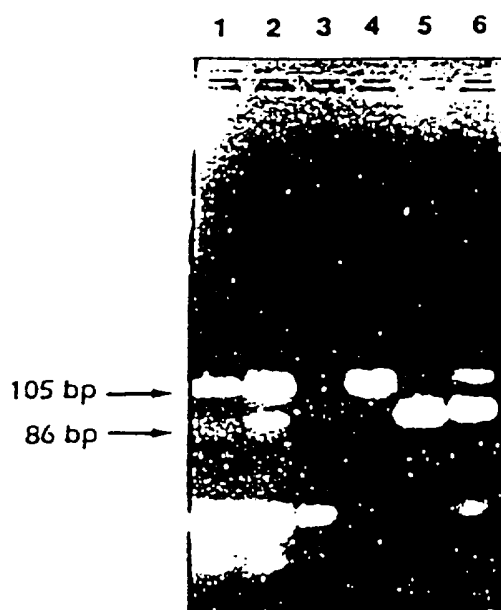


FIG.5

Handwritten signature or mark.

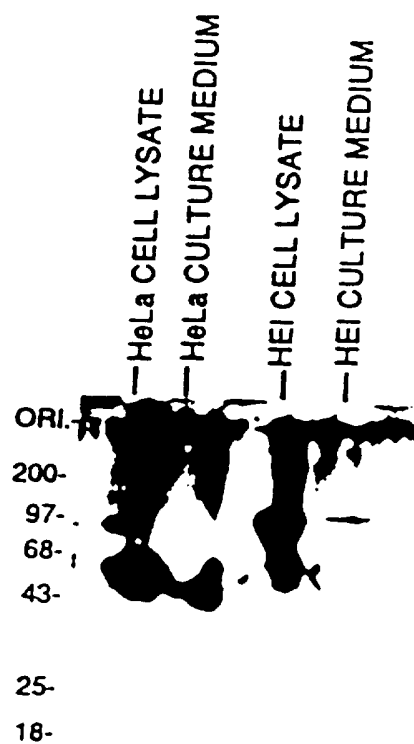
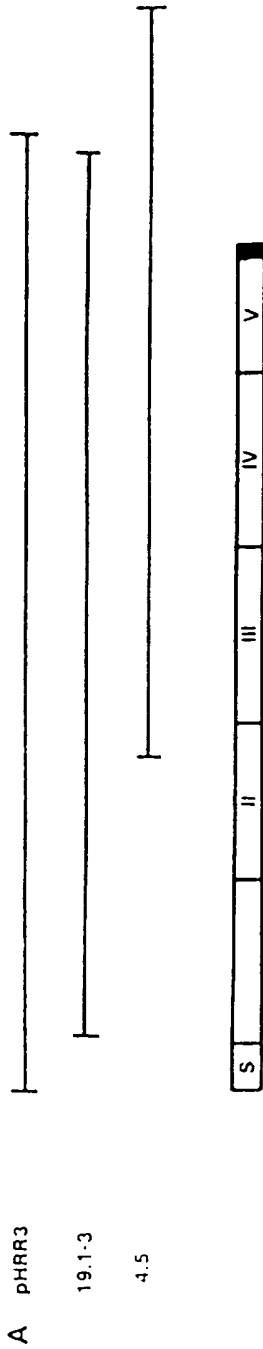


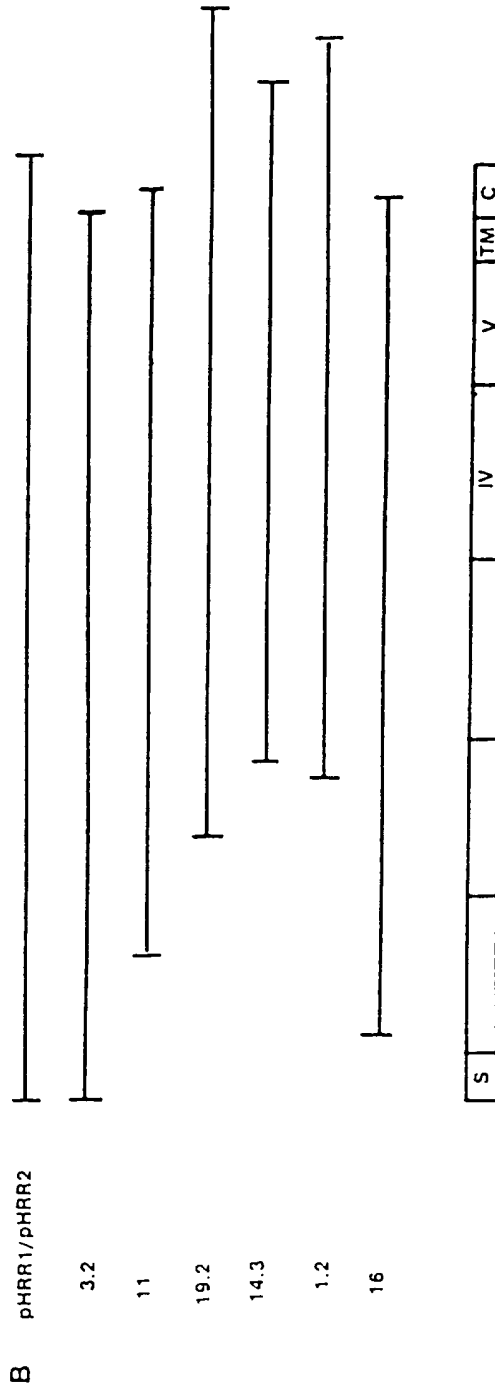
FIG.6

Handwritten signature or initials.

SICAM-1 cDNA CLONES



ICAM-1 cDNA CLONES



100bp

FIG.7