(19) INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* **PT 721469 E**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
C07K016/28 A A61K039/395 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) *Data de depósito:* 1994.09.02

(30) *Prioridade:* 1993.09.02 US 116255
1994.04.25 US 232929

(43) *Data de publicação do pedido:*
1996.07.17

(45) *Data e BPI da concessão:*
2000.01.05

(73) *Titular(es):*
TRUSTEES OF DARTMOUTH COLLEGE
- HANOVER, NH 03755 US

BRISTOL-MYERS SQUIBB PHARMACEUTICAL RESE.INSTITUT
3005 FIRST AVENUE SEATTLE, WA 98121 US

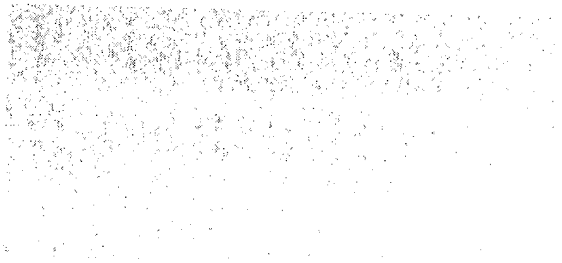
(72) *Inventor(es):*

ALEJANDRO ARUFFO US
JEFFREY A. LADBETTER US
RANDOLPH J. NOELLE US
TERESA M. FOY US

(74) *Mandatário(s):*
JOSÉ LUÍS FAZENDA ARNAUT DUARTE
RUA DO PATROCÍNIO, 94 1350 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* ANTICORPOS ANTI-GP39 E SUAS UTILIZAÇÕES2

(57) *Resumo:*



N° 721469

DESCRIÇÃO

"ANTICORPOS ANTI-GP39 E SUAS UTILIZAÇÕES"

Antecedentes da invenção

De modo a induzir a activação de células T específicas para antigénios e a expansão clonal, é necessário que cheguem à superfície dos linfócitos T em repouso dois sinais, proporcionados pelas células que apresentam antigénios (APCs) (Jenkins, M. e Schwartz, R. (1987) *J. Exp. Med.* 165, 302-319; Mueller, D. L. et al. (1990) *J. Immunol.* 144, 3701-3709; Williams, I. R. e Unanue, E.R. (1990) *J. Immunol* 145, 85-93). O primeiro sinal, que confere especificidade à resposta imune, é mediado via o receptor da célula T (TCR), a seguir ao reconhecimento do péptido antigénico estranho, apresentado no contexto do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). O segundo sinal, designado por co-estimulação, induz as células T a proliferarem e a tornarem-se funcionais (Scwartz, R. H. (1990) *Science* 248, 1349-1356). A co-estimulação não é nem específica de antigénios, nem restrita ao MHC e pensa-se que é proporcionada por uma ou mais moléculas de superfície diferentes, expressas pelas APCs (Jenkins, M. K. et al. (1988) *J. Immunol.* 140, 3324-3330; Linsley, P.S. et al. (1991) *J. Exp. Med.* 173, 721-730; Gimmi, C.D. et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 88, 6575-6579; Young, J.W. et al. (1992) *J. Clin. Invest.* 90, 229-237; Koulova, L. et al. (1991) *J. Exp. Med.* 173, 759-762; Reiser, H. et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 271-275; van-Seventer, G.A. et al. (1990) *J. Immunol.* 144, 4579-4586; LaSalle, J. M. et al., (1991) *J. Immunol.* 147, 774-80; Dustin, M.I. et al. (1989) *J. Exp. Med.* 169, 503; Armitage, R.J. et al. (1992) *Nature* 357, 80-82; Liu, Y. et al. (1992) *J. Exp Med* 175, 437-445). Uma via co-

estimulatória envolvida na activação de células T envolve a molécula CD28 na superfície de células T. Esta molécula pode receber um sinal co-estimulatório fornecido por um ligando das células B ou outras APCs. Os ligandos para CD28 incluem membros da família B7 dos antigénios de activação de linfócitos B, como B7-1 e/ou B7-2 (Freedman, A.S. et al. (1987) *J Immunol.* 137, 3260-3267; Freeman, G.J. et al. (1989) *J. Immunol* 143, 2714-2722; Freeman, G.J. et al. (1991) *J. Exp Med.* 174, 625-631; Freeman, G.J. et al. (1993) *Science* 262, 909-911, Azuma, M. et al. (1993) *Nature* 366, 76-79; Freeman, G.J. et al. (1993) *J. Exp Med.* 178, 2185-2192). O B7-1 e B7-2 são também ligandos para uma outra molécula, a CTLA4, presente na superfície de células T activadas, embora o papel do CTLA4 na co-estimulação não seja claro.

O fornecimento de um sinal específico para antigénios com um sinal co-estimulatório a uma célula T, conduz à activação da célula T, o que pode incluir, quer a proliferação de células T, quer a secreção de citoquinas. Pelo contrário, pensa-se que o fornecimento de um sinal específico para antigénio a uma célula T, na ausência de um sinal co-estimulatório, induz um estado de não resposta ou anergia na célula T, induzindo desse modo uma tolerância da célula T a antigénios específicos.

As interacções entre as células T e B desempenham um papel central nas respostas imunes. A indução de imunidade humoral a antigénios dependentes do timo, requer a "ajuda" fornecida pelas células T ajudantes (daqui para a frente Th). Embora alguma da ajuda fornecida pelos linfócitos B seja mediada por moléculas solúveis libertadas pelas células Th (por exemplo linfoquinas como a IL-4 e IL-5), a activação de células B requer a interacção dependente do contacto, entre as células B e Th. Hirohata et al. *J. Immunol.* 140:3736-3744 (1988); Bartlett et al. *J. Immunol.* 143:1745-1754 (1989). Isto indica que a activação de células B envolve uma interacção obrigatória entre as moléculas de superfície celular nas

células B e células Th. A(s) molécula(s) nas células T medeiam, portanto, as funções efectoras ajudantes dependentes do contacto, das células T. A existência de uma interacção dependente do contacto, entre moléculas nas células B e células T, é ainda suportada pela observação de que as membranas plasmáticas, isoladas de células T activadas, podem proporcionar funções ajudantes, necessárias para a activação de células B. Brian, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:564-568 (1988); Hodgkin et al., *J. Immunol* 145:2025-2034 (1990); Noelle et al., *J. Immunol.* 146:1118-1124 (1991).

Foi identificada uma molécula, a CD40, na superfície de linfócitos B imaturos e maduros que, quando cruzada com anticorpos, induz a proliferação de células B. Valle et al., *Eur. J. Immunol.* 19:1463-1467 (1989); Gordon et al., *J Immunol.*, 140:1425-1430 (1988); Gruber et al. *J Immunol.*, 142:4144-4152 (1989). A CD40 já foi clonada e caracterizada molecularmente. Stamenkovic et al., *EMBO J.*, 8:1403-1410 (1989). Foi já também clonado e caracterizado molecularmente um ligando para CD40, a gp39 (também designado por ligando CD40 ou CD40L). Armitage et al., *Nature*, 357: 80-82 (1992); Lederman et al., *J. Exp. Med.*, 175:1091-1101 (1992); Holenbaugh et al., *EMBO J.*, 11:4313-4319 (1992). A proteína gp39 é expressa em células Th $CD4^+$ activadas, mas não nas em repouso. Spriggs et al., *J. Exp. Med.*, 176:1543-1550 (1992); Lane et al., *Eur. J. Immunol.*, 22:2573-2578 (1992); Roy et al., *J. Immunol.*, 151:1-14 (1993). As células transfectadas com o gene de gp39 e que expressam a proteína gp39 na sua superfície podem desencadear a proliferação de células B e, juntamente com outros sinais estimulatórios, podem induzir a produção de anticorpos. Armitage et al., *Nature*, 357:80-82 (1992); Hollenbaugh et al., *EMBO J.*, 11:4213-4319 (1992).

Lederman descreve, no J.Exp Med (1992) nas páginas 1091 a 1101, a identificação de uma proteína de superfície nas células T $CD4^+$ activadas que induz a diferenciação de células B dependente do contacto e um anticorpo monoclonal designado por

5c8, que inibe a capacidade de células $CD4^+$ activadas, fixas, induzirem a expressão de CD23 de superfície de células B e dirigir a diferenciação de células B, induzida pelo mitogénio de *Phytolacea decandra* ("pokeweed"). Lederman discute ainda os papéis do antigénio 5c8 e de CD40 que activam as células T-células B, na ajuda dependente de contacto, no J. Immunology (1992), páginas 3817 a 3826. Marshall et al. discutem, no J. Clin. Immunology (1993) páginas 165 a 174, a base molecular para a ajuda de células T na imunidade humoral e fazem uma revisão do trabalho sobre CD40 e o seu ligando, a gp39. Noelle discute, na Immunology Today (1992), páginas 431 a 433 o papel do CD40 e do seu ligando como um par ligando-receptor essencial para a activação de células B dependente do timo.

Sumário da invenção

A presente invenção proporciona um anticorpo monoclonal anti-gp39 humano, ou fragmento seu derivado, que compreende o anticorpo monoclonal fornecido pelo hibridoma 24-31 (ATCC HB 11712) ou possui a mesma especificidade de ligação ao epítopo e aproximadamente a mesma afinidade para o gp39, que o anticorpo monoclonal proporcionado pelo hibridoma 24-31 (ATCC HB 11712).

As moléculas de superfície celular que medeiam as funções efectoras ajudantes depedentes do contacto, são importantes para induzir respostas imunes que requerem a ajuda de células T. Por exemplo, a interacção de gp39 nas células T com o CD40 nas células B desempenha um papel central na activação de respostas de células B a antigénios. A presente invenção baseia-se, pelo menos em parte, na descoberta de que as moléculas de superfície celular que medeiam as funções efectoras ajudantes dependentes de contacto, desempenham também um papel crítico na resposta de células T aos antigénios. Em particular, verificou-se que, sob condições adequadas, a interferência de uma interacção entre a gp39 numa célula T e um ligando numa célula que está a apresentar o

antigénio à célula T, pode induzir tolerância das células T a antigénios específicos. Assim, a célula que apresenta antigénios à célula T requer uma interacção entre um ligando de gp39 (e.g., CD40) na célula e o gp39 na célula T, de modo a ser capaz de fornecer os sinais necessários para a activação da célula T. A inibição da interacção entre o ligando de gp39 e a gp39 impede a activação da célula T, induzindo em vez disso tolerância das células T a antigénios específicos.

Os métodos de acordo com a invenção dizem respeito à indução de tolerância em células T a antigénios específicos. Os métodos envolvem o contacto de uma célula T com 1) uma célula que apresenta antigénios à célula T e tem um ligando na superfície celular que interage com um receptor na superfície da célula T, que medeia as funções efectoras ajudantes dependentes do contacto; e 2) um antagonista do receptor na superfície de uma célula T, que medeia as funções efectoras ajudantes dependentes do contacto. O antagonista inibe a interacção do receptor com o seu ligando. Uma célula T pode entrar em contacto com a célula que apresenta antigénios e com o antagonista *in vitro*, ou alternativamente, a célula e o antagonista podem ser administrados a um indivíduo, para induzir tolerânica em células T *in vivo*.

O receptor na superfície da célula T que medeia as funções efectoras ajudantes dependentes de contacto é o gp39. O antagonista é uma molécula de anticorpo monoclonal anti-gp39, que inibe a interacção do gp39 com o seu ligando, numa célula que apresenta antigénios à célula T. A célula que apresenta antigénios à célula T é de preferência uma célula B. A célula B pode ser uma célula B em repouso, pequena. De forma a induzir tolerância das células T a um antigénio solúvel, a célula B pode entrar em contacto com o antigénio antes do contacto com a célula T (e.g. antes da administração a um indivíduo). Noutra concretização, de forma a induzir tolerância da célula T a aloantigénios, a célula que é utilizada para apresentar antigénios à célula T é uma célula

alogénica. A célula alogénica pode ser, por exemplo, uma célula B alogénica, medula óssea alogénica, esplenócitos alogénicas ou células alogénicas de sangue periférico.

Os métodos de acordo com a presente invenção podem ser utilizados, por exemplo, para induzir tolerância das células T a um antigénio solúvel, de forma a induzir tolerância de células T a um transplante de medula, ou outro transplante de orgãos, ou a inibir a doença enxerto-versus-hospedeiro no transplante de medula. No caso de transplante de medula óssea, as próprias células de medula óssea transplantadas servem como células que apresentam antigénios à célula T, no método de acordo com a invenção. Deste modo, numa concretização de acordo com a invenção, a aceitação de um transplante de medula óssea é promovida pela administração a um indivíduo de medula óssea alogénica, juntamente com o anticorpo anti-gp39.

A presente invenção refere-se ainda a anticorpos monoclonais anti-gp39 humano capazes de inibir a proliferação de células B, diferenciação de células B e respostas de células T, e a composições farmacêuticas que compreendem estes anticorpos. Os anticorpos monoclonais anti-gp39 humano de acordo com a invenção são preferidos para utilização na modulação de respostas imunes em geral e em particular para utilização na indução de tolerância de células T a antigénios específicos.

Os anticorpos particularmente preferidos são o anticorpo monoclonal 24-31. O hibridoma 24-31, que produz o anticorpo 24-31, foi depositado sob as normas do tratado de Budapeste na American Type Culture Collection, Parklawn Drive, Rockville, Md. em 2 de Setembro 1994. Atribuiu-se ao hibridoma 24-31 o número de registo da ATCC, HB11712. O anticorpo 24-31 é do isotipo IgG1.

Deste modo, a presente invenção proporciona um anticorpo monoclonal anti-gp39 humano (mAc) de um isotipo IgG1. O mAc

anti-gp39 humano de acordo com a invenção pode inibir a proliferação de células B num teste convencional *in vitro*, por exemplo, a proliferação de células B induzida por tratamento das células B com interleucina-4 e gp39 solúvel. De preferência, o anticorpo anti-gp39 humano inibe a proliferação de células B com uma IC_{50} (i.e. concentração necessária para inibir a proliferação em 50%) entre cerca de 0,01 e 5,0 μg/ml, mais preferencialmente entre cerca de 0,1 e 2,5 μg/ml e mesmo mais preferencialmente entre cerca de 0,1 e 1,25 μg/ml. Os mAcs anti-gp39 humano de acordo com a invenção podem também inibir a produção pelas células B de IgG, IgM e/ou IgA num teste padrão *in vitro*, por exemplo, a produção de Ig induzida pela cultura de células B com células T activadas (e.g. células T activadas pelo tratamento com anticorpos anti-CD3). De preferência, o anticorpo anti-gp39 humano inibe a produção pelas células B de IgG, IgM e/ou IgA, com uma IC_{50} entre cerca de 0,01 e 1,0 μg/ml, ou, mais preferencialmente, entre cerca de 0,01 e 0,1 μg/ml.

Numa concretização preferencial, o mAc anti-gp39 humano liga-se a um epítopo que é reconhecido pelo anticorpo monoclonal 24-31, ou anticorpo monoclonal 89-76. A capacidade de um mAc se ligar a um epítopo reconhecido por qualquer dos anticorpos acima mencionados, pode ser determinada por testes de competição cruzada convencionais. Por exemplo, um anticorpo que se liga ao mesmo epítopo reconhecido pelo mAc 24-31 irá competir com a ligação de 24-31 marcado para activar as células T, enquanto que um anticorpo que se liga a um epítopo diferente do que é reconhecido pelo mAc 24-31, não irá competir para a ligação de 24-31 marcado, para activar as células T.

A invenção proporciona também composições farmacêuticas dos anticorpos anti-gp39 humano de acordo com a invenção. Estas composições compreendem tipicamente um mAc anti-gp39 humano (e.g. de preferência 24-31) e um veículo farmaceuticamente aceitável.

Ainda num outro aspecto, a invenção refere-se a um ácido nucleico que codifica para um mAc anti-gp39 humano (e.g. ADN que codifica para uma cadeia pesada ou cadeia leve de imunoglobulina, ou porção sua derivada, de um mAc anti-gp39 humano). Este ácido nucleico pode ser isolado a partir de uma célula (e.g. hibridoma) que produz um mAc anti-gp39 humano, por técnicas convencionais. Por exemplo, o ácido nucleico que codifica para o mAc 24-31 pode ser isolado a partir do hibridoma 24-31, respectivamente, por pesquisa de uma biblioteca de ADNc, amplificação por PCR ou outra técnica convencional. O ácido nucleico que codifica para uma cadeia de mAc anti-gp39 humano pode ser manipulado por técnicas convencionais de ADN recombinante, para produzir mAcs anti-gp39 humano recombinantes, por exemplo, mAcs anti-gp39 humanos quiméricos ou humanizados.

Para além disso, os ácidos nucleicos que codificam para um mAc anti-gp39 humano podem ser incorporados num vector de expressão e introduzidos numa célula hospedeira, para facilitar a expressão e produção de formas recombinantes de anticorpos anti-gp39 humanos.

Descrição sumária dos desenhos

A *Figura 1* é uma representação gráfica da tolerância de células T a um antigénio proteico, induzida por tratamento anti-gp39 *in vivo*. As respostas de células T foram medidas *in vitro* por teste com um antigénio que foi previamente administrado *in vivo* a células B pulsadas com antigénio, com ou sem um anticorpo anti-gp39.

A *Figura 2* é uma representação gráfica da tolerância de células T a células B alogénicas, induzida por tratamento com anti-gp39 *in vivo*. As respostas de células T foram medidas *in vitro* por desafio com células B alogénicas, que foram anteriormente administradas *in vivo*, quer com, quer sem um anticorpo anti-gp39.

A *Figura 3A* é uma representação gráfica da inibição de respostas primárias de CTL alogénico, induzidas por células B alogénicas, quando os animais receptores são tratados com um anticorpo anti-gp39. Os grupos representados são ratos não tratados (■), ratos tratados com anti-gp39 (Δ) e esplenócitos de ratos Balb/c não pré-imunizados (•; utilizados como células efectoras de controlo negativo).

As *Figuras 3B e 3C* são representações gráficas da inibição de respostas primárias de CTL alogénico, induzidas por blastos de células B tratados com LPS, quando os animais receptores são tratados com anticorpos anti-gp39. Os painéis B e C representam duas experiências independentes. Os grupos representados são blastos LPS *in vivo* sem tratamento (▸), blastos LPC *in vivo* com tratamento anti-gp39 (•), células B em repouso *in vivo*, sem tratamento (o) e células B em repouso *in vivo*, com tratamento anti-gp39 (□)

A *Figura 4A* é uma representação gráfica da inibição de respostas secundárias de CTL alogénico, induzidas por células B alogénicas, quando os animais receptores são tratados com anticorpo anti-gp39. Os grupos efectores apresentados são: receptores tratados com HIg (•), Balb/c nativos (▸) e receptores tratados com anti-gp39 (■). As respostas isogénicas correspondentes (células Balb/c estimuladas com células Balb/c) são indicadas por símbolos abertos.

A *Figura 4B* é uma representação gráfica da especificidade de inibição de respostas de CTL alogénicas por tratamento com anti-gp39. São apresentadas as respostas de CTL contra alvos $H\text{-}2^k$, por células Balb/c nativas (o) ou por células tornadas tolerantes a $H\text{-}2^b$, por administração de células B do haplotipo $H\text{-}2^b$ e anti-gp39 (■).

A *Figura 5* é um gráfico de barras que apresenta o número de esplenócitos num hospedeiro que recebeu um transplante de medula óssea, a diferentes tempos após a transferência da

medula óssea para o hospedeiro, quer com, quer sem tratamento com um anticorpo anti-gp39.

A *Figura 6A* é uma representação gráfica da concentração de IgA produzido por células B do baço *in vitro*, após remoção a partir de ratos que receberam um transplante de medula óssea, quer com, quer sem tratamento anti-gp39 *in vivo*. Removeram-se os esplenócitos B e mediu-se a produção de anticorpos, quer aos 7, quer aos 14 dias após o transplante de medula óssea.

A *Figura 6B* é uma representação gráfica da concentração de IgG1 produzido pelos esplenócitos B *in vitro*, após remoção a partir de ratos que receberam um transplante de medula óssea, quer com, quer sem tratamento anti-gp 39 *in vivo*. Removeram-se os esplenócitos B e mediu-se a produção de anticorpos, quer aos 7, quer aos 14 dias após o transplante de medula óssea.

A *Figura 7A* é uma representação gráfica das concentrações de IgE no soro em ratos que receberam um transplante de medula óssea, quer com, quer sem tratamento anti-gp39 *in vivo*, a vários tempos após a transferência de medula óssea.

A *Figura 7B* é uma representação gráfica das concentrações de anticorpo anti-ADN no soro de ratos que receberam um transplante de medula óssea, quer com, quer sem tratamento anti-gp39 *in vivo*, a vários tempos após a transferência de medula óssea.

As *Figuras 8A e 8B* são representações gráficas que mostram a actividade citolítica *in vitro* de células T citotóxicas, obtidas de ratos que receberam um transplante de medula óssea, quer com, quer sem tratamento anti-gp39 *in vivo*, a diferentes razões de efector em relação à célula alvo (razão E:T). Os painéis A e B representam duas experiências independentes.

As *Figuras 9A, 9B e 9C* são perfis de citometria de fluxo que mostram a coloração de linfócitos de sangue periférico

humano, activados durante 6 horas, quer com CD40Ig (painel A), mAc 4D9-8 (painel B) ou mAc 4D9-9 (painel C).

As *Figuras 10A, 10B e 10C* são perfis de citometria de fluxo que mostram a coloração de linfócitos de sangue periférico humano, activados durante 6 horas, cuja cultura foi feita na presença de ciclosporina A, corada quer com mAc 4D9-8 (painel A), mAc 4D9-9 (painel B), quer com CD40Ig (painel C).

As *Figuras 11A e 11B* são perfis de citometria de fluxo que mostram a coloração de linfócitos de sangue periférico humano activados durante 6 horas, com CD40Ig na presença de mAc 4D9-8 não marcado (painel A) ou mAc 4D9-9 não marcado (painel B).

A *Figura 12* é uma representação gráfica da inibição da proliferação de células B humanas induzida por gp39 e IL-4 solúvel, quando a cultura das células é feita na presença dos mAcs anti-gp 39 humano, 4D9-8, 4D9-9, 24-31, 24-43, 89-76 ou 89-79.

A *Figura 13* é uma representação gráfica da inibição de uma resposta de linfócitos mista aloespecífica, quando a cultura das células é feita na presença dos mAcs anti-gp39 humano, 24-31 ou 89-79.

Descrição pormenorizada da invenção

A presente invenção refere-se a métodos para a indução de tolerância em células T, a antigénios específicos. O método envolve o contacto de uma célula T com 1) uma célula que apresenta antigénios à célula T e possui um ligando na superfície celular que interage com um receptor na superfície da célula T, que medeia as funções efectoras ajudantes dependentes de contacto e 2) um antagonista do receptor na célula T, que inibe a interacção do receptor e do ligando. Tal como aqui definido, uma molécula ou receptor que medeia as funções efectoras ajudantes dependentes do contacto é aquela

que é expressa numa célula Th e interage com um ligando numa célula efectora (e.g. uma célula B), em que a interacção do receptor com o seu ligando é necessária para produzir uma resposta celular efectora (e.g. activação de células B). Para além de estarem envolvidas nas respostas das células efectoras, verificou-se agora que estas moléculas estão envolvidas na resposta da célula T ao antigénio.

A molécula de uma célula T que medeia a função efectora ajudante dependente do contacto é a gp39. Deste modo, em concretizações preferidas, os métodos de acordo com a invenção envolvem o contacto de uma célula T com uma célula que apresenta antigénio e um antagonista de gp39. Assim, a célula utilizada para apresentar antigénios é a que interage com gp39 na superfície de uma célula T, para activar a célula T (i.e para fornecer, às células T, os sinais necessários para a activação de células T). Por exemplo, a célula pode ser uma célula B que expressa CD40 e apresenta antigénios à célula T. Inibindo a interacção entre um ligando de gp39 na célula que apresenta antigénios e o gp39 na célula T, a célula T não é activada pelo antigénio apresentado, tornando-se, ao invés, tolerante ao antigénio.

Os métodos de acordo com a invenção podem ser utilizados para induzir tolerância de células T a um antigénio *in vivo*. Por exemplo, pode-se administrar a um indivíduo uma célula que apresenta antigénios a uma célula T, juntamente com um antagonista de um receptor expresso na célula T que medeia a função efectora ajudante dependente do contacto (e.g. um antagonista de gp39). Os métodos de acordo com a invenção podem ainda ser utilizados para tornar uma célula T tolerante a um antigénio *in vitro*, através do contacto da célula T *in vitro* com uma célula que apresenta antigénio à célula T, juntamente com um antagonista de um receptor expresso na célula T que medeia as funções efectoras ajudantes dependentes do contacto (e.g. antagonista de gp39). As células T tornadas tolerantes *in vitro* podem então ser administradas a um

indivíduo. Os métodos de acordo com a invenção podem ser utilizados para tornar as células T de um indivíduo tolerantes a um antigénio específico, ou a células transplantadas, como medula óssea alogénica (e.g. no transplante de medula óssea). Os métodos de acordo com a invenção são também úteis para a inibição da doença enxerto versus hospedeiro, no transplante de medula óssea.

Alguns aspectos da invenção serão descritos em maior pormenor nas subsecções seguintes.

I. Antagonistas de gp39

De acordo com os métodos da invenção, coloca-se em contacto um antagonista de gp39 com uma célula T (e.g. administrada a um indivíduo), a fim de interferir com a interacção do gp39 de uma célula T com um ligando de gp39 numa célula que apresenta antigénios, tal como uma célula B. Um antagonista de gp39 é definido como uma molécula que interfere com esta interacção. O antagonista de gp39 compreende um anticorpo monoclonal contra gp39, um fragmento ou derivado do anticorpo dirigido contra gp39 (e.g. fragmentos Fab ou F(ab)'2, anticorpos quiméricos ou anticorpos humanizados) formas solúveis de um ligando de gp39 (e.g. CD40 solúvel), formas solúveis de uma proteína de fusão de um ligando gp39 (e.g. CD40Ig solúvel), ou agentes farmacêuticos que desfazem ou interferem com a interacção gp39-CD40.

A. anticorpos

Um mamífero (e.g. um cavalo, hamster ou coelho) pode ser imunizado com uma forma imunogénica da proteína gp39 ou fragmento da proteína (e.g. fragmento peptídico), o que desencadeia uma resposta de anticorpos no mamífero. Pode-se também utilizar como imunogénio, uma célula que expressa gp39 na sua superfície. Os imunogénios alternativos incluem a proteína gp39 purificada, ou fragmentos de proteína. A gp39

pode ser purificada a partir de uma célula que expressa gp39, por técnicas de purificação convencionais; O ADNc de gp39 (Armitage et al., *Nature*, 357:80-82 (1992); Lederman et al., *J. Exp. Med.*, 175:109-1101 (1992); Hollenbaugh et al., *EMBO J.*, 11:4313-4319 (1992)) pode ser expresso numa célula hospedeira, e.g. bactérias, ou uma linha celular de mamífero, e a proteína gp39 pode ser purificada a partir da cultura de células, por técnicas convencionais. Os péptidos gp39 podem ser sintetizados com base na sequência de aminoácidos de gp39 (descrito em Armitage et al., *Nature*, 357:80-82 (1992); Lederman et al., *J. Exp Med.* 175:1091-1101(1992); Hollenbaugh et al., *EMBO J.*, 11:4313-4319 (1992)) utilizando técnicas conhecidas (e.g. síntese química F-moc ou T-boc). As técnicas que conferem imunogenecidade a uma proteína incluem a conjugação com veículos, ou outras técnicas bem conhecidas na arte. Por exemplo, pode-se administrar uma proteína na presença de adjuvantes. O progresso da imunização pode ser monitorizado por detecção de títulos de anticorpos no plasma, ou soro. Pode-se utilizar o teste ELISA, ou outro imunoensaio convencional, com o imunogénio como antigénio, para determinar os níveis de anticorpos.

A seguir à imunização, podem-se obter antisoros e, se desejado, podem-se isolar os anticorpos a partir dos soros. A fim de produzir anticorpos monoclonais, podem-se recolher células que produzem anticorpos (linfócitos) de um animal imunizado e fundir com células de mieloma, por processos convencionais de fusão de células somáticas, imortalizando assim estas células e obtendo-se células de hibridoma. Estas técnicas são bem conhecidas na arte. Por exemplo, a técnica de hibridoma originalmente desenvolvida por Kohler e Milstein (*Nature* (1975) 256:495-497), bem como outras técnicas como a técnica do hibridoma de células B humanas (Kozbar et al., *Immunol. Today* (1983) 4:72), a técnica EBV-hibridoma para produzir anticorpos monoclonais humanos (Cole et al. *Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy* (1985) (Allen R. Bliss, Inc. páginas 77-96) e pesquisa de bibliotecas

combinadas de anticorpos (Huse et al., *Science* (1989) 246:1275). As células de hibridoma podem ser pesquisadas imunoquimicamente, quanto à produção de anticorpos especificamente reactivos com a proteína ou péptido e anticorpos monoclonais isolados.

O termo anticorpo, tal como aqui utilizado, inclui fragmentos seus derivados que são especificamente reactivos com uma proteína gp39, ou péptido seu derivado, ou proteína de fusão gp39. Os anticorpos podem ser fragmentados utilizando técnicas convencionais e pode-se pesquisar a utilidade dos fragmentos, do mesmo modo que acima descrito para anticorpos totais. Por exemplo, podem-se produzir fragmentos F(ab')2 por tratamento de anticorpos com pepsina. O fragmento F(ab')2 resultante pode ser tratado para reduzir as pontes dissulfureto, para produzir fragmentos Fab'. O anticorpo de acordo com a presente invenção inclui ainda moléculas biespecíficas e quiméricas com uma porção anti-gp39.

Quando se utilizam anticorpos produzidos em indivíduos não humanos, em aplicações terapêuticas em humanos, eles são reconhecidos em vários graus como estranhos e poder-se-á produzir uma resposta imune no paciente. Uma aproximação para minimizar ou eliminar este problema, que é preferível à imunossupressão geral, é a produção de derivados quiméricos de anticorpos, i.e. moléculas de anticorpos que combinam uma região variável animal, não-humana, e uma região constante humana. As moléculas de anticorpo quiméricas podem incluir, por exemplo, o domínio de ligação ao antigénio de um anticorpo de um rato, ratinho ou outra espécie, com regiões constantes humanas. Foram já descritas diversas aproximações para a produção de anticorpos quiméricos e estas podem ser utilizadas para produzir anticorpos quiméricos, que contêm a região variável da imunoglobulina que reconhece a gp39. Veja-se, por exemplo, Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851 (1985); Takeda et al., *Nature* 314:452 (1985), Cabilly et al., Patente U.S. No., 4,816,567; Boss et al., Patente U. S. No.

4,816,397; Tanaguchi et al., Patente europeia EP171496; Patente Europeia 0173494, Patente do Reino Unido GB 2177096B. É esperado que estes anticorpos quiméricos sejam menos imunogénicos num indivíduo humano, do que o anticorpo não quimérico correspondente.

Para fins terapêuticos em humanos, os anticorpos monoclonais ou quiméricos especificamente reactivos com uma proteína gp39 ou péptido podem ser ainda humanizados, produzindo quimeras de regiões variáveis humanas, em que partes das regiões variáveis, especialmente as regiões de sequência conservada do domínio de ligação ao antigénio, são de origem humana e apenas as regiões hipervariáveis são de origem não humana. Estas moléculas de imunoglobulina alteradas podem ser produzidas por qualquer de várias técnicas conhecidas na arte (e.g. Teng et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:7308-7312 (1983); Kozbor et al. *Immunology Today*, 4:7279 (1983); Olsson et al., *Meth Enzymol.* 92:3-16 (1982)) e são preferencialmente produzidas de acordo com os ensinamentos da publicação PCT WO 92/06193 ou EP 0239400. Os anticorpos humanizados podem ser produzidos comercialmente, por exemplo, pela Scotgen Limited, 2 Holly Road, Twickenham, Middlesex, Grã-Bretanha.

Um outro método para a produção de anticorpos específicos, ou fragmentos de anticorpos, reactivos contra uma proteína gp39 ou péptido, é pesquisar bibliotecas de expressão de genes que codificam para imunoglobulinas, ou porções suas derivadas, expressas em bactérias, com uma proteína ou péptido gp39. Por exemplo, os fragmentos Fab completos, regiões VH e regiões FV podem ser expressos em bactérias utilizando bibliotecas de expressão de fagos. Veja-se por exemplo, Ward et al., *Nature* 341:544-546 (1989); Huse et al., *Science* 246:1275-1281 (1989) e McCafferty et al. *Nature*, 348:552-554 (1990). A pesquisa destas bibliotecas com, por exemplo, um péptido gp39, pode identificar fragmentos de imunoglobulina reactivos com gp39. Alternativamente, pode-se utilizar o rato SCID-hu (disponível

da Genpharm) para produzir anticorpos, ou fragmentos seus derivados.

As metodologias para a produção de anticorpos monoclonais direccionados contra gp39, incluindo gp39 humano e de rato, e anticorpos monoclonais adequados para utilização nos métodos de acordo com a invenção, são descritos em maior pormenor no exemplo 6. Os anticorpos anti-gp39 humano de acordo com a invenção particularmente preferidos, são o mAc 24-31, produzido, respectivamente, pelo hibridoma 24-31.

Podem-se produzir anticorpos anti-gp39 recombinantes, tais como anticorpos quiméricos e humanizados, por manipulação de ácidos nucleicos (e.g. ADN), que codificam para um anticorpo anti-gp39, de acordo com técnicas convencionais de ADN recombinante. Deste modo, um outro aspecto da presente invenção diz respeito a moléculas de ácidos nucleicos isolados, que codificam para as cadeias pesada ou leve de imunoglobulinas, ou porções suas derivadas, reactivas com gp39, particularmente a gp39 humana. O ácido nucleico que codifica para a imunoglobulina pode codificar uma região variável da cadeia leve ou pesada da imunoglobulina, com ou sem uma região constante de cadeia pesada ou leve ligada (ou porção sua derivada). Este ácido nucleico pode ser isolado a partir de uma célula (e.g. hibridoma) que produz um mAc anti-gp39 humano, por técnicas convencionais. Por exemplo, o ácido nucleico que codifica para o mAc 24-31 pode ser isolado a partir do hibridoma 24-31 por pesquisa de uma biblioteca de ADNc, amplificação por PCR ou outras técnicas convencionais. Após o isolamento, e possível manipulação subsequente, o ácido nucleico que codifica para um mAc anti-gp39 humano pode ser incorporado num vector de expressão e introduzido numa célula hospedeira, para facilitar a expressão e produção de formas recombinantes de anticorpos anti-gp39 humano.

B. Ligandos para gp39 solúveis

Outros antagonistas de gp39 que podem ser utilizados para induzir tolerância em células T são formas solúveis de um ligando de gp39. Um ligando de gp39 solúvel, monovalente, tal como CD40 solúvel, pode-se ligar a gp39, inibindo desse modo a interacção do gp39 com o CD40 nas células B. O termo "solúvel" indica que o ligando não está permanentemente associado com a membrana celular. Pode-se preparar um ligando de gp39 solúvel, por síntese química ou, preferencialmente, por técnicas de ADN recombinante, por exemplo, através da expressão de apenas o domínio extracelular (estando ausentes os domínios transmembranar e citoplasmático) do ligando. Um ligando de gp39 solúvel preferido é o CD40 solúvel. Alternativamente, um ligando de gp39 solúvel pode ser na forma de uma proteína de fusão. Esta proteína de fusão compreende pelo menos uma porção do ligando de gp39 ligada a uma segunda molécula. Por exemplo, o CD40 pode ser expresso como uma proteína de fusão com imunoglobulina (i.e. uma proteína de fusão CD40Ig). Numa concretização, produz-se uma proteína de fusão que compreende resíduos de aminoácidos de uma porção de domínio extracelular da molécula de CD40, ligada a resíduos de aminoácidos de uma sequência que corresponde à zona de "dobradiça" ("hinge"), as regiões CH2 e CH3 de uma cadeia pesada de imunoglobulina, e.g. Cγ1, de modo a formar uma proteína de fusão CD40Ig (veja-se e.g., Linsley et al. (1991), *J. Exp Med.* 1783:721-730; Capon et al., (1989) *Nature* 337, 525-531 e Capon U.S. 5,116,964). A proteína de fusão pode ser produzida por síntese química, ou, preferencialmente, por técncias de ADN recombinante, baseadas no ADNc de CD40 (Stamenkovic et al., *EMBO J.* 8:1403-1410 (1989)).

II. Células para a indução de tolerância a antigénios específicos

A presente invenção baseia-se, pelo menos em parte, na descoberta de que a apresentação de um antigénio a uma célula T, por uma célula que apresenta o antigénio e também interage com a gp39, resulta numa tolerância das células T a antigénios

específicos, quando o antigénio é apresentado à célula T na presença de uma antagonista de gp39. As células capazes de induzir tolerância em células T, requerem a interacção entre um ligando gp39 na célula e a gp39 na célula T, de modo a fornecer os sinais necessários, à célula T, para a activação de células T. A inibição desta interacção impede a activação das células T pelo antigénio apresentado, e induz, em vez disso, uma tolerância específica ao antigénio nas células T. Uma interferência com a activação da célula T através da gp39 impede a indução de moléculas co-estimuladoras na célula que apresenta o antigénio (e.g. moléculas da família B7 numa célula que apresenta antigénios, como uma célula B), de modo que a célula que apresenta antigénios fornece apenas um sinal antigénico na ausência de um sinal co-estimulador, induzindo deste modo tolerância.

Assim, nos métodos de acordo com a invenção, administra-se uma célula que apresenta antigénio ao indivíduo receptor. A frase "célula que apresenta antigénios" e "célula apresentadora de antigénios" são aqui utilizados de forma interpermutável e pretendem englobar células que possam apresentar antigénios a células T do receptor e incluem linfócitos B, células que apresentam antigénios "profissionais" (e.g. monócitos, células dendríticas, células de Langerhan) e outras células que apresentam antigénios às células imunes (e.g. queranócitos, células endoteliais, astrócitos, fibroblastos, oligodendrócitos). Para além disso, é preferido que a célula que apresenta antigénio tenha uma capacidade reduzida de estimular um sinal co-estimulatório nas células T receptoras. Por exemplo, a célula que apresenta antigénios poderá não ter expressão, ou expressar apenas níveis reduzidos de moléculas co-estimulatórias, como a família B7 de proteínas (e.g. B7-1 e B7-2). A expressão de moléculas co-estimulatórias em células que apresentam antigénios, a serem potencialmente utilizadas no método de acordo com a invenção, pode ser determinada por técnicas

convencionais, por exemplo por citometria de fluxo, utilizando anticorpos direccionados contra moléculas co-estimulatórias.

As células que apresentam antigénios preferidas para a indução de tolerância em células T são as células linfóides, por exemplo linfócitos de sangue periférico, ou esplenócitos. As células linfóides preferidas para a indução de tolerância em células T são as células B. As células B podem ser purificadas a partir de uma população mista de células (e.g. outros tipos de células no sangue periférico, ou baço), por técnicas convencionais de separação de células. Por exemplo, as células aderentes podem ser removidas por cultura de esplenócitos em placas de plástico e recuperação da população de células não aderentes. As células T podem ser removidas a partir de uma população mista de células, por tratamento com um anticorpo anti-células T (e.g. anti-Thy 1.1 e/ou anti-Thy1.2) e complemento. Numa concretização, as células linfóides em repouso, de preferência as células B em repouso, são utilizadas como células que apresentam antigénios. As células linfóides em repouso, como as células B em repouso, podem ser isoladas por técnicas conhecidas na arte, por exemplo baseadas no seu tamanho reduzido e densidade. As células linfóides em repouso podem ser isoladas, por exemplo, por eluição centrífuga de contra-corrente, como descrito em Tony, H-P e Parker, D.C. (1985) *J. Exp Med* 161:223-241.

Utilizando a técnica de eluição centrífuga de contra-corrente, pode-se obter uma população pequena de células linfóides em repouso, depletada de células que podem activar respostas de células T, através da recolha de uma fracção(ões) a 14-19 ml/min, de preferência 19 ml/min (a 3200 rpm). Alternativamente, podem-se isolar linfócitos em repouso, pequenos (e.g. células B), por centrifugação em gradiente de densidade descontínuo, por exemplo utilizando um gradiente de Ficoll ou Percoll, e pode-se obter uma camada contendo linfócitos em repouso, pequenos, após centrifugação. As células B em repouso, pequenas, também podem ser distinguidas

das células B activadas, testando a expressão de moléculas co-estimulatórias, como B7-1 e/ou B7-2, na superfície de células B activadas, por técnicas convencionais (e.g. imunofluorescência).

A célula que apresenta antigénios, como a célula B, pode entrar em contacto com um antigénio (e.g. uma proteína solúvel) antes do contacto com a célula T (e.g., antes da administração a um indivíduo) e a célula pode ser utilizada para apresentar o antigénio à célula T, na presença de um antagonista de gp39, para induzir tolerância em células T a antigénios específicos (veja-se Exemplo 1). Alternativamente, pode-se induzir tolerância a aloantigénios utilizando uma célula alogénica como célula que apresenta antigénios (veja-se exemplos 2 e 3). A célula alogénica apresenta fragmentos antigénicos de proteínas alogénicas, às células T. Numa concretização, a célula alogénica é uma célula linfóide alogénica, como uma célula B alogénica. Alternativamente, pode-se tornar um indivíduo tolerante, com células de sangue periférico (e.g. linfócitos de sangue periférico), esplenócitos ou células de medula óssea. No caso do transplante de medula óssea, as células de medula óssea dadoras podem servir elas próprias como células que apresentam antigénios, que entram em contacto com as células T (e.g., administradas a um indivíduo). Deste modo, pode-se administrar medula óssea alogénica juntamente com um antagonista de gp39, para induzir tolerância à medula óssea num receptor e para evitar a doença enxerto versus hospedeiro (veja-se Exemplos 4 e 5).

III. Administração de células e antagonistas gp39

Pode-se induzir tolerância em células T a antigénios específicos, de acordo com a invenção, por administração de um antagonista de gp39 a um indivíduo, juntamente com uma célula que apresenta antigénios a uma célula T e expressa um ligando que interage com a gp39 na célula T. Numa concretização

preferida, a célula que apresenta antigénios e o antagonista de gp39 são administrados em simultâneo, ou contemporaneamente. Alternativamente, o antagonista de gp39 pode ser administrado antes da administração das células, por exemplo, quando o antagonista é um anticorpo com uma semi-vida longa. No caso em que as células a ser administradas são células de medula óssea, em que é desejada uma inibição da doença enxerto-versus-hospedeiro, as células T dadoras podem ser tornadas tolerantes na medula óssea, antes da transferência para um hospedeiro receptor, através da incubação da medula óssea dadora com células B do hospedeiro e um antagonista de gp39, *in vitro*. O tratamento com gp39 pode ser continuado *in vivo* durante e após a transferência de medula óssea, se necessário. Em indivíduos que irão receber uma medula óssea ou outro transplante de orgãos, pode-se induzir tolerância alogénica ao transplante num indivíduo, por tratamento com um regime que induz tolerância alogénica, antes da transferência do orgão, ou células de medula óssea. Este regime de pré-tratamento pode envolver a administração a um indivíduo de células do dador, juntamente com um antagonista de gp39. As células do dador podem ser, por exemplo, células B, sangue periférico total ou alguma fracção sua derivada (e.g. linfócitos de sangue periférico, ou linfócitos em repouso de pequena dimensão, ou células B).

Tem-se verificado que a administração de uma única dose de células que apresentam antigénios (em combinação com o antagonista) é suficiente para induzir tolerância em células T (veja-se exemplos). O número de células que apresentam antigénios a ser administrado pode variar, dependendo do tipo de célula utilizada, do tipo de enxero de tecido ou orgão, do peso do receptor, da condição geral do receptor e outras variáveis conhecidas do perito na arte. O número de células adequado para utilização no método de acordo com a invenção pode ser determinado por qualquer perito na arte, por métodos convencionais (por exempolo utilizando os testes descritos nos exemplos). As células são administradas numa forma e por uma

via que seja adequada para a indução de tolerância num receptor. As células podem ser administradas numa solução fisiologicamente aceitável, tal como uma solução salina tamponada, ou veículo semelhante. As células são preferencialmente administradas intravenosamente.

Administra-se um antagonista de acordo com a invenção a indivíduos, numa forma biologicamente compatível, adequada para administração farmacêutica *in vivo* para induzir tolerância em células T. O termo "forma biologicamente compatível, adequada para administração *in vivo*" designa uma forma do antagonista a ser administrado, para a qual quaisquer efeitos tóxicos são compensados pelos efeitos terapêuticos da proteína. O termo indivíduo pretende incluir organismos vivos em que pode ser produzida uma resposta imune, e.g. mamíferos. Exemplos de indivíduos incluem os humanos, cães, ratos, ratinhos e espécies transgénicas suas derivadas. Pode-se administrar um antagonista de gp39 numa forma farmacológica, opcionalmente num veículo farmaceuticamente aceitável. A administração de uma quantidade terapeuticamente activa de antagonista é definida como uma quantidade eficaz, em dosagens e por períodos de tempo necessários para se obter o resultado desejado. Por exemplo, uma quantidade terapeuticamente activa de um antagonista de gp39 pode variar de acordo com factores como o estado da doença, idade, sexo e peso do indivíduo, e da capacidade do antagonista produzir a resposta desejada no indivíduo. O regime de dosagem poderá ser ajustado de modo a proporcionar uma resposta terapêutica óptima. Por exemplo, podem-se administrar várias doses divididas diariamente, ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida, como seja indicado pelas exigências da situação terapêutica.

O composto activo (e.g. antagonista) pode ser administrado numa forma conveniente, por exemplo por injecção (subcutânea, intravenosa, etc.), administração oral, inalação, aplicação transdérmica ou administração rectal. Dependendo da via de administração, o composto activo pode ser revestido num

material para proteger o composto da acção de enzimas, ácidos e outras condições naturais, que podem inactivar o composto. Uma via de administração preferida é a injecção intravenosa.

A fim de administrar um antagonista de gp39 por outra via de administração que não a parentérica, pode ser necessário revestir o antagonista, ou co-administrar o antagonista com um material, a fim de evitar a sua inactivação. Por exemplo, pode-se administrar um antagonista a um indivíduo num veículo ou diluente adequado, co-administrar com inibidores de enzimas ou num veículo adequado, como lipossomas. Os diluentes farmaceuticamente adequados incluem soluções tampão salinas e aquosas. Os inibidores de enzimas incluem o inibidor de tripsina pancreática, diisopropilfluorofosfato (DEP) e trasilol. Os lipossomas incluem emulsões água-em-óleo-em-água, bem como lipossomas convencionais (Strejan et al., (1984) *J. Neuroimmunol* 7:27).

O composto activo pode ser também administrado parentérica ou intraperitonealmente. As dispersões podem ser também preparadas em glicerol, polietilenoglicóis líquidos e misturas suas derivadas e em óleos. Em condições normais de armazenamento e utilização, estas preparações podem conter um preservante para evitar o crescimento de microorganismos.

As composições farmacêuticas adequadas para utilização injectável, incluem soluções aquosas estéreis (quando solúveis em água), ou dispersões e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções, ou dispersões injectáveis estéreis. Em todos os casos, a composição deverá ser estéril e fluida, na medida em que permita uma fácil injecção através da seringa. Deverá ser estável nas condições de fabrico e armazenamento e deverá ser preservada contra a acção de microorganismos contaminantes, como bactérias e fungos. O veículo pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, um poliol (por exemplo glicerol, propileno glicol e polietilenoglicol líquido e semelhantes) e

misturas suas derivadas adequadas. Pode-se manter a fluidez adequada, por exemplo, através da utilização de um revestimento como lecitina, através da manutenção do tamanho de partícula necessário, no caso da dispersão, e através da utilização de agentes tensio-activos. A prevenção da acção de microorganismos pode ser conseguida por vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabens, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal e semelhantes. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotónicos, por exemplo, açúcares, poliálcoois como o manitol, sorbitol, cloreto de sódio na composição. A absorção prolongada de composições injectáveis pode ser conseguida incluindo na composição um agente que atrasa a absorção, por exemplo, o monoestearato de alumínio e gelatina.

As soluções injectáveis estéreis podem ser preparadas através da incorporação de um composto activo (e.g. um antagonista de gp39) na quantidade necessária, num solvente adequado com um, ou uma combinação dos ingredientes acima enumerados, como necessário, seguido de esterilização por filtração. De um modo geral, as dispersões são preparadas incorporando o composto activo num veículo estéril que contém um meio de dispersão base e os outros ingredientes necessários, de entre os acima enumerados. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injectáveis estéreis, os métodos preferidos de preparação são a secagem por vácuo e liofilização, que originam um pó do ingrediente activo (e.g. antagonista) e de qualquer ingrediente desejado adicional, de uma solução sua derivada, anteriormente esterilizada por filtração.

Quando o composto activo é protegido de forma adequada, como acima descrito, a proteína pode ser administrada oralmente, por exemplo, com um diluente inerte ou um veículo comestível, assimilável. Tal como aqui utilizado, o termo "veículo farmaceuticamente aceitável" inclui qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes de isotonicidade e

agentes retardadores da absorção e semelhantes. A utilização destes meios e agentes para substâncias farmaceuticamente activas é bem conhecida na arte. Excepto no caso em que um meio ou agente convencional é incompatível com o composto activo, a sua utilização em composições terapêuticas é contemplada.

É especialmente vantajoso formular composições parentéricas na forma de dosagens unitárias, para facilidade de administração e uniformidade da dosagem. A forma de dosagem unitária, tal como aqui utilizada, refere-se a unidades fisicamente discretas, adequadas como dosagens unitárias para os indivíduos mamíferos a ser tratados; cada unidade contém uma quantidade pré-determinada de composto activo, calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o veículo farmacêutico necessário. A especificação para as formas de dosagem unitárias de acordo com a invenção são ditadas e directamente dependentes de (a) características únicas do composto activo e do efeito terapêutico particular a ser atingido e (b) limitações inerentes à arte de formular composições destes compostos activos para o tratamento de sensibilidade em indivíduos.

Para além de tornar as células T tolerantes *in vivo*, a invenção contempla também a situação de tornar as células T tolerantes *in vitro*, e.g., através do contacto com uma célula que apresenta antigénios, na presença de um antagonista de gp39. Por exemplo, podem-se obter células T a partir de um indivíduo, torná-las tolerantes *in vitro* por cultura com células que apresentam antigénios e com o antagonista, e em seguida re-administrá-las ao indivíduo.

IV Utilização do método de acordo com a invenção

Os métodos de acordo com a invenção podem ser aplicados para induzir tolerância em células T a uma variedade de antigénios. Por exemplo, pode-se induzir tolerância em células

T a um antigénio solúvel (e.g. uma proteína solúvel), como descrito no Exemplo 1. As células T podem ser tornadas tolerantes a antigénios envolvidos em doenças ou desordens auto-imunes, associadas com respostas imunes anormais. Por exemplo, numa concretização, o antigénio é um autoantigénio. Noutra concretização, o antigénio é um alergénio. Alternativamente, as células T podem ser tornadas tolerantes a antigénios expressos em células estranhas (como descrito nos exemplos 2 a 5). Em acordo, ainda noutras concretizações, o antigénio é um aloantigénio ou xenoantigénio. A indução de tolerância de células T a aloantigénios e xenoantigénios tem utilização particular no transplante, por exemplo para inibir a rejeição, por parte de um receptor de transplante, de um enxerto de um dador, e.g., um enxerto de tecido ou orgão, ou transplante de medula óssea. Adicionalmente, tornar as células T do dador tolerantes num enxerto de medula óssea é útil na inibição da doença enxerto versus hospedeiro (veja-se Exemplo 5).

A invenção é melhor ilustrada pelos exemplos seguintes, que não são limitativos. Os conteúdos de todas as referências, patentes e pedidos de patentes publicados, citados ao longo deste pedido, são aqui incorporados para referência.

EXEMPLO 1 Indução de tolerânica a antigénios específicos

Métodos

Imunizaram-se ratos com linfócitos B do baço, pulsados com KLH durante 5 dias. Durante a primeira imunização, os animais ou não foram tratados ou foram tratados com um anticorpo anti-gp39 MR1. Cinco dias após a imunização inicial, os ratos foram desafiados localmente (almofada da pata) com KLH, em adjuvante de Freund completo (CFA). Sacrificaram-se os ratos 5 dias mais tarde, removeram-se os nódulos linfáticos de drenagem e testou-se subsequentemente, *in vitro*, a resposta proliferativa das células T, ao KLH.

Resultados

Os animais imunizados com linfócitos B activados, pulsados com antigénio e subsequentemente desafiados com o mesmo antigénio, desenvolvem respostas imunes significativas ao antigénio imunizante. A resposta, medida por proliferação de linfócitos T específicos de antigénios, é apresentada na figura 1. O tratamento de animais com um anticorpo anti-gp39 durante a imunização primária resulta numa não resposta dos linfócitos T específicos para antigénios, por desafio *in vitro* com antigénios. Os linfócitos T obtidos a partir de nódulos linfáticos de animais tratados com um anticorpo anti-gp39, mostram uma capacidade proliferativa diminuída, quando comparados com linfócitos T obtidos de nódulos linfáticos de animais não tratados.

EXEMPLO 2 Indução de tolerância em células T a células alogénicas

Métodos

Imunizaram-se ratos Balb/c ($H\text{-}2^d$) com esplenócitos B alogénicos de ratos DBA/2 ($H\text{-}2^b$). Os animais foram tratados com um anticorpo anti-gp39, MR1, ou não foram tratados, durante 5 dias após imunização. Ao dia 6, os animais foram sacrificados e removeram-se os baços. Fez-se em seguida a cultura *in vitro* dos esplenócitos de animais tratados com anticorpo anti-gp39, ou não tratados, quer sem estímulo, quer com esplenócitos DBA/2 irradiados. A resposta proliferativa a este estímulo alogénico secundário foi medida ao dia 3 após o início da cultura.

Resultado

Os linfócitos T de animais imunizados com esplenócitos B alogénicos têm respostas proliferativas fortes, quando desafiados 5 dias mais tarde com as mesmas células *in vitro* (Figura 2). No entanto, os linfócitos T de ratos imunizados

com esplenócitos B alogénicos e tratados com um anticorpo anti-gp39 têm uma capacidade proliferativa diminuída, quando desafiados subsequentemente *in vitro*. Os ratos tratados com anticorpos anti-gp39 exibem um decréscimo de aproximadamente 50% na resposta ao desafio, comparado com os ratos controlo não tratados.

EXEMPLO 3 O tratamento com anti-gp39 interfere com a produção de respostas CTL a células B alogénicas

Neste exemplo, investigou-se o papel do gp39 na produção de células T citotóxicas (CTL). Para determinar a função do gp39 *in vivo*, no desenvolvimento de CTL, avaliaram-se os efeitos do tratamento anti-gp39 na produção de CTL aloespecífico, por imunização com células B alogénicas. Determinaram-se os efeitos do tratamento anti-gp39, quer de respostas CTL primárias, quer secundárias.

Respostas primárias de CTL

De modo a testar se o anti-gp39 pode impedir as células B alogénicas de produzir respostas CTL aloespecíficas *in vivo*, administraram-se células B alogénicas (esplenócitos depletados de T) a ratos receptores, com ou sem anti-gp39. Imunizaram-se ratos Balb/c fêmea (fêmea, 6-8 semanas de idade, Laboratórios Jackson, Bar Harbor, ME) com esplenócitos de C57BL/6 (fêmeas, 6-8 semanas de idade, Laboratórios Jackson, Bar Harbor, ME) ($30-50 \times 10^6$) depletados de células T por anti-Thy1.2 (ascites preparadas a partir do clone HO13.4 da ATCC) e tratados com complemento de coelho. Estes ratos receptores em seguida, ou foram não tratados, ou foram tratados com anti-gp39 durante 5 dias (250 mg/recipiente aos dias 0, 2 e 4). Ao dia cinco, removeram-se os baços e mediram-se as respostas CTL, utilizando o teste de libertação do crómio de 4 horas. Utilizaram-se os esplenócitos de ratos Balb/c não pré-imunizados como células efectoras de controlo negativo. As células alvo utilizadas eram K1 de fêmeas E (linfoma de

células T de H-2^b, derivado da estirpe C57BL/6) e P815 (H-2^d, mastocitoma, derivado da estirpe DBA/2J). As células alvo marcadas com ^{51}Cr foram lavadas e plaqueadas a 1 x 10^4 células por poço, em placas de 96 poços, com células efectoras, com razões efector:alvo (E:T) de 100:1, 20:1, e 4:1. As placas foram centrifugadas por pouco tempo e em seguida incubadas a 37°C em 5% de CO_2, durante 4 horas. As placas foram mais uma vez centrifugadas e recolheram-se 100 ml de sobrenadante isento de células de cada poço, para contagem gama (LKB Clinigama, Wallace Inc., Gaithersburg, MD). A percentagem de lise específica é definida como (a-b)/c em que a = cpm libertados pelas células alvo incubadas com células efectoras, b = cpm libertados pelas células alvo incubadas apenas com meio (libertação espontânea) e c = cpm libertados por congelamento-descongelamento de células alvo (aproximadamente 80% dos cpm totais incorporados). Os alvos P815 não foram lisados por quaisquer amostras de células testadas. Os resultados para os alvos K1 de fêmea E são ilustrados na figura 3A, em que os grupos apresentados são ratos não tratados (■), ratos tratados com anti-gp39 (Δ) e esplenócitos de ratos Balb/c não pré-imunizados (•; utilizado como células efectoras de controlo negativo). Os resultados demonstram que os ratos que receberam anti-gp39 e células alogénicas não produziram uma resposta CTL primária *in vivo*, em resposta a células B alogénicas. Pelo contrário, na ausência de anti-gp39, as células B alogénicas sensibilizaram o receptor para o aloantigénio e induziram uma resposta CTL substancial.

A fim de determinar se o anti-gp39 poderia apenas amplificar o efeito de tolerância de esplenócitos B não activados, utilizaram-se células B activadas por LPS, para pré-imunizar, desencadeando a formação de CTL, na presença ou ausência de anti-gp39. As células B de ratos C57BL/6 foram preparadas como acima descrito e fez-se a cultura durante 2 dias na presença ou ausência de lipopolissacáridos (LPS; 50 mg/ml; Sigma Diagnostics St. Louis, MO). Recolheram-se em seguida as células, lavaram-se e injectaram-se i.p. (30-50 x

10^6) em ratos Balb/c receptores. Os ratos receptores ou não eram tratados, ou eram tratados com anti-gp39 aos dias 0, 2 e 4, como acima descrito. Ao dia 5 removeram-se os baços e determinaram-se as respostas CTL, como acima descrito. Os resultados de duas experiências independentes são apresentados na Figura 3B (painéis superior e inferior). Os grupos representados são blastos LPS *in vivo*, sem tratamento (>), blastos LPS *in vivo* com tratamento anti-gp39 (•), células B em repouso *in vivo* sem tratamento (o) e células B em repouso *in vivo* sem tratamento anti-gp39 (□). Estes resultados indicam que, embora não completo, o tratamento com anti-gp39 também reduz a resposta CTL primária aos blastos LPS alogénicos.

Respostas CTL secundárias

De modo a examinar o impacto da administração de anti-gp39 e células B alogénicas na formação de CTL, as células do baço de ratos, tratados e não tratadas, foram estimuladas *in vitro* e analisou-se o âmbito de respostas CTL. Os ratos Balb/c foram pré-imunizados in vivo com células B derivadas de C57BL/6, como acima descrito. Removeram-se os esplenócitos dos animais tratados com anti-gp39 e com Ig de Hamster (HIg) e fez-se a cultura de 5 x 10^6 células/ml durante 5 dias ("os que respondem"-"responders"), com várias estirpes de esplenócitos B tratados com mitomicina C (2,5 mg/ml a 37°C, Sigma Diagnostics, St. Louis, MO) (preparadas por tratamento anti-Thy1.2 + complemento) a 5 x 10^6 estimuladores/ml. Os grupos de estimuladores eram C57BL/6(H-2^b) e Balb/c(H-2^d), o que indica a resposta alogénica secundária e a resposta singénica primária, respectivamente. Fez-se a cultura das células estimuladoras e que respondem, em meio RPMI-1640 de sensibilização, preparado de fresco (Bio Wittaker, Walkersville, MD), 2-mercaptoetanol 1 x 10^5 M (Laboratórios Bio-Rad, Hercules, CA), L-glutamina 2 mM (Sigma diagnostics, St. Louis, MO), penicilina 500 U/ml e estreptomicina 5000 U/ml (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO). Após 5 dias, as células que respondem foram recolhidas e removeram-se as células mortas por centrifugação num gradiente

de densidade. As células vivas resultantes foram utilizadas como efectores num teste CTL, como descrito acima. Os alvos incluiam K1 de fêmeas E (H-2^b, linfoma de células T derivado da estirpe C57BL/6) e P815 (H-2^d, mastocitoma, derivado da estirpe DBA/2J). Os resultados são ilustrados na Figura 4A. Os grupos efectores estimulados alogénicos apresentados são: receptores tratados com HIg (•), Balb/c nativos (>) e receptores tratados com anti-gp39 (■). As respostas isogénicas correspondentes (Células Balb/c estimuladas com células Balb/c) são indicadas por símbolos abertos. Tal como previsto, a imunização *in vivo* de ratos, com esplenócitos depletados de T alogénicos (H-2^b), na ausência de tratamento anti-gp39, resultou numa resposta CTL secundária forte *in vitro*. Esta resposta de CTL anti-H-2^b aumentada, não era observada quando os ratos recebiam anti-gp39 *in vivo*.

A fim de determinar a especificidade da inibição das respostas CTL por tratamento anti-gp39, analisaram-se as culturas de esplenócitos acima descritas quanto a respostas anti-H-2^k-alogénico (respostas alogénicas de terceira parte) utilizando esplenócitos B B10BR (H-2^k) como estimuladores e SL8 (H-2^k, linfoma de células T espontâneo, derivado da estirpe AKR) como alvos, no teste CTL. Os resultados são apresentados na Figura 4B. Os grupos apresentados são Balb/c nativos (o) e receptores tratados com anti-gp39 (■). Os resultados demonstram que a inibição de respostas CTL específicas de anti-H2^b por tratamento anti-gp39 era aloespecífica, uma vez que a administração de esplenócitos H-2^b e anti-gp39 não alterou a resposta CTL *in vitro* a um aloantigénio espectador (H-2^k).

Em conjunto, estes dados mostram que o anti-gp39 interfere com a produção de respostas CTL aloespecíficas (tanto primárias, como secundárias). Na presença de anti-gp39, os precursores específicos para o aloantigénio relevante estão ainda presentes, uma vez que se pode demonstrar alguma actividade CTL anti-H-2^b na cultura secundária *in vitro*. Pode-se concluir que o tratamento anti-gp39 reduziu a resposta

secundária *in vitro*, através do bloqueamento da pré-imunização para indução de CTL, ou reduzindo a frequência de CTL aloespecífico pré-imunizado. A utilização de células B em repouso não é imperativa para demonstrar a não resposta, uma vez que a resposta CTL alogénica induzida pelos blastos LPS era também impedida pelo anti-gp39.

EXEMPLO 4 A transferência de medula óssea de murídeo alogénica induz quimeras estáveis, quando os receptores são tratados com um anticorpo para gp39.

O tratamento de muitas desordens hematológicas que não podem ser curadas com métodos de quimioterapia convencionais, envolve a transferência de medula óssea alogénica. Esta terapia agressiva envolve a administração de doses elevadas, mieloablativas, de quimioterapia, juntamente com a perfusão de medula óssea alogénica, permitindo a erradicação de células de tumor clonogénicas.

Já se verificou que a irradiação do timo, que elimina as células T do timo, aumenta a incidência de quimeras estáveis, quando se utilizam os anticorpos monoclonais (mAcs) para as células T, incluindo o anti-CD4. Este regime de anticorpos conduziu à eliminação de células T e assim à tolerância específica do dador, o que pode ser indicado pela tolerância aos enxertos de pele do dador. Uma falha em conseguir um enxerto alogénico permanente após tratamento com mAc anti-células T de 300 rad WBI *in vivo* e administração de medula óssea alogénica, poderá ser resultado das células T do timo que não foram não afectadas. A utilização de mAcs anti-CD4 e anti-CD8 pode conduzir à depleção efectiva de sangue periférico e esplenócitos T, mas as células T do timo são simplesmente revestidas com mAcs, e não eliminadas. Em conformidade, realiza-se uma irradiação do timo em ratos.

Métodos

Utilizou-se um modelo de murídeo para a transferência de medula óssea (BMT) dos F1 nos progenitores, de forma a evitar a indução da doença enxerto-versus-hospedeiro. Utilizou-se a estirpe CB6 F1 que são F1(C54BL/6 x Balb/c), resultando no haplotipo geral MHC de $H\text{-}2^{d/b}$. Removeu-se a medula óssea e injectou-se i.v. em progenitores Balb/c, com ou sem um anticorpo anti-gp39, MR1. Os níveis de irradiação de todo o corpo (WBI) foram variados, de modo a determinar o melhor nível de quimerismo e a comparar os animais tratados com anticorpo anti-gp39 e os não tratado, em cada nível de irradiação. O quimerismo foi determinado por análise de citometria de fluxo dos linfócitos de sangue periférico do haplotipo MHC $H\text{-}2^{b}$, presente no rato $H\text{-}2^{d}$(Balb/c). Foi anteriormente demonstrado que esta combinação de ratos é adequada e podem-se obter quimeras a níveis de WBI de 500 e 600 rads.

Resultados

A existência de quimerismo foi detectada por identificação de células ($H\text{-}2^{b}$) derivadas de C57BL/6 por citometria de fluxo. Verificou-se que o quimerismo se desenvolve em ratos irradiados com 400, 500 e 600 de irradiação corporal total em 14 dias, apenas quando tratados com anticorpo anti-gp39 desde o início do estudo. Os ratos que não receberam nenhum tratamento com anticorpo, rejeitaram as células a todos os níveis de irradiação, excepto quando lhes foi dado 600 de irradiação corporal total, altura em que aceitaram a medula óssea na mesma extensão que o grupo tratado com anticorpo a 400 rads (Tabela 1). Verificou-se que o nível de quimerismo após 6 semanas de terapia a 400, 500 e 600 rads, com terapia de anticorpo anti-gp39 era de 70,7 + 5,74, 94,1 e 84,4 + 8,56, respectivamente, enquanto que para 600 rads, sem qualquer tratamento, se verificou que eram 85,7 + 5,9 quiméricos (Tabela 2). A determinação fenotípica das células neste ponto, indicou que as células T, células B e macrófagos eram todas quimerisadas na mesma extensão para 400 rads, quando tratados,

comparadas com os 600 rads, para o grupo não tratado (Tabela 2). Parece também que o tratamento com anticorpo anti-gp39 não alterou significativamente a percentagem total da população de quaisquer células linfóides na periferia. No final do tratamento dos animais com anticorpo anti-gp39, verificou-se que os animais eram quimericamente estáveis durante até 8 semanas pós transplante.

TABELA I

Nível de irradiação corporal total (rads)	No. de animais quiméricos tratados com tratamento anti-gp39	No. de animais quiméricos sem tratamento anti-gp39
0	0(5)	0(5)
200	0(5)	0(5)
400	9(9)	0(9)
450	3(5)	0(5)
500	4(5)	2(5)
600	7(9)	7(9)

Os níveis de irradiação corporal total resultaram em quimerismo. Os números entre parentesis indicam o número total de animais testados em cada nível.

TABELA 2

Rads.	Tratamento	II-$2K^{b+}$	células B II-$2K^{b+}$	células T II-$2K^{b+}$	Mac. II-$2K^{b+}$
400	+	70,7 ± 5,74	89 ± 2,6	45,9 ± 13,3	82,3 ± 3,3
500	+	94,1	100	89	100
600	+	84,4 ± 8,56	99,3 ± 0,94	72,3 ± 15,9	91,1 ± 8,3
600	-	85,7 ± 5,9	97,3 ± 1,77	67,1 ± 10,3	91 ± 9

Percentagem de células B, células T e macrófagos (Mac.) positivos para H-2Kb ± erro padrão

EXEMPLO 5: O transplante de medula óssea alogénica combinado com o tratamento do receptor com anti-gp39 inibe a doença de enxerto versus hospedeiro, crónica e aguda.

Utilizou-se a seguinte metodologia neste exemplo:

Ratos: os ratos DBA/2(H-2^d), C57BL/6(H-2^b) e B6D2F_1 (híbridos da F_1 (C57BL/6(H-2^d) x DBA/2) foram obtidos dos laboratórios NCI (Bethesda, Maryland) e mantidos num ambiente isento de vírus, no departamento animal da Dartmouth Medical School. Todos os ratos utilizados neste estudo eram fêmeas, e tinham 6 a 8 semanas de idade.

Indução de GVHD crónica: a GVHD crónica foi induzida por injecção i.v. de esplenócitos de progenitores (DBA/2) em receptores híbridos F_1 (C57BL/6 x DBA/2), não irradiados (Fast, L.D. (1990) *J. Immunol.* 144:4177). Os ratos progenitores foram anestesiados e mortos por deslocamento cervical, como preparação para a remoção do baço. Os esplenócitos dissociados foram lavados e resuspendidos em meio RPMI 1640 (Wittaker, Waldersville, Maryland), para injecção i.v. nos receptores F_1.

Indução de GVHD aguda: Induziu-se GVHD aguda por injecção i.v. de esplenócitos C57BL/6 progenitores em receptores híbridos F_1 (C57BL/6 x DBA/2), não irradiados. As células foram preparadas para a transferência, do mesmo modo que para a indução de GVHD crónica.

Anticorpos: Produziu-se anti-gp39:MR1 em ascites e purificou-se por HPLC de troca iónica, como anteriormente descrito (Foy, T.M et al., (1993) *J. Exp Med.* 178:1567-1575; Noelle, R.J. et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6550). Anticorpos policlonais anti-isotipo: Todos os anticorpos anti-IgG_1 e IgA e controlos padrão foram obtidos da Southern Biotechnology Associates, Inc. (Birmingham AL). Anticorpos Anti-IgE: Todos os anticorpos anti-IgE (BIE3 e Biotin AM95) e padrões (A3B1) utilizados em ELISA específico para IgE, foram gentilmente cedidos pelo Dr. T. Waldschmidt, IA. Anticorpos do haplotipo Anti-MHC: o anticorpo H-$2K^b$

conjugado com FITC e o anticorpo H-2D^d conjugado com biotina foram obtidos da PharMingen (Sand Diego, CA).

Linhas celulares: as linhas celulares utilizadas incluiram P815 (H-2^d) e LB27,4(H-2^{bxd}), que foram obtidas da American Type Culture Collection. A linha celular c1.18,5 (H-2^b) foi gentilmente cedida pelo Dr. William R. Green.

Produção de Ig policlonal in vitro: Removeram-se os esplenócitos de ratos controlo e cGVHD e prepararam-se suspensões de células isoladas. Trataram-se as células com cloreto de amónio tamponado com Tris, para remoção de eritrócitos e determinaram-se as contagens totais de glóbulos brancos por contagem visual num hemacitómetro. Incubaram-se as células (5 x 10^6) em 1ml de meio (c)RPMI-1640 completo (suplementado com 10% de soro fetal (Hyclone, Logan UT, HEPES 25 mM, L-glutamina 2 mM, penicilina 5000 U/ml e estreptomicina 5000 mg/ml) durante 3 dias a 37°C, 5% de CO_2. Os sobrenadantes das culturas foram recolhidos por sedimentação das células e quantificou-se a Ig por meio de um teste ELISA, específico para o isotipo.

ELISAs específicos para o isotipo e para o antigénio: *ELISA para a determinação de IgG$_1$ e IgA*. Absorveu-se IgG$_1$ ou IgA de cabra anti-rato (10 µg/ml; Southern Biotechonolgy Associates, Inc., Birmingham AL) em PBS, em poços de uma placa de microtítulo de polivinilo de 96 poços, durante 1 hora a 37°C e em seguida durante a noite a 4°C. Lavaram-se as placas e bloqueou-se com PBS contendo 1% de FCS, durante 1 hora a 37°C. Lavaram-se as placas mais uma vez e adicionaram-se as diluições adequadas dos sobrenadantes e controlos padrão (IgG$_1$ e IgA, Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham AL) durante 2 horas a 37°C. Após este período de tempo, lavaram-se as placas 3 vezes e adicionou-se IgG$_1$ ou IgA de cabra anti-rato, conjugado com fosfatase alcalina (diluições 1/5000) (Southern Biotechnology Associates, Inc. Birmingham Alabama) durante 2 horas a 37°C. Lavaram-se bem as placas e adicionou-se substracto de fosfatase (1 mg/ml; Sigma Diagnostics, St Louis,

MO), resultando na alteração de cor adequada. As leituras foram determinadas por um leitor de ELISA (Dynatech Laboratories, Inc.) a uma absorvância a 410 nm. Determinaram-se as concentrações de Ig por comparação com a curva padrão de isotipo adequada e expressaram-se como média + desvio padrão (n=3)

ELISA para a detecção de IgE: Revestiu-se uma placa de microtítulo de polivinilo de 96 poços com um anticorpo de captura IgE anti-rato (B1E3(2 mg/ml), durante a noite a 4°C e em seguida bloqueou-se com PBS contendo 1% de FCS, durante 1 hora a 37°C. As placas foram mais uma vez lavadas e adicionaram-se as diluições adequadas de sobrenadantes e controlos padrão (A3B1 (IgE), durante 2 horas a 37°C. As placas foram lavadas cuidadosamente e adicionou-se EM95-Biotina (5 mg/ml) a cada poço e incubou-se durante 2 horas a 37°C. Após este tempo, adicionou-se fosfatase alcalina conjugada com estreptavidina (diluição 1/500) durante mais 2 horas e em seguida lavou-se cuidadosamente antes da adição do substracto de fosfatase (1 mg/ml; Sigma Diagnostics, St. Louis, MO), resultando na alteração de cor adequada. As leituras foram determinadas por meio de um leitor de ELISA (Dynatech Laboratories, Inc.) a uma absorvância a 410 nm. Determinaram-se as concentreções de Ig por comparação com uma curva padrão e expressaram-se os valores como média + desvio padrão (n=3).

ELISA para a detecção de Ac anti-ADN: Dissolveu-se ADN de timo de vitela (Sigma St. Louis, MO) (5 µg/ml) em tampão de acoplamento contendo carbonato de sódio /bicarbonato de sódio 0,1M (pH 9,8). Ferveu-se durante 10 minutos e em seguida incubou-se em gelo durante 3 minutos. Determinou-se a DO a 260 do ADN e ajustou-se a concentração para obter os 5 µg/ml de ADN necessários. Adicionaram-se então 100 µl aos poços de uma placa de microtítulo de polivinilo de 96 poços e incubou-se durante a noite a 4°C. A placa foi lavada em seguida 3 vezes e bloqueada durante 1 hora a 37°C, com PBS contendo FCS 1% e azida de sódio 0,02%. A placa foi mais uma vez lavada e

adicionaram-se em seguida diluições em série de amostras de soro (100 ml) e incubou-se durante 2 horas a 37°C. O anticorpo de detecção, IgG_1 de cabra anti-rato, conjugado com fosfatase alacalina, foi então adicionado a cada poço e incubou-se mais uma vez durante 2 horas a 37°C. As placas foram cuidadosamente lavadas e adicionou-se substracto de fosfatase (1 mg/ml; Sigma Diagnostics, St. Louis, MO), resultando na alteração de cor adequada. Determinaram-se as leituras por meio de um leitor de ELISA (Dynatech Laboratories, Inc.) a uma absorvância a 410 nm. Compararam-se os títulos de anticorpo com amostras de soros positivos e expressaram-se os resultados em unidades arbitrárias.

Análise de citometria de fluxo para a detecção de células derivadas a partir do dador. Removeram-se os baços de ratos cGVHD, BDF_1 normais tratados com e sem anti-gp39 e preparou-se uma única suspensão de células. Colocaram-se as células numa camada em Ficoll-Hypaque (4:1) e em seguida centrifugou-se a 2000 rpm durante 20 minutos à temperatura ambiente. Removeu-se a camada de linfócitos resultante e lavou-se uma vez com BSS contendo 5% de FCS. Utilizaram-se 1 x 10^6 células, por tubo, para a coloração, num volume final de 50 µl. Adicionaram-se 50 µl de soro de rato a cada tubo para impedir a ligação não específica de anticorpos. Coraram-se as células com (a) anticorpos controlo: Ig de rato FITC (diluição final 1:100) e PE-estreptavidina (diluição final 1:500) e (b) FITC H-$2K^b$ e biotina H-$2D^d$ (ambos com diluição final 1:100). Incubaram-se as células durante 20 minutos em gelo e em seguida lavaram-se duas vezes para remover quaisquer anticorpos não ligados. Por fim, adicionou-se PE-estreptavidina (diluição final 1:500) ao tubo adequado, a fim de detectar o anticorpo conjugado com biotina, por mais 20 minutos em gelo. As células foram mais uma vez lavadas duas vezes, para análise num Becton Dickinson FACScan. Após determinação da dispersão de luz, frontal e lateral através das fendas, recolheram-se 10.000 acontecimentos por amostra, para determinação da percentagem de células positivas para o haplotipo MHC relevante.

Teste de libertação do crómio para avaliação do teste CTL. Lavaram-se células alvo marcadas com ^{51}Cr e plaquearam-se a 1 x 10^4 por poço, em placas de 96 poços, com células efectoras a razões E:T de 100:1, 20:1 e 4:1. As células alvo utilizadas incluiam P815 ($H\text{-}2^d$), LB27,4 ($H\text{-}2^{bxd}$) e c118,5 ($H\text{-}2^b$). As placas são centrifugadas e em seguida incubadas a 37 °C em 5% de CO_2, durante 4 horas. As placas foram mais uma vez centrifugadas e recolheu-se uma alíquota de sobrenadante isento de células, de cada poço, para contagem num contador gama. A percentagem de lise específica é definida como (a-b)/c em que a=cpm libertados pelas células alvo incubadas com células efectoras, b=cpm libertados pelas células alvo incubadas apenas com meio (libertação espontânea) e c=cpm libertados por congelamento-descongelamento de células alvo (aproximadamente 80% dos cpm totais incorporados)

Estímulo secundário de esplenócitos de GVHD aguda in vitro. Removeram-se os esplenócitos de GVHD aguda de animais tratados com anti-gp39, tratados com HIg ou não tratados. Os baços foram depletados de glóbulos vermelhos e em seguida fizeram-se alíquotas a 1 x 10^4 por poço celular. Adicionaram-se as células estimulantes irradiadas (P815) aos poços adequados. Após 7 dias realizaram-se testes CTL contra os alvos adequados, como anteriormente mencionado.

Resultados

A GVHD em ratos resulta em esplenomegalia. No rato, uma das consequências da cGVHD é o aumento do baço. São inicialmente as próprias células do hospedeiro que se infiltram e aumentam o baço, embora isto seja em resposta à presença de células dadoras (Rolink, A.G. et al. (1983) *J. Exp Med.* 158:546). A figura 5 indica que 7-14 dias após o início da cGVHD, os esplenócitos contêm duas vezes o número de leucócitos, comparado com os ratos sem cGVHD. O tratamento dos ratos no início da cGVHD com anti-gp39 (250 µg/rato, dias 0, 2,

4 e 6) reduz o número de leucócitos/baço nos ratos cGVHD, para valores que são idênticos aos dos ratos sem a doença.

Hiperprodução de imunoglobulina policlonal induzida por GVHD. Foi referido que ocorre hiperprodução de Ig em ratos com cGVHD, devido a interacções cognatas entre as células T e células B do dador (Morris, S.E. et al., (1990) *J. Exp Med* 171:503). Para determinar se o anti-gp39 inibe a hiper produção de Ig, administrou-se anti-gp39 aos ratos com cGVHD. Ao dia 7 ou 14, removeram-se os baços dos ratos controlo e cGVHD e testaram-se os ratos cGVHD e as células B quanto à produção espontânea de IgG_1 e IgA *in vitro*. Os esplenócitos de ratos com cGVHD produziram níveis elevados de IgA e IgG^1 (Figuras 6a e 6B) *in vitro*. No entanto, os esplenócitos de ratos com cGVHD e tratados com anti-gp39 (dias 0, 2, 4 e 6) produziram níveis de IgG_1 e IgA idênticos aos de ratos sem doença. A adição de anti-gp39 a culturas de esplenócitos de ratos com cGVHD não reduziu os níveis de produção de Ig *in vitro*, sugerindo que o anti-gp39 exercia os seus efeitos *in vivo*.

Quando se utilizou Ig de Hamster (HIg) como controlo nestas experiências, verificou-se que não tinha nenhum papel inibitório na indução de GVHD, mas que de facto acentuava a doença, não só em termos de produção de Ig policlonal, mas também na esplenomegalia resultante. Detectou-se um aumento de 8 vezes no nível da Ig produzida por ratos com GVHD induzida tratados com HIg, de 1 semana, comparado com ratos com GVHD induzida, não tratados, de uma semana. Era evidente que a HIg era, ela própria, um imunogénio. Consequentemente, decidiu-se designar os ratos receptores F_1 não tratados, como o grupo controlo relevante.

Efeito de anti-gp39 em soro hiper-IgE induzido por GVHD e autoanticorpos anti-ADN. O desenvolvimento da cGVHD pode ser monitorizado pelo aumento da IgE do soro e anticorpos para a cadeia dupla de ADN (Morris, S.E. et al. (1990) *J. Exp Med.*

171:503). Os níveis de IgE do soro foram medidos por meio de um ELISA específico para IgE. Os ratos com GVHD crónica induzida foram tratados com anti-gp39 aos dias 0, 2, 4 e 6 e não foi administrado mais anticorpo. Os ratos foram sangrados a intervalos semanais e determinaram-se os níveis de IgE do soro (Figura 7A). A cGVHD induz um aumento de 10-15 vezes nos níveis de IgE do soro. A administração de anti-gp39 inibiu os aumentos na IgE do soro induzidos pelo cGVHD, até 8 semanas após o início da doença. Para além da inibição de de níveis elevados de IgE no soro, a administração de anti-gp39 também bloqueou a produção de anticorpos anti-ADN no soro. A GVHD crónica induz um aumento de 5-10 vezes nos níveis de anticorpos anti-ADN encontrados, que foi reduzido por tratamento com anti-gp39 (Figura 7B)

Estudos anteriores mostraram que a semi-vida de anti-gp39 (clone MR1) é de 12 dias (Foy, T. M et al. (1993) *J. Exp Med.* 178:1567-1575). Os testes ELISA específicos para a detecção de anti-gp39, indicam que o anti-gp39 não era detectável no soro de ratos tratados, oito semanas após a terapia. Assim, o anti-gp39 persistente não pode justificar a supressão tardia de cGVHD. Realizaram-se estudos de transferência a fim de investigar se os esplenócitos de ratos com cGVHD e os que receberam anti-gp39 eram capazes de transferir a cGVHD. Os esplenócitos de ratos a que foi dado cGVHD e anti-gp39 eram incapazes de induzir níveis séricos elevados de IgE e autoanticorpos anti-ADN, por transferência adoptiva, enquanto que os esplenócitos de ratos com cGHVD induziram níveis aumentados de sIgE e anticorpos anti-ADN. Estes dados sugerem que as células T aloreactivas foram induzidas a tornar-se num estado de não resposta, como resultado do tratamento com anti-gp39.

Detecção de células dadoras aloreactivas. Quando se analizaram ratos com cGVHD induzida, quanto à presença de células derivadas do dador nos seus baços, verificou-se que comparado com os BDF_1 normais, que coram positivo para $H\text{-}2K^b$ e

$H\text{-}2D^d$, os cGVHD possuem aproximadamente 5-7% de células dadoras. Estas células são derivadas de DBA/2 e portanto coram positivo para $H\text{-}2D^d$. Estas células foram detectadas independentemente do tratamento com anti-gp39. Isto reforça a questão de que o tratamento com anti-gp39 permite o enxerto de células dadoras, sem induzir qualquer função ajudante nas células B receptoras, que resulta na produção de Ig policlonal no grupo cGVHD não tratado.

Efeito do tratamento com anti-gp39 na indução de GVHD aguda. A GVHD aguda está associada com a indução do aumento da resposta CTL anti-alogénica. Embora seja claro que as interacções gp39-CD40 são críticas para as interacções T_h-células B, não é claro se a indução de outros mecanismos efectores imunes pode ser também alterada por terapia anti-gp39. A GVHD foi induzida por administração de baços de C57BL/6 aos receptores F_1. Tal como mostrado na figura 8, 12 dias após a transferência de células alogénicas, mede-se uma resposta CTL $H\text{-}2^b$ anti-$H\text{-}2^d$ forte. O tratamento dos ratos com anti-gp39, mas não com HIg, impede a produção de CTL $H\text{-}2^b$ anti-$H\text{-}2^d$ (Figura 8). Numa de 2 experiências, o tratamento com anti-gp39 reduziu as respostas de CTL abaixo do que era observado com os esplenócitos nativos. Se se fizer a cultura destes esplenócitos durante 7 dias na presença de células P815 irradiadas e em seguida se realizar um teste CTL, estas células não originam uma segunda estimulação das células P815, mas no entanto os esplenócitos BDF_1 normais desencadeiam uma resposta primária. Os ratos com aGHVD induzida não tratados desencadeiam uma resposta imune secundária, como esperado. Estes resultados indicam que o tratamento de ratos com GVHD aguda com anti-gp39 induz um estado de não resposta na população CD8+, a um segundo desafio.

Discussão

A reversão da esplenomegalia (Figura 5), inibição da hiper produção de Ig (Figuras 6A e 6B), inibição dos níveis séricos

de IgE e produção de autoanticorpos anti-ADN (Figuras 7A e 7B) em ratos com GVH induzida, por administração de anti-gp39, sugere que o anti-gp39 bloqueou a capacidade das células T enxertadas induzirem a activação de células B do hospedeiro. Esta inibição da esplenomegalia e da produção de IgG_1 e IgA policlonal permanece baixa 7 dias após o final da administração de anticorpos. A redução em anticorpos IgE e anti-ADN persiste durante 8 semanas, mesmo quando o tratamento é terminado. Estes resultados indicam que a função das células T foi afectada, ou por delecção clonal de células T reactivas, ou porque ocorreu anergia das células T. Já foi anteriormente verificado (Van der Eertwegh et al. (1993) *J. Exp. Med.* 178:1555-1565) que os níveis de células que produzem citoquinas permanece normal, em ratos tratados com anticorpos, em estudos *in situ* de ratos imunizados. Isto indica que as células T não são eliminadas como consequência do tratamento. Quando os ratos cGVHD foram analisados quanto à presença de células derivadas do dador, verificou-se que estas existiam, quer o animal não fosse tratado, quer fosse tratado com anti-gp39. O anti-gp39 tem assim a capacidade de induzir um estado de não resposta nestas células T dadoras, induzindo a inibição de respostas de anticorpos. De facto, se os esplenócitos destes animais forem transferidos para receptores nativos, os níveis de anticorpos aumentam quando os esplenócitos dadores são de cGVHD não tratados, mas os ratos com cGHVD tratados com anti-gp39 não são capazes de desencadear um segundo estado cGVHD, aquando da transferência. Estes dados sugerem que o anti-gp39 interfere com a capacidade das células T induzirem uma imunopatologia clínica de GVHD forte e esplenomegalia, que a administração de anticorpos desencadeia um estado de não resposta na subpopulação CD4+.

Foi referido que as células B são necessárias para proporcionar ajuda para a indução de CTLs, como se pode ver através do estudo de ratos deficientes em células B, quanto à indução de imunidade de células T protectoras, a uma leucemia induzida pelo vírus de leucemia de murídeo Friend (Schultz,

K.R. et al. (1990) *Science* 249). Parece portanto concebível que num rato com aGVHD induzida, o anti-gp39 inibe a activação de células B e impede assim a apresentação de antigénio, pré-imunizando deste modo as células CD8+. Também foi sugerido que a produção de CTL CD8+ requer a interacção com células Th restritas à classe II (von Boehmer H. et al. (1979) *J. Exp Med* 150:1134; Keene J et al. (1982) *J. Exp Med* 155:768 e que quando a afinidade de TCR é baixa, a ajuda de células T mediada por CD4+ é necessária *in vivo* (Gao, X et al. (1991) *J. Immunol.* 147:3268).

Foram realizados estudos a fim de investigar o papel das interacções CD28-B7/BB1 na indução de respostas CTL CD8+. Verificou-se que as interacções CD28-B7/BB1 eram necessárias e suficientes para produzir CTL específico de MHC de classe 1 (Harding, F.A. e Allison, J.P. (1993) *J. Exp. Med.* 177:1791). Foi sugerido que o ligando para CD40 pode ser um inductor importante para B7 (Ranheim, E.A. e Kipps T.J. (1993) *J. Exp Med.* 177:925), tal como se verificou por estudos que envolvem a inibição da expressão de B7 em células normais e leucémicas, por anticorpos para CD40. Em conjunto, estes estudos indicam que o anti-gp39 poderá bloquear a interacção de células T CD4+ com células B, não conseguindo desse modo induzir a expressão de B7 que permite a uma célula B activar de forma eficaz uma célula T, a fim de esta proliferar e produzir citoquinas. Em conjunto, estes dados sugerem que as células T CD4+ são necessárias para induzir a formação de CTL, primeiro pela interacção cognata de células T-células B entre gp39 e o seu ligando CD40. A sinalização de CD40 nas células B permite em seguida a regulação positiva de B7/BB1. A interacção recíproca entre B7/BB1 com o seu ligando CD28 nas células T, permite assim uma maior proliferação de células T e produção de citoquinas. Se, no entanto, apenas for fornecido um sinal às células T, i.e. a interacção de gp39 com CD40, e o segundo sinal não for obtido, então é induzido um estado de não resposta nas células T e estas tornam-se tolerantes ou anergisadas.

Estes estudos indicam que quando se induz uma aGVHD em ratos, se obtem uma resposta anti-H-2^d. No entanto, se os animais são tratados com anti-gp39, então não se observa nenhuma resposta CTL. Poderá parecer que o anti-gp39 está a inibir a formação de CTL por um método anteriormente descrito (Schultz, K.R. et al. (1990) *Science* 249). As células B não conseguem ser activadas via ligação de CD40 e são portanto incapazes de promover a indução de CTLs. Para além disso, os estudos dos requerentes mostram que quando os esplenócitos são desafiados *in vitro* com células P815, se verifica que as células que foram expostas a anti-gp39 *in vivo* não são capazes de desencadear um CTL anti-H-2^d secundário. Assim, isto poderá indicar que o anti-gp39 induziu um estado de tolerância no compartimento de células T, uma vez que o gp39 não é capaz de se ligar a CD40, não existindo assim regulação positiva B7/BB1 não sendo, deste modo, as células T mais activadas, permanecendo num estado de não resposta. Sabe-se também que as células B em repouso são estimuladores ineficazes de células T alogénicas na reacção de linfócitos mista, a menos que sejam pré-activados pelos anticorpos anti-IgM, PMA ou LPS (Inaba, K. e Steinman, R.M. (1989) *J. Exp Med.* 160:1717; Metley, J.P. et al. (1989) *J. Exp. Med* 169:239; Frohman, M. e Cowing, C. (1985) *J. Immunol.* 134:2269). Para além disso, os antigénios monoméricos solúveis dirigidos para células B, para apresentação *in vivo* poderão resultar numa anergia de células T específica (Eynon, E.E. e Parker D. (1992) *J. Exp Med* 175:131). Assim, parece evidente, dependendo do método de administração do antigénio e APCs envolvidos, que se pode induzir anergia ou tolerância. Por desafio de células P815 no compartimento de células T CD8+ do baço, não são necessárias células B para apresentação de antigénios, permitindo assim que os aloantigénios sejam apresentados directamente e que o CTL seja induzido. O estado de não resposta dos baços a um estímulo secundário, indica que houve indução de tolerância aloespecífica neste sistema.

Estes resultados estão em oposição a resultados anteriores (Foy, T. M. et al. (1993) *J. Exp. Med.* 178:1567-1575), que

indicam que a tolerância não é induzida pelo anticorpo num sistema específico de antigénios. Os dois sistemas diferem, uma vez que o modelo aGVHD apresenta aloantigénios já ligados às células que apresentam antigénio, enquanto que nos sistemas específicos de antigénios, o antigénio é administrado e absorvido, processado e apresentado por APC profissional, *in vivo*. Parece assim que o anti-gp39 poderá ter efeitos diferentes, dependendo do antigénio utilizado e do método de apresentação.

Pode-se concluir que o anti-gp39 pode induzir tolerância aloespecífica, quer nos compartimentos CD4+, quer CD8+, do sistema imune e isto poderá ser obviamente uma intervenção terapêutica benéfica, quando se considera uma imunologia e imunoterapia de transplante. É concebível que para o tratamento de pacientes submetidos a transplantes de medula, a terapia anti-gp39 seja suficiente para indução de tolerância ao enxerto e prevenção da indução destas consequências de tratamentos de transplante, como a GVHD.

EXEMPLO 6: Produção e caracterização de anticorpos anti-gp39

Experiência 1 - anticorpos dirigidos contra gp39 humano

Para indução de tolerância em células T, específica de antigénios, num indivíduo humano, é preferível administrar um anticorpo dirigido contra gp39 humano. Utilizou-se a metodologia seguinte para produzir anticorpos monoclonais de rato anti-gp39 humano. Imunizaram-se ratos Balb/c com uma proteína de fusão gp39 solúvel, a gp39-CD8, em adjuvante de Freund completo (CFA). Os ratos foram subsequentemente desafiados 6 semanas mais tarde, com gp39-CD8 solúvel em adjuvante de Freund incompleto (IFA). Forneceu-se gp39-CD8 solúvel, na forma solúvel, 4 semanas após a imunização secundária. Os ratos foram pré-imunizados com linfócitos de sangue periférico humano 2 semanas mais tarde, seguido de uma pré-imunização final com gp39-CD8 solúvel, após mais 2 semanas. Os esplenócitos foram fundidos com o par de fusão NS-

1, ao dia 4 após a imunização final, como em protocolos convencionais.

Os clones que produzem anticorpos anti-gp39 humano foram seleccionados com base em processos de pesquisa múltiplos. Os clones foram inicialmente pesquisados por um teste de ligação a placas utilizando gp39-CD8. Os clones positivos foram pesquisados de novo contra uma proteína de fusão CD8, aCD72-CD8. Os clones positivos no teste de ligação de placas CD8-CD72 foram eliminados. Os clones remanescentes foram subsequentemente pesquisados em repouso e activados durante 6 horas com linfócitos de sangue periférico humano (PBL), por análise de citometria de fluxo. Os hibridomas que coram activados, mas não em repouso, com PBL, foram considerados positivos. Finalmente, os clones remanescentes foram testados quanto à sua capacidade para bloquear a ligação de CD40Ig ao gp39 ligado à placa.

Foram pesquisados inicialmente, aproximadamente, 300 clones contra gp-39-CD8 e CD72-CD8 em testes de ligação a placas. De entre estes clones, verificou-se que 30 detectavam a gp39 ligada a placas e não a CD8. Estes clones foram subsequentemente pesquisados para detecção de gp39 em PBL humano activado. Aproximadamente 15 clones detectaram uma molécula em PBL activado, mas não em células em repouso. A especificidade foi ainda confirmada determinando a capacidade dos clones bloquearem a detecção por CD40, de gp39 ligado às placas. 3 de 10 clones testados bloqueiam a ligação de CD40 neste ensaio.

Estes clones eram 3E4, 2H5 e 2H8. Prefere-se a utilização destes clones nos métodos aqui descritos. Os clones que deram positivo em PBL activado, mas não em repouso, foram também pesquisados quanto à reactividade com um clone de células T de rato activadas, POMC8. O clone 2H8 expressou reactividade cruzada com esta linha de células T de rato.

Experiência 2 - anticorpos dirigidos contra gp39 humano

Utilizou-se um processo de imunização semelhante ao descrito na experiência 1 para produzir anticorpos adicionais dirigidos contra gp39 humano. Imunizou-se um rato Balb/c com gp39-CD8 solúvel em CFA, seguido de desafio com linfócitos de sangue periférico humano, activados durante 6 horas, 4 semanas mais tarde. O rato foi subsequentemente pré-imunizado com gp39-CD8 solúvel, 4 dias antes da fusão de esplenócitos com o par de fusão NS-1, utilizando protocolos convencionais. A pesquisa de clones de hibridoma foi realizada por coloração por citometria de fluxo, de PBLs humanos activados durante 6 horas. Seleccionaram-se os clones de PBLs que coraram activados, mas não em repouso. Seleccionaram-se para posterior análise seis clones, 4D9-8, 4D9-9, 24-31, 24-43, 89-76 e 89-79.

A especificidade dos anticorpos seleccionados foi confirmada por diversos testes. Primeiro, a análise por citometria de fluxo demonstrou que todos os seis mAcs coram células T sanguíneas activadas, mas não em repouso (veja-se figura 9B e 9C para um exemplo representativo, que apresenta a coloração de células T activadas com 4D9-8 e 4D9-9, respectivamente). A expressão da molécula reconhecida por cada um destes seis anticorpos é detectável em 4 horas de activação, é máxima 6-8 horas após activação e não é detectável em 24 horas após activação. Todos os seis mAcs reconhecem uma molécula que é expressa em PBLs CD3+ activados, predominantemente do fenótipo CD4+, mas uma porção das células T CD8+ também expressa a molécula. A expressão da molécula reconhecida pelos seis mAcs é inibida pela presença de ciclosporina A no meio de cultura, tal como é a expressão de gp39 (veja-se figura 10A e 10B para um exemplo representativo, que mostra a coloração de células T tratadas com ciclosporina com 4D9-8 e 4D9-9, respectivamente). As cinéticas e distribuição da expressão da molécula reconhecida por estes mAcs são idênticas às do gp39, tal como detectado pela proteína de fusão de CD40Ig humano. Para além disso, todos os seis mAcs bloqueiam a coloração de gp39 por CD40Ig (veja-se figura 11A e 11B para um exemplo representativo, que apresenta

a inibição da coloração de gp39 por CD40Ig, na presença de 4D9-8 e 4D9-9, respectivamente). Num teste ELISA, todos os seis mAcs reconhecem a gp39-CD8, uma forma de fusão solúvel da molécula gp39. Para além disso, todos os seis mAcs imunoprecipitam uma molécula de aproximadamente 36 kd de PBLs humanos activados, marcados com ^{35}S-metionina. A molécula imunoprecipitada é idêntica à precipitada pela proteína de fusão CD40Ig humana.

A actividade funcional dos seis mAcs seleccionados (4D9-8, 4D9-9, 24-32, 24-43, 89-76 e 89-79) foi testada como se segue. Primeiro, mediu-se a capacidade dos mAcs inibirem a proliferação de células B humanas purificadas, cuja cultura é realizada com IL-4 e gp39 solúvel. A cultura de células B humanas purificadas foi realizada com gp-39 e IL-4 na presença ou ausência de anticorpos monoclonais purificados, ou CD40Ig em doses entre 0 e 1,25 μg/ml. A proliferação de células B foi determinada após 3 dias em cultura, por incorporação de timidina. Os resultados (apresentados na Figura 12) demonstram que todos os seis mAcs podem inibir a proliferação de células B induzida por gp39 e IL-4. Os mAcs 89-76 e 24-31 foram bastante eficazes na inibição da proliferação de células B induzida. A IC_{50} (concentração de anticorpo necessária para inibir a proliferação de células B em 50%), era de aproximadamente 1 μg/ml para 89-76 e aproximadamente 1,25 μg/ml para 24-31.

Em seguida, analisou-se a capacidade dos mAcs inibirem a diferenciação de células B, tal como medido pela produção de Ig induzida por células T activadas com anti-CD3 e IL-2. Prepararam-se células B humanas IgD^+ por selecção positiva com FACS e em seguida fez-se a cultura com células T humanas activadas com anti-CD3 (tratadas com mitomicina C) e IL-2, durante 6 dias, na presença ou ausência de anticorpos monoclonais anti-gp39 purificados, a dosagens entre 0 e 10 μg/ml. A produção de IgM, IgG e IgA foi determinada por ELISA ao dia 6. Os resultados (apresentados a seguir na tabela 3) demonstram que todos os seis anticorpos podem inibir a

diferenciação de células B dependente de células T, tal como medido pela produção de IgM, IgG e IgA. A Ic_{50} (concentração de anticorpos necessária para inibir a produção de Ig em 50%) era na gama de 1,0 µg/ml até menos de 0,1 µg/ml, para os seis mAcs, incluindo os anticorpos 24-31 e 89-76

Tabela 3

		Produção de imunoglobulinas		
mAc	µg/ml	IgM	IgG	IgA
nenhum	-	17.500	6710	4471
4D9-8	0,1	4813	2130	2819
	1,0	4394	2558	1519
	10,0	1081	389	396
4D9-9	0,1	3594	919	1731
	1,0	2659	1233	1606
	10,0	374	448	266
24-31	0,1	3863	981	344
	1,0	1287	314	165
	10,0	1120	596	23
24-43	0,1	6227	4132	432
	1,0	3193	2130	192
	10,0	7021	1232	1081
89-76	0,1	3783	1069	344
	1,0	2180	352	171
	10,0	818	551	19
89-79	0,1	9763	1924	3021
	1,0	2314	460	156
	10,0	183	135	434

A fim de analisar o efeito de mAcs anti-gp39 nas respostas de células T, incluiram-se os mAcs em reacções de linfócitos

mistas convencionais (MLR). Fez-se a cultura de 300.000 linfócitos de sangue humano periférico (que respondem = R) com 100.000 linfócitos de sangue periférico alogénicos irradiados (estimulantes = S) na presença ou ausência de mAcs anti-gp39 (10 μg/ml). As culturas foram pulsadas com 3H-timidina ao dia 4, 5 ou 6 e recolhidas 18 horas mais tarde. Todos os seis mAcs anti-gp39 humano inibiram as respostas alo-específicas, tal como medido por MLR (veja-se figura 13 para um exemplo representativo, que mostra a inibição de respostas alo-específicas quando R e S são incubados na presença de 24-31 ou 89-76; utilizou-se uma proteína de fusão CTLA-4-imunoglobulina e um mAc anti-CD8 como controlos positivos).

A fim de determinar se os seis mAcs reconhecem epítopos distintos na molécula gp39 humana, realizaram-se experiências de bloqueamento cruzado. Os PBLs humanos activados foram primeiro bloqueados com cada um dos seis mAcs (25 μg/ml de anticorpo não conjugado). As células foram lavadas e em seguida coradas com 10 μg/ml de anticorpo conjugado com biotina, seguido de reacção com avidina conjugada com fitoeritrina (PE-Av). A coloração de células com PE-Av foi analisada por FACS. Os resultados são apresentados a seguir na tabela 4

Tabela 4

Ac bloqueante	Anticorpo de coloração					
	4D9-8	4D9-9	24-31	24-43	89-76	89-79
nenhum	+++	+++	++++	++++	++++	++++
4D9-8	ND	-	++++	++++	+++	+++
4D9-9	+++	ND	+++	++++	+++	+++
24-31	+	+	ND	+++	++	++
24-43	+	+	+++	ND	++	+
89-76	+	+	+++	+++	ND	+++
89-79	+	++	+++	+++	+++	ND

A intensidade de coloração e a percentagem de céluls positivas é apresentada pelo símbolo + (++++ = MI >200; +++ = MI > 125; ++ = MI > 50; + = MI > 25; - = nenhuma coloração acima do ruído de fundo). ND = não determinado

Todos os anticorpos bloquearam a ligação de CD40Ig a PBLs humanos activados. No entanto, os dados apresentados na tabela 4 mostram claramente a incapacidade de alguns anticorpos bloquearem a ligação de outros anticorpos a PBLs humanos activados, sugerindo que estes reconhecem epítopos distintos nas moléculas gp39 humanas.

Os hibridomas 89-76 e 24-31, que produzem os anticorpos 89-76 e 24-31, respectivamente, foram registados de acordo com o tratado de Budapeste na American Type Culture Collection, Parklawn Drive, Rockville, Md. em 2 de Setembro, 1994. Ao hibridoma 89-76 foi atribuído o número de registo da ATCC HB 11713 e ao hibridoma 24-31 foi atribuído o número de registo da ATCC HB11712. Os anticorpos 24-31 e 89-76 são do isotipo IgG1.

Experiência 3 - Anticorpos dirigidos contra gp39 de rato

Numa concretização do invento, o antagonista gp39 é um anticorpo monoclonal anti-gp39 de rato, MR1. Utilizou-se o método seguinte para produzir o anticorpo monoclonal MR1 e pode ser utilizado para produzir outros anticorpos dirigidos contra gp39.

Imunizaram-se hamsters intraperitonealmente com 5 - 10^6 células T_h^1 activadas (d1.6), a intervalos semanais, durante seis semanas. Quando o título do soro contra T_h^1 de murídeo era maior que cerca de 1:10.000 realizaram-se fusões celulares com polietilenoglicol, utilizando esplenócitos de hamster imune e NS-1. Os sobrenadantes de poços que contêm hibridomas em crescimento foram pesquisados por citometria de fluxo, em T_h^1 em repouso e activados. Um hibridoma particular, que produziu

um Mab que reconheceu selectivamente T_h activado, foi ainda testado e subclonado para derivar MR1. O MR1 foi produzido em ascites e purificado por HPLC de troca iónica. Registou-se um hibridoma MR1 na American Type Culture Collection e atribuiu-se-lhe o número de registo HB11048.

EQUIVALENTES

Utilizando apenas experimentação de rotina, os peritos na arte reconhecerão ou serão capazes de determinar, várias formas equivalentes das concretizações específicas da invenção, aqui descritas. Estas formas equivalentes deverão ser abrangidas pelas reivindicações seguintes. Os conteúdos de todas as referências e pedidos de patentes publicados, citados ao longo deste requerimento, são aqui incorporados para referência.

Lisboa, 28 de Janeiro de 2000

AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

REIVINDICÇÕES

1. Anticorpo monoclonal anti-gp39 humano ou fragmento seu derivado que compreende o anticorpo monoclonal proporcionado pelo hibridoma 24-31 (ATCC HB 11712), ou que possui a mesma especificidade de ligação ao epítopo e aproximadamente a mesma afinidade de ligação a gp39, que o anticorpo monoclonal fornecido pelo hibridoma 24-31 (ATCC HB 11712).

2. Anticorpo anti-gp39 humano quimérico ou humanizado, de acordo com a reivindicação 1.

3. Anticorpo monoclonal anti-gp39 humano de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, que inibe a proliferação de células B num teste convencional *in vitro*, com uma Ic_{50} entre 0,01 e 5,0 µg/ml.

4. Anticorpo monoclonal anti-gp39 humano de acordo com a reivindicação 3 que inibe a proliferação de células B num teste *in vitro* convencional, com uma IC_{50} entre 0,1 e 2,5 µg/ml.

5. Anticorpo monoclonal anti-gp39 humano de acordo com a reivindicação 4 que inibe a proliferação de células B num teste convencional *in vitro*, com uma Ic_{50} entre 0,1 e 1,25 µg/ml.

6. Anticorpo monoclonal anti-gp39 humano de acordo com qualquer das reivindicações 3 a 5, em que a proliferação de células B é induzida *in vitro* por tratamento de células B com interleucina 4 e gp39 solúvel.

7. Anticorpo monoclonal anti-gp39 humano de acordo com qualquer das reivindicações anteriores que inibe a produção pelas células B, de IgM, IgG ou IgA, num teste convencional *in vitro* com uma IC_{50} entre 0,01 e 1,0 μg/ml.

8. Anticorpo monoclonal anti-gp39 anti-humano de acordo com a reivindicação 7 que inibe a produção de células B de IgM, IgG ou IgA num teste convencional *in vitro*, com uma Ic_{50} entre 0,01 e 0,1 μg/ml.

9. Anticorpo monoclonal anti-gp39 humano de acordo com a reivindicação 7 ou reivindicação 8, em que a produção de IgM, IgG ou IgA é induzida por cultura de células B com células T activadas com anti-CD3.

10. Anticorpo monoclonal anti-gp39 humano produzido pelo hibridoma 24-31 (ATCC HB 11712)

11. Hibridoma ou linha celular que produz um anticorpo monoclonal anti-gp39 humano, de acordo com qualquer das reivindicações anteriores.

12. Hibridoma 24-31 (ATCC HB 11712)

13. Composição farmacêutica que contém um anticorpo monoclonal anti-gp39 humano, ou fragmento de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 10 e um veículo farmaceuticamente aceitável.

Lisboa, 28 de Janeiro de 2000

AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

FIG. 1

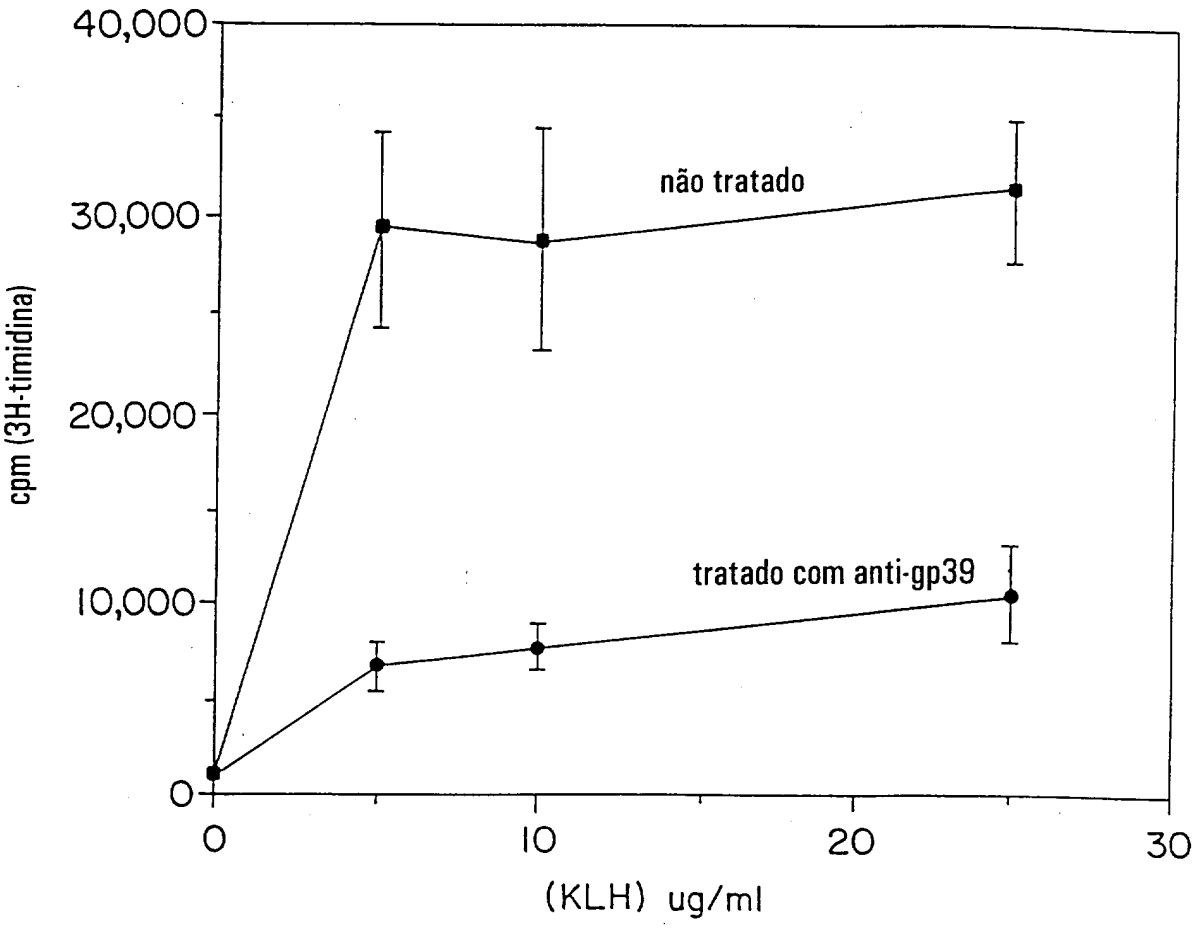

40,000
30,000
20,000
10,000
0
cpm (3H-timidina)
não tratado
tratado com anti-gp39
0
10
20
30
(KLH) ug/ml

FIG. 2

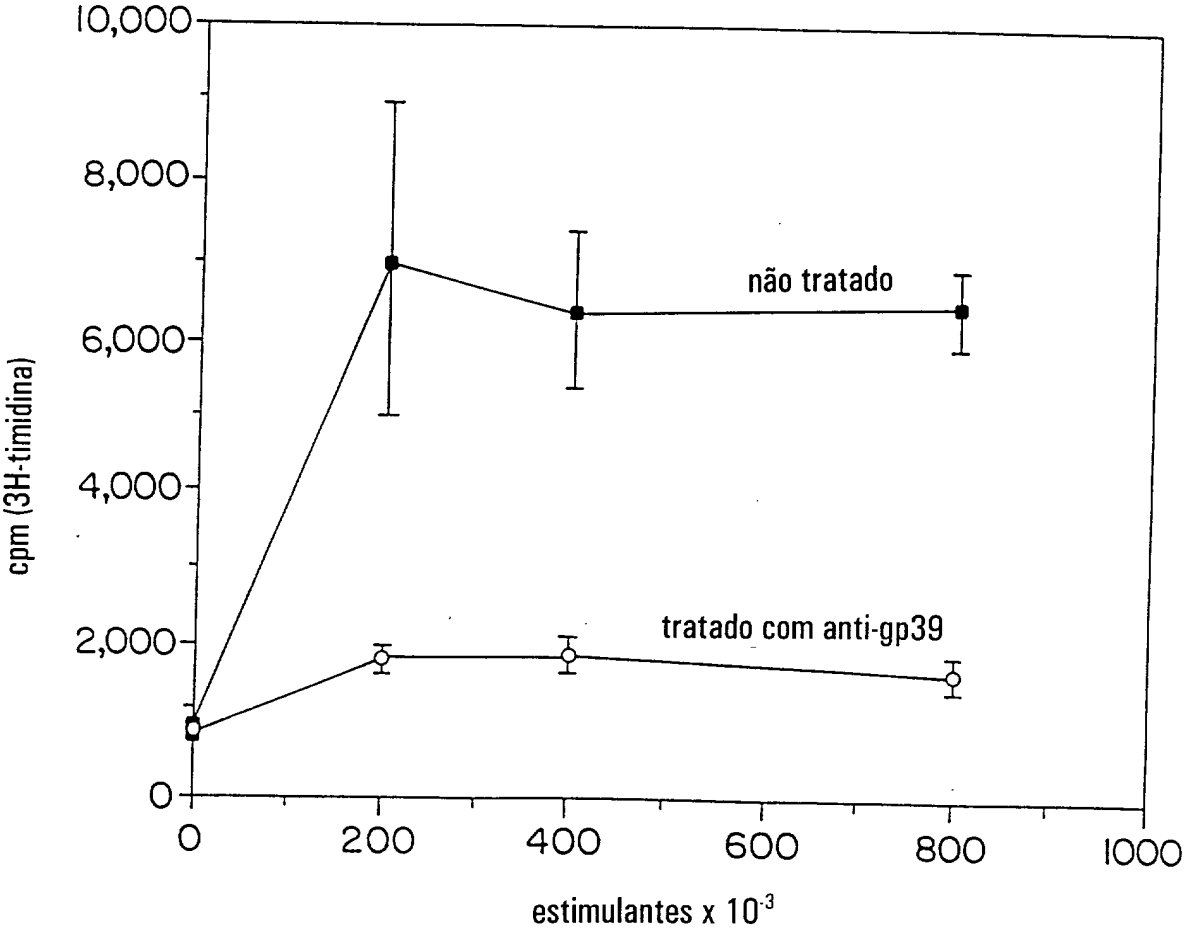

10,000
8,000
6,000
4,000
2,000
0
cpm (3H-timidina)
não tratado
tratado com anti-gp39
0
200
400
600
800
1000
estimulantes x 10-3

FIG. 3A

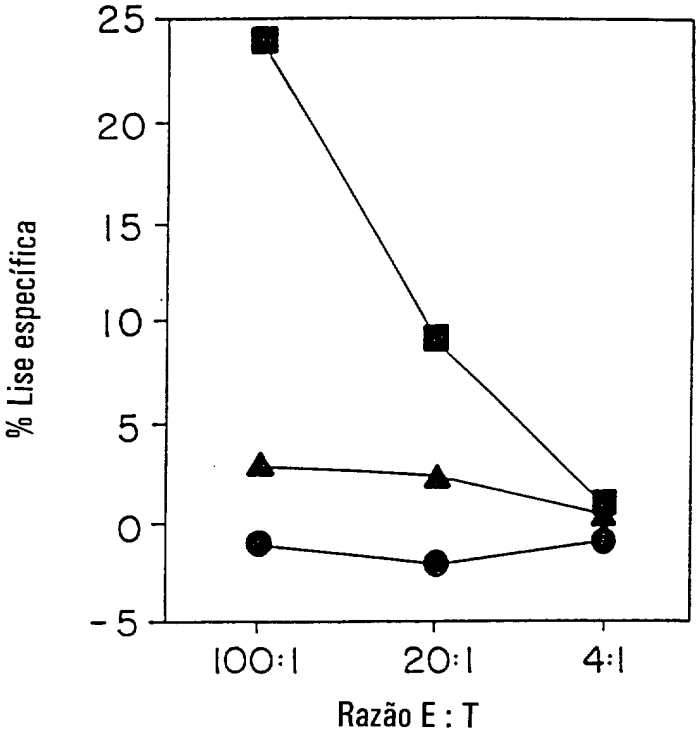


FIG. 3B

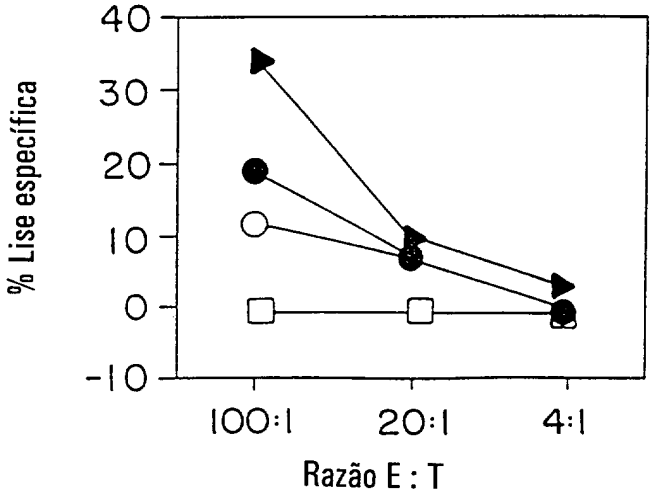


FIG. 3C

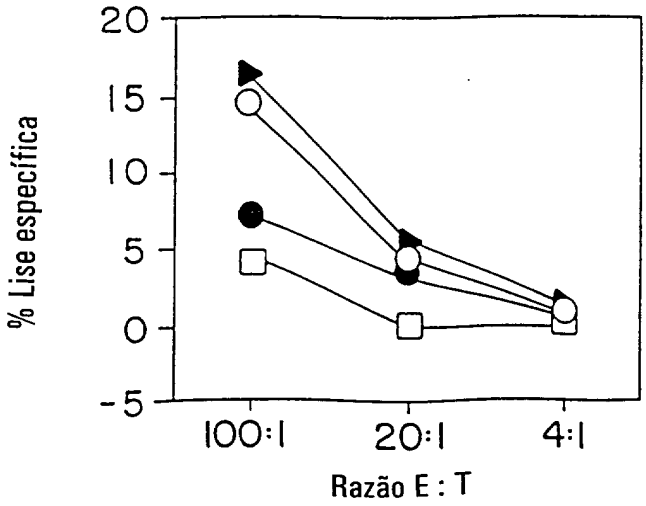


FIG. 4A

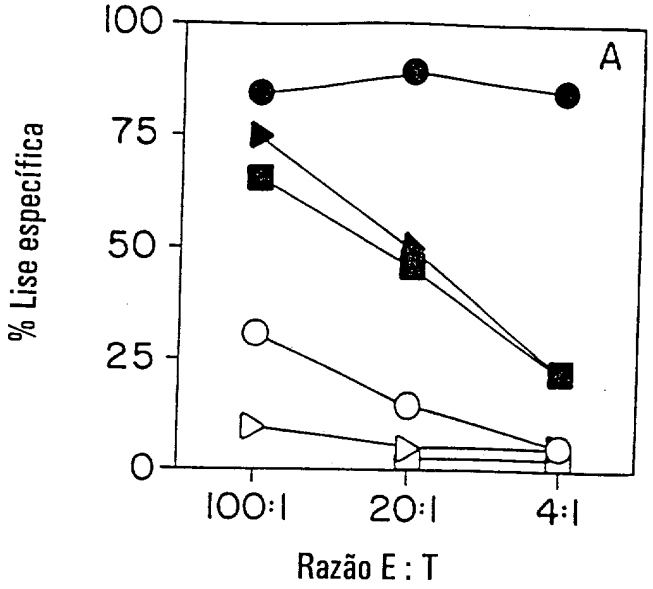

100
75
50
25
0
% Lise específica
A
100:1
20:1
4:1
Razão E : T

FIG. 4B

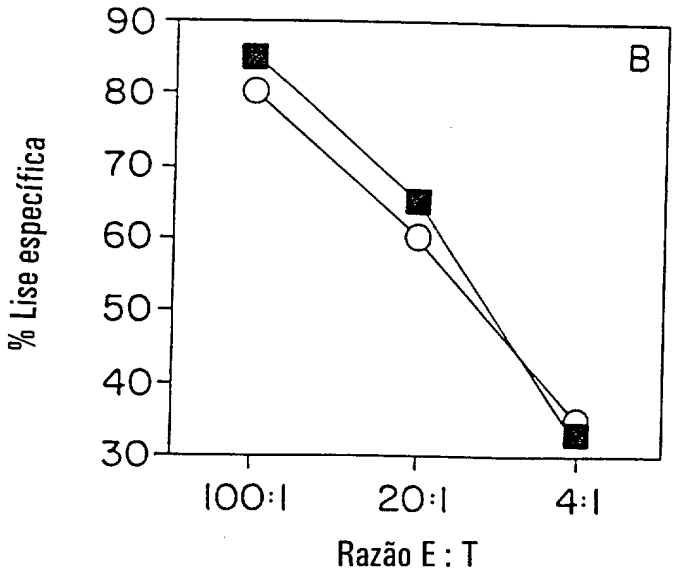

90
80
70
60
50
40
30
% Lise específica
B
100:1
20:1
4:1
Razão E : T

FIG. 5

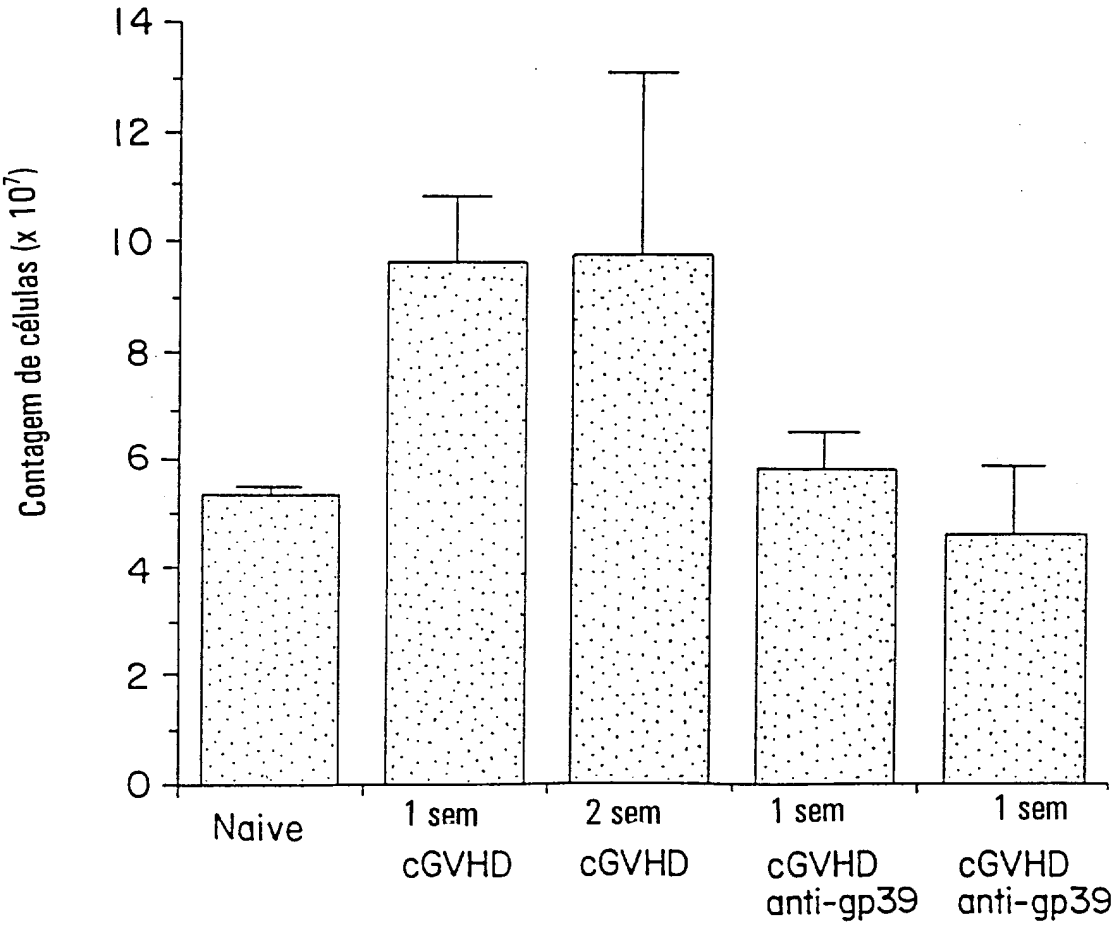

Contagem de células (x 10^7)
14
12
10
8
6
4
2
0
Naive
1 sem cGVHD
2 sem cGVHD
1 sem cGVHD anti-gp39
1 sem cGVHD anti-gp39

FIG. 6A

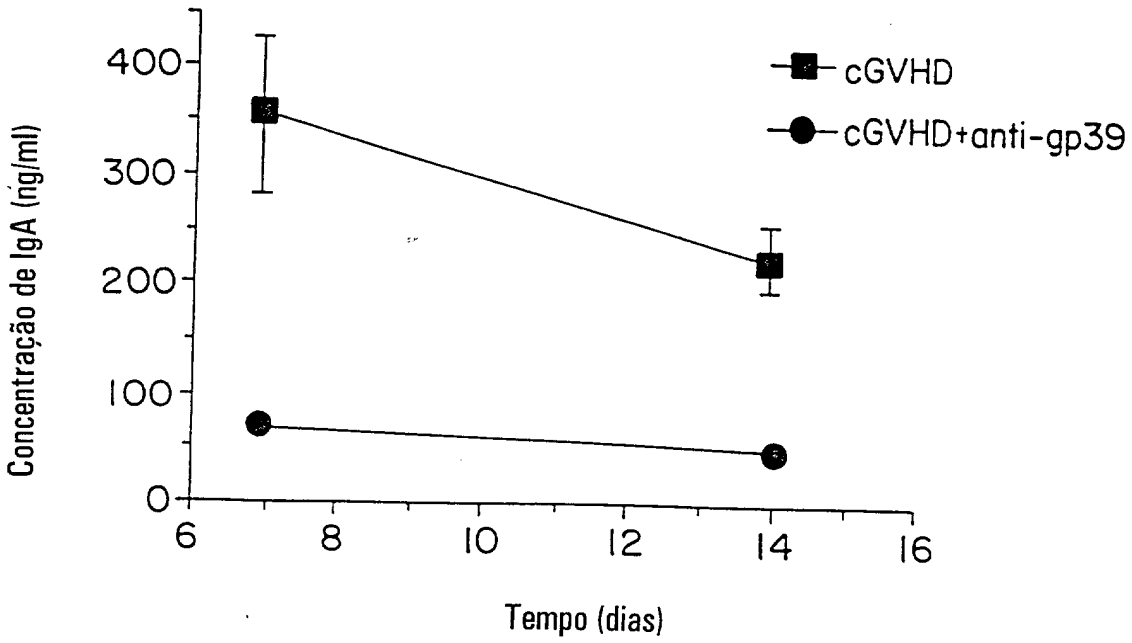

400
300
200
100
0
6
8
10
12
14
16
Concentração de IgA (ng/ml)
Tempo (dias)
cGVHD
cGVHD+anti-gp39

FIG. 6B

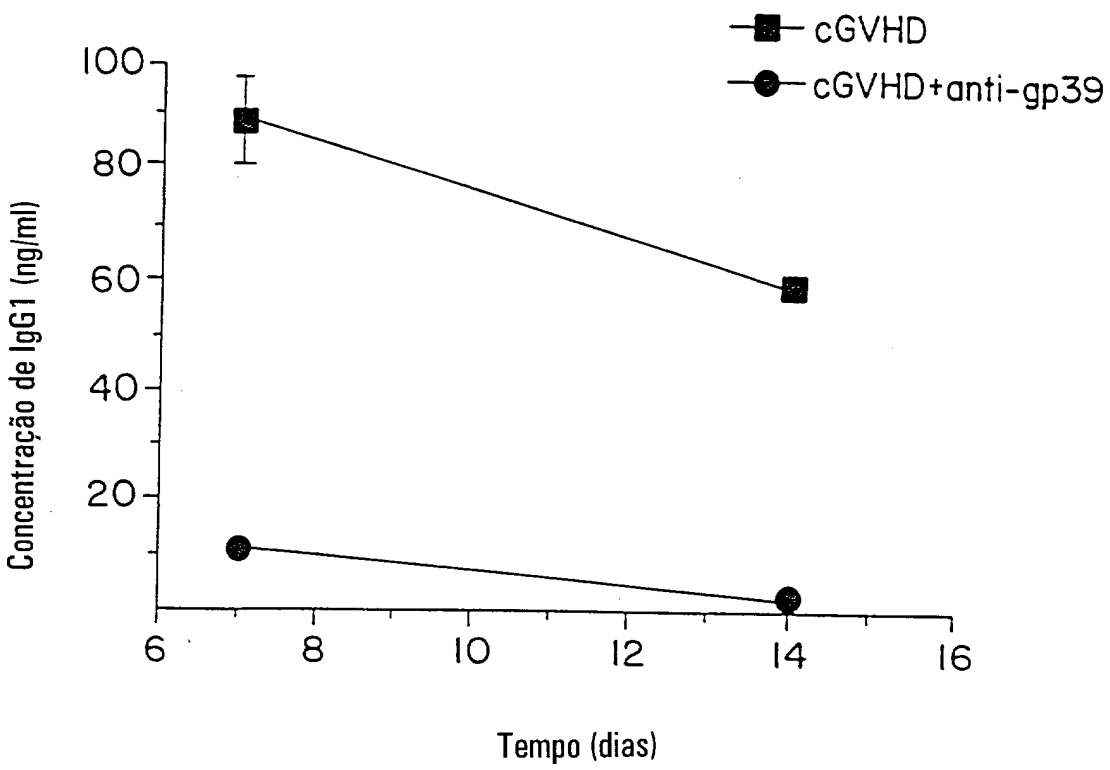

cGVHD
cGVHD+anti-gp39
100
80
60
40
20
Concentração de IgG1 (ng/ml)
6
8
10
12
14
16
Tempo (dias)

FIG. 7A

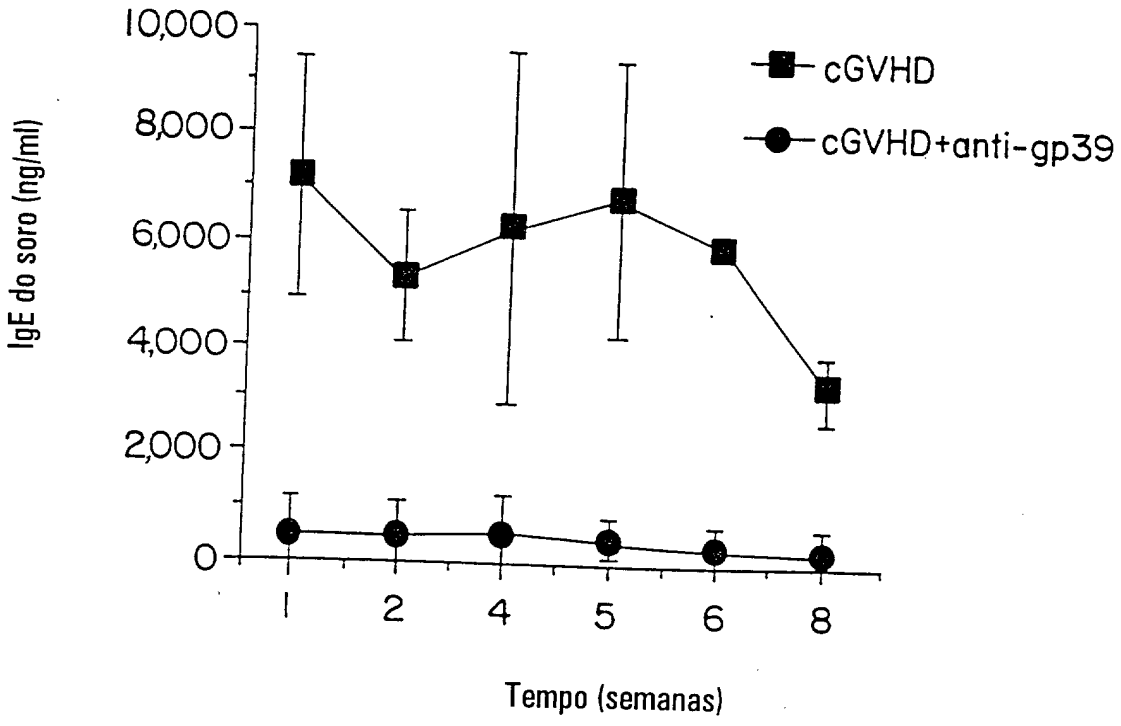

10,000
8,000
6,000
4,000
2,000
0
IgE do soro (ng/ml)
1
2
4
5
6
8
Tempo (semanas)
cGVHD
cGVHD+anti-gp39

FIG. 7B

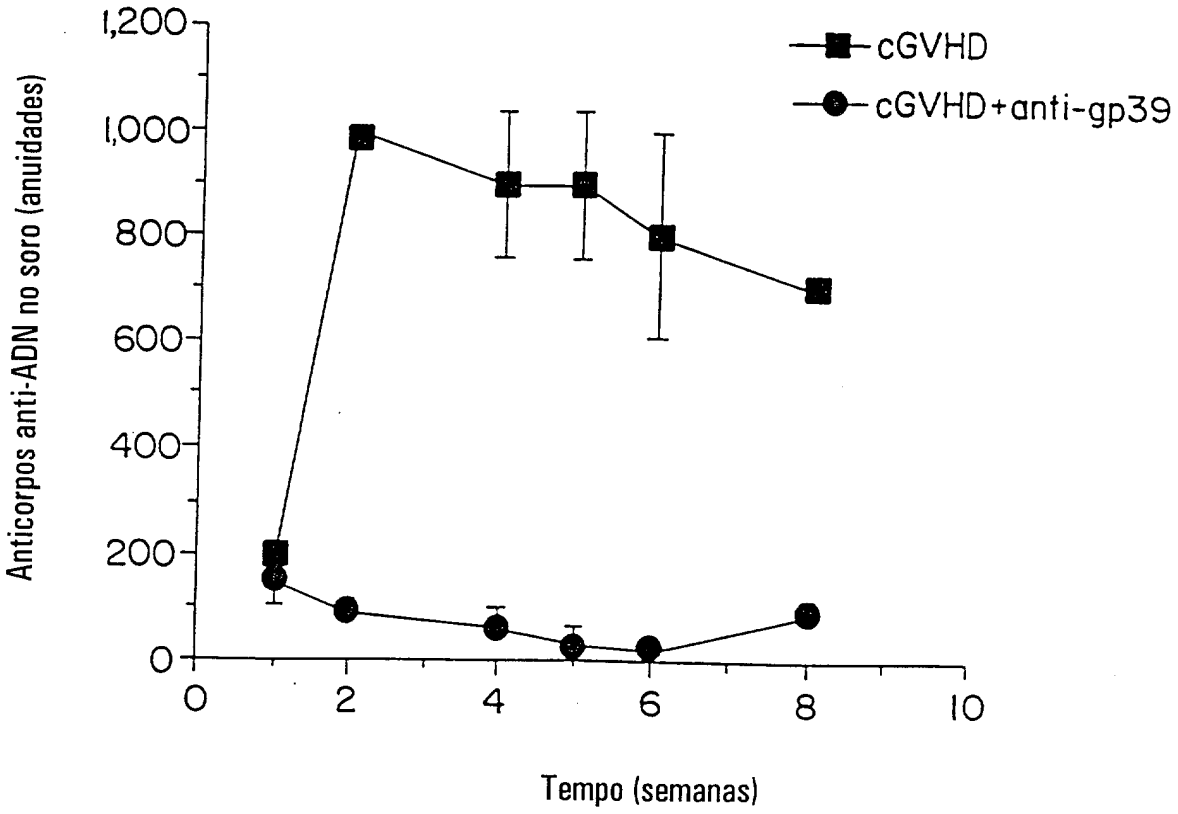

1,200
1,000
800
600
400
200
0
0
2
4
6
8
10
Anticorpos anti-ADN no soro (anuidades)
Tempo (semanas)
cGVHD
cGVHD+anti-gp39

FIG. 8A

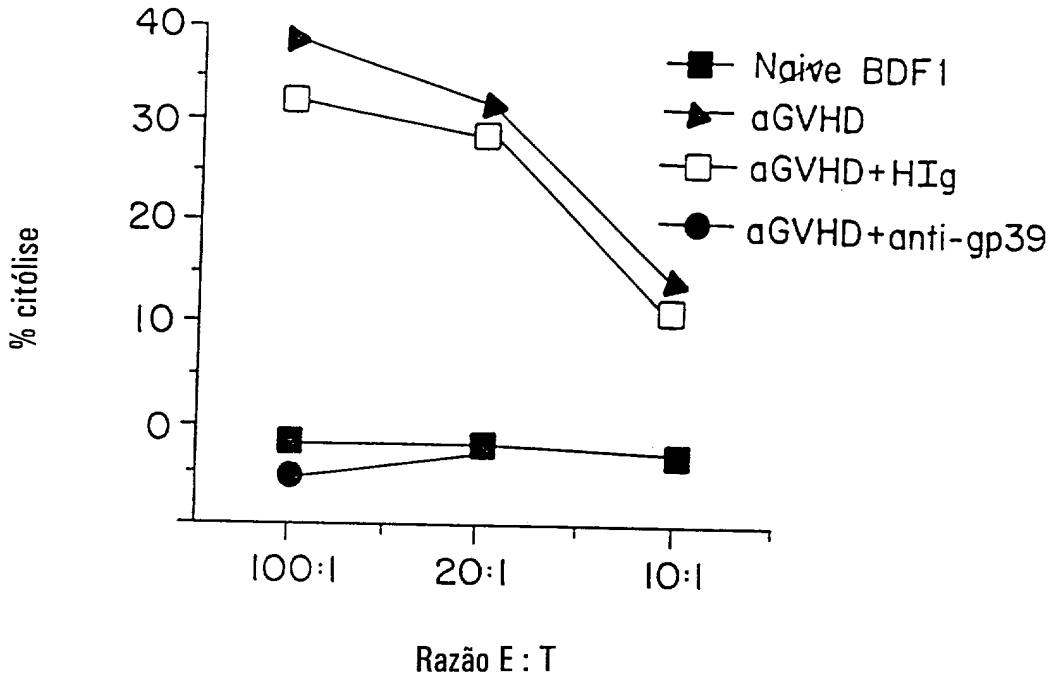

40
30
20
10
0
% citólise
Naive BDF1
aGVHD
aGVHD+HIg
aGVHD+anti-gp39
100:1
20:1
10:1
Razão E : T

FIG. 8B

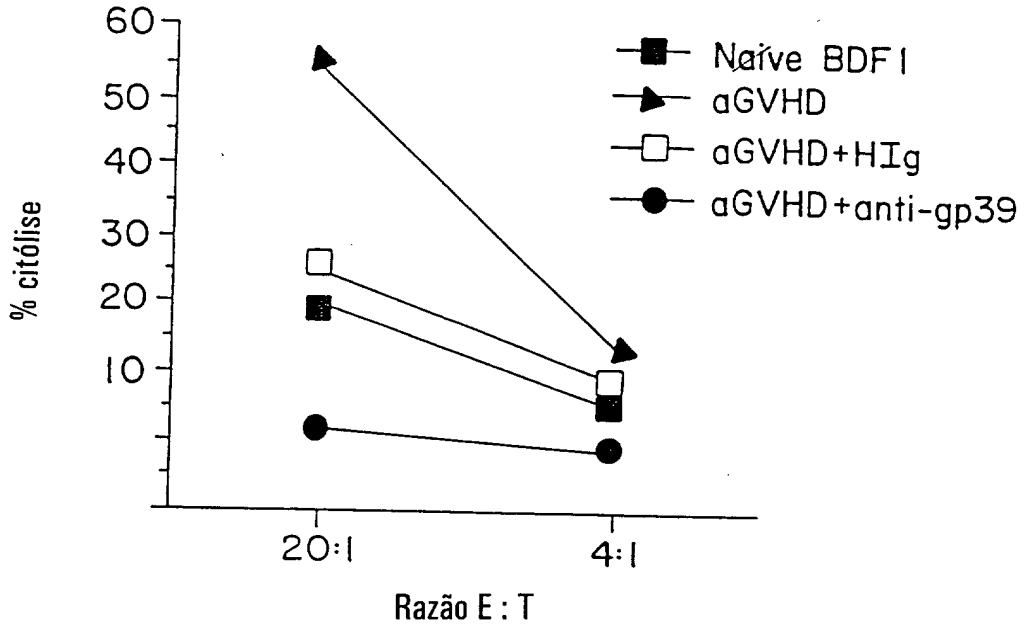

60
50
40
30
20
10
% citólise
Naive BDF1
aGVHD
aGVHD+HIg
aGVHD+anti-gp39
20:1
4:1
Razão E : T

FIG. 9A

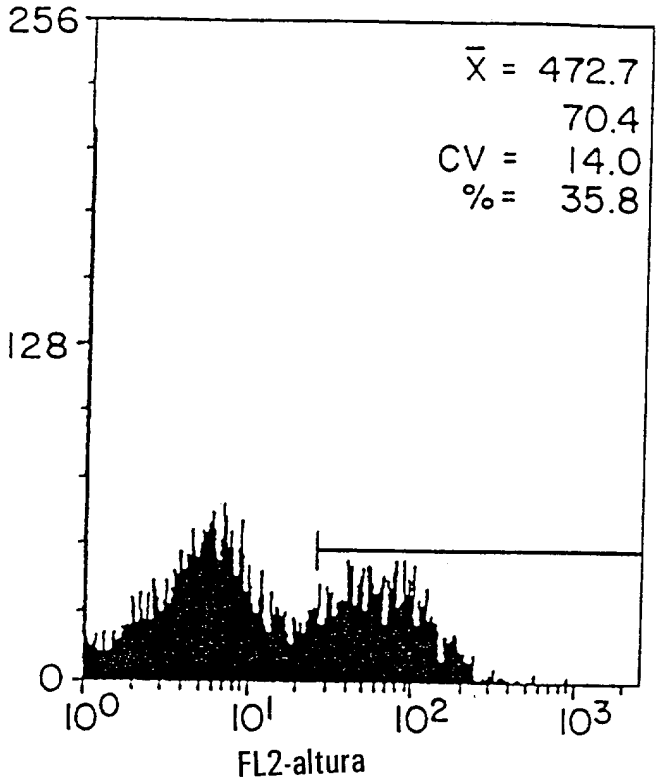

256
128
0
$\bar{X}$ = 472.7
70.4
CV = 14.0
% = 35.8
10^0
10^1
10^2
10^3
FL2-altura

FIG. 9B

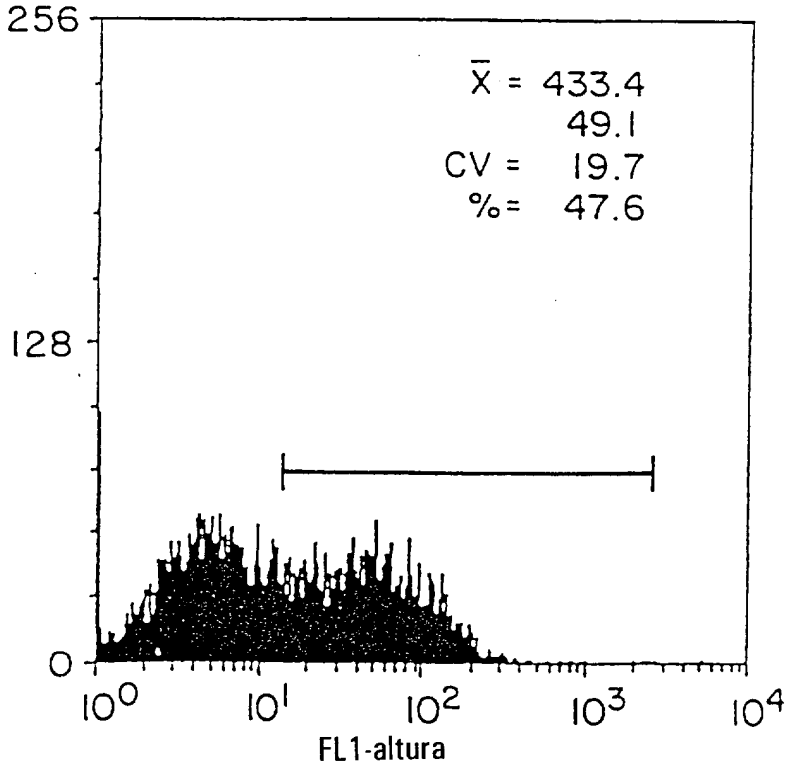

256
128
0
$\bar{X}$ = 433.4
49.1
CV = 19.7
% = 47.6
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL1-altura

FIG. 9C

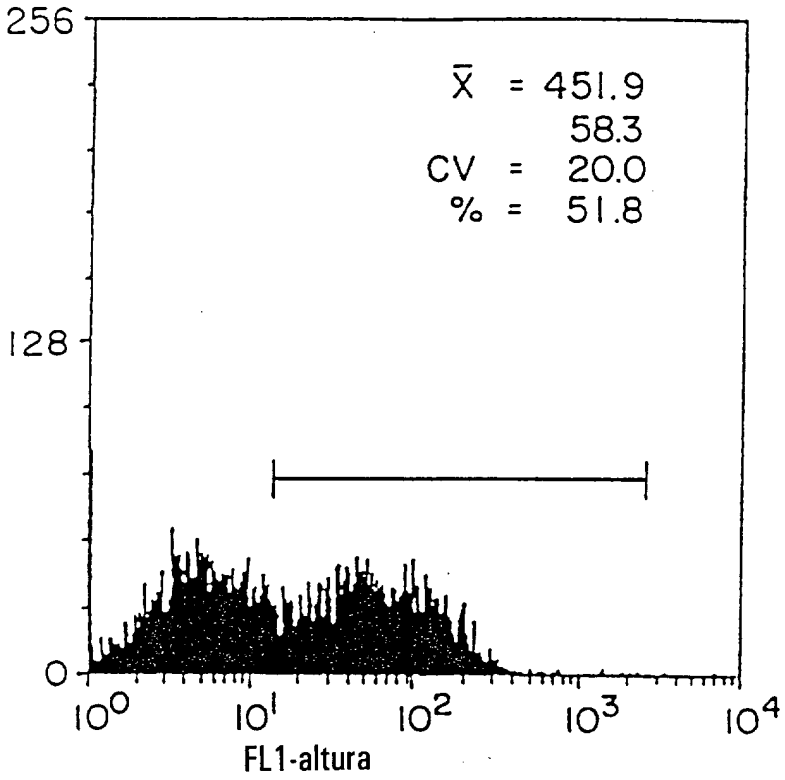


FIG. 10A

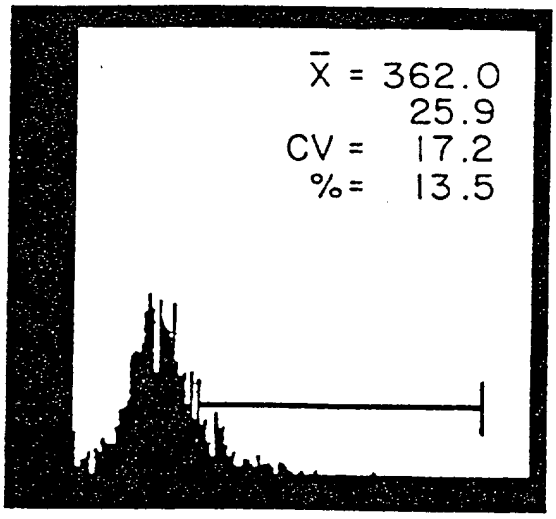


FIG. 10B

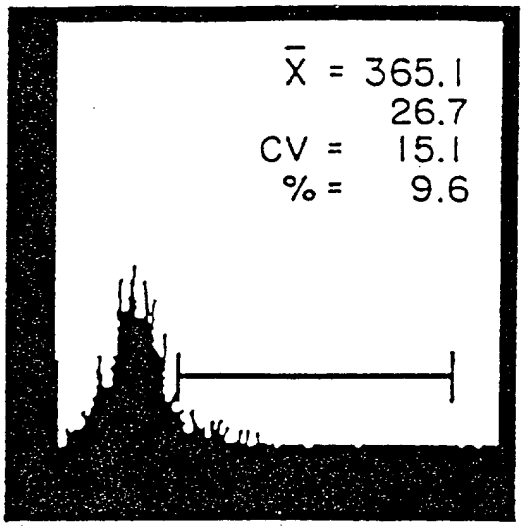


FIG. 10C

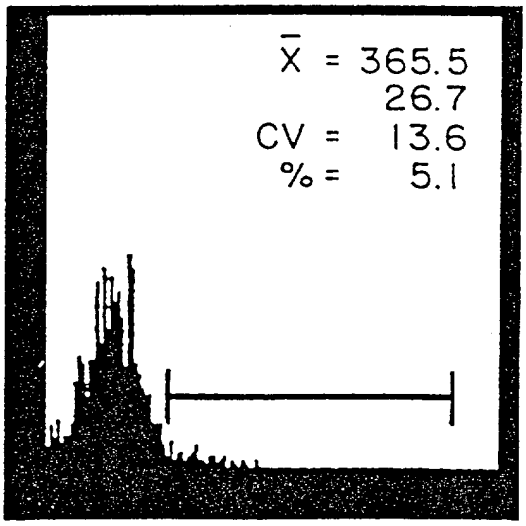


FIG. 11A

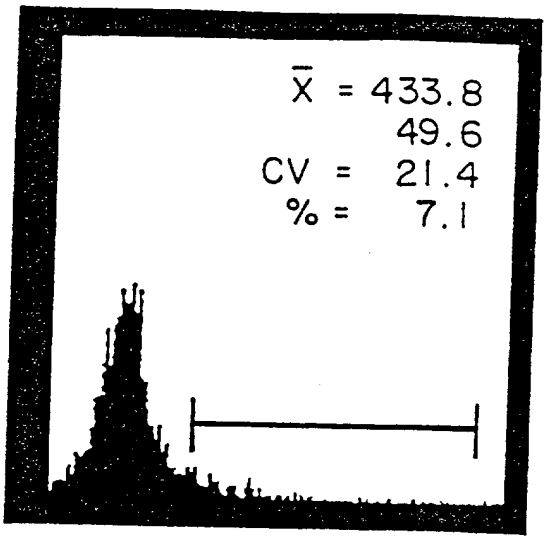


FIG. 11B

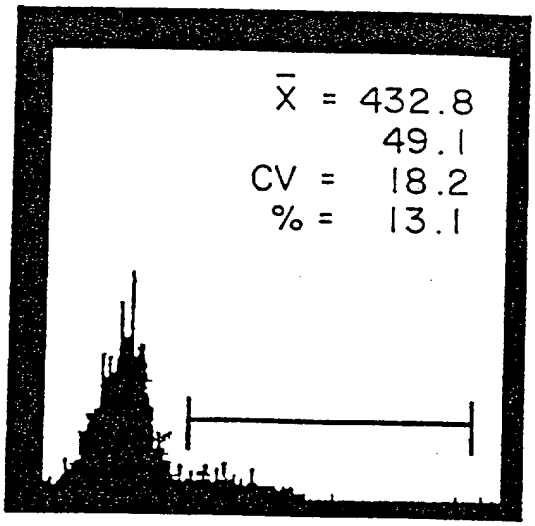


FIG. 12

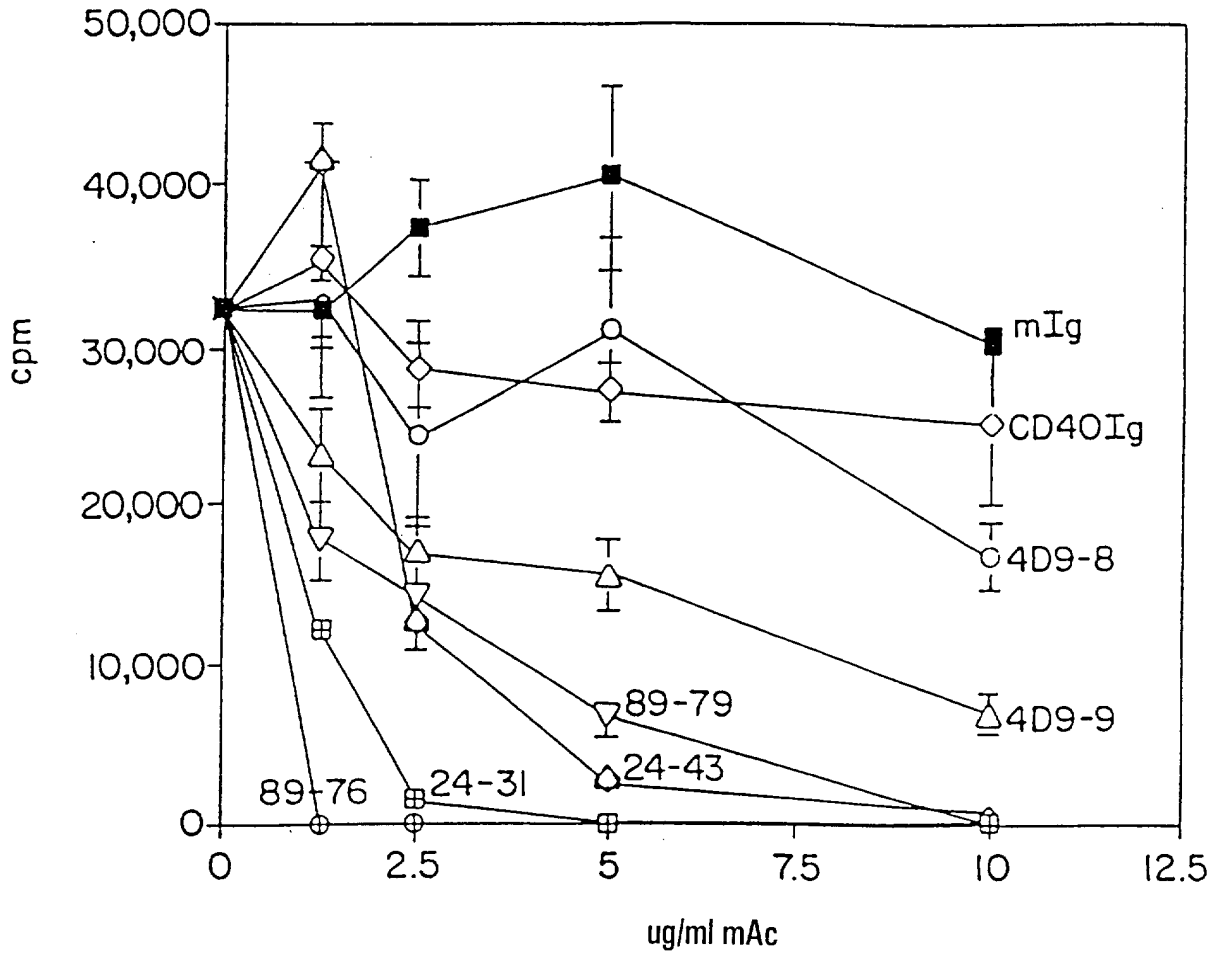
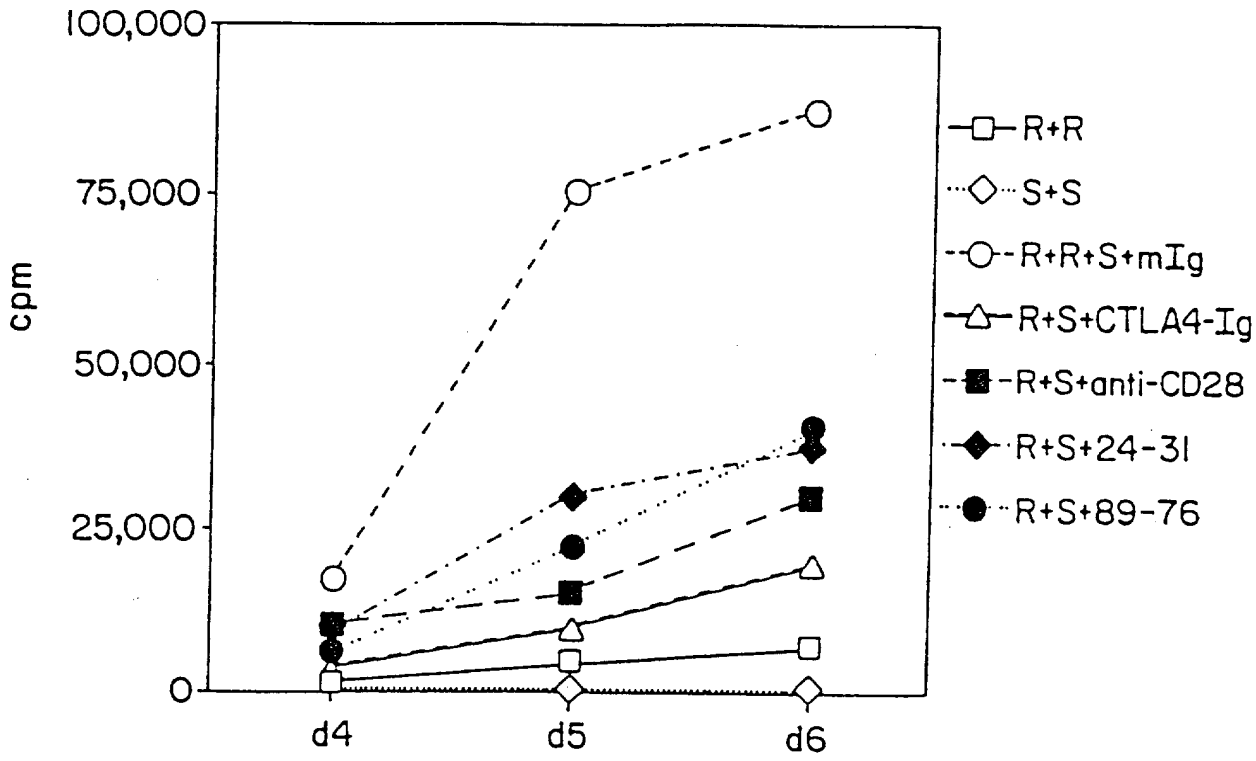

50,000
40,000
30,000
20,000
10,000
0
cpm
0
2.5
5
7.5
10
12.5
ug/ml mAc
mIg
CD40Ig
4D9-8
4D9-9
89-79
24-43
24-31
89-76

FIG. 13


100,000
75,000
50,000
25,000
0
cpm
d4
d5
d6
R+R
S+S
R+R+S+mIg
R+S+CTLA4-Ig
R+S+anti-CD28
R+S+24-31
R+S+89-76