

(11) Número de Publicação: **PT 1086137 E**

(51) Classificação Internacional:

C07K 16/28 (2007.10) **A61K 39/395** (2007.10)

C12N 5/08 (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2000.04.19	(73) Titular(es): KATHOLIEKE UNIVERSITEIT NIJMEGEN PHILIPS VAN LEYDENLAAN 25 6525 EX NIJMEGEN NL
(30) Prioridade(s): 1999.04.19 EP 99201204 2000.01.20 US 176924 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2001.03.28	(72) Inventor(es): CARL GUSTAV FIGDOR TEUNIS BERNARD HERMAN GEIJTENBEEK YVETTE VAN KOOYK RUURD TORENSMA NL NL NL NL
(45) Data e BPI da concessão: 2008.06.11 176/2008	(74) Mandatário: PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÃO E MÉTODO PARA MODULAR A INTERACÇÃO CÉLULA DENDRÍTICA-CÉLULA-T**

(57) Resumo:

RESUMO

"COMPOSIÇÃO E MÉTODO PARA MODULAR A INTERACÇÃO CÉLULA DENDRÍTICA-CÉLULA-T"

A presente invenção refere-se à utilização de um composto que se liga a uma lectina do tipo C na superfície de uma célula dendrítica, na preparação de uma composição para modular, em particular, reduzir a resposta imunitária num animal, em particular, num humano ou noutro mamífero. A composição em particular modula as interacções entre uma célula dendrítica e uma célula T, mais especificamente, entre uma lectina do tipo C na superfície de uma célula dendrítica e um receptor ICAM na superfície de uma célula T. As composições podem ser utilizadas para prevenir/inibir as respostas imunitárias contra antigénios específicos, para induzir tolerância, para imunoterapia, para imunossupressão, para o tratamento de doenças auto-imunes, tratamento de alergia e/ou para inibir a infecção com HIV. O composto que se liga a uma lectina do tipo C é, de um modo preferido, escolhido de manose, fucose, lecitinas vegetais, antibióticos, açúcares, proteínas ou anticorpos contra lectinas do tipo C. A invenção refere-se também a estes anticorpos e a um método para isolar células dendríticas utilizando estes anticorpos.

DESCRIÇÃO

"COMPOSIÇÃO E MÉTODO PARA MODULAR A INTERACÇÃO CÉLULA DENDRÍTICA-CÉLULA-T"

A presente invenção refere-se a composições e sua utilização para reduzir a resposta imunitária num animal, tal como um humano ou outro mamífero.

Numa forma de realização, a invenção refere-se a composições e sua utilização para reduzir a adesão de células dendríticas a células T.

Mais especificamente, esta forma de realização da invenção refere-se a composições e sua utilização para reduzir a adesão de receptores de lectina do tipo C à superfície de células dendríticas aos receptores ICAM à superfície das células T. Através da modulação desta adesão, as interacções célula dendrítica-célula T, tal como a formação de conjuntos e apresentação de antigénio, assim como, por exemplo, respostas primárias de células T dependentes destas, podem ser influenciadas, resultando numa modulação da resposta imunitária.

As composições da invenção podem, deste modo, ser utilizadas para alterar as respostas imunitárias a antigénios específicos bem como a respostas imunitárias causadas por distúrbios do sistema imunitário, tal como podem ocorrer em doenças auto-imunitárias ou na alergia.

Numa outra forma de realização, o método da invenção pode ainda ser utilizado no tratamento de infecções com HIV e distúrbios semelhantes do sistema imunitário, assim como para modular a resposta imunitária contra enxertos ou após transplante.

A invenção é baseada na surpreendente observação de que a adesão de células dendríticas a células T é mediada por um receptor de lectina do tipo C na superfície das células dendríticas. Verificou-se que esta lectina do tipo C se liga aos receptores ICAM na superfície de células T. Com o termo "receptor(es) ICAM" entende-se tanto o receptor ICAM-2 como o ICAM-3 e, em particular, o receptor ICAM-3.

A invenção é ainda baseada na observação de que a inibição deste receptor de lectina do tipo C nas células dendríticas por anticorpos específicos dirigidos contra o receptor de lectina do tipo C, podem modular e, mais especificamente, reduzir, a adesão de células T a células dendríticas e podem assim influenciar a resposta imunitária, em particular os estádios iniciais da resposta imunitária.

O documento WO 96/23882 descreve um receptor de murino e humano com domínios de lectinas tipo C que são abundantemente expressos à superfície de células dendríticas e células epiteliais do timo. O receptor de murino - denominado "DEC-205"- é descrito como uma proteína de 295 kDa com um ponto isoeléctrico de cerca de 7,5 que contém 10 domínios de lectina tipo C e que é homólogo do receptor de manose de macrófagos (MMR).

O documento WO 96/23882 descreve ainda anticorpos monoclonais e policlonais contra DEC-205. Contudo, estes anticorpos não foram capazes de bloquear a função de células dendríticas. Em particular, os anticorpos monoclonais e policlonais anti-DEC-205 não foram capazes de inibir a interacção entre células dendríticas e células T auxiliares, ambos *in vitro* (como determinado pela incapacidade de anti-DEC-205 inibir a proliferação alogénica de células T de uma forma misturada com a reacção de leucócitos) e *in vivo* (como determinado pela incapacidade do anti-DEC-205 inibir uma resposta *in vivo*, *i. e.*, num local de reacção enxerto-versus-hospedeiro (GVH)). Estes resultados sugerem que o receptor DEC-205 não está envolvido na interacção célula dendrítica-célula T (*i. e.*, adesão) e que os anticorpos anti-DEC-205 não podem ser utilizados para modular a resposta imunitária.

Curtis *et al.* em *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 (1992), p. 8356-8360, assim como no documento WO 93/0 1820, descrevem um receptor de gp 120 não CD4 isolado e clonado de tecido de placenta humana. Este receptor de gp 120 é expresso em células de mamífero que não exibem níveis elevados de CD4, tal como placenta, músculo esquelético, cérebro, células neurais e mucosa, assim como outros tecidos e células incluindo cólon, timo, coração, células T, células B e macrófagos (mas não no fígado ou rim). A sequência de aminoácidos do receptor de gp 120 lectina do tipo C divulgad nas SEQ ID M° 1 e 2 do documento WO 93/01820 possui um elevado grau de homologia de sequência (>98%) com as lectinas do tipo C que se verificou agora estarem presentes em células dendríticas.

Curtis e o documento WO 93/01820 discutem ainda o papel que este receptor de lectina do tipo C desempenha na infecção das

células/tecidos acima mencionados com HIV, *i. e.*, por ligação da glicoproteína principal do envelope de HIV gp 120 antes da internalização do virião na célula. Verificou-se que a inibição do receptor de gp 120 lectina do tipo C pode reduzir ou inibir a infecção com HIV destas células/tecidos. Como inibidores adequados, o documento WO 93/01820 divulga hidratos de carbono de manose, hidratos de carbono de fucose, lectinas vegetais, tal como concanavalina A, antibióticos específicos, tal como pradimicina A, e açúcares tais como N-acetil-D-glucosamina e galactose (que são, contudo, descritos como menos potentes). Estes compostos e composições que os contêm são utilizadas *in vitro* ou *in vivo* para inibir a ligação de HIV à superfície celular.

O documento WO 93/01820 divulga ainda que a ligação de HIV a células COS-7 pode ser inibida pela pré-incubação de gp 120 com um anticorpo monoclonal anti-gp 120 (denominado "anticorpo 110.1"). Contudo, este anticorpo não é dirigido contra as lectinas do tipo C, mas contra a proteína gp 120.

Contudo, nem Curtis nem o documento WO 93/01820 menciona ou sugere a presença desta lectina do tipo C em células dendríticas, nem estas referências mencionam ou sugerem o seu papel na interacção célula dendrítica - célula T durante os estágios iniciais de uma resposta imunitária.

O documento WO 95/32734 descreve composições de FcγRII em ponte (CD32) (ou ligação cruzada) e sua utilização na modulação da resposta imunitária a antigénios específicos. Esta referência é baseada na verificação de que a ligação de moléculas de FcγRII (CD32) em células apresentadoras de antígeno (APC) impedem a expressão das moléculas co-estimuladoras essenciais B7-1/2

(i. e., previne a sua sobre-regulação e causa, deste modo, impedimento da expressão (i. e., causa a sub-modulação) da molécula de adesão ICAM-3, com a consequência funcional de uma capacidade de impedimento dos monócitos na co-estimulação da activação de células T específicas para antigénios (i. e., resultando na modulação de células T específicas para antigénio que não respondem). O agente de reticulação é escolhido de moléculas de IgG humana agregadas ou seus fragmentos Fc; anticorpos monoclonais bi- ou multivalentes contra FcγRII ou seus fragmentos, ou uma fusão de duas ou mais partes Fc de IgG humana.

O documento WO 95/32734 é deste modo dirigido contra a modulação (i. e., inibição) do sinal de co-estimulação necessário para a activação de células T (i. e., para além do sinal primário da interacção TcR/CD3), em particular para induzir proliferação e maturação em células efectoras. O documento WO 95/32734 não é dirigido contra a modulação da adesão célula dendrítica - célula T, nem divulga ou sugere a presença de lectinas do tipo C (à superfície) nas células dendríticas ou sua interacção com os receptores ICAM-3 nas células T.

O documento WO 98/02456 divulga um grupo II da lectina humana do tipo C isolada de uma biblioteca de macrófagos estimulados. O documento WO 98/49306 divulga um grupo IV de lectina do tipo C presente na proteína associada a pancreatite humana ("PAP"). O documento WO 98/41633 divulga um grupo V de lectina do tipo C humana isolada de um clone de tumor humano.

Os documentos WO 98/02456, WO 98/49306 e WO 98/41633 divulgam ainda métodos para produzir anticorpos contra estas lectinas do tipo C.

Contudo, nenhuma destas referências se refere a lectinas do tipo C em células dendríticas; as lectinas do tipo C divulgadas nestas referências diferem das lectinas do tipo C aqui descritas na origem, na função biológica e na estrutura.

As células dendríticas (DC) são células apresentadoras de antígenos profissionais que capturam antígenos nos tecidos periféricos e migram através da linfa ou sangue para a área das células T de drenagem dos gânglios linfáticos e baço. Aqui apresentam antígenos processados a células T naíves, iniciando as respostas primárias de células T específicas para antígeno.

Devido à sua posição à superfície do corpo como células de imunovigilância, é provável que as DC sejam as primeiras células infectadas com HIV-1 após exposição das mucosas e estejam, deste modo, implicadas no desempenho de um importante papel na imunopatogénese de HIV. Crê-se agora geralmente que o HIV converte os processos normais de transporte de DC para ganhar a entrada nos gânglios linfáticos e aceder a células T CD4'', como foi demonstrado *in vivo* utilizando a infecção de macacos com o vírus da imunodeficiência primária de símios como um sistema modelo (Spira *et al.*, 1996) (Joag *et al.*, 1997). A infecção produtiva de DC com HIV-1 foi reportada por vários investigadores (Graneli-Piperno *et al.*, *J Virol* 72(4), 2733-7, 1998) (Blauvelt *et al.*, *Nat Med* 3(12), 1369-75. 1997.) e evidência substancial indica que DC pulsadas com HIV-1 *in vitro* podem induzir uma infecção vigorosa quando co-cultivadas com células T (Cameron *et al.*, *Science* 257(5068), 383-7, 1992).

Embora não esteja ainda claro se um cenário semelhante ocorre em indivíduos infectados com HIV, a transmissão de HIV-1 de DC para células T pode contribuir para a diminuição de células T CD4+ observada na SIDA. Estudando as interações HIV-DC deve contribuir para a compreensão de eventos precoces da infecção com HIV e espera-se que leve da melhor forma a estratégias que visam o bloqueio de eventos precoces na transmissão. Para uma outra discussão, é também feita referência aos documentos WO 95/32734 e WO 96/23882.

As DC são únicas na sua capacidade para interagir e activar as células T em repouso. Contudo, anteriormente à presente invenção, era amplamente desconhecido como o contacto DC-células T era iniciado e regulado. Aqui, o papel de ICAM-3 nas interações DC-células T é investigado. É demonstrado que embora as DC adiram fortemente a ICAM-3, esta adesão não é mediada por LFA-1, α D ou qualquer outra integrina. Na pesquisa deste novo receptor ICAM-3 em DC foi clonado um receptor lectina do tipo C, designado DC-SIGN, que é, de um modo preferido, expresso por DC. Além do seu papel proeminente em agrupamentos DC-células T e iniciação de respostas de células T verificou-se que DC-SIGN é um receptor principal de HIV-1 envolvido na infecção de DC e subsequente transmissão de HIV-1 a células T. Deste modo, o HIV-1 e as células T em repouso exploram um receptor semelhante altamente expresso para interagir com DC.

Num primeiro aspecto, a invenção refere-se à utilização de um anticorpo que se liga ao receptor designado DC-SIGN, na superfície de uma célula dendrítica e representado como seq ID N°:2 ou uma variante natural ou seu fragmento, na preparação de um medicamento para reduzir uma resposta

imunitária num animal, em que o referido anticorpo inibe a interacção entre uma célula dendrítica e uma célula T.

Em particular, o anticorpo pode reduzir a adesão entre uma célula dendrítica e uma célula T.

Especialmente, o anticorpo pode reduzir a adesão entre DC-SIGN na superfície de uma célula dendrítica e um receptor de ICAM na superfície de uma célula T.

A sequência de aminoácidos de uma lectina do tipo C, designada DC-SIGN que se observou estar envolvida na ligação das células dendríticas às células T, é apresentada em SEQ ID N° 1 e na Figura 9. Este receptor de lectina de tipo C é essencialmente semelhante ao receptor de lectina do tipo C de gp 120 descrito por Curtis et al. em *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 (1992), p. 8356-8360 e no documento WO 93/01820. Em particular, possui um elevado grau de homologia (< 98%) com a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID N° 1 do documento WO 93/01820. É uma lectina do grupo II do tipo C de 404 aminoácidos; com um Mr aparente de cerca de 44 kDa; e com um primeiro domínio (Met 1 até Ala 76) compreendendo um terminal citoplásmico amino, um segundo domínio (Ile 77 até Val 249) compreendendo repetições em tandem e um terceiro domínio (Cys 253 até Ala 404) com um elevado grau de homologia como outras lectinas conhecidas do tipo C que são proteínas de membrana de tipo II. É apresentada abaixo uma caracterização adicional.

Na invenção, esta lectina do tipo C em células dendríticas verificou-se estar ligada a receptores ICAM na superfície de células T.

Consequentemente, as composições da invenção podem ser utilizadas para modular (*i. e.*, alterar e/ou modificar), e mais especificamente inibir (*i. e.*, reduzir e/ou ajustar negativamente), a(s) interacção(ões) entre células dendríticas e células T.

Essas interacções incluem a adesão de células T a células dendríticas, por exemplo no agrupamento de célula dendrítica - célula T, activação de células T e ainda incluem todas as interacções que se baseiam no contacto entre células dendríticas e células T, pelas quais se pretende ou um contacto directo célula-a-célula ou proximidade estreita de células dendríticas e células T.

Essas outras interacções incluem, mas não estão limitadas a, processos envolvidos na criação de uma resposta imunitária, em particular durante os estágios iniciais de uma tal resposta, tal como sensibilização/activação primária de linfócitos T, (*i. e.*, apresentação de antigénio e/ou péptidos ligados a MHC em células T) e co-estimulação de células T; assim como processos, tais como sinalização química, endocitose e transporte trans-epitelial. Para uma discussão da interacção célula dendrítica-células T em geral, em que todas podem ser influenciadas pelas composições da invenção, é feita referência na discussão abaixo, assim como nos documentos WO 95/32734 e WO 96/23882.

As composições da invenção podem deste modo ser utilizadas para influenciar a capacidade imunomoduladora das células dendríticas; para modular e, em particular, reduzir respostas de células T mediadas por células dendríticas (primárias) e/ou

geralmente para influenciar e, em particular, inibir o sistema imunitário.

Algumas aplicações específicas incluem prevenir ou inibir respostas imunitárias para antigénios específicos; induzir tolerância; imunoterapia; imunossupressão, por exemplo, prevenir a rejeição a transplante; o tratamento de doenças auto-imunes, tais como tiroidite, artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistémico (SLE), esclerose múltipla e diabetes auto-imune; e a prevenção ou tratamento de alergias.

As composições da invenção podem também modular a activação de outros receptores em células T que são dependentes da adesão ou proximidade estrita de células dendríticas para células T. Além disso, a verificação da invenção que a lectina do tipo C em células dendríticas se liga aos receptores ICAM nas células T, pode abrir novas estratégias ou possibilidades para influenciar a interacção entre células dendríticas e células T e, desse modo, modular o sistema imunitário em geral.

Além disso, as composições da invenção podem ser utilizadas para prevenir ou reduzir a transferência de matéria das células dendríticas para células T, tais como produtos químicos, factores de sinalização, tais como quimiocinas e/ou interleucinas, etc., e em particular de partículas virais, tal como HIV. Deste modo, utilizando as composições da invenção, não apenas pode a adesão inicial de NV às células dendríticas ser inibida, mas também a disseminação da infecção com HIV das células dendríticas para células T.

Esta observação é de particular importância já que se pensa que as células dendríticas podem servir como um "reservatório"

de HIV, em particular durante os estádios iniciais da infecção com MV. As composições da invenção podem deste modo ser, não apenas utilizadas para prevenir infecção com HIV de células dendríticas, mas também reduzir a disseminação da infecção com HIV para células T após as células dendríticas terem sido infectadas, retardando assim o processo da doença.

Também é conhecido que a activação de células T - *i. e.* nas glândulas da linfa - desempenha um papel importante no desenvolvimento de SIDA num doente infectado com HIV. Crê-se que as composições da invenção podem ser utilizadas para prevenir, inibir ou, pelo menos, retardar a referida activação de células T e, desse modo, retardar o início e/ou a progressão da doença.

Por isso, num outro aspecto, a invenção refere-se ainda à utilização de um anticorpo que se liga ao receptor designado DC-SIGN, na superfície de uma célula dendrítica e representada como seq ID N°: 2 ou uma variante natural ou seu fragmento, na preparação de um medicamento para inibir a adesão da proteína de superfície de HIV (*i. e.*, gp 120) à superfície de uma célula dendrítica e, deste modo, a entrada de HIV na referida célula dendrítica.

Compostos que podem ser utilizados como inibidores para as lectinas do tipo C são conhecidas *per se*, incluindo aqueles descritos no documento WO 93/01820 como mencionado acima.

Em geral, estes são compostos que se podem ligar ou aderir a (*e. g.*, de um modo reversível), ou que podem servir como um ligando para as lectinas do tipo C, em particular a lectina do tipo C de SEQ ID N° 1/Figura 9 ou variantes naturais ou seus equivalentes. Exemplos são hidratos de carbono de manose, tais

como manano e D-manose; hidratos de carbono de fucose, tal como L-fucose; lectinas vegetais, tal como concanavalina A; antibióticos, tal como pradimicina A; açúcares, tais como N-acetil-D-glucosamina e galactose (que, todavia, são descritos como menos potentes); assim como compostos peptidomiméticos adequados e moléculas de fármaco pequenos que podem, por exemplo, ser identificados utilizando técnicas de apresentação em fagos. Além disso, podem ser utilizadas proteínas, tais como gp 120 e análogos ou seus fragmentos ou proteínas semelhantes com capacidade de ligação a lectinas do tipo C em células dendríticas, assim como receptores de ICAM isolados e seus análogos, incluindo parte ou seus fragmentos. Essas partes ou fragmentos devem ser ainda de modo a que se possam ligar às lectinas do tipo C na superfície de células dendríticas.

Contudo, a utilização de hidratos de carbono é normalmente menos desejada de um ponto de vista terapêutico, como tal podem ser rapidamente metabolizados *in vivo*. Também, a utilização de lectinas vegetais, tais como os antibióticos concanavalina A e pradimicina podem possuir desvantagens num sistema terapêutico, em particular quando se tratam doentes com distúrbios auto-imunes e/ou infecções com HN.

Podem ser utilizados um ou mais compostos fisiologicamente toleráveis e/ou farmacologicamente aceitáveis, tais como definidos no documento WO 93/01820. Por exemplo, a utilização de gp 120 ou seus derivados podem provocar efeitos colaterais indesejados, em particular no sistema nervoso (vide documento WO 93/01820).

Em contraste, de acordo com a invenção, é utilizado um anticorpo dirigido contra DC-SIGN como presente/expesso na

superfície de uma célula dendrítica, ou uma parte, Segmento ou seu epitopo. Como aqui utilizado, o termo anticorpos inclui *inter alia* anticorpos policlonais, monoclonais, quiméricos e de cadeia simples, assim como fragmentos (Fab, Fv, Fa) e uma biblioteca de expressão de Fab. Além disso, podem ser utilizados anticorpos "humanizados", por exemplo, como descrito no documento WO 98/49306.

Esses anticorpos contra DC-SIGN da invenção podem ser obtidos como aqui descrito abaixo ou em qualquer outro modo conhecido *per se*, tal como os descritos nos documentos WO 95/32734, WO 96/23882, WO 98102456, WO 98/41633 e/ou WO 98/49306.

Por exemplo, os anticorpos policlonais podem ser obtidos imunizando um hospedeiro adequado, tais como cabras, coelho, ovelha, rato, porco ou murganho com DC-SIGN ou uma porção imunogénica, fragmento ou fusão deste, opcionalmente com a utilização de um veículo imunogénico (tal como albumina do soro bovino ou hemocianina de lapa) e/ou um adjuvante, tal como de Freund, saponina, ISCOM's, hidróxido de alumínio ou um gel mineral semelhante, ou hemocianina de lapa ou uma substância de superfície activa semelhante. Após ter sido criada uma resposta imunitária contra DC-SIGN (normalmente entre 1-7 dias), os anticorpos podem ser isolados de sangue ou de soro retirado do animal imunizado, de um modo conhecido *per se*, que pode envolver opcionalmente um passo de rastreio para um anticorpo com propriedades desejadas (*i. e.* especificidade) utilizando técnicas de imunoensaio conhecidas, para as quais é feita referência novamente em, por exemplo, documento WO 96/23882.

Os monoclonais podem ser produzidos utilizando linhas celulares contínuas em cultura, incluindo técnicas de hibridoma e semelhantes, novamente essencialmente como descritas nas referências acima citadas.

Fragments de Fab, tal como fragmentos $F(ab)_2$, Fab' e Fab, podem ser obtidos por digestão com um anticorpo com pepsina ou outra protease, reduzindo as ligações persulfureto e tratamento com papaína e um agente de redução, respectivamente. As bibliotecas de expressão de Fab podem ser obtidas, por exemplo, pelo método de Huse *et al.*, 1989, *Science* 245:1275-1281.

De um modo preferido, é utilizado um anticorpo monoclonal contra DC-SIGN em células dendríticas, mais especificamente contra o péptido com a sequência de aminoácidos apresentada em/codificada pelas SEQ ID N° 1 e 2 e Figura 9, ou (um antigénico) parte desta; e esses monoclonais são um outro aspecto da invenção. Aqui abaixo, a invenção será ilustrada por meio de dois desses monoclonais, aqui referidos como um AZN-D1 e AZN-D2, embora monoclonais semelhantes com especificidade comparável para DC-SIGN possam também ser utilizados.

Num outro aspecto, a invenção proporciona uma linha celular, tal como um hibridoma que produz anticorpos, de um modo preferido, anticorpos monoclonais contra DC-SIGN em células dendríticas. Mais especificamente contra o péptido com a sequência de aminoácidos apresentada em/codificada por SEQ ID N° 1 e 2 e Figura 9 ou (um antigénico) parte desta. Os hibridomas que produzem os monoclonais acima mencionados AZN-1 e AZN-2 da invenção foram depositados em 8 de Abril de 1999 na European Collection of Cell Cultures com os números de acesso (provisórios) EGACC 990400818 e 99040819, respectivamente.

A invenção também se refere a um método para produzir um anticorpo, de um modo preferido, um anticorpo monoclonal contra DC-SIGN em células dendríticas, mais especificamente contra o péptido com a sequência de aminoácidos apresentada em (ou codificada) por SEQ ID N° 1 e 2 e Figura 9 ou (um antigénico) parte desta, compreendendo o referido método cultivar uma célula ou uma linha celular que produz o referido anticorpo e recolher/isolar o anticorpo da cultura de células.

Nem anticorpos (monoclonais) contra DC-SIGN em células dendríticas, nem células ou linhas celulares que produzem esses anticorpos, foram descritos até à data e está contemplado que os novos anticorpos da invenção possuirão vasta aplicabilidade (*i. e.,* além das utilizações farmacêuticas/terapêuticas aqui reveladas). Algumas destas aplicações - que formam ainda outro aspecto da invenção - serão claras para o especialista a partir da presente divulgação.

Por exemplo, os anticorpos da invenção podem ser utilizados para detectar a presença de (e desse modo determinar a expressão de) DC-SIGN nos tecidos ou células totais, assim como detectar a presença de DC-SIGN noutras amostras biológicas, tais como fragmentos celulares ou em preparações celulares. A informação assim obtida pode ser então (também) utilizada para determinar se o método ou composições da invenção podem ser aplicados a esses tecidos ou células. Os anticorpos da invenção podem ser também utilizadas para detectar (qualitativamente e/ou quantitativamente), isolar, purificar e/ou produzir células dendríticas, por exemplo em/a partir de amostras biológicas, incluindo fluidos biológicos, tais como sangue, plasma ou fluido linfático; amostras de tecido ou amostras de células, tais como

medula óssea, tecido ósseo, tecidos tumorais, etc; ou culturas de células ou meios de cultura.

Por exemplo, os poucos métodos presentemente disponíveis para isolar/produzir células dendríticas a partir de amostras biológicas - tal como o método descrito no documento US-A-5643786, compreendendo leucaferese seguido por separação de células por tamanho, activado por fluorescência - são muito processos de múltiplos passos muito trabalhosos que proporcionam apenas níveis baixos e amostras heterogéneas. Como resultado, a disponibilidade limitada de células dendríticas prejudicou severamente a investigação nesta importante classe de células.

Utilizando os monoclonais da invenção, as células dendríticas podem ser isoladas e produzidas com nível (mais) elevado e com especificidade mais elevada. Num tal método, os monoclonais podem ser utilizados de um modo conhecido *per se* para a recolha, isolamento e/ou purificação de células a partir dos fluidos biológicos utilizando anticorpos.

Por exemplo, os monoclonais podem estar ligados a uma coluna ou matriz, a esferas (para)magnéticas ou a um suporte sólido semelhante, que pode ser, então, colocado em contacto com uma amostra biológica ou meio de cultura contendo células dendríticas. As células que não se ligam elas próprias ao veículo são então separadas ou removidas - e. g. por lavagem após a qual as células dendríticas são separadas do veículo e isoladas de um modo conhecido *per se*.

Também, os monoclonais da invenção podem ser utilizadas para detectar/determinar a presença de dendríticas (células e/ou DC-SIGN) e/ou a expressão de genes que codificam para estes em

amostras biológicas, em que os anticorpos podem ser novamente utilizados de um modo conhecido *per se* para a analítica de anticorpos, tal como ensaios de inibição competitiva ou imunoensaios do tipo ELISA. Por exemplo, os anticorpos podem ser utilizados em combinação com técnicas de microscopias, técnicas de separação de células incluindo citometria de fluxo e FACS, técnicas baseadas em suportes sólidos e/ou rótulos ou marcadores detectáveis (que podem ser ligados aos anticorpos), técnicas baseadas em esferas (para)magnéticas ou qualquer outra técnica de detecção ou ensaio conhecida *per se* na qual os anticorpos podem ser utilizados. Esses ensaios e kits para essa utilização - que para além dos anticorpos da invenção podem conter todos os outros componentes conhecidos *per se* para ensaios à base de anticorpo, assim como manuais etc.- formam um outro aspecto da invenção.

Assim, os monoclonais da invenção constituem uma ferramenta muito útil de diagnóstico e investigação, para utilização tanto *in vitro* como *in vivo*. Campos de aplicação possíveis não limitantes incluem o estudo de células dendríticas e sua função e interações; o estudo do sistema imunitário; a detecção de células dendríticas e/ou DC-SIGN em células, tecidos ou fluidos biológicos tais como tecido sinovial e tecido da pele/células da pele (células dendríticas dérmicas); assim como o estudo do papel que as células dendríticas desempenham em processos biológicos ou mecanismos de doença, tais como cancro (as células dendríticas são exploradas *in vivo* em ensaios clínicos para erradicar a formação e desenvolvimento de tumor) e doenças auto-imunes (incluindo por exemplo artrite reumatóide).

Para posterior descrição dos métodos e técnicas conhecidos *per se* em que os anticorpos da invenção podem ser utilizados, é

feita referência aos livros de texto gerais, tais como D.P. Sites, A.I. Terr, T.G. Parslow; *"Basic and clinical immunology"*, 8ª Ed., Prentice-Hall (1994); I. Roitt, J. Brostoff, D. Male: *"Immunology"*, 2ª. Ed., Churchill Livingstone (1994); todos aqui incorporados por referência. É feita particular referência às utilizações gerais de anticorpos e técnicas aí envolvidas como mencionado nas secções 2.7 a 2.17 do trabalho de referência geral por Janeway-Travers: *"Immunobiology, the immune system in health and disease"*, Terceira Edição.

A composição da invenção pode conter dois ou mais dos compostos activos acima mencionados, ou esses compostos podem ser utilizados em combinação. Por exemplo, um anticorpo anti-DC-SIGN pode ser formulado com hidratos de carbono de manose ou fucose, lectinas e/ou antibióticos, tal como pridamicina A., em que pode ser obtido um efeito sinérgico.

As composições da invenção podem também conter ou ser utilizadas em combinação com compostos co-inibidores conhecidos, tais como anti-LF3A; assim como outros princípios activos conhecidos *per se*, dependendo do estado a ser tratado. Por exemplo, as composições da invenção podem ser formuladas ou utilizadas em combinação com imunossuppressores (*i. e.*, para prevenir a rejeição de transplante), imunomoduladores, antibióticos, auto-antígenos ou alérgenos (por exemplo como descrito no documento WO 95/3234 ou WO 96/23882), Factor de Necrose de Tumor (TNF), e agentes anti-virais, tais como agentes anti-HIV e inibidores de CD4 incluindo anticorpos dirigidos a CD4, tal como Leu-3A, pelos quais pode ser novamente obtido um efeito sinérgico.

As composições da invenção podem ser ainda formuladas utilizando veículos conhecidos e/ou adjuvantes para proporcionar uma forma farmacêutica conhecida *per se*, tal como um comprimido, cápsula, pó, preparação liofilizada, solução para injeção, etc., de um modo preferido numa forma de dosagem unitária. Essas formas farmacêuticas, a sua utilização e administração (na forma de dosagem única ou múltipla), assim como veículos, excipientes, adjuvantes e/ou formulantes para serem aí utilizados, são geralmente conhecidos na técnica e são, por exemplo, descritos nos documentos WO 93/01820, WO 95/32734, WO 96/23882, WO 98/02456, WO98/41633 e/ou WO 98/49306, todos aqui incorporados por referência. Para além disso, a formulação pode estar na forma de um lipossoma, como descrito no documento WO 93/01820.

Formulações farmacêuticas de anticorpos, sua administração e utilização, são descritos de um modo geral nos documentos WO 95/32734, WO 96/23882, WO 98/02456, WO 98/41633 e/ou WO 98/49306.

As composições da invenção podem ser ainda embaladas, por exemplo em frascos, garrafas, saquetas, blisters, etc.; opcionalmente com folhetos contendo informação relevante para o doente e/ou instruções para utilização.

As composições da invenção podem ser utilizadas para modular a resposta imunitária num animal, em particular um humano ou outro mamífero, administrando ao referido animal um anticorpo que se liga ou pode ligar-se a um DC-SIGN na superfície de uma célula dendrítica, de um modo preferido, na forma de uma composição, como descrito acima, numa quantidade suficiente para alterar ou modificar uma resposta imunitária.

O anticorpo ou composição é, em particular, administrada numa quantidade em que a(s) interacção(ões) entre células dendríticas e células T são alteradas ou modificadas, mais em particular, numa quantidade em que a adesão de células dendríticas a células T é reduzida.

Este método pode ser utilizado para prevenir e/ou tratar distúrbios do sistema imunitário, assim como para prevenir rejeição de transplante, como descrito acima.

A composição da invenção pode ser utilizada para a prevenção ou tratamento de infecções com HIV, administrando a um doente infectado com HIV ou uma pessoa em risco de se tornar infectada com HIV, um anticorpo que se pode ligar ou liga-se a DC-SIGN na superfície de uma célula dendrítica, numa quantidade em que a adesão de HIV às células dendríticas e, em particular, da proteína do envelope gp 120 de HIV para DC-SIGN na superfície de células dendríticas, é inibida.

Em todos os métodos acima em formas de realização, os compostos/composições utilizados serão administrados numa quantidade terapeuticamente eficaz, para a qual o termo referência é geralmente tomado como WO 93/01820, WO 95/32734 e/ou WO 96/23882. A administração pode ser uma dose única, mas é, de um modo preferido, parte de um regime de administração em multidoses tomado ao longo de um ou mais dias, semanas ou meses.

Todos os termos aqui utilizados possuem o significado normal na técnica, para o qual podem ser feitas referências *inter alia* nas definições fornecidas nos documentos WO 93/01820,

WO 95/32734, WO 96/23882, WO 98/02456, WO 98/41633 e/ou WO 98/49306, aplicados analogamente.

Além disso, embora a invenção seja aqui descrita em relação ao receptor de lectina específico para 44 kDa do tipo C designado DC-SIGN aqui divulgado, não se exclui que outras lectinas do tipo C geralmente semelhantes, incluindo variantes naturais da sequência de SEQ ID N° 1 e Figura 9, possam também estar presentes em células dendríticas e/ou possam estar envolvidas na interação célula dendrítica - célula T. Essas variantes possuirão normalmente um grau elevado de homologia de aminoácidos (mais do que 80% até mais do que 90%) com, e/ou sejam funcionalmente equivalentes a, lectina específica do tipo C aqui divulgada. Também, qualquer receptor apresentará geralmente propriedades semelhantes aquelas aqui descritas; em particular que a inibição deste receptor, quer por inibidores de hidratos de carbono ou anticorpos específicos, irá conduzir a uma alteração de interação célula dendrítica/célula T. Quaisquer desses receptores variantes deve, contudo, ser distinguido do receptor de lectina do tipo C divulgado no documento WO 96/23882, cuja inibição não resulta na inibição da interação de células dendríticas e células T.

A invenção será agora ainda ilustrada por meio da Parte Experimental aqui apresentada abaixo, assim como as Figuras, nas quais:

- Figuras 1A - 1C são gráficos apresentando: adesão espontânea de leucócitos a ICAM-1 e ICAM-3 (fig. 1A); adesão de leucócitos a ICAM-3 após activação de β 2-integrinas (fig. 1B); adesão de DC a ICAM-3 na presença de anticorpos bloqueadores (20 μ g/mL) contra β 2-integrinas

(NKI-L19), β 1-integrina (AIIB2), ICAM-3 (CBR-IC3/1, CBR-IC3/2) ou na presença de EDTA (5 mM) ou EGTA (5 mM) (fig. 1C).

- Figuras 2A - 2C são gráficos demonstrando que os anticorpos AZN-D1 e AZN-D2 inibem a adesão de DC a ICAM-3 e reconhecem um antigénio que é especificamente expresso por DC.
- Figuras 3A e 3B demonstram que DC-SIGN é idêntico a gp 120 de HIV em placenta humana que se liga a lectina do tipo C, como pode ser observado por SDS-PAGE (fig. 3A) e por apresentação esquemática de DC-SIGN isolado a partir de DC humano (3B).
- Figuras 4A e 4B demonstram que DC-SIGN, sobre-expresso em células COS7, é reconhecido pelo anticorpo AZN-D 1 anti_DC-SIGN e se liga a ICAM-3.
- Figura 5 demonstra a distribuição de tecido de DC-SIGN como determinado por análise imuno-histoquímica da expressão de DC-SIGN nas amígdalas (A e B) e secções de nódulo linfático (C e D) (OMx100).
- Figuras 6A - 6D demonstram que a adesão mediada por DC-SIGN de DC a ICAM-3 está envolvida na interacção DC-T-linfócito, como demonstrado pela adesão mediada por DC-SIGN de DC a ICAM-3 (fig. 6A); o agrupamento de células heterotípicas de DC com células K562-ICAM-3 (fig. 6B); agrupamento de células dinâmico de DC com PBL em repouso (fig. 6C); e o papel que a interacção DCSIGN-ICAM-3 desempenha na proliferação de células T induzidas por DC (fig. 6D).

- Figura 7 demonstra que DC SIGN é um receptor para HIV-1 em DC.
- Figura 8 demonstra que DC SIGN se liga a ambas células K562 expressando ICAM-3 assim como ICAM-3.
- Figura 9 apresenta a sequência de DC-SIGN.

Experimental

As células dendríticas (DC) capturam antígenos e migram para tecidos linfóides secundários onde apresentam antígenos para células T naïve. O HIV-1 subverte esta capacidade única para ganhar acesso a células T CD4⁺. Na invenção, foi clonada uma lectina do tipo C específica para DC, designada DC-SIGN, que não se ligam apenas a ICAM-2 e/ou ICAM-3 com elevada afinidade, mas é também capaz de se ligar a HIV-1. Também, foram desenvolvidos anticorpos anti-DC-SIGN que não inibem apenas interações de células DC-T transiente e proliferação de célula T induzida por DC, mas também inibe eficazmente a infecção com HIV-1 de DC. Estas descobertas não têm apenas consequências importantes para a compreensão da entrada de HIV independente de CD4 em DC, mas também trás alguma luz no papel de DC-SIGN na iniciação de respostas imunitárias primárias.

Exemplo 1: Adesão de DC a ICAM-3 não é mediada por integrinas

O papel da adesão mediada por ICAM-3 no primeiro contacto de células DC-T foi investigado. Explorando um novo ensaio de adesão de citometria de fluxo envolvendo esferas fluorescentes revestidas por quimera ICAM-3-Fc (Geijtenbeek *et al.*), foi testada a capacidade de DC, linfócitos de sangue periférico em repouso (PBL) e monócitos para se ligarem a este ligando da integrina. DC imaturas, obtidas após cultura de monócitos durante 7 dias na presença de IL-4 e GM-CSF, ligam-se fortemente a ICAM-3 sem activação anterior de $\beta 2$ integrinas (72%, Figura 1A). A Figura 1 demonstra que a adesão de DC a ICAM-3 é dependente de Ca^{2+} e independente de integrina: nas Figs. 1A, B e C uma experiência representativa de pelo menos 3 é apresentada ($\text{SD} < 5\%$).

- 1A: Adesão espontânea de leucócitos para ICAM-1 e ICAM-3. PBL isoladas de fresco, monócitos e DC foram incubados durante 30 min. a 37 °C com esferas fluorescentes com ICAM-1 Fc ou ICAM-3Fc. Após lavagem, a percentagem de células que se ligam a esferas foi determinada por citometria de fluxo.
- 1B: Adesão de leucócitos a ICAM-3 após activação de $\beta 2$ -integrinas. A ligação de esferas de ICAM-3Fc fluorescentes foi medida após 30 min. a 37 °C na presença de quer de PMA a 980 nM) ou o anticorpo KIM185 de activação anti- $\beta 2$ -integrina (10 $\mu\text{g/mL}$). A inibição da adesão específica de LFA-1 após activação por PMA foi determinada na presença do anticorpo bloqueante anti-LFA-1 NKI-L15 (20 $\mu\text{g/mL}$).

- 1C: Adesão de DC a ICAM-3 na presença de anticorpos bloqueadores (20 $\mu\text{g/mL}$) contra $\beta 2$ -integrinas (NKI-L19), $\beta 1$ -integrina (AIIB2), ICAM-3 (CBR-IC3/1, CBR-IC3/2) ou na presença de EDTA (5 mM) ou EGTA (5 mM). A adesão foi determinada como descrito na Fig. 1A.

Esta ligação espontânea de DC a ICAM-3 é mais forte do que a dos monócitos, enquanto que PBL em repouso dificilmente se liga a ICAM-3 (Figura 1A). A adesão de DC a ICAM-3 não pode ser bloqueada com qualquer anticorpo anti- αL ou anti- $\beta 2$ integrina (Figura. 1A). Em contraste, a adesão de monócitos para ICAM-3 é dependente de LFA-1, uma vez que a adesão é bloqueada por anticorpos anti- αL (Figura 1A). Uma vez que nem os anticorpos dirigidos contra os outros membros de $\beta 2$ integrina ($\alpha\text{D}\beta 2$, $\alpha\text{M}\beta 2$, $\alpha\text{X}\beta 2$, resultados não apresentados), nem anticorpos dirigidos contra outras integrinas ($\beta 1$, $\beta 7$ integrinas, Figura 1B), bloquearam a adesão de DC a ICAM-3, foi concluído que a ligação de DC a ICAM-3 é independente da integrina.

A interação de DC com esferas ICAM-3-Fc é específica para ICAM-3 uma vez que os anticorpos anti-ICAM-3 CBR3/1, CBR3/2 da invenção e uma combinação de ambos os anticorpos são capazes de inibir a adesão numa larga escala (Figura 1B). Interessantemente, a adesão de DC a ICAM-3 pode ser completamente bloqueada por EDTA e EGTA (Figura 1B). Estas descobertas sugerem fortemente que DC se liga a ICAM-3 através de um receptor de superfície dependente de Ca^{2+} que não pertence à família das $\beta 1$ ou $\beta 2$ integrinas. Esta molécula foi designada: "DC-Specific ICAM-3 Grabbing Non-integrin (DC-SIGN)".

Exemplo 2: Anticorpos contra DC-SIGN inibem a interacção DC-ICAM-3.

Para investigar DC-SIGN em maior detalhe, foram criados anticorpos contra o receptor de ligação a ICAM-3. Os baços de murganhos imunizados com DC foram fundidos com células de mieloma SP2/0 e os sobrenadantes dos hibridomas resultantes foram rastreados para a presença de anticorpos capazes de inibir a adesão específica de DC a ICAM-3. Foram seleccionados dois hibridomas, clonados e os anticorpos resultantes foram nomeados AZN-D1 e AZN-D2. Ambos os anticorpos purificados inibem fortemente a adesão de DC a ICAM-3, mas não afectam a adesão de monócitos mediada por LFA-1 a ICAM-3 (Figura 2A). A Figura 2 demonstra que os anticorpos AZN-D1 e AZN-D2 inibem a adesão de DC a ICAM-3 e reconhecem um antígeno que é especificamente expresso por DC:

- 2A: Os anticorpos monoclonais AZN-D1 e AZN-D2 (20 µg/mL) bloqueiam a adesão de DC mas não a de monócitos isolados de fresco a esferas de ICAM-3Fc fluorescentes. É apresentada uma experiência representativa de pelo menos 3 experiências (SD<5%).
- 2B: expressão de DC-SIGN aumentada durante o desenvolvimento de DC. Foram cultivadas DC a partir de monócitos na presença de GM-CSF e IL-4. Em diferentes pontos de tempo as DC em desenvolvimento foram analisadas quanto à expressão do monócito marcador CD14, β 2 integrina LFA-1 e DC-SIGN. As células foram conduzidas para um sistema de rastreio em sentido directo e o meio de fluorescência é apresentado no topo do canto direito dos

histogramas. É apresentada uma experiência representativa em 3.

- 2C: DC desenvolvido de monócitos, na presença de GM-CSF e IL-4, ligação crescente a ICAM-3 de um modo dependente de DC-SIGN. Em pontos de tempo diferentes durante as células em cultura foram recolhidas e incubadas com esferas fluorescentes de ICAM-3Fc na presença do anticorpo bloqueador anti- β 2-integrina AZN-L 19 ou o anticorpo AZN-D1 (20 μ g/mL). A adesão foi determinada como descrito na Fig. 1A. AZN-D2 inibiu a adesão a ICAM-3 semelhante a AZND1 (resultados não apresentados). É apresentada uma experiência representativa em 3 (SD<5%).
- 2D: Contribuição relativa de β 2-integrinas e adesão mediada por DC-SIGN a ICAM-3 pelas DC em desenvolvimento. A contribuição relativa é calculada a partir da inibição da adesão na presença de AZN-D1 ou AZN-L19 como descrito na Fig. 2C.

Utilizando anticorpos AZN-D1 em análise de citometria de fluxo foi demonstrado que DC-SIGN não é expressa por monócitos (Figura 2B). As células que expressam DC-SIGN podem já ser detectadas após 1 dia de cultura. O nível de expressão de DC-SIGN aumenta durante a cultura (Figura 2B). A expressão do marcador de monócito CD14 diminua gradualmente durante a cultura e no dia 7 é apenas observada uma baixa expressão de CD14 (Figura 2B). Outras análises de citometria de fluxo demonstraram que no dia 7 as células também expressam níveis elevados de MHC Classe I, II, as β 2 integrina p150.95 e CD86 (resultados não apresentados), consistente com a diferenciação de monócitos nas DC imaturas. Estes resultados demonstraram que DC-SIGN é

expressa abundantemente por DC no dia 7, o nível de expressão é várias vezes mais elevado do que o de LFA-1.

Simultaneamente, o envolvimento de DC-SIGN na ligação a ICAM-3 durante a diferenciação de monócitos em DC imaturas foi investigado (Figura 2C). No início da cultura (dia 0) a ligação a ICAM-3 pelos monócitos é completamente dependente de $\beta 2$ integrina (LFA-1), como demonstrado pela inibição da adesão com o anticorpo L19 de bloqueamento anti- $\beta 2$ integrina (Figura 2C). No dia 1, quando são expressos níveis baixos de DC-SIGN (Figura 2B), a adesão específica de ICAM-3 depende, tanto de $\beta 2$ integrina (LFA-1) como de DC-SIGN (Figura 2C). Do dia 2 ao dia 7 a adesão específica de ICAM-3 aumenta, torna-se independente de $\beta 2$ integrina. (Figura 2C) e a partir do dia 2 é unicamente mediada por DC-SIGN, uma vez que anti-DC-SIGN bloqueia a adesão completamente. A adesão máxima através de DC-SIGN é alcançada no dia 7 (Figura 2C).

Em conjunto, estes resultados demonstram que o aumento na expressão de DC-SIGN coincide com o aumento observado na ligação a ICAM-3 (Figura 2A e B). A partir destas descobertas pode ser concluído que DC-SIGN, reconhecida pelos anticorpos AZN-D1 e AZN-D2, é o novo receptor de ligação a ICAM-3 expresso por DC.

Exemplo 3: DC-SIGN é uma proteína de 44 kDa.

Para obter informação em relação ao peso molecular da DC-SIGN, a DC-SIGN foi imunoprecipitada a partir de um lisado de DC marcadas na superfície com ^{125}I . A análise por SDS-PAGE em condições redutoras revelou uma única proteína de 44 kDa (Figura

3A, pistas 1-2). A Figura 3 demonstra que a DC-SIGN é idêntica a lectina do tipo C de ligação a gp 120 de HIV da placenta humana:

- 3A: DC-SIGN é uma proteína de 44 kDa. As DC foram marcadas na superfície com I^{125} , lisadas e a DC-SIGN foi imunoprecipitada com os anticorpos anti-DC-SIGN AZN-D1 (pista 1). AZN-D2 (pista 2) e AZN-L 19 (anti-J32-integrina: pista 3). Os imunoprecipitados foram analisados por SDS-PAGE (gel de 5-15%) seguido por autorradiografia. A migração dos marcadores de peso molecular é indicada à esquerda. As setas indicam as cadeias α de LFA-1 (α L, 180 kDa), MAC-1 (α M, 165 kDa) e p150,95 (α X, 150 kDa), a cadeia de β 2 integrina (95 kDa) e DC-SIGN (44 kDa). Foram obtidos resultados semelhantes em 3 outras experiências.
- 3B: apresentação esquemática de DC-SIGN isolada de DC humanas. Os dois péptidos em caixas (posições de aminoácidos 296-306 e 187-197 da lectina do tipo C de ligação a gp 120 da placenta humana ()) foram identificados por sequenciação peptídica interna de DC-SIGN imunoprecipitada utilizando degradação de Edman. O ADNc codificando DC-SIGN foi isolado a partir de DC. A sequência de aminoácidos deduzida é 100% idêntica à da lectina do tipo C de ligação a gp 120 de placenta humana (). A região transmembranar, o domínio de lectina e as sete repetições completas e oito parciais (R1-R8) estão indicadas.

A análise do imunoprecipitado num gel de SDS-PAGE não redutor demonstra que a DC-SIGN existe como um monômero (resultados não apresentados). Além disso, utilizando esferas revestidas com ICAM-3-Fc também pode ser extraída uma proteína

de 44 kDa a partir do lisado de DC, enquanto que na presença de anticorpos bloqueadores anti-DC-SIGN esta proteína não pode ser precipitada com esferas revestidas com ICAM-3-Fc (resultados não apresentados). Estas observações demonstram que DC-SIGN é expresso por DC como uma proteína de 44 kDa em condições redutoras. A observação de que esferas acopladas a ICAM-3 Fc apenas extraíram uma proteína de 44 kDa a partir do lisado de DC indica que a DC-SIGN possui uma afinidade elevada para ICAM-3, muito maior do que para LFA-1 ou $\alpha\text{D}\beta\text{2}$, que são também expressas por DC (Figura 3A) e foram relatadas como ligando-se a ICAM-3 (Vandervieren *et al.*, *Immunity*. 3. 683-690, 1995). Uma vez que são imunoprecipitadas quantidades muito pequenas de LFA-1 em comparação com DC-SIGN (Figura 3A, pista 1 e 3) isto confirma que DC-SIGN é expresso de modo mais abundante por DC do que por LFA-1. Em conjunto, estes resultados demonstram que DC-SIGN é um polipéptido simples de 44 kDa e é o receptor primário para ICAM-3 em DC.

Exemplo 4: DC-SIGN é idêntica à lectina do tipo C de ligação a gp 120 de HIV humana.

Para identificar DC-SIGN foi realizada uma imunoprecipitação preparativa de um lisado de DC com o anticorpo anti-DC-SIGN AZND-1 e foi excisada a proteína de 44 kDa do gel de SDS-PAGE. Após digestão triptica, os péptidos resultantes foram extraídos a partir do gel e purificados utilizando HPLC preparativa. Subsequentemente, as sequências de aminoácidos dos 2 péptidos (0,5-1 pmol) foram determinadas utilizando o processo de degradação de Edman. Ambos os péptidos consistiram em 11 resíduos de aminoácidos (Figura 3B) e as sequências peptídicas foram utilizadas para pesquisar a base de dados EMBL

para homologia com proteínas conhecidas. Ambos os péptidos demonstraram ser 100% idênticos à sequência de aminoácidos deduzida da lectina do tipo C de ligação a gp 120 de HIV humana (Curtis *et al.*, 1992). Esta proteína foi previamente identificada, exclusivamente, na placenta como um receptor independente de CD4 para a glicoproteína gp 120 do envelope do vírus da imunodeficiência humana (HIV).

A análise de RT-PCR com iniciadores baseados na sequência do lectina do tipo C da ligação a gp 120, em ARN isolado de DC produziu um produto de PCR do comprimento esperado de 1237 nt. O produto de PCR específico para DC foi clonado e a sequenciação confirmou identidade de 100% com a lectina de ligação a gp 120 humana (Figura 3B). A análise de citometria de fluxo de células COS7, transfectadas com o ADNc codificando a lectina do tipo C de ligação a gp 120 da placenta prova inequivocamente que a lectina do tipo de C de ligação a gp 120 é na verdade idêntica a DC-SIGN (Figura 4A). A Figura 4 demonstra que a DC-SIGN, sobre-expressa em células COS7, é reconhecida pelo anticorpo anti-DC-SIGN AZN-D1 e liga-se a ICAM-3:

- 4A: AZN-D1 reconhece células COS7 transfectadas com o ADNc codificando DC-SIGN (cheio) e não com células COS7 simuladamente transfectadas (vazio). AZN-D2 produziu uma coloração semelhante (resultados não apresentados).
- 4B: Adesão de COS7-DC-SIGN a ICAM-3. Foram transfectadas células COS7 e a adesão foi determinada como descrito na Fig. 1A, respectivamente. A adesão de células COS7-DC-SIGN a ICAM-3 foi medida na presença de EGTA (5 mM) e anticorpos bloqueadores contra DC-SIGN (AZN-D1), ICAM-3 (CBR-IC3/1,

CBR-IC3/2) e $\beta 2$ integrinas (AZN-L 19). É apresentada uma experiência representativa de 3 (SD<5%).

Cerca de 30% das células COS7 transfectadas são coradas com anticorpo anti-DC-SIGN- e, deste modo, a DC-SIGN expressa. Além disso, as células COS7-DC-SIGN são capazes de se ligar a ICAM-3 enquanto que as células COS7 simuladamente transfectadas são incapazes de se ligar a ICAM-3 (Figura 4B). A ligação de DC-SIGN expressa por COS7 pode ser completamente inibida pelos anticorpos contra ICAM-3 e DC-SIGN e foi dependente de Ca^{2+} uma vez que EGTA bloqueia completamente a adesão (Figura 4B).

Foi concluído que o receptor de ligação a ICAM-3 expresso por DC (DC-SIGN) é idêntico à lectina do tipo C de ligação a gp 120 de HIV da placenta (Curtis *et al.*, 1992), uma proteína de transmembrana de tipo II consistindo em 404 aa com três domínios distintos. O domínio citoplásmico N-terminal de 40 resíduos de aa é separado por uma sequência hidrofóbica de 15 aa de uma região que consiste em sete repetições em tandem completas e uma incompleta de sequência quase idêntica. A região C-terminal restante (Cys253-Ala404) apresenta homologia com lectinas dependentes de Ca^{2+} (tipo C) (Figura 3B).

Exemplo 5: DC-SIGN é especificamente expressa por DC.

A análise de citometria de fluxo de um painel extensivo de células hematopoiéticas com os anticorpos AZN-D1/D2 demonstrou que o antígeno é, de um modo preferido, expresso por DC (Tabela 1). Todas as células hematopoiéticas testadas foram negativas para a expressão de DC-SIGN excepto para DC. Para além

disso, a análise de RT-PCR confirma que o ARNm codificando DC-SIGN é especificamente transcrito em DC que está de acordo com o padrão de expressão da proteína DC-SIGN (Tabela 1).

Para investigar adicionalmente a expressão de DC-SIGN *in vivo*, foi realizada análise imuno-histoquímica de tecidos linfóides secundários com os anticorpos anti-DC-SIGN. Estes tecidos são conhecidos por conterem células dendríticas. Secções de amígdalas e gânglios linfáticos continham células que expressam DC-SIGN que foram, predominantemente, observadas na área das células T tanto de amígdalas como de gânglios linfáticos (Figura 5). A Figura 5 apresenta a distribuição de tecidos de DC-SIGN: Análise imuno-histoquímica da expressão de DC-SIGN em amígdalas e secções de gânglios linfáticos (OMx100). As secções foram fixas com acetona e a coloração nuclear foi realizada com Hemateína. A coloração de DC-SIGN foi realizada com AZN-D1. São apresentados o centro germinal (GC), T-(T) e áreas de células B (B).

Consistente com a distribuição e morfologia de células dendríticas, as células que expressam DC-SIGN não são detectadas nos centros germinais e a zona da manta dos tecidos linfóides (Figura 5). Coloração de secções em série para CD3 e CD14 confirmaram que as células que expressam DC-SIGN são distintas das células T e monócitos (resultados não apresentados) como foi também demonstrado por análise de citometria de fluxo e RT-PCR destas células (Tabela 1).

Exemplo 6: interações DC-SIGN/ICAM-3 medeiam o agrupamento transiente de DC-linfócitos T.

Para demonstrar que DC se liga a transfectantes que expressam ICAM-3 de um modo dependente de DC-SIGN, foi investigada a capacidade da linha celular de leucemia K562 transfectada com o ADNc codificando ICAM-3 (K562-ICAM-3) para se ligar a DC. Como apresentado na Figura 6A, DC agrupa com K562-ICAM-3 de um modo dependente de DC-SIGN, uma vez que a interação pode ser bloqueada por anticorpos anti-DC-SIGN. Não foi observado agrupamento entre DC e K562 demonstrando que ICAM-3 é o ligando para DC-SIGN. A Figura 6 mostra que a adesão mediada por DC-SIGN de DC a ICAM-3 está envolvida na interação DC-linfócito T:

- 6A: A adesão mediada por DC-SIGN de DC a ICAM-3 está dependente de um citoesqueleto intacto. A adesão de DC a esferas de ICAM-3 foi determinada com (caixa vazia) ou sem (caixa a cheio) anticorpo de bloqueamento de DC-SIGN AZN-D1 na presença de Citocalasina D, que foi titulada em várias concentrações. É apresentada uma experiência representativa de 2 experiências (SD<5%).
- 6B: Agrupamento heterotípico de células de DC com células K562-ICAM-3. Células K562 e K562 estáveis transfectadas com o ADNc codificando ICAM-3 (K562-ICAM-3) foram marcadas com o corante vermelho HE (hidroetidina). As DC foram marcadas com o corante verde SFDA. K562 e K562-ICAM-3 foram incubadas com DC (5×10^3 células/tipo de célula) com ou sem anticorpo bloqueante anti-DCSIGN (AZN-D1: 10 min. Pré-incubação) a 37 °C. A diferentes pontos de tempo as células foram fixadas com paraformaldeído (0,5%) e o

agrupamento de células heterotípicas foi medido por citometria de fluxo. É apresentada uma experiência representativa de 2 experiências.

- 6C: O agrupamento de células dinâmicas de DC com PbL em repouso é mediado por DC-SIGN. DC (50×10^3 células) foram pré-incubadas com/sem os anticorpos anti-DC-SIGN AZN-D1 e AZN-D2 ($10 \mu\text{g/mL}$) durante 10 min. à TA. Foram adicionadas PBL alogénicas (1×10^6 células), marcadas com o corante fluorescente Calceína-A ($25 \mu\text{g}/10^7$ células/mL durante 30 min. a 37°C), e a mistura celular foi incubada a 37°C . O agrupamento foi medido por citometria de fluxo. É apresentada uma experiência representativa de 2 experiências.
- 6D: A interacção DC-SIGN-ICAM-3 é importante na proliferação de células T induzida por DC. Foram adicionados linfócitos T de resposta alogénica (100×10^3) a estimuladores de DC ($1,5 \times 10^3$) na presença de anticorpos bloqueadores ($20 \mu\text{g/mL}$) contra LFA-3 (TS2/9) e DC-SIGN (AZN-D1, AZN-D2). As células foram cultivadas durante 4 dias. No dia 4 as células foram pulsadas durante 16 h com [^3H]metil-timidina e a incorporação foi determinada. Os resultados são expressos como a percentagem média de CPM de poços em triplicado.

O agrupamento dependente de DC-SIGN é transiente, com um máximo a 60 minutos indicando que as interacções DC-SIGN-ICAM-3 podem ser reguladas activamente pelas DC. Além disso, este fenómeno permite que as DC interactuem, transientemente, com múltiplas células T naïve até a interacção ser fortalecida após ligação de TCR.

Para testar isto, foi investigado se o agrupamento de DC às células T é mediado por DC-SIGN e se esta interacção é também transiente. As DC foram incubadas com células T alogénicas em repouso (DC:células T, 1:20) e o agrupamento de DC-células T foi determinado. Como mostrado na Figura 6B, o agrupamento de DC com células T é transiente e atinge um máximo após 20 min (32%). Além disso, a interacção DC-células T pode ser inibida (aproximadamente 50%) por anticorpos anti-DC-SIGN sugerindo que o agrupamento de DC-células T é, também, mediado por outros receptores de superfície. Assim, o agrupamento DC-células T é na verdade transiente e, parcialmente, mediado por interacções DC-SIGN/ICAM-3. De um modo semelhante, a Figura 8 mostra que DC-SIGN se liga não apenas com células K562 expressando ADNC que codifica ICAM-3, mas também a células K562 que expressam ADNC que codifica ICAM-3. e que a referida ligação pode ser inibida tanto por manano como por anticorpos anti DC-SIGN.

Exemplo 7: proliferação de células T em repouso induzida por DC alogénicas é dependente de DC-SIGN

Como a ligação de DC-SIGN a ICAM-3 é importante para o agrupamento de DC com as células T, o papel de DC-SIGN na proliferação de células T induzida por DC foi também investigado. Linfócitos T em repouso foram estimulados com DC alogénicas na presença ou ausência dos anticorpos de bloqueamento anti-DC-SIGN. Como apresentado na Figura 6C, os anticorpos anti-DC-SIGN AZN-D1 e AZN-D2 inibiram ambos a proliferação de linfócitos T em mais do que 75%. Do mesmo modo, os anticorpos contra a molécula co-estimuladora LFA-3, que se liga a CD2 nas células T e é, também, conhecida por mediar a

proliferação de células T, inibe a proliferação de células T. Uma combinação de anticorpos anti-LFA-3 e anti-DC-SIGN inibe completamente a proliferação de células T (Figura 6C).

Exemplo 8: DC-SIGN está envolvido na infecção de HIV-1 das DC

Como foi aqui acima demonstrado que DC-SIGN é idêntica à lectina da placenta que se liga a gp 120 de HIV e é abundantemente expressa pelas DC, DC-SIGN pode facilitar a entrada de HIV-1 em DC. Para investigar isto, DC foi pulsada com HIV-1 e a infecção produtiva em co-culturas DC-células T foi medida. As DC recolhidas após 7 dias de cultura na presença de IL-4 e GM-CSF expressaram níveis baixos de CD4 (Blauvelt et al., 1997; Granelli-Piperno et al., *J Exp Med* 184(6), 2433-8, 1996) e níveis elevados de DC-SIGN (Figura 7). Como apresentado na Figura 7 ocorre uma forte infecção produtiva quando as DC são pulsadas com HIV-1 durante 2 horas, lavadas e cultivadas na presença de células PBMC activadas. Pelo dia 3 de co-cultura das DC-células T a proteína Gag p24, uma medida para a replicação de HIV-1, começa a acumular no meio (Figura 7) demonstrando que HIV-1 é eficientemente replicado na co-cultura, de modo semelhante ao demonstrado por outros (Blauvelt et al., 1997; Granelli-Piperno et al. 1998; Granelli-Piperno et al. *Curr Biol* 9(1), 21-29, 1999). Contudo, quando as DC antes do pulso de HIV-1 são pré-incubadas com anticorpos anti-DC-SIGN e incubadas com PBMC activados. A replicação de HIV-1 é inibida em mais de 75%, como apresentado para o dia 3 e da co-cultura DC-células T (Figura 7). Quando as DC foram incubadas com anticorpos anti-DC-SIGN após pulso com HIV-1, foi ainda observada uma eficiente replicação de HIV-1 na co-cultura DC-células T

(Figura 7). Estas observações demonstram que os anticorpos anti-DC-SIGN bloqueiam a infecção de HIV-1 através da inibição da ligação de HIV-1 a DC e não a transmissão de HIV-1 a partir das DC para células T, indicando que DC-SIGN actua como receptor principal para HIV-1 nas DC. Deste modo, a DC-SIGN é amplamente expresso nas DC e funciona como um receptor específico de DC para ICAM-3 e HIV-1.

Dos resultados experimentais acima, pode ser concluído, *inter alia*, que a interacção inicial de DC com linfócitos T é independente do antigénio e transiente. Esta natureza, transiente, proporciona DC com a capacidade de interagir com uma variedade de células T até que seja produzido um aprisionamento de TCR produtivo. Até agora, o mecanismo pelo qual este processo transiente é iniciado não foi claro. Aqui, é demonstrado que a interacção de um novo receptor específico para DC, DC-SIGN, com ICAM-3 medeia esta interacção transiente DC-células T. O DC-SIGN é abundantemente expresso por DC e foi mostrado que DC-SIGN serve como um receptor principal de HIV-1 nas DC.

Um papel importante para DC durante o curso da infecção com HIV-1 é a capacidade de disseminar HIV-1 em células T, promovendo a replicação extensiva que leva a morte das células T CD4+ (Cameron *et al.*, 1992; Cameron: AIDS Res Hum Retroviruses 10(1), 61-71, 1994). A infecção produtiva com HIV-1 de DC foi claramente demonstrada e depende do estágio de desenvolvimento de DC (Graneli-Piperno *et al.*, 1998). As DC imaturas, cultivadas a partir de monócitos na presença de IL-4 e GM-CSF, são produtivamente infectadas por estirpes de HIV-1 M-trópicas (Graneli-Piperno *et al.*, 1996; Graneli-Piperno *et al.*, 1998) (Blauvelt *et al.*, 1997) enquanto a entrada de ambos os HIV-1 trópicos M e T nas DC maduras não leva a uma infecção produtiva

(Granelli 1998). Contudo, a entrada de HIV-1 em ambos os tipos de DC leva a uma replicação explosiva após co-cultura com células T em repouso ou activadas (Granelli 1998, 1999). Os eventos iniciais na infecção HIV-1 das células alvo incluem a ligação ao receptor e fusão com a membrana. Este processo é iniciado pela ligação com afinidade elevada da glicoproteína do envelope gp 120 a CD4. Contudo, o CD4 isolado não é suficiente para iniciar a fusão, os receptores de quimiocinas tal como CCR5 e CXCR4 são necessários como co-receptores para que ocorra o evento da fusão final (revisto por Littman *et al.*, 1998) (Dragic *et al.*, *Nature* 381 (6584), 667-73, 1996; Feng *et al.* *Science* 272(5263), 872-7, 1996). As DC expressam pequenas quantidades de CD4, embora sejam expressos níveis elevados de DC-SIGN à superfície da célula. Foi sugerido que a infecção produtiva das DC e a sua capacidade para capturar e subsequentemente transmitir HIV-1 são mediadas através de vias separadas. A infecção produtiva das DC é mediada pela via dependente de CD4 enquanto HIV-1 pode ser capturado pelas DC através de uma via independente de CD4 que permite ainda às DC transmitir HIV-1 às células T (Blauvelt *et al.* (1997)). Aqui, foi demonstrado que DC-SIGN media especificamente a entrada de HIV-1 nas DC, como foi medido por uma ausência de infecção produtiva na co-cultura de DC-células T após pré-incubação de DC com anticorpos anti-DC-SIGN antes do pulso com HIV-1. Os anticorpos anti-DC-SIGN não inibem completamente a entrada de HIV-1 em DC. Esta via independente de DC-SIGN é, provavelmente, mediada por CD4 () que é expresso a níveis baixos nas DC. Estes resultados confirmam a presença de ambas as vias dependentes de CD4 e independentes para a entrada viral nas DC. Foram apresentadas várias moléculas de adesão como sendo capazes de inibir a transmissão de HIV-1 a partir das DC para células T através da interferência do contacto DC-células T (Tsunetsugu-Yokota *et al.*, 1997). Os

anticorpos anti-DC-SIGN não podem evitar a transmissão de HIV-1 a células T quando os anticorpos anti-DC-SIGN foram adicionados após o pulso de HIV-1 para inibir a interacção DC-células T. Estes dados indicam que DC-SIGN serve como um receptor principal para a entrada de HIV-1 nas DC. O facto de que DC expressa níveis elevados de DC-SIGN e baixos níveis de CD4 (Figura 7) demonstram ainda que a entrada de HIV-1 nas DC é, predominantemente, mediada através de DC-SIGN. A observação de DC-SIGN como um receptor de HIV-1 pode ser importante para uma melhor compreensão da entrada de HIV-1 nas DC. Além disso, a inibição da infecção de HIV-1 observada na presença de anticorpos anti-DC-SIGN permitirá o desenvolvimento de anticorpos anti-DC-SIGN em estratégias terapêuticas, contra a infecção viral e disseminação regional de HIV-1.

As DC constituem uma população heteróloga de células que estão presentes em níveis vestigiais em vários tecidos. Para melhor definir as diferentes populações foi feito um esforço considerável na produção de anticorpos que são dirigidos contra as moléculas de superfície específicas da linhagem das DC. Até agora, foram produzidos apenas alguns anticorpos que reconhecem antígenos específicos das DC humanas ((Hock *et al.*, *Immunol.* 83. 573-581, 1994), (de Saint-Vis *et al.*, *Immunity* 9(3), 325-36, 1998)(Hart *et al.*, 1997). A DC-SIGN pode agora ser adicionada a esta lista de antígenos específicos para as DC humanas uma vez que foi aqui demonstrado que ao nível da proteína, assim como ao nível do ARNm, de todas as células hematopoiéticas testadas, apenas as DC expressam DC-SIGN (Tabela 1). A DC-SIGN *in situ* é exclusivamente expressa por subconjuntos de DC presentes na área de células T de amígdalas e gânglios linfáticos. Estas DC maduras são muito potentes na activação de células T naïve. Deste modo, a expressão de DC-SIGN *in situ* correlaciona com a

sua função como um importante mediador do agrupamento DC-células T e subsequente activação de células T.

A activação de linfócitos T em repouso pelas células apresentadoras de antígeno é um passo criticamente importante na resposta imunitária adquirida. Localizadas na maioria dos tecidos, as DC capturam e processam antígenos e migram para tecidos linfóides onde interactivam com e activam células T naïve específicas para o antígeno. As células T são dirigidas por quimiocinas para estes sítios de apresentação de antígeno. Recentemente, foi identificada uma quimiocina específica para DC DC-CK1 que especificamente atrai células T naïve para os sítios de iniciação imunitária (Adema *et al.*, *Nature* 387, 713-717, 1997). Após a chegada aos tecidos linfóides secundários, as células T interagem com DC e ocorre a activação após reconhecimento por TCR de péptidos ligados a moléculas MHC. Contudo, uma vez que a afinidade do TCR para o antígeno apresentado pelas moléculas MHC é muito baixa e o número de complexos de péptidos específicos para MHC nos APC é limitado, a interacção de TCR com o antígeno é normalmente insuficiente para levar à formação de contacto membranar íntimo entre DC e linfócitos T necessária para activação total.

Até á data, LFA-1 foi o receptor mais importante para ICAM-3 nas DC. Contudo, o seu papel na ligação a ICAM-3 tem sido agora disputado devido à presente observação de DC-SIGN. Foi demonstrado que a adesão de DC a ICAM-3 é completamente mediada por DC-SIGN. DC-SIGN é mais abundantemente expresso por DC do que LFA-1 (Figura 2B). Além disso, LFA-1 é inactivo em DC (Figura 2C) e a sua afinidade para ICAM-3 é bastante inferior à de DC-SIGN para ICAM-3. Estes dados demonstram claramente que DC-SIGN é o receptor primário para ICAM-3 nas DC. A função de

DC-SIGN nas DC foi posteriormente clarificada pela observação de que os anticorpos anti-DC-SIGN inibiram *parcialmente* o agrupamento transiente de DC-células T. Deste modo, DC-SIGN está envolvido na interacção inicial DC-células T numa resposta imunitária. Um papel que foi anteriormente atribuído a LFA-1. A natureza transiente da interacção DC-células T mediada por DC-SIGN permite a DC interagir com um grande número de células T em repouso, até que seja concretizada uma interacção produtiva mediada por TCR, após o que a interacção é estabilizada. A importância da interacção de DC-SIGN-ICAM-3 é ainda sublinhada pela observação de que os anticorpos contra DC-SIGN são capazes de inibir a proliferação alogénica de linfócitos T induzida por DC. Além disso, a combinação de anticorpos contra DC-SIGN e LFA-3, uma conhecida molécula co-estimuladora (), inibe quase completamente a proliferação de linfócitos T. Deste modo, a adesão de elevada afinidade transiente de DC-SIGN a ICAM-3 desempenha um importante papel na interacção inicial independente do antígeno entre DC e células T naïves. Presumivelmente, esta interacção inicial de elevada afinidade permite o aprisionamento do TCR pelo MHC ligado ao antígeno, que, subsequentemente, inicia várias outras interacções adesivas entre DC e células T, tal como a interacção LFA-1-ICAM-1. Uma vez que LFA-1 é inactiva nas células T, a activação do complexo TCR/CD3 após a apresentação do antígeno pelas DC resultará na activação de LFA-1 e subsequente ligação forte de LFA-1 a ICAM-1 expresso nas DC (). O fortalecimento da interacção entre DC e células T através de contactos múltiplos levará então à activação completa de linfócitos T pelo estimulador de DC ().

Em conclusão, foi identificado um novo receptor ICAM-3 em DC, designado DC-SIGN, cujo receptor é especificamente expresso por DC humanas e está envolvido na interacção inicial transiente

DC-células T necessária para iniciar uma resposta imunitária. De forma interessante, DC-SIGN é também capaz de se ligar à proteína gp 120 do envelope de HIV e de facilitar a entrada de HIV-1 nas DC. Várias possibilidades e técnicas terapêuticas e profiláticas, baseadas nas verificações aqui divulgadas, serão por si sugeridas ao especialista da técnica.

Exemplo 9: Procedimentos experimentais.

Ex. 9A: Anticorpos

Foram utilizados os seguintes anticorpos: KIM185 (anti- β 2 integrina, (Andrew *et al.* *Eur. J. Immunol.* 23, 2217-2222, 1993), AZN-L19 (anti- β 2 integrina,)), NKI-L15 (anti- α L, (Keizer *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 15, 1142-1147, 1985)), AIIB2 (anti- β 1 integrina, (Da Silva *et al.*, *J. Immunol.* 143. 617-622, 1989)), CBR-IC3/1 e CBR-IC3/2 (anti-ICAM-3 (de Fougereolles *et al.*, *J.Exp.Med.* 177, 1187-1192, 1993)), CD14 (WT14 ()), CD4 (wt4 ()). Os anticorpos anti-DC-SIGN AZN-D1 e AZN-D2 foram obtidos por imunização de murganhos BALB/c com DC e pesquisa subsequente dos sobrenadantes de hibridoma quanto à capacidade de bloquear a adesão de DC a ICAM-3 como medido pelo ensaio de adesão das esferas fluorescentes.

Ex. 9B: Células

As DC foram cultivadas a partir de monócitos como descrito (Sallusto e Lanzavecchia, *J. Exp. Med.* 179, 1109-1118, 1994; Romani *et al.*, *J. Exp. Med.* 180, 83-93, 1994). Resumidamente, os monócitos foram isolados a partir de PBMC frescos através de um

passo de aderência. Os monócitos foram cultivados na presença de IL-4 (Schering-Plough, Bruxelas, Bélgica; 500 U/mL) e GMCSF (Schering-Plough, Bruxelas, Bélgica; 1000 U/mL) durante 7 dias. No dia 4 foram adicionadas citoquinas frescas. No dia 7 o fenótipo das DC cultivadas foi confirmado por análise de citometria de fluxo da expressão de MHC de classe I e II, CD1a, p150,95 e CD80. Os transfectantes K562 estáveis que expressam ICAM-3 (K562-ICAM-3) foram produzidos por transfecção de K562 com 10 µg de plasmídeo PCRII ICAM-3 R1 (oferecido por Dr D. Simmons) e 2 µg de vector PGK-hyg (te Riele *et al*, 1990) por electroporação como descrito (Lub *et al.*, *Mol. Biol Cell* 8, 719-728, 1997). As células T em repouso (>90% positivas para CD3) foram obtidas por elutriação por centrifugação de PBMC da medula óssea de doadores saudáveis, como descrito (Figdor *et al.*, *J. Immunol. Methods* 68, 73-87, 1984).

Ex. 9C: Marcação radioactiva, imunoprecipitação e análise da sequência de proteína.

As células foram marcadas à superfície com Na¹²⁵I (Amersham, Buckinghamshire, RU) através do método da lactoperoxidase (Pink e Ziegler, 1979, em: *Research Methods in Immunology*, L. Lefkovits e B. Pernis. eds. (Nova Iorque: Academic Press), pp. 169-180.). As DC foram lisadas durante 1 h a 4 °C em tampão de lise (1% de NP-40, 50 mM de trietanolamina (pH 7,8), 150 mM de NaCl, 1 mM de CaCl₂, 1 mM de MgCl₂, 1 mM de PMSF, 0,02 mg/mL de leupeptina). Os resíduos nucleares foram removidos do lisado por centrifugação a 13000 g durante 15 min a 4 °C. Os lisados pré-límpidos foram incubados durante 3 h com um mAb específico covalentemente acoplado a esferas de Protein A-sepharose CL-4B (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ). Os imunoprecipitados

foram extensivamente lavados com tampão de lise e analisados por SDS-PAGE de acordo com uma modificação do processo de Laemmli (Laemmli, *Nature* 227, 680-685, 1970). A digestão triptica da proteína excisada, a purificação dos péptidos resultantes e a análise de sequência foi efectuada através de Eurosequence BV (Groningen, Holanda).

Ex. 9D: Isolamento e expressão do ADNc que codifica DC-SIGN.

O ARN total foi isolado por um processo de isotiocianato de guanidina ácido-fenol-clorofórmio (Chomczynski e Sacchi, *Anal Biochem* 162(1), 156-9, 1987). O ADNc que codifica a lectina do tipo C da placenta que liga gp 120 foi amplificado por RT-PCR no ARN total a partir de DC. Os iniciadores de PCR foram baseados na sequência de nucleótidos da lectina do tipo C da placenta que liga gp 120 (Nº de acesso M98457, (Curtis et al., 1992)) e as sequências de nucleótidos (5' a 3') são as seguintes: XF29, AGAGTGGGGTGACATGAGTG; XR1265, GAAGTTCTGCTACGCAGGAG. O fragmento de PCR foi clonado no vector pGEM-T (Promega, Madison WI) e sequenciado. A sequência de nucleótidos do ADNc clonado foi idêntica à da lectina do tipo C da placenta que liga gp 120 (Curtis et al., 1992). O ADNc foi, subsequentemente, clonado no vector de expressão eucariótico pRc/CMV (pRc/CMV-DC-SIGN) e as células COS7 foram, transientemente transfectadas com pRc/CMV-DC-SIGN utilizando o método de DEAE dextrano (Seed e Aruffo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 3365-3369, 1987).

Ex. 9E: Ensaio de adesão a esferas fluorescentes

TransFluorSpheres modificadas com carboxilato (488/645 nm. 1,0 μm ; Molecular Probes. Eugene. OR) foram revestidas com ICAM-1 Fc e ICAM-3 Fc como descrito anteriormente (Geijtenbeek *et al.*, 1999 submetido). Resumidamente, foram adicionados 20 μL de estreptavidina (5 mg/mL em 50 mM de tampão MES) a 50 μL de TransFluorSpheres. Foram adicionados 30 μL de EDAC (1,33 mg/mL) e a mistura foi incubada à TA durante 2h. A reacção foi interrompida pela adição de glicina para uma concentração final de 100 mM. As esferas revestidas com estreptavidina foram lavadas três vezes com PBS (50 mM de fosfato, 0,9% de NaCl pH 7,4) e ressuspensas em 150 μL de PBS, 0,5% de BSA (p/v). As esferas revestidas com estreptavidina (15 μL) foram incubadas com fragmentos Fab2 de cabra anti-humano anti-Fc biotinilados (6 $\mu\text{g/mL}$) em 0,5 mL de PBA durante 2 horas a 37 °C. As esferas foram lavadas uma vez com PBS, 0,5% de BSA e incubadas com ligandos em fusão com Fc de IgG1 humana (ICAM-1 Fc, VCAM-1 Fc; 250 ng/mL) em 0,5 mL de um dia para o outro a 4 °C. As esferas revestidas com ligandos foram lavadas, ressuspensas em 100 μL de PBS, 0,5% de BSA e armazenadas a 4 °C. ICAM-1 Fc e ICAM-3 Fc consistem numa parte extracelular da proteína fundida com um fragmento Fc de IgG1 humano (fornecido pelo Dr D. Simmons). O ensaio de adesão com esferas fluorescentes foi efectuado como descrito por Geijtenbeek *et al.* (submetido). Resumidamente, as células foram ressuspensas em tampão Tris-Sódio-BSA (20 mM de Tris-HCl pH 8,0, 150 mM de NaCl, 1 mM de CaCl_2 , 2 mM de MgCl_2 , 0,5% de BSA; 5×10^6 células/mL). Foram pré-incubadas 50000 células com/sem mAb de bloqueamento (20 $\mu\text{g/mL}$) durante 10 min a TA numa placa de fundo em V de 96 poços. As esferas fluorescentes revestidas com ligandos (20 esferas/célula) e diferentes estimuladores/inibidores foram adicionados e a suspensão foi

incubada durante 30 min a 37 °C. As células foram lavadas e ressuspensas em 100 µL de TSA. A adesão foi determinada pela medida da percentagem das células, que se ligaram a esferas fluorescentes, por citometria de fluxo utilizando o FACScan (Becton e Dickinson & Co., Oxnard, CA).

Ex. 9F: Ensaios de agrupamento de células heterotípicas

O agrupamento entre DC e células que expressam ICAM-3 foi avaliado por citometria de fluxo. DC e as células que expressam ICAM-3 (2×10^6 células/mL) foram marcadas respectivamente com sulfofluoresceína (Molecular Probes, Eugene, OR; 50 µg/mL) e hidroetidina (Molecular Probes, Eugene, OR; 40 µg/mL) durante 1 hora a 37 °C. Após lavagem, DC e as células que expressam ICAM-3 foram misturadas (50×10^3 células cada) e incubadas a 37 °C. em diferentes pontos de tempo as células foram fixas com paraformaldeído (0,5%) e o agrupamento de células heterotípicas foi medido por citometria de fluxo utilizando o FACScan (Becton an Dickinson & Co., Oxnard, CA).

O agrupamento entre DC com células T em repouso foi avaliado através de um método diferente. DC (50×10^3 células) foram pré-incubadas com/sem os anticorpos anti-DC-SIGN AZN-D1 e AZN-D2 (10 µg/mL) durante 10 min. à TA. PBL alogénicos (1×10^6 células), marcados com o corante fluorescente Calceína-A (Molecular Probes, Eugene, OR; 25 µg/ 10^7 células/mL durante 30 min. a 37°), foram adicionados e a mistura de células foi incubada a 37°C. O agrupamento foi determinado através da medição da percentagem de DC que possuía células T fluorescentes ligadas através de citometria de fluxo utilizando o FACScan (Becton e Dickinson & Co., Oxnard, CA).

Ex. 9G: Ensaio de proliferação de células T induzida por DC

Foram adicionados linfócitos T alogénicos com capacidade de resposta (100×10^3) a estimuladores de DC ($1,5 \times 10^3$) na presença de anticorpos de bloqueamento (20 μ g/mL). As células foram cultivadas durante 4 dias. No dia 4 as células foram pulsadas durante 16 h com [3 H]metiltimidina (1,52 TBq/mmol, 0,5 μ Ci/poço; Amersham, Buckinghamshire, RU) e a incorporação foi quantificada.

Ex. 9H: Infecção de DC por HIV-1

HIV-1_{Ba-L} foi cultivado num título elevado em macrófagos derivados de monócitos (MDM). Sete dias após titulação do vírus armazenado em MDM, a TCID₅₀ foi determinada com um antigénio ELISA p24 ((Diagnostics Pasteur, Marnes la Coquette, França) e estimada como 10^4 /mL. DC (50×10^3), pré-incubadas com anticorpos (50 μ g/mL) durante 20 min. à TA, foram pulsadas durante 2 h. com HIV-1_{Ba-L} do tipo selvagem (a uma multiplicidade da infecção de 10^3 unidades infecciosas por 10^5 células), lavadas e co-cultivadas com PBMC activados com PHA/IL-2 (50×10^3). Os sobrenadantes foram recolhidos 3 e 5 dias após a co-cultura DC-células T e os níveis de antigénio p24 foram medidos através de uma ELISA para o antigénio p24 (Diagnostics Pasteur Marnes la Coquette, França). Os PBMC foram activados por cultura na presença de IL-2 (10 U/mL) e PHA (10 μ g/mL).

Ex. 9I: Análise imuno-histoquímica

Criosecções (8 µm) de amígdalas e gânglios linfáticos foram fixas em 100% de acetona (10 min), lavadas com PBS e incubadas com o primeiro anticorpo (10 µg/mL) durante 60 min à TA. Após lavagem, a coloração final foi efectuada com o kit ABC-AP Vectastain (Vector Laboratories, Burlingame, CA) de acordo com o protocolo do fabricante. A coloração nuclear foi efectuada com hemateína ().

Tabela 1: Nível de expressão de DC-SIGN em células hematopoiéticas como determinado por análises de citometria de fluxo e TA-PCR.

Tipo de célula	Expressão de DC-SIGN*	ARNm de DC-SIGN ‡
monócitos	-	-
DC dia 7	+++	+
PBL	-	-
Células T	-	-
Células B	-	-
Células B-(amígdalas)\$	-	n.d.
Timócitos	-	-
Granulócitos	-	-
Células CD34+	-	n.d.
PBMC (activados#)	-	-
Linhas de células T†	-	-
Linhas de células monocíticas††	-	-
* fluorescência média: -=<20, +++ >400 (coloração com AZN-D1) ‡ TA-PCR com os iniciadores específicos para DC-SIGN XF29 e XR1265 em ARN total isolado das diferentes células \$ isolado a partir das amígdalas # activado com PHA (10 µg/mL) e IL-2 (10 U/mL) durante 2 dias † linhas de células T: HSB, PEER, CEM e Jurkat ††linhas de células monocíticas: THP-1. MM6 e U937 n.d., não determinado		

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<1> INFORMAÇÃO GERAL

<I> REQUERENTE

(A) NOME: Koninklijke Universiteit Nijmegen, Afdeling
tumorimmunologie

(B) RUA: Philips van Leydenlaan 25

(C) CIDADE: Nijmegen

(E) PAÍS: Holanda

(D) CÓDIGO POSTAL: 6525 EX

(E) TELEFONE: + 31 243 617 600

(F) FAX: + 31 243 540 339

(v) FORMA DE LEITURA POR COMPUTADOR:

(A) TIPO DE MEIO: disquete

(B) COMPUTADOR: IBM PC compatível

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0. Versão #1.30

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: COMPOSIÇÃO E MÉTODO PARA MODULAR A
INTERACÇÃO CÉLULA DENDRÍTICA-CÉLULA-**T**

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 2

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N° 1:

(I) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 1215 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°: 1

ATGAGTGACT CCAAGGAACC AAGACTGCAG CAGCTGGGCC TCCTGGAGGA GGAACAGCTG	60
AGAGGCCTTG GATTCCGACA GACTCGAGGA TACAAGAGCT TAGCAGGGTG TCTTGGCCAT	120
GGTCCCCTGG TGCTGCAACT CCTCTCCTTC ACCTCTTGG CTGGGCTCCT TGTCCAAGTG	180
TCCAAGGTCC CCAGCTCCAT AAGTCAGGAA CAATCCAGGC AAGACGCGAT CTACCAGAAC	240
CTGACCCAGC TTAAAGCTGC AGTGGGTGAG CTCTCAGAGA AATCCAAGCT GCAGGAGATC	300
TACCAGGAGC TGACCCAGCT GAAGGCTGCA GTGGGTGAGC TTCCAGAGAA ATCTAAGCTG	360
CAGGAGATCT ACCAGGAGCT GACCCGGCTG AAGGCTGCAG TGGGTGAGCT TCCAGAGAAA	420
TCTAAGCTGC AGGAGATCTA CCAGGAGCTG ACCTGGCTGA AGGCTGCAGT GGGTGAGCTT	480
CCAGAGAAAT CTAAGATGCA GGAGATCTAC CAGGAGCTGA CTCGGCTGAA GGCTGCAGTG	540
GGTGAGCTTC CAGAGAAATC TAAGCAGCAG GAGATCTACC AGGAGCTGAC CCGGCTGAAG	600

GCTGCAGTGG GTGAGCTTCC AGAGAAATCT AAGCAGCAGG AGATCTACCA GGAGCTGACC	660
CGGCTGAAGG CTGCAGTGGG TGAGCTTCCA GAGAAATCTA AGCAGCAGGA GATCTACCAG	720
GAGCTGACCC AGCTGAAGGC TGCAGTGGAA CGCCTGTGCC ACCCCTGTCC CTGGGAATGG	780
ACATTCTTCC AAGGAAACTG TTAATTCATG TCTAACTCCC AGCGGAACTG GCACGACTCC	840
ATCACCGCCT GCAAAGAAGT GGGGGCCCAG CTCGTCGTAA TCAAAAGTGC TGAGGAGCAG	900
AACTTCCTAC AGCTGCAGTC TTCCAGAAGT AACCGCTTCA CCTGGATGGG ACTTTCAGAT	960
CTAAATCAGG AAGGCACGTG GCAATGGGTG GACGGCTCAC CTCTGTTGCC CAGCTTCAAG	1020
CAGTATTGGA ACAGAGGAGA GCCCAACAAC GTTGGGGAGG AAGACTGCGC GGAATTTAGT	1080
GGCAATGGCT GGAACGACGA CAAATGTAAT CTTGCCAAAT TCTGGATCTG CAAAAAGTCC	1140
GCAGCCTCCT GCTCCAGGGA TGAAGAACAG TTTCTTTCTC CAGCCCCTGC CACCCCAAAC	1200
CCCCCTCCTG CGTAG	1215

<210> 2

<211> 404

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Met Ser Asp Ser Lys Glu Pro Arg Leu Gln Gln Leu Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 Glu Glu Glu Gln Leu Arg Gly Leu Gly Phe Arg Gln Thr Arg Gly
 20 25 30
 Tyr Lys Ser Leu Ala Gly Cys Leu Gly His Gly Pro Leu Val Leu
 35 40 45
 Gln Leu Leu Ser Phe Thr Leu Leu Ala Gly Leu Leu Val Gln Val
 50 55 60
 Ser Lys Val Pro Ser Ser Ile Ser Gln Glu Gln Ser Arg Gln Asp
 65 70 75
 Ala Ile Tyr Gln Asn Leu Thr Gln Leu Lys Ala Ala Val Gly Glu
 80 85 90
 Leu Ser Glu Lys Ser Lys Leu Gln Glu Ile Tyr Gln Glu Leu Thr
 95 100 105
 Gln Leu Lys Ala Ala Val Gly Glu Leu Pro Glu Lys Ser Lys Leu
 110 115 120
 Gln Glu Ile Tyr Gln Glu Leu Thr Arg Leu Lys Ala Ala Val Gly
 125 130 135
 Glu Leu Pro Glu Lys Ser Lys Leu Gln Glu Ile Tyr Gln Glu Leu
 140 145 150
 Thr Trp Leu Lys Ala Ala Val Gly Glu Leu Pro Glu Lys Ser Lys
 155 160 165
 Met Gln Glu Ile Tyr Gln Glu Leu Thr Arg Leu Lys Ala Ala Val
 170 175 180
 Gly Glu Leu Pro Glu Lys Ser Lys Gln Gln Glu Ile Tyr Gln Glu
 185 190 195
 Leu Thr Arg Leu Lys Ala Ala Val Gly Glu Leu Pro Glu Lys Ser
 200 205 210
 Lys Gln Gln Glu Ile Tyr Gln Glu Leu Thr Arg Leu Lys Ala Ala
 215 220 225
 Val Gly Glu Leu Pro Glu Lys Ser Lys Gln Gln Glu Ile Tyr Gln
 230 235 240
 Glu Leu Thr Gln Leu Lys Ala Ala Val Glu Arg Leu Cys His Pro
 245 250 255
 Cys Pro Trp Glu Trp Thr Phe Phe Gln Gly Asn Cys Tyr Phe Met
 260 265 270

Ser Asn Ser Gln Arg Asn Trp His Asp Ser Ile Thr Ala Cys Lys
275 280 285

Glu Val Gly Ala Gln Leu Val Val Ile Lys Ser Ala Glu Glu Gln
290 295 300

Asn Phe Leu Gln Leu Gln Ser Ser Arg Ser Asn Arg Phe Thr Trp
305 310 315

Met Gly Leu Ser Asp Leu Asn Gln Glu Gly Thr Trp Gln Trp Val
320 325 330

Asp Gly Ser Pro Leu Leu Pro Ser Phe Lys Gln Tyr Trp Asn Arg
335 340 345

Gly Glu Pro Asn Asn Val Gly Glu Glu Asp Cys Ala Glu Phe Ser
350 355 360

Gly Asn Gly Trp Asn Asp Asp Lys Cys Asn Leu Ala Lys Phe Trp
365 370 375

Ile Cys Lys Lys Ser Ala Ala Ser Cys Ser Arg Asp Glu Glu Gln
380 385 390

Phe Leu Ser Pro Ala Pro Ala Thr Pro Asn Pro Pro Pro Ala
395 400 404

Lisboa, 28 de Agosto de 2008

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de um anticorpo que se liga ao receptor designado DC-SIGN, na superfície de uma célula dendrítica e representada como SEQ ID N° 2 ou uma variante natural ou seu fragmento, na preparação de um medicamento para reduzir uma resposta imunitária num animal, em que o referido anticorpo inibe a interacção entre uma célula dendrítica e uma célula T.
2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, na preparação de uma composição para reduzir uma ou mais interacções entre uma célula dendrítica e uma célula T.
3. Utilização de acordo com a reivindicação 1 e/ou 2, na preparação de uma composição para reduzir a adesão entre um DC-SIGN à superfície de uma célula dendrítica e um receptor ICAM na superfície de uma célula T.
4. Utilização de acordo com a reivindicação 3, em que o receptor ICAM é o receptor ICAM-3 na superfície de uma célula T.
5. Utilização de um anticorpo que se liga ao receptor designado DC-SIGN na superfície de uma célula dendrítica e representado como SEQ ID N° 2 ou uma variante natural ou seu fragmento, na preparação de um medicamento para inibir a adesão da proteína de superfície de HIV à superfície de uma célula dendrítica.

6. Utilização de acordo com qualquer reivindicação anterior em que o anticorpo é um anticorpo monoclonal.
7. Utilização de acordo com qualquer reivindicação anterior em que o animal é humano.
8. Anticorpo dirigido contra o receptor designado DC-SIGN na superfície de uma célula dendrítica e representada como SEQ ID N° 2 ou uma variante natural ou seu fragmento, em que o referido anticorpo inibe a interacção entre uma célula dendrítica e uma célula T.
9. Anticorpo de acordo com a reivindicação 8 que é um anticorpo monoclonal.
10. Anticorpo de acordo com a reivindicação 9, sendo AZN-D1 e identificado como o número de acesso ECACC 99040818 ou AZND2 identificado aqui como o número de acesso ECACC 99040819.
11. Composição farmacêutica contendo, pelo menos, um anticorpo de acordo com qualquer das reivindicações 8 a 10 e, pelo menos, um outro veículo, excipiente, adjuvantes e/ou formulantes conhecidos *per se*.
12. Utilização de um anticorpo de acordo com as reivindicações 8 a 10 na detecção de células dendríticas numa amostra biológica.
13. Utilização de um anticorpo de acordo com as reivindicações 8 a 10 no isolamento, preparação e/ou purificação de

células dendríticas a partir de uma amostra biológica ou um meio de cultura.

14. Método para produzir, isolar e/ou purificar células dendríticas a partir de uma amostra biológica ou um meio de cultura, compreendendo os passos de: a) colocar em contacto uma amostra biológica ou um meio de cultura que contém células dendríticas com um anticorpo de acordo com qualquer das reivindicações 8 a 10; b) separar as células que se ligam ao referido anticorpo das células que não se ligam ao referido anticorpo e, opcionalmente, de quaisquer outros constituintes da amostra ou meio; e, opcionalmente, compreende ainda os passos de: c) separar as células que se ligam ao anticorpo do referido anticorpo.
15. Método de acordo com a reivindicação 14, em que o anticorpo é ligado a uma coluna ou matriz, a esferas (para)magnéticas ou a um suporte sólido semelhante.
16. Método de acordo com a reivindicação 14 ou 15, em que a amostra biológica é um fluido biológico, tal como sangue, plasma ou fluido linfático.

Lisboa, 28 de Agosto de 2008

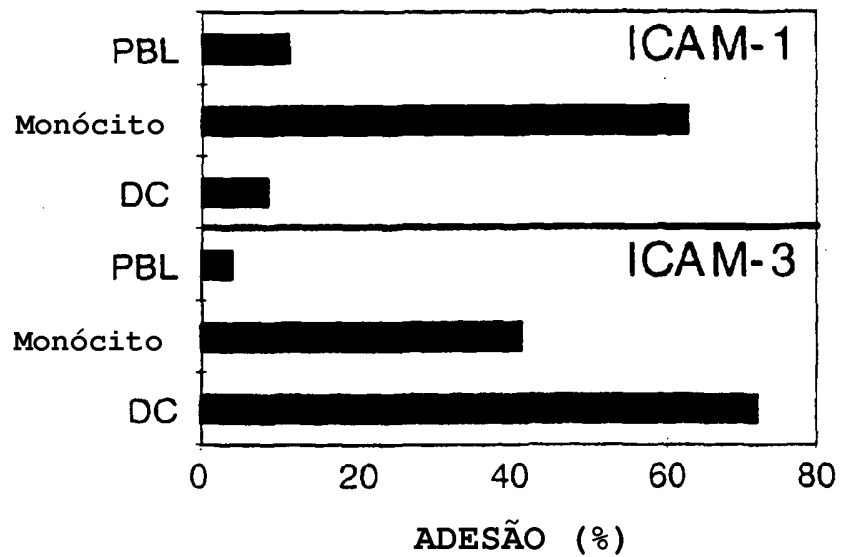
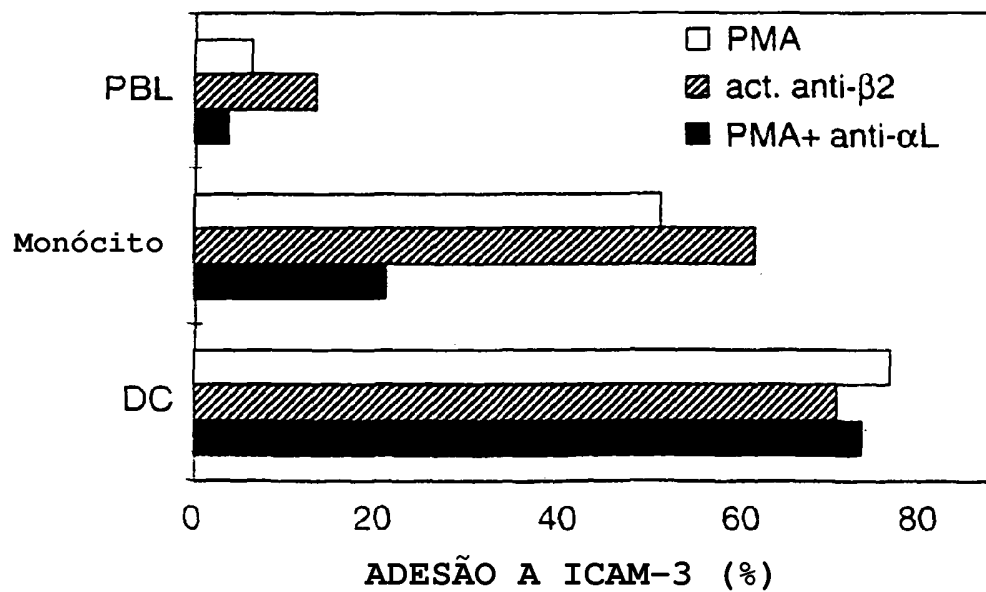
Fig 1a*Fig 1b*

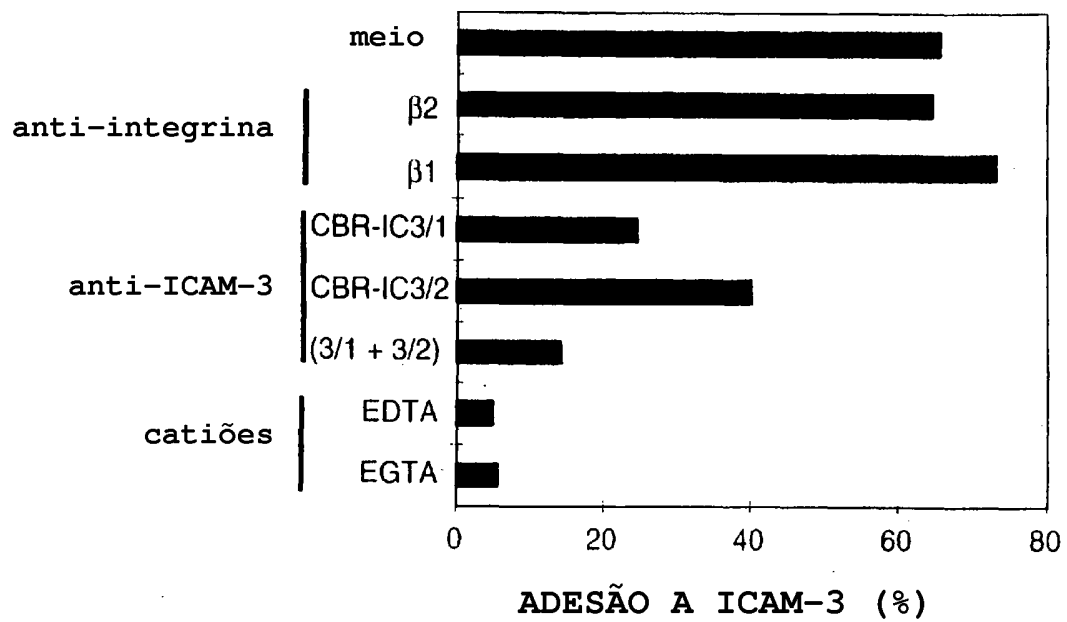
Fig 1c

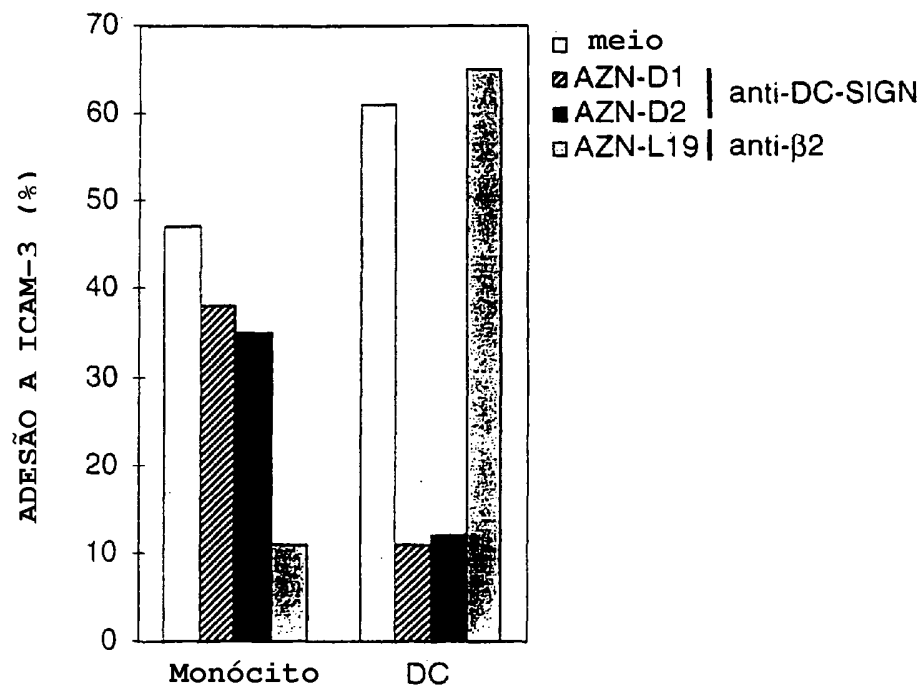
Fig 2a

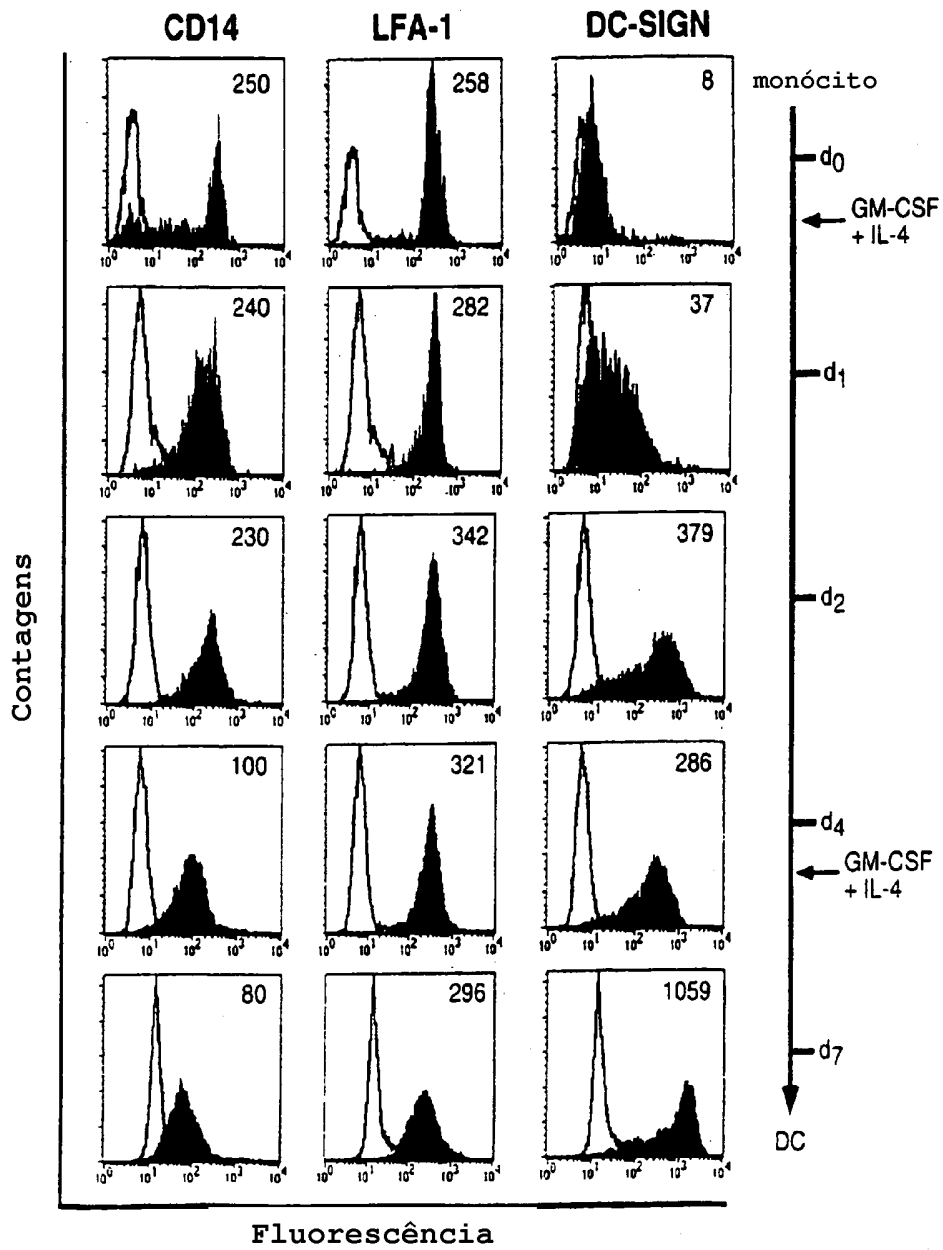
Fig 2b

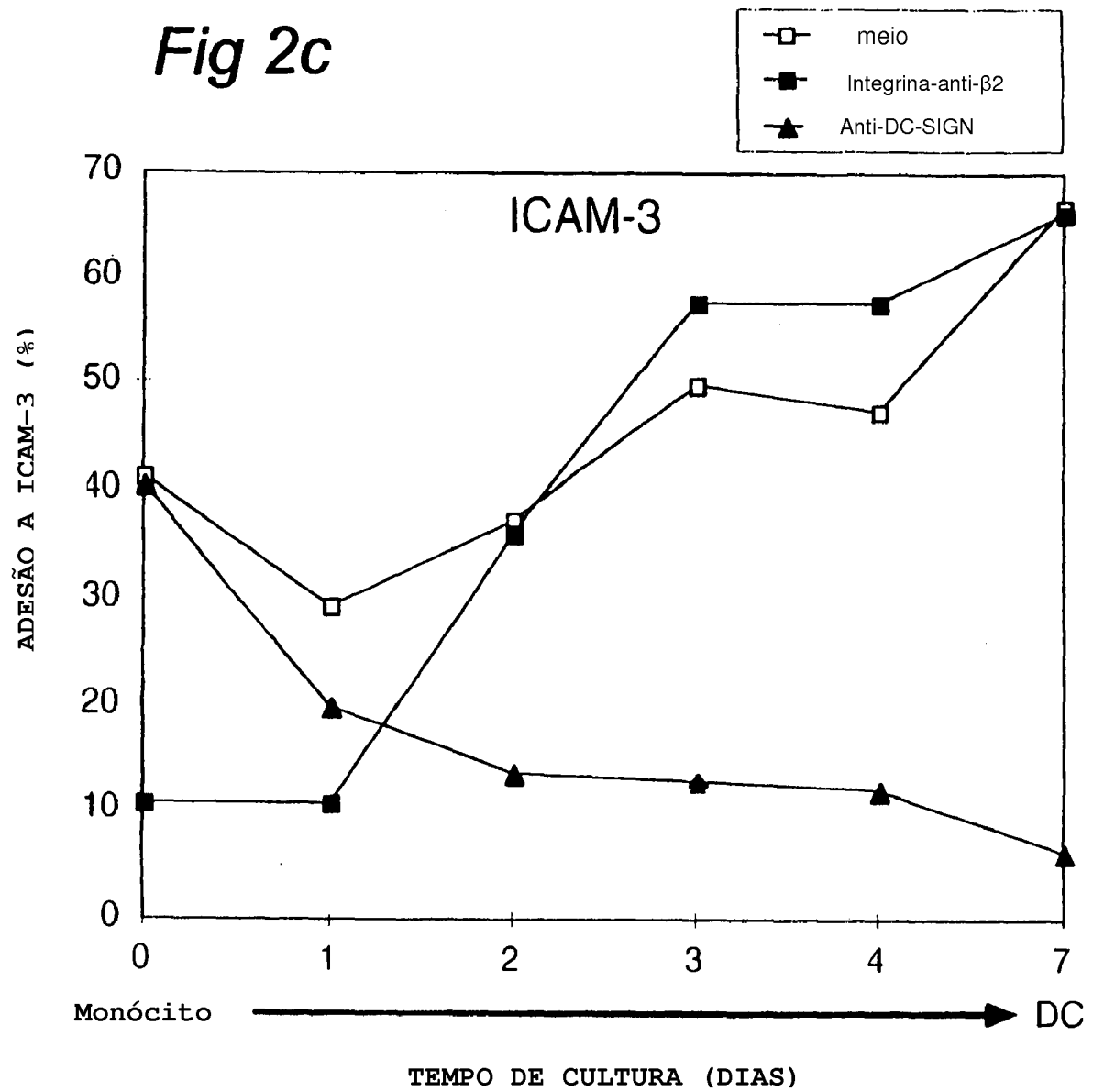
Fig 2c

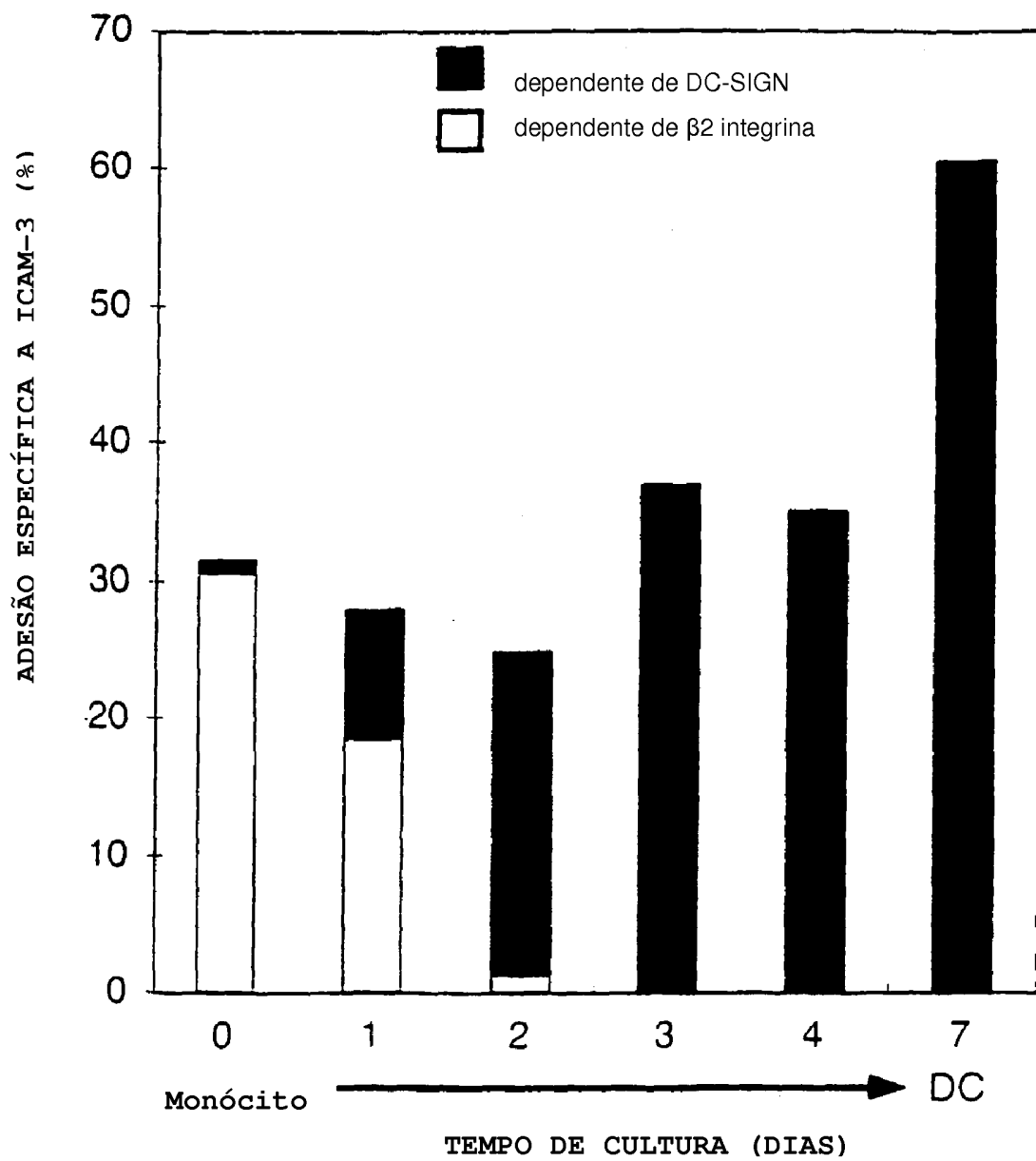
Fig 2d

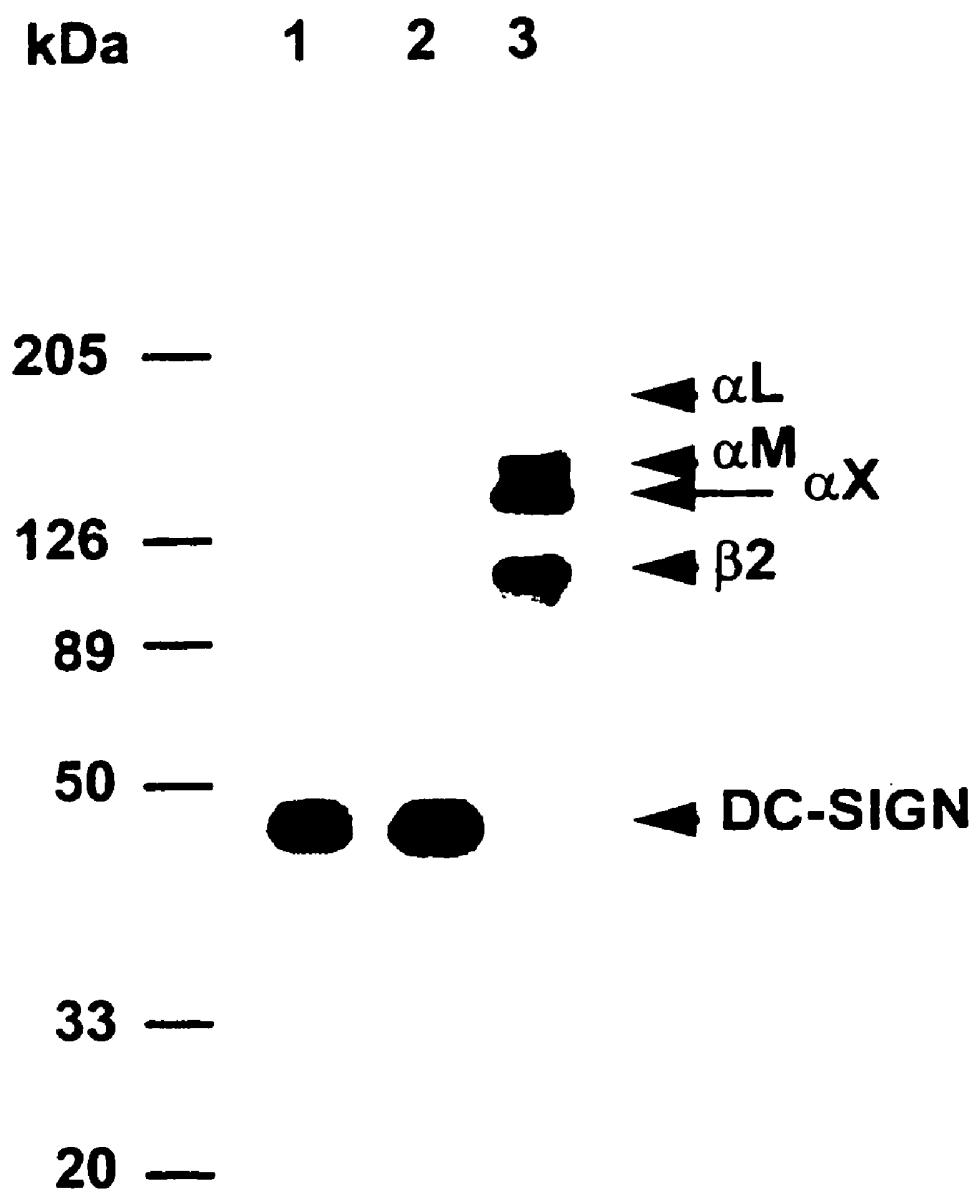
Fig 3a

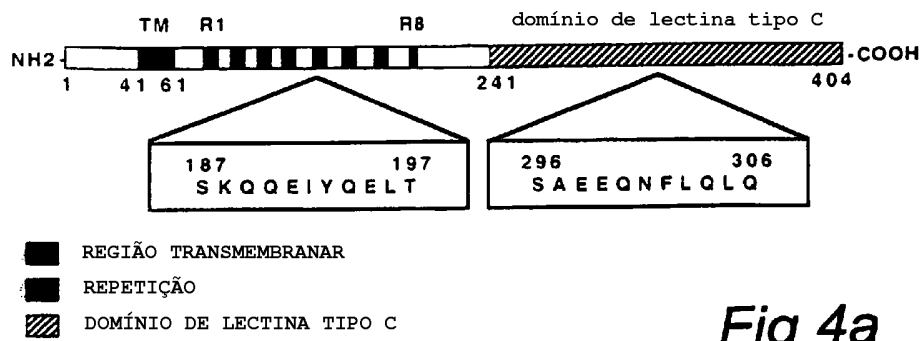
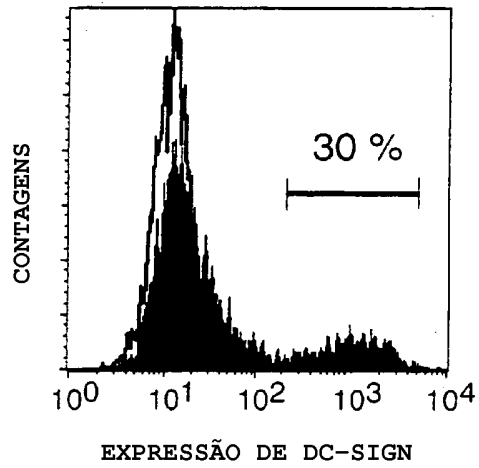
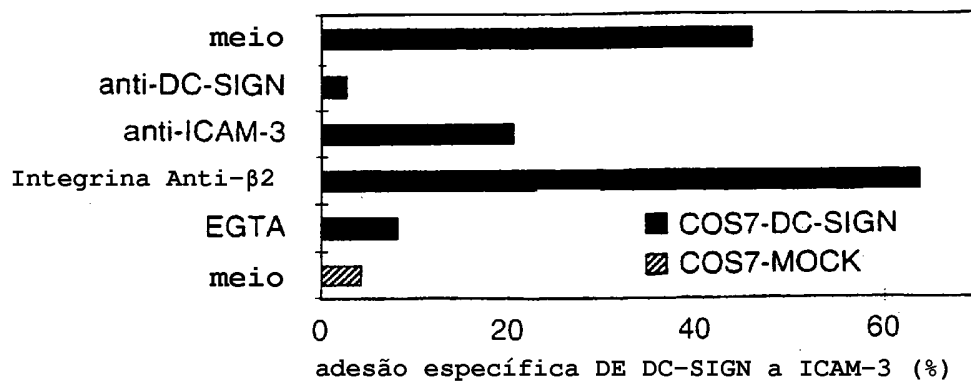
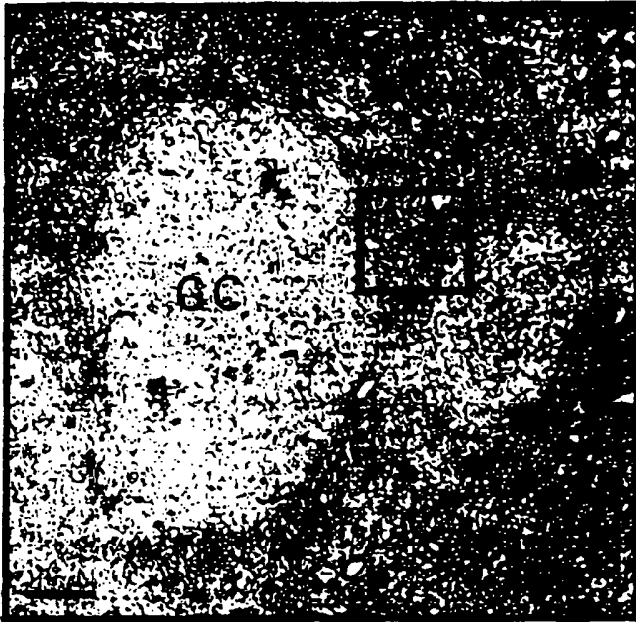
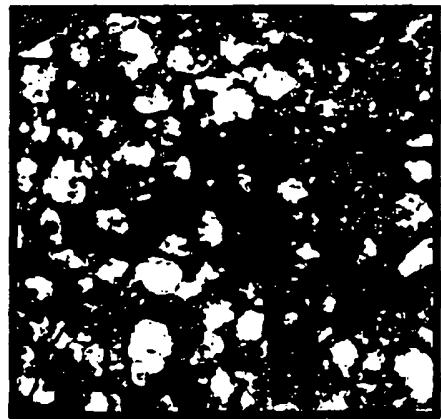
Fig 3b*Fig 4a**Fig 4b*

Fig 5

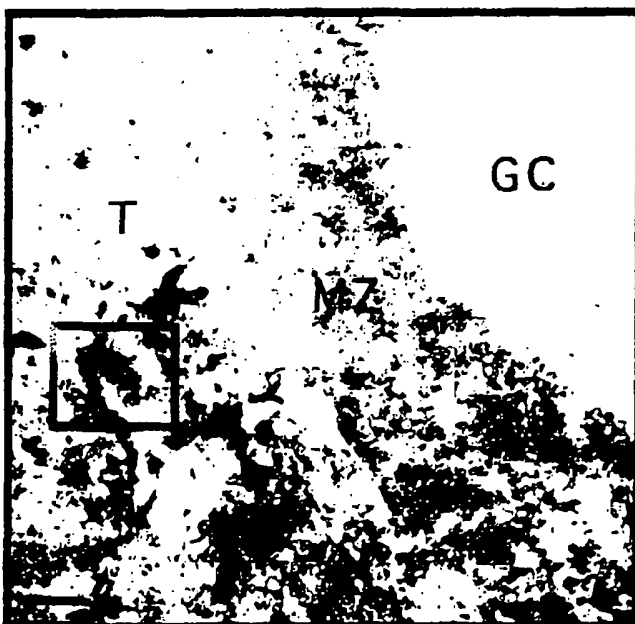
A



B



C



D

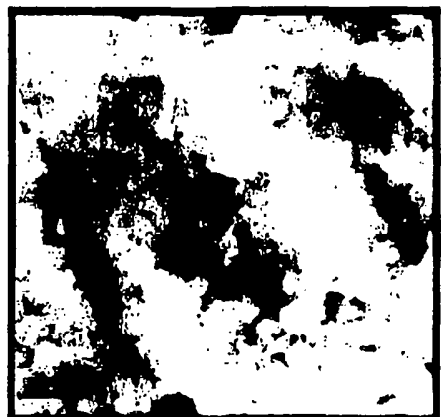


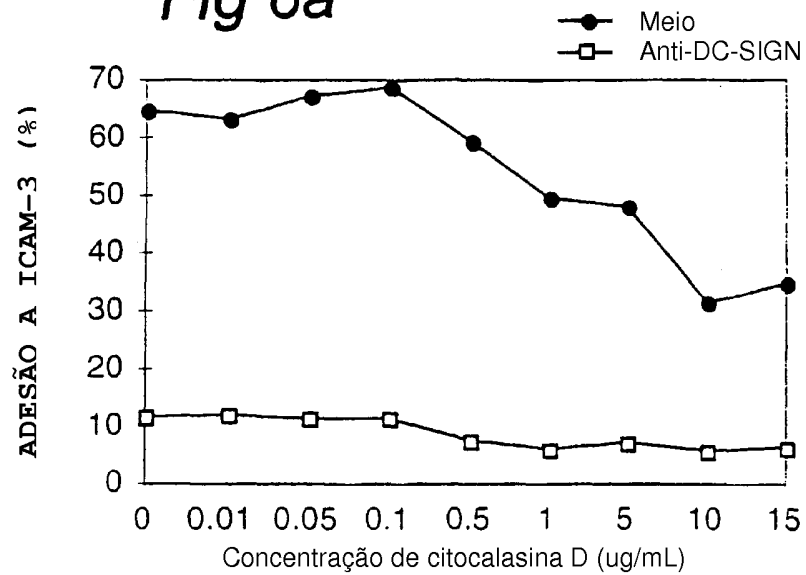
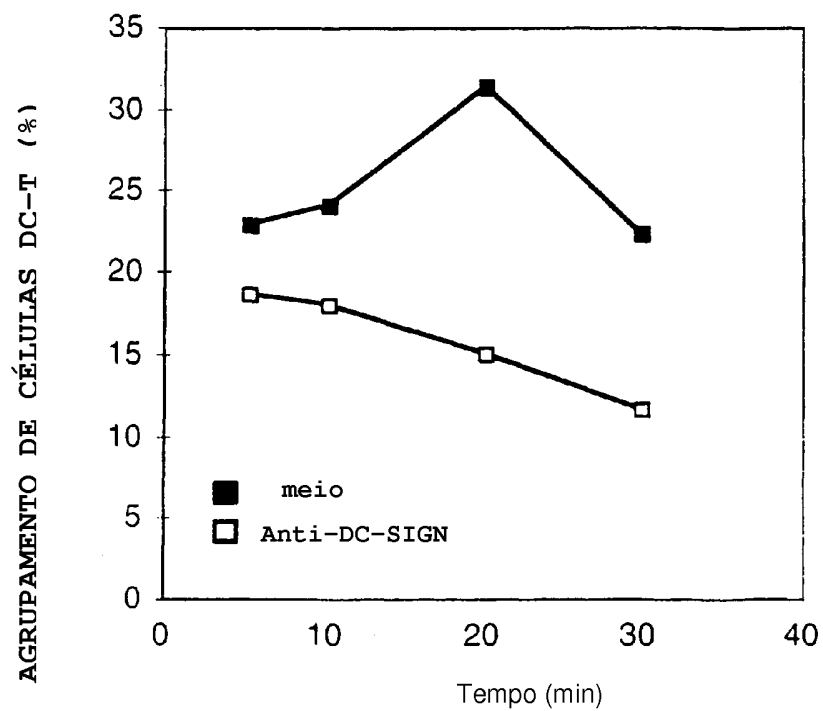
Fig 6a**Fig 6c**

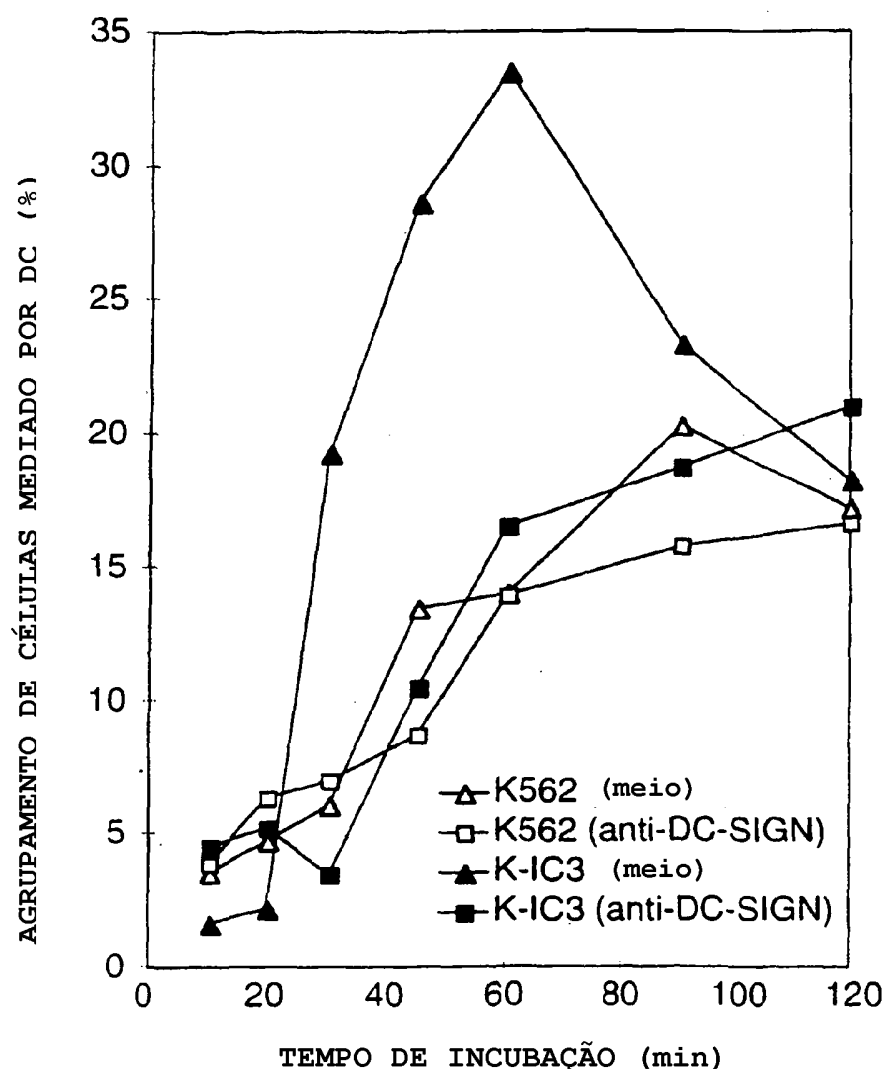
Fig 6b

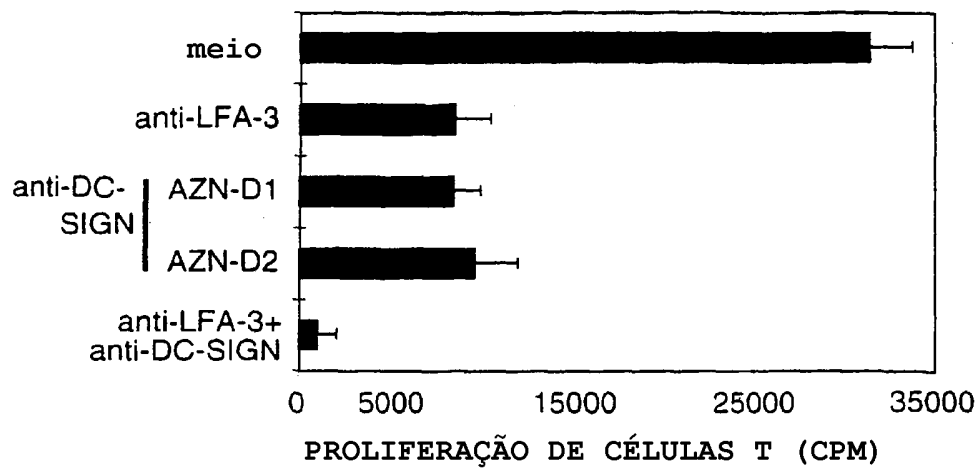
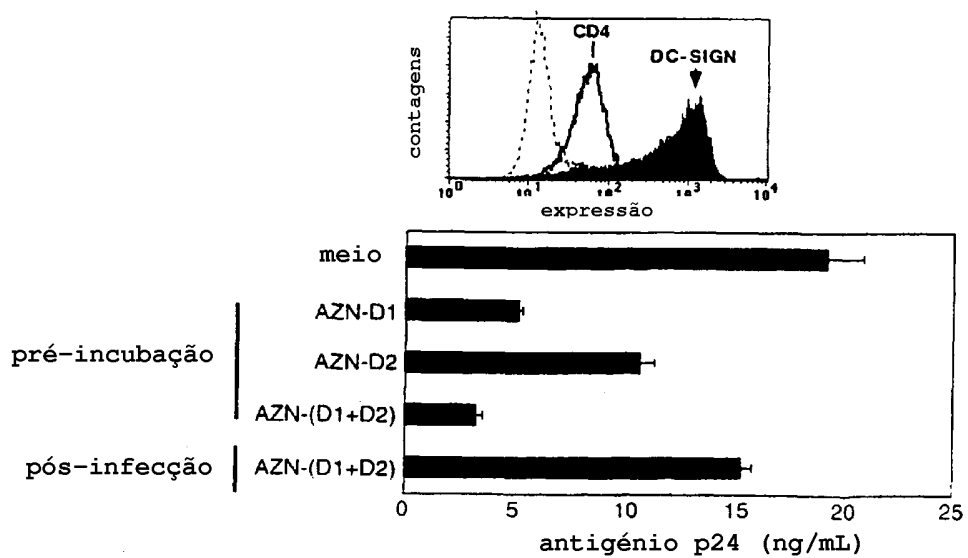
Fig 6d*Fig 7*

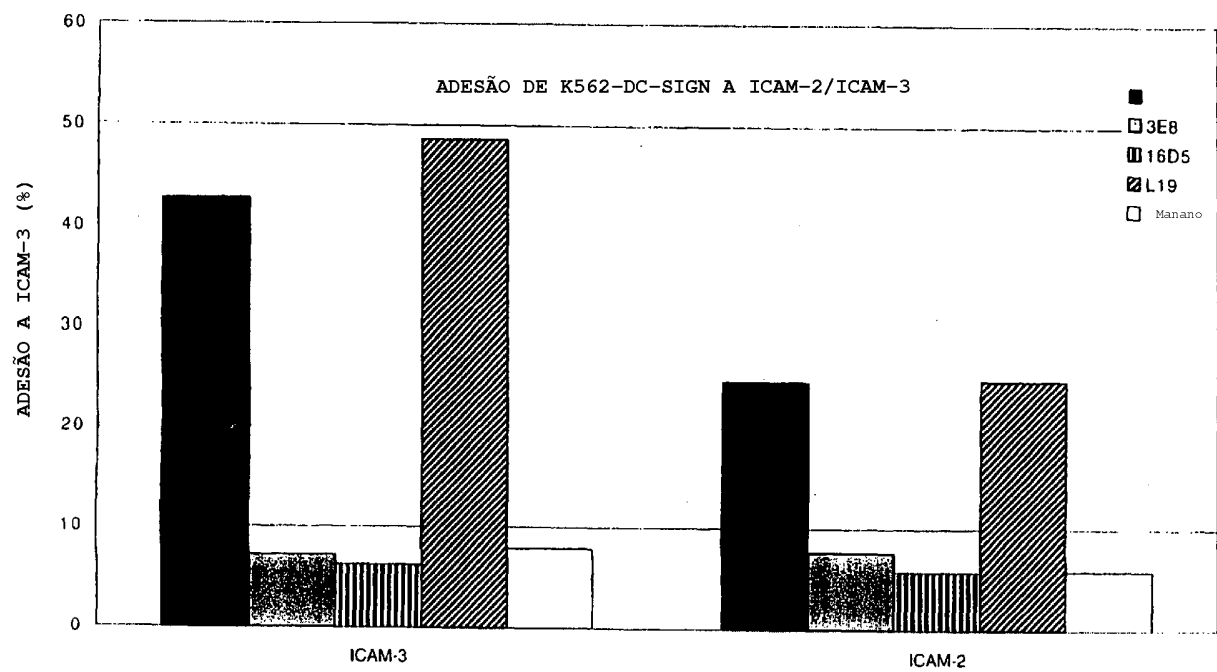
Fig 8

Fig 9

```

1/1          31/11
ATG AGT GAC TCC AAG GAA CCA AGA CTG CAG CAG CTG GGC CTC CTG GAG GAG GAA CAG CTG
Met ser asp ser lys glu pro arg leu gln gln leu gly leu leu glu glu glu gln leu
61/21          91/31
AGA GGC CTT GGA TTC CGA CAG ACT CGA GGA TAC AAG AGC TTA GCA GGG TGT CTT GGC CAT
arg gly leu gly phe arg gln thr arg gly tyr lys ser leu ala gly cys leu gly his
121/41          151/51
GGT CCC CTG GTG CTG CAA CTC CTC TCC TTC ACG CTC TTG GCT GGG CTC CTT GTC CAA GTG
gly pro leu val leu gln leu leu ser phe thr leu leu ala gly leu leu val gln val
181/61          211/71
TCC AAG GTC CCC AGC TCC ATA AGT CAG GAA CAA TCC AGG CAA GAC GCG ATC TAC CAG AAC
ser lys val pro ser ser ile ser gln glu gln ser arg gln asp ala ile tyr gln asn
241/81          271/91
CTG ACC CAG CTT AAA GCT GCA GTG GGT GAG CTC TCA GAG AAA TCC AAG CTG CAG GAG ATC
leu thr gln leu lys ala ala val gly glu leu ser glu lys ser lys leu gln glu ile
301/101          331/111
TAC CAG GAG CTG ACC CAG CTG AAG GCT GCA GTG GGT GAG CTT CCA GAG AAA TCT AAG CTG
tyr gln glu leu thr gln leu lys ala ala val gly glu leu pro glu lys ser lys leu
361/121          391/131
CAG GAG ATC TAC CAG GAG CTG ACC CGG CTG AAG GCT GCA GTG GGT GAG CTT CCA GAG AAA
gln glu ile tyr gln glu leu thr arg leu lys ala ala val gly glu leu pro glu lys
421/141          451/151
TCT AAG CTG CAG GAG ATC TAC CAG GAG CTG ACC TGG CTG AAG GCT GCA GTG GGT GAG CTT
ser lys leu gln glu ile tyr gln glu leu thr trp leu lys ala ala val gly glu leu
481/161          511/171
CCA GAG AAA TCT AAG ATG CAG GAG ATC TAC CAG GAG CTG ACT CGG CTG AAG GCT GCA GTG
pro glu lys ser lys met gln glu ile tyr gln glu leu thr arg leu lys ala ala val
541/181          571/191
GGT GAG CTT CCA GAG AAA TCT AAG CAG CAG GAG ATC TAC CAG GAG CTG ACC CGG CTG AAG
gly glu leu pro glu lys ser lys gln gln glu ile tyr gln glu leu thr arg leu lys
601/201          631/211
GCT GCA GTG GGT GAG CTT CCA GAG AAA TCT AAG CAG CAG GAG ATC TAC CAG GAG CTG ACC
ala ala val gly glu leu pro glu lys ser lys gln gln glu ile tyr gln glu leu thr
661/221          691/231
CGG CTG AAG GCT GCA GTG GGT GAG CTT CCA GAG AAA TCT AAG CAG CAG GAG ATC TAC CAG
arg leu lys ala ala val gly glu leu pro glu lys ser lys gln gln glu ile tyr gln
721/241          751/251
GAG CTG ACC CAG CTG AAG GCT GCA GTG GAA CGC CTG TGC CAC CCC TGT CCC FGG GAA TGG
glu leu thr gln leu lys ala ala val glu arg leu cys his pro cys pro trp glu trp
781/261          811/271
ACA TTC TTC CAA GGA AAC TGT TAC TTC ATG TCT AAC TCC CAG CGG AAC TGG CAC GAC TCC
thr phe phe gln gly asn cys tyr phe met ser asn ser gln arg asn trp his asp ser
841/281          871/291
ATC ACC GCC TGC AAA GAA GTG GGG GCC CAG CTC GTC GTA ATC AAA AGT GCT GAG GAG CAG
ile thr ala cys lys glu val gly ala gln leu val val ile lys ser ala glu glu gln
901/301          931/311
AAC TTC CTA CAG CTG CAG TCT TCC AGA AGT AAC CGC TTC ACC TGG ATG GGA CTT TCA GAT
asn phe leu gln leu gln ser ser arg ser asn arg phe thr trp met gly leu ser asp
961/321          991/331
CTA AAT CAG GAA GGC ACG TGG CAA TGG GTG GAC GGC TCA CCT CTG TTG CCC AGC TTC AAG
leu asn gln glu gly thr trp gln trp val asp gly ser pro leu leu pro ser phe lys
1021/341          1051/351
CAG TAT TGG AAC AGA GGA GAG CCC AAC AAC GTT GGG GAG GAA GAC TGC GCG GAA TTT AGT
gln tyr trp asn arg gly glu pro asn asn val gly glu glu asp cys ala glu phe ser
1081/361          1111/371
GGC AAT GGC TGG AAC GAC GAC AAA TGT AAT CTT GCC AAA TTC TGG ATC TGC AAA AAG TCC
gly asn gly trp asn asp asp lys cys asn leu ala lys phe trp ile cys lys lys ser
1141/381          1171/391
GCA GCC TCC TGC TCC AGG GAT GAA GAA CAG TTT CTT TCT CCA GCC CCT GCC ACC CCA AAC
ala ala ser cys ser arg asp glu glu gln phe leu ser pro ala pro ala thr pro asn
1201/401
CCC CCT CCT GCG TAG
pro pro pro ala END

```