

(11) Número de Publicação: **PT 1177312 E**

(51) Classificação Internacional:
C12N 15/24 (2007.10) **C07K 16/24** (2007.10)
C07K 14/54 (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2000.04.28**

(30) Prioridade(s): **1999.04.28 US 131473 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2002.02.06**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.10.31**
015/2008

(73) Titular(es):
GENETICS INSTITUTE, LLC
87 CAMBRIDGE PARK DRIVE CAMBRIDGE, MA
02140 US

(72) Inventor(es):
KENNETH JACOBS US
LYNETTE FOUSER US
VIKKI SPAULDING US
DEJUN XUAN US

(74) Mandatário:
ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **PROTEÍNAS GIL-19/AE289 HUMANAS E POLINUCLEÓTIDOS CODIFICADORES DAS MESMAS**

(57) Resumo:

RESUMO

**"PROTEÍNAS GIL-19/AE289 HUMANAS E POLINUCLEÓTIDOS
CODIFICADORES DAS MESMAS"**

Descreve-se a nova proteína GIL-19/AE289 humana que apresenta um elevado grau de homologia com interleucina-10 (IL-10). São igualmente descritos polinucleótidos codificadores de tal proteína.

DESCRIÇÃO**"PROTEÍNAS GIL-19/AE289 HUMANAS E POLINUCLEÓTIDOS
CODIFICADORES DAS MESMAS"****CAMPO DO INVENTO**

O presente invento proporciona novas proteínas que apresentam homologia com interleucina-10 (IL-10) e polinucleótidos codificadores de tais proteínas, juntamente com utilizações terapêuticas, de diagnóstico e de pesquisa para estes polinucleótidos e proteínas.

FUNDAMENTO DO INVENTO

A tecnologia dirigida para a descoberta de factores proteicos (incluindo e.g., citocinas, tais como linfocinas, interferões, CSFs e interleucinas) tem evoluído rapidamente ao longo da última década. As técnicas de rotina de clonagem de hibridação e clonagem de expressão permitem clonar novos polinucleótidos "directamente", no sentido de se basearem em informação directamente relacionada com a proteína descoberta (*i.e.*, sequência parcial de DNA/aminoácidos da proteína no caso da clonagem de hibridação; actividade da proteína no caso da clonagem de expressão). As técnicas de clonagem "indirectas", mais recentes, tais como a clonagem da sequência sinal que isola

sequências de DNA com base na presença de um motivo de sequência líder secretória agora do conhecimento geral, assim como várias técnicas de clonagem de hibridação de baixa restringência ou baseadas em PCR, fizeram avançar o conhecimento na área ao tornarem disponíveis grandes números de sequências de DNA/aminoácidos para proteínas que se sabe possuírem actividade biológica, devido a serem secretadas, no caso da clonagem da sequência líder, ou devido à fonte de células ou tecido no caso das técnicas baseadas em PCR. É a estas proteínas e polinucleótidos que as codificam que o presente invento é dirigido.

SUMÁRIO DO INVENTO

Numa realização, o presente invento proporciona um polinucleótido isolado, seleccionado do grupo consistindo em:

(a) um polinucleótido compreendendo a sequência de nucleótidos de SEQ ID NO:1;

(b) um polinucleótido compreendendo a sequência de nucleótidos de SEQ ID NO:1 do nucleótido 65 ao nucleótido 601;

(c) um polinucleótido compreendendo a sequência de nucleótidos de uma sequência codificadora da proteína de tamanho completo do clone hGIL-19/AE289 depositada com o número de acesso ATCC 207231;

(d) um polinucleótido compreendendo a sequência de nucleótidos de uma sequência codificadora da proteína madura do clone hGIL-19/AE289 depositada com o número de acesso ATCC 207231;

(e) um polinucleótido codificador de uma proteína compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2;

(f) uma sequência nucleotídica codificadora de uma proteína compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2 aproximadamente entre os aminoácidos 34 e 179; e

(g) uma sequência nucleotídica codificadora de uma proteína compreendendo um fragmento da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2, o fragmento compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo nos aminoácidos 50-60, 63-81 e 168-177 de SEQ ID NO:2.

De preferência, tal polinucleótido compreende a sequência nucleotídica de SEQ ID NO:1 do nucleótido 65 ao nucleótido 601; a sequência nucleotídica da sequência codificadora da proteína de tamanho completo do clone hGIL-19/AE289 depositado com o número de acesso ATCC 207231; ou a sequência nucleotídica de uma sequência codificadora da proteína madura do clone hGIL-19/AE289 depositada com o número de acesso ATCC 207231 (e.g., nucleótidos 1-1177 de SEQ ID NO:1). Noutras realizações preferidas, o poli-

nucleótido codifica a proteína de tamanho completo, ou madura, através do inserto de cDNA do clone hGIL-19/AE289 depositado com o número de acesso ATCC 207231 (e.g., aminoácidos 1-179 de SEQ ID NO:2). São igualmente aqui descritos polinucleótidos codificadores de uma proteína compreendendo um fragmento da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2 tendo actividade biológica, o fragmento, de preferência, compreendendo oito (mais de preferência vinte, mais de preferência trinta) aminoácidos contíguos de SEQ ID NO:2 ou um polinucleótido codificador de uma proteína compreendendo um fragmento da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2 tendo actividade biológica, o fragmento compreendendo a sequência de aminoácidos desde o aminoácido 84 até ao aminoácido 93 de SEQ ID NO:2.

Outras realizações proporcionam o gene correspondendo à sequência de cDNA de SEQ ID NO:1.

São igualmente descritos polinucleótidos isolados produzidos de acordo com um processo seleccionado do grupo consistindo em:

(a) um processo compreendendo os passos de:

(i) preparação de uma ou mais sondas polinucleotídicas que hibridam, em SSC 6X, a 65 graus C, com uma sequência nucleotídica seleccionada do grupo consistindo em:

(aa) SEQ ID NO:1, mas excluindo a cauda poli(A) no extremo 3' de SEQ ID NO:1; e

(ab) a sequência de nucleótidos do inserto de cDNA do clone hGIL-19/AE289 depositado com o número de acesso ATCC 207231;

(ii) hibridação das referidas sondas com DNA genómico humano em condições pelo menos tão restritivas como 4X SSC a 50 graus C; e

(iii) isolamento dos polinucleótidos de DNA detectados com as sondas;

e

(b) um processo compreendendo os passos de:

(i) preparação de uma ou mais sequências iniciadoras polinucleotídicas que hibridam, em SSC 6X, a 65 graus C, com uma sequência nucleotídica seleccionada do grupo consistindo em:

(ba) SEQ ID NO:1, mas excluindo a cauda poli(A) no extremo 3' de SEQ ID NO:1; e

(bb) a sequência de nucleótidos do inserto de cDNA do clone hGIL-19/AE289 depositado com o número de acesso ATCC 207231;

(ii) hibridação das referidas sequências iniciadoras com o DNA genómico humano em condições pelo menos tão restritivas como 4X SSC, a 50 graus C;

(iii) amplificação das sequências de DNA humano; e

(iv) isolamento dos produtos polinucleotídicos do passo (b)(iii).

De preferência, o polinucleótido isolado de acordo com o processo atrás referido compreende uma sequência nucleotídica correspondendo à sequência de cDNA de SEQ ID NO:1 e estendendo-se contiguamente desde uma sequência nucleotídica correspondendo ao extremo 5' de SEQ ID NO:1 até à sequência nucleotídica correspondendo ao extremo 3' de SEQ ID NO:1, mas excluindo a cauda poli(A) no extremo 3' de SEQ ID NO:1. Igualmente, de preferência, o polinucleótido isolado de acordo com o processo atrás referido compreende uma sequência nucleotídica correspondendo à sequência de cDNA de SEQ ID NO:1 desde o nucleótido 65 até ao nucleótido 601 e estendendo-se, contiguamente, desde uma sequência nucleotídica correspondendo ao extremo 5' da referida sequência de SEQ ID NO:1, desde o nucleótido 65 até ao nucleótido 601, até uma sequência nucleotídica correspondendo ao extremo 3' da referida sequência de SEQ ID NO:1 desde o nucleótido 65 até ao nucleótido 601.

Noutras realizações, o presente invento proporciona uma composição compreendendo uma proteína, em que a referida proteína compreende uma sequência de aminoácidos seleccionada do grupo consistindo em:

- (a) a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2;
- (b) um fragmento da sequência de aminoácidos de

SEQ ID NO:2, o fragmento compreendendo uma sequência de aminoácidos seleccionada do grupo consistindo nos aminoácidos 50-60, 63-81 e 168-177 de SEQ ID NO:2;

(c) a sequência de aminoácidos codificada por uma sequência codificadora da proteína de tamanho completo do clone hGIL-19/AE289 depositado com o número de acesso ATCC 207231;

(d) a sequência de aminoácidos codificada por uma sequência codificadora da proteína madura do clone hGIL-19/AE289 depositado com o número de acesso ATCC 207231; e

(e) a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2 desde o aminoácido 34 até ao aminoácido 179;

a proteína estando substancialmente livre de outras proteínas de mamífero. De preferência tal proteína compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2. Também é descrita uma proteína compreendendo um fragmento da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2 tendo actividade biológica, o fragmento, de preferência, compreendendo oito (mais de preferência vinte, mais de preferência trinta) aminoácidos contíguos de SEQ ID NO:2.

Em determinadas realizações preferias, o polinucleótido está operacionalmente ligado a uma sequência de controlo da expressão. O invento proporciona igualmente uma célula hospedeira, incluindo células bacterianas, de levedura, insecto e mamífero, transformadas com tais composições polinucleotídicas. São igualmente proporcionadas pelo presente invento organismos que possuem expressão

aumentada, reduzida ou modificada dos genes correspondendo à sequência polinucleotídica aqui descrita.

São igualmente proporcionados processos para a produção de uma proteína, os quais compreendem:

(a) crescimento de uma cultura da célula hospedeira transformada com tais composições polinucleotídicas num meio de cultura adequado; e

(b) purificação da proteína a partir da cultura. A proteína produzida de acordo com tais métodos é igualmente proporcionada pelo presente invento.

As composições proteicas do presente invento podem ainda compreender um veículo farmacêuticamente aceitável.

Numa outra realização, o invento está relacionado com um anticorpo ou seu fragmento que se liga a uma proteína como aqui descrito e reivindicado. O anticorpo pode ser um anticorpo neutralizante e pode ser seleccionado do grupo consistindo num anticorpo monoclonal, um anticorpo policlonal, um anticorpo quimérico, um anticorpo de cadeia simples, um anticorpo com enxerto de CDR e um anticorpo humanizado. Pode também ser um anticorpo humano.

Ainda noutra realização, o invento está relacionado com a utilização de um anticorpo como aqui descrito e reivindicado para a preparação de uma composição

farmacêutica para o tratamento ou prevenção de artrite num indivíduo. Numa realização, a artrite é artrite reumatóide.

Numa outra realização, o invento está relacionado com um polinucleótido isolado, compreendendo uma sequência nucleotídica que híbrida, em condições restritivas, com SEQ ID NO:1 ou um seu complemento. Ainda noutra realização, o invento está relacionado com uma proteína codificada por uma sequência nucleotídica que híbrida, em condições restritivas, com o complemento de SEQ ID NO:1, a proteína estando substancialmente livre de outras proteínas de mamífero.

O invento ainda está relacionado com um polinucleótido isolado codificador de um fragmento de uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo nos aminoácidos 50-60 e 168-177 de SEQ ID NO:2. Ainda, o invento está relacionado com um fragmento de uma proteína substancialmente pura, compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo nos aminoácidos 50-60, 63-81 e 168-177 de SEQ ID NO:2.

Ainda numa outra realização, o invento está relacionado com uma proteína de fusão compreendendo uma proteína, como aqui descrito e reivindicado, fundida com uma molécula veículo. A molécula veículo pode ser uma imunoglobulina ou porção Fc de uma imunoglobulina. A imunoglobulina pode ser uma imunoglobulina IgG ou uma IgM.

A proteína pode ser ainda fundida com uma molécula veículo através de uma sequência de ligação.

O presente invento também proporciona composições compreendendo um anticorpo, o qual reage especificamente com a proteína aqui descrita e reivindicada.

São igualmente descritos métodos para a prevenção, tratamento ou alívio de uma condição médica, os quais compreendem a administração a um mamífero de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição compreendendo uma proteína do presente invento e um veículo farmacêuticamente aceitável.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Proteínas e Polinucleótidos Isolados

As sequências de nucleótidos e de aminoácidos, como presentemente determinado, estão descritas abaixo para cada clone e proteína descrita no presente pedido. A sequência de nucleótidos de cada clone pode ser facilmente determinada através de sequenciação do clone depositado de acordo com métodos conhecidos. A sequência de aminoácidos prevista (formas de tamanho completo e madura) pode ser então determinada a partir de tal sequência de nucleótidos. A sequência de aminoácidos da proteína codificada por um clone particular pode também ser determinada através da expressão do clone numa célula hospedeira adequada, recuperação da proteína e determinação da sua sequência.

Como aqui usado, uma proteína "secretada" é aquela que, quando expressa numa célula hospedeira adequada, é transportada através de uma membrana, incluindo transporte como resultado de sequências sinal na sua sequência de aminoácidos. As proteínas "secretadas" incluem, sem limites, proteínas secretadas totalmente (e.g., proteínas solúveis) ou parcialmente (e.g., receptores) pela célula em que são expressas. Proteínas "secretadas" também incluem, sem limites, proteínas que são transportadas através da membrana do retículo endoplasmático.

Clone "hGIL-19/AE289"

Um polinucleótido do presente invento foi inicialmente identificado como o clone "hTIF/AE289", mais tarde atribuída nova designação e aqui referida também como "hGIL-19/AE289" e "hGIL-19". O clone hGIL-19/AE289 foi isolado de acordo com o método que se segue. Uma EST murina foi identificada a partir de uma biblioteca de cDNA de murganho, preparada a partir de esplenócitos activados com ConA e de células dendríticas derivadas da medula óssea. A EST foi identificada usando métodos selectivos para cDNAs codificadores das proteínas secretadas (ver Pat. U.S. N° 5536637). A sequência EST de murganho foi usada para isolar um clone de tamanho completo murino derivado da mesma biblioteca de cDNA (SEQ ID NO:4; A Figura 1 descreve a sequência do cDNA de GIL-19 murino). A análise da sequência do clone de murganho revelou uma homologia significativa com interleucina-10 (IL-10).

Para isolar um homólogo humano do clone murino, foram construídas sequências iniciadoras para PCR com base na região da sequência murina que mostrou homologia com IL-10. A utilização de tais sequências iniciadoras para amplificação numa biblioteca de PBMCs humanos produziu um produto de PCR de tamanho significativo. A análise da sequência do produto de PCR confirmou que era um homólogo do cDNA murino. Foram construídos oligonucleótidos a partir da sequência do clone humano parcial e usados para isolar um clone humano de tamanho completo a partir da biblioteca de PBMCs.

hGIL-19/AE289 é um clone humano de tamanho completo, incluindo a totalidade da sequência codificadora de uma proteína secretada (igualmente aqui referida como "proteína hTIF/AE289", "proteína hGIL-19/AE289" e "proteína hGIL-19"). A análise da sua sequência confirma a sua homologia com IL-10.

A sequência nucleotídica de hGIL-19 como agora determinado está descrita em SEQ ID NO:1 e inclui uma cauda poli(A). A grelha de leitura aberta e a sequência de aminoácidos da proteína hGIL-19 de tamanho completo correspondendo à sequência nucleotídica anterior está descrita em SEQ ID NO:2. A sequência de aminoácidos de hGIL-19 madura corresponde aos aminoácidos 34-179 de SEQ ID NO:2.

O clone "hGIL-19/AE289" foi depositado em 28 de Abril, 1999 na "American Type Culture Collection" (10801 University Boulevard, Manassas, Virgínia 20110-2209 USA) como um depósito original de acordo com o Tratado de Budapeste e foi-lhe dado o número de acesso ATCC 207231. Todas as restrições à disponibilidade ao público do material depositado serão irrevogavelmente removidas quando da concessão da patente, excepto para os requisitos especificados em 37 C.F.R. §1.808 (b) e o termo de depósito estará de acordo com 37 C.F.R. §1.806.

Fragmentos das proteínas do presente invento (e.g. fragmentos que são capazes de apresentar actividade biológica) estão também incluídos no presente invento. Os fragmentos da proteína podem estar na forma linear ou podem ser tornados cíclicos usando métodos conhecidos, por exemplo, como descrito em H.U. Saragovi, *et al.*, Bio/Technology 10, 773-778 (1992) e em R.S. McDowell, *et al.*, J. Amer. Chem. Soc. 114, 9245-9253 (1992). Tais fragmentos podem ser usados como moléculas veículo para muitas finalidades, incluído aumento da valência dos locais de ligação à proteína. Por exemplo, os fragmentos da proteína podem ser fundidos através de sequências de "ligação" à porção Fc de uma imunoglobulina. Para uma forma bivalente da proteína, tal fusão poderá ser com a porção Fc de uma molécula de IgG. Outros isotipos de imunoglobulinas poderão ser também usados para gerar tais fusões. Por exemplo, uma proteína de fusão com IgM gerará uma forma decavalente da proteína.

O presente invento também proporciona formas de tamanho completo e maduras das proteínas descritas. A forma de tamanho completo de tais proteínas é identificada na listagem de sequências através da tradução da sequência nucleotídica de cada um dos clones descritos. A ou as formas maduras de tal proteína pode ser obtida através de expressão do polinucleótido de tamanho completo descrito (de preferência os depositados na ATCC) numa célula de mamífero adequada ou outra célula hospedeira. A ou as sequências da ou das formas maduras da proteína podem também ser determináveis a partir da sequência de aminoácidos da forma de tamanho completo e estão aqui descritas, por exemplo como aminoácidos 1-179 de SEQ ID NO:2.

O presente invento também proporciona genes correspondendo às sequências polinucleotídicas aqui descritas. "Genes correspondentes" são as regiões do genoma que são transcritos para produzir os mRNAs a partir dos quais derivam as sequências polinucleotídicas de cDNA e podem incluir regiões contíguas do genoma necessárias para a expressão regulada de tais genes. Os genes correspondentes podem assim incluir, mas não estão limitados a sequências codificadoras, regiões 5' e 3' não traduzidas, exões com splicing alternativo, intrões, promotores e elementos silenciadores ou supressores. Os genes correspondentes podem ser isolados de acordo com métodos conhecidos usando a informação da sequência aqui descrita. Tais métodos incluem a preparação de sondas ou sequências ini-

ciadoras a partir da informação da sequência descrita para identificação e/ou amplificação de genes em bibliotecas genómicas adequadas ou outras fontes de materiais genómicos. Um "gene isolado" é um gene que foi separado das sequências codificadoras adjacentes, se existirem, presentes no genoma do organismo a partir do qual o gene foi isolado.

A localização cromossómica correspondendo às sequências polinucleotídicas aqui descritas pode ser igualmente determinada, por exemplo, através da hibridação de polinucleótidos adequadamente marcados do presente invento com cromossomas *in situ*. Pode também ser possível determinar a correspondente localização cromossómica para um polinucleótido descrito através da identificação de sequências nucleotídicas significativamente semelhantes existentes nas bases de dados, tais como as sequências tags# expressas (ESTs), que já foram mapeadas em localizações cromossómicas particulares. Para pelo menos algumas das sequências polinucleotídicas aqui descritas, as sequências das bases de dados públicas tendo pelo menos alguma semelhança com o polinucleótido do presente invento foram listadas de acordo com o número de acesso nas bases de dados. As pesquisas efectuadas usando os números de acesso do GenBank destas sequências em bases de dados públicas podem ser então realizadas num local da Internet disponibilizado pelo National Center for Biotechnology Information tendo o endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>, de forma a identificar "grupos UniGene" de sequências

sobreponíveis. Muitos dos "grupos UniGene" assim identificado já forma mapeados em locais cromossômicos particulares.

São proporcionados organismos que possuem expressão aumentada, reduzida ou modificada dos genes correspondentes às sequências polinucleotídicas aqui descritas. A alteração pretendida na expressão genica pode ser conseguida através da utilização de polinucleótidos complementares da sequência codificadora ou ribozimas que se ligam e/ou clivam o mRNA transcrito a partir do gene (Albert and Morris, 1994, Trends Pharmacol. Sci. 15(7):250-254; Lavarosky et al., 1997, Biochem. Mol. Med. 62(1):11-22; e Hampel, 1998, Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 58:1-39. São proporcionados animais transgênicos não humanos que possuem múltiplas cópias de um ou mais genes correspondentes às sequências polinucleotídicas aqui descritas, de preferência produzidos pela transformação de células com construções genéticas que sejam estavelmente mantidas dentro das células transformadas e na sua descendência. Animais transgênicos não humanos que possuam regiões de controle genético modificadas que aumentem ou reduzam os níveis de expressão génica, ou que alterem os padrões temporais ou espaciais da expressão génica, são igualmente proporcionados (ver Pedido de Patente Europeia N°0649464B1). Ainda, são proporcionados organismos não humanos em que um ou mais genes, correspondentes às sequências polinucleotídicas aqui descritas, foram parcialmente ou totalmente inactivados, através da inserção de sequências estranhas

num ou mais genes correspondentes ou através da deleção da totalidade ou de parte de um ou mais genes correspondentes. A inativação parcial ou completa do gene pode ser conseguida através da inserção, de preferência seguida de excisão imprecisa, de elementos tipo transposição (Plasterk, 1992, *Bioessays* 14(9):629-633; Zwaal *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(16): 7431-7435; Clark *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(2):719-722) ou através de recombinação homóloga, de preferência detectada por estratégias de selecção genética positiva/negativa (Mansour *et al.*, 1988, *Nature* 336:348-352; Patente U.S. Nos. 5464764; 5487992; 5627059; 5631153; 5614396; 5616491, e 5679523). Estes organismos com a expressão génica alterada são, de preferência, eucariotas e, mais de preferência, são mamíferos não humanos. Tais organismos são úteis para o desenvolvimento de modelos não humanos para o estudo de alterações envolvendo os genes correspondentes e para o desenvolvimento de sistemas de ensaio para a identificação de moléculas que interagem com os produtos proteicos dos genes correspondentes.

As proteínas e fragmentos proteicos aqui descritos incluem proteínas com comprimentos de sequências de aminoácidos que são pelo menos 25% (mais de preferência pelo menos 50%, e mais de preferência pelo menos 75%) do comprimento de uma proteína descrita e possuem pelo menos 60% de identidade de sequências (mais de preferência, pelo menos 75% de identidade; mais de preferência pelo menos 90% ou 95% de identidade) com a proteína descrita, em que a

identidade de sequências é determinada através da comparação das sequências de aminoácidos das proteínas quando alinhadas de forma a maximizar a sobreposição e identidade, minimizando ao mesmo tempo os intervalos de sequências. São também incluídas proteínas e fragmentos proteicos que possuem um segmento compreendendo, de preferência, 8 ou mais (mais de preferência 20 ou mais, mais de preferência 30 ou mais) aminoácidos contíguos que partilham pelo menos 75% de identidade de sequências (mais de preferência, pelo menos 85% de identidade; mais de preferência pelo menos 95% de identidade) com qualquer desses segmentos das proteínas descritas.

Numa realização, proteínas, fragmentos proteicos e proteínas recombinantes do presente invento incluem os que podem ser identificados com base na presença de pelo menos um "motivo de ligação ao receptor de HGIL-19/AE289". Como aqui usado, o termo "motivo de ligação ao receptor de hGIL-19/AE289" inclui sequências de aminoácidos ou resíduos que são importantes para a ligação de hGIL-19 ao seu receptor preciso. Numa realização preferida, uma proteína hGIL-19 possui um motivo de ligação ao receptor de hGIL-19/AE289 incluindo cerca de 50-60 aminoácidos de SEQ ID NO:2. Numa outra realização, uma proteína GIL-19 possui um motivo de ligação ao receptor de hGIL-19/AE289 incluindo aproximadamente os aminoácidos 63-81 de SEQ ID NO:2. Ainda numa outra realização, uma proteína GIL-19 possui um motivo de ligação ao receptor de hGIL-19/AE289 incluindo aproximadamente os aminoácidos 168-177 de SEQ ID NO:2. Numa

realização preferida, uma proteína GIL-19 possui um motivo de ligação ao receptor de hGIL-19/AE289 incluindo pelo menos um dos aminoácidos 50-60, aminoácidos 63-81 e/ou aproximadamente os aminoácidos 168-177 de SEQ ID NO:2.

Ainda numa outra realização, um motivo de ligação ao receptor de hGIL-19/AE289 tem uma sequência de aminoácidos pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos seleccionada do grupo consistindo nos aminoácidos 50-60 de SEQ ID NO:2, aminoácidos 63-81 de SEQ ID NO:2 e aminoácidos 168-177 de SEQ ID NO:2.

Numa outra realização, proteínas, fragmentos proteicos e proteínas recombinantes do presente invento incluem os que podem ser identificados com base na presença de pelo menos um, dois, três, quatro ou mais locais de glicosilação ligada em N.

Em particular, a identidade de sequência pode ser determinada usando o programa WU-BLAST (Washington University BLAST) versão 2.0, desenvolvido com base em WU-BLAST versão 1.4 que, por sua vez, se baseia no domínio público NCBI-BLAST versão 1.4 (Altschul and Gish, 1996, "Local alignment statistics", Doolittle ed., Methods in Enzymology 266: 460-480; Altschul et al., 1990, "Basic local alignment search tool", Journal of Molecular Biology 215:403-410; Gish and States, 1993, "Identification of protein coding regions by database similarity search", Nature Genetics

3:266-271; Karlin and Altschul, 1993, "Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877). Os programas executáveis por WU-BLAST versão 2.0 para várias plataformas UNIX podem ser descarregados a partir de <ftp://blast.wust.edu/bast/executables>. A série completa de programas de pesquisa (BLASTP, BLASTN, BLASTX, TBLASTN e TBLASTX) está disponível naquele endereço, para além de vários programas de apoio. WU-BLAST 2.0 tem direitos de autor e não pode ser vendido ou redistribuído de qualquer forma ou modo sem o consentimento expresso, por escrito, do autor; mas os executáveis publicados podem ser livremente usados para fins comerciais, não lucrativos ou académicos. Em todos os programas de pesquisa na série - BLASTP, BLASTN, BLASTX, TBLASTN e TBLASTX - de rotina o alinhamento com intervalos faz parte da própria pesquisa da base de dados e assim dão melhor sensibilidade e selectividade, produzindo simultaneamente resultados mais facilmente interpretáveis. Caso de pretenda, a introdução de intervalos pode, facultativamente, não ser usada em todos estes programas. A penalização por defeito (Q) para um intervalo de comprimento um é $Q=9$ para proteínas e BLASTP e $Q=10$ para BLASTN, mas pode ser alterado para qualquer valor inteiro incluindo zero, um a oito, nove, dez, onze, doze a vinte, vinte e um a cinquenta, cinquenta e um a cem, etc. A penalização por resíduo, por defeito, para a extensão de um intervalo (R) é $R=2$ para proteínas e BLASTP, e $R=10$ para BLASTN, mas pode ser alterada para qualquer valor inteiro incluindo zero, um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete,

oito, nove, dez, onze, doze a vinte, vinte e um a cinquenta, cinquenta e um a cem, etc. Qualquer combinação de valores para Q e R pode ser usada de forma a alinhar sequências que tornem máximas a sobreposição e identidade, minimizando simultaneamente os intervalos da sequência. A matriz de comparação de aminoácidos por defeito é BLOSUM62, mas podem ser usadas outras matrizes de comparação, tais como PAM.

Homólogos de espécies dos polinucleótidos e proteínas referidos são aqui igualmente descritos. Como aqui usado, um "homólogo de espécie" é uma proteína ou polinucleótido tendo uma espécie diferente de origem relativamente à de uma determinada proteína ou polinucleótido, mas com semelhança de sequências significativa com a referida proteína ou polinucleótido. De preferência, os homólogos de espécies polinucleotídicos possuem pelo menos 60% de identidade de sequências (mais de preferência, pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%) com o referido polinucleótido e os homólogos de espécies proteicos possuem pelo menos 30% de identidade de sequência (mais de preferência, pelo menos 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%) com a referida proteína, em que a identidade de sequências é determinada por comparação das sequências nucleotídicas dos polinucleótidos ou das sequências de aminoácidos das proteínas quando alinhadas de forma a tornar máxima a sobreposição e identidade, minimizando ao mesmo tempo os intervalos das sequências. Os homólogos de espécies podem ser isolados e identificados através da preparação de sondas ou sequências iniciadoras adequadas

aqui disponibilizadas e testada uma fonte de ácido nucleico adequada da espécie pretendida. De preferência, os homólogos de espécie são os isolados a partir de espécies de mamíferos. Mais de preferência, os homólogos de espécie são isolados a partir de determinadas espécies de mamífero tais como, por exemplo, *Pan troglodytes*, *Gorilla gorilla*, *Pongo pygmaeus*, *Hylobates concolor*, *Macaca mulata*, *Papio papio*, *Papio hamadryas*, *Cercopithecus aethiops*, *Cebus capucinus*, *Aotus trivirgatus*, *Sanguinus oedipus*, *Microcebus murinus*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Cricetulus griseus*, *Felis catus*, *Mustela vison*, *Canis familiaris*, *Oryctolagus cuniculus*, *Bos taurus*, *Ovis aries*, *Sus scrofa* e *Equus caballus*, para as quais foram criados mapas genéticos que permitem a identificação de relações de sintenia entre a organização genómica dos genes numa espécie e a organização genómica de genes relacionados noutras espécies (O'Brien e Seuánez, 1988, Ann. Rev. Genet. 22: 323-351; O'Brien et al., 1993, Nature Genetics 3:103-112; Johansson et al., 1995, Genomics 25: 682-690; Lyons et al., 1997, Nature Genetics 15 : 47-56; O'Brien et al., 1997, Trends in Genetics 13(10) :393-399 ; Carver and Stubbs, 1997, Genome Research 7 : 1123-1137).

São igualmente aqui descritas variantes alélicas dos polinucleótidos ou proteínas descritos; ou seja, formas alternativas naturais dos polinucleótidos isolados que também codificam proteínas que são idênticas, ou possuem sequências significativamente semelhantes, às codificadas pelos polinucleótidos descritos. De preferência, as

variantes alélicas possuem pelo menos 60% de identidade de sequências (mais de preferência, pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%) com o referido polinucleótido, em que a identidade de sequências é determinada por comparação das sequências nucleotídicas dos polinucleótidos, quando alinhadas de forma a tornar máxima a sobreposição e identidade, minimizando ao mesmo tempo os intervalos da sequência. Podem ser isoladas e identificadas variantes alélicas, através da produção de sondas ou sequências iniciadoras adequadas, a partir das sequências aqui disponibilizadas e rastreamento de uma fonte adequada de ácido nucleico a partir de indivíduos das espécies adequadas.

O invento também inclui polinucleótidos com sequências complementares dos polinucleótidos aqui descritos.

O presente invento também inclui polinucleótidos que hibridam em condições altamente restritivas com os polinucleótidos aqui descritos. São também aqui descritos polinucleótidos que hibridam em condições de restrição reduzida com os polinucleótidos aqui descritos. Exemplos de condições de restrição estão apresentados na tabela abaixo: condições altamente restritivas são, por exemplo, as condições A-F; condições restritivas são pelo menos tão restritivas como, por exemplo, as condições G-L; e condições de restrição reduzida são pelo menos tão restritivas quanto, por exemplo, as condições M-R.

Condições de restringência	Híbrido de polinucleótidos	Comprimento do híbrido (pb)†	Temperatura e Tampão de hibridação†	Temperatura e Tampão de lavagem
A	DNA:DNA	≥	65°C; 1xSSC ou 42°C; 1xSSC, 50% formamida	65°; 0,3xSSC
B	DNA:DNA	<50	T _B *; 1xSSC	T _B *; 1xSSC
C	DNA:RNA	≥50	67°C; 1xSSC ou 45°C; 1xSSC, 50% formamida	67°; 0,3xSSC
D	DNA:RNA	<50	T _D *; 1xSSC	T _D *; 1xSSC
E	RNA:RNA	≥50	70°C; 1xSSC ou 50°C; 1xSSC, 50% formamida	70°; 0,3xSSC
F	RNA:RNA	<50	T _F *; 1xSSC	T _F *; 1xSSC
G	DNA:DNA	≥50	65°C; 4xSSC ou 42°C; 4xSSC, 50% formamida	65°; 1xSSC
H	DNA:DNA	<50	T _H *; 4xSSC	T _H *; 4xSSC
I	DNA:RNA	≥50	67°C; 4xSSC ou 45°C; 4xSSC, 50% formamida	67°; 1xSSC
J	DNA:RNA	<50	T _J *; 4xSSC	T _J *; 4xSSC
K	RNA:RNA	≥50	70°C; 4xSSC ou 50°C; 4xSSC, 50% formamida	67°; 1xSSC
L	RNA:RNA	<50	T _L *; 2xSSC	T _L *; 2xSSC
M	DNA:RNA	≥50	50°C; 4xSSC ou 40°C; 6xSSC, 50% formamida	50°; 2xSSC
N	DNA:DNA	<50	T _N *; 6xSSC	T _N *; 6xSSC
O	DNA:RNA	≥50	55°C; 4xSSC ou 42°C; 6xSSC, 50% formamida	55°; 2xSSC
P	DNA:RNA	<50	T _P *; 6xSSC	T _P *; 6xSSC

(continuação)

Condições de restringência	Híbrido de polinucleótidos	Comprimento do híbrido (pb)†	Temperatura e Tampão de hibridação†	Temperatura e Tampão de lavagem
Q	DNA:RNA	≥50	60°C; 4xSSC ou 45°C; 6xSSC, 50% formamida	60°; 2Xssc
R	RNA:RNA	<50	T _R *; 4xSSC	T _R *; 4xSSC

†: O comprimento do híbrido é o esperado para as regiões hibridadas dos polinucleótidos da hibridação. Quando da hibridação de um polinucleótido com um polinucleótido alvo de sequência desconhecida, o comprimento do híbrido é assumido como sendo o do polinucleótido de hibridação. Quando os polinucleótidos de sequência conhecida são hibridados, o comprimento do híbrido pode ser determinado alinhando as sequências dos polinucleótidos e identificando a região ou regiões de complementaridade ótima entre sequências.

†: SSPE (1xSSPE é NaCl 0,15M, NaH₂PO₄ 10 mM e EDTA 1,25, pH 7,4) pode ser substituído por SSC (1xSSC é NaCl 0,15M e citrato de sódio 15 mM) na hibridação e tampões de lavagem; as lavagens são realizadas durante 15 minutos após a hibridação estar completa.

*T_B-T_R: A temperatura de hibridação para os híbridos com menos de 50 pares de bases de comprimento deverá ser 5-10°C menos que a temperatura de fusão (T_m) do híbrido, onde T_m é determinada de acordo com as equações que se seguem. Para os híbridos com menos de 18 pares de bases de comprimento, T_m(°C) = 2(# de A + T bases) + 4(# de G+C bases). Para os híbridos entre 18 e 49 pares de bases de comprimento, T_m(°C) = 81,5 + 16,6 (log₁₀[Na⁺]) + 0,41(%G+C) - (600/N), em que N é o número de bases no híbrido e [Na⁺] é a concentração de íons de sódio no tampão de hibridação ([Na⁺] para 1xSSC = 0,165M).

Outros exemplos de condições de restringência para a hibridação de polinucleótidos estão disponíveis em Sambrook, J., E.F. Fritsch e T. Maniatis, 1989, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, capítulos 9 e 11

e "Current Protocols in Molecular Biology", 1995, F.M. Ausubel *et al.*, eds., John Wiley & Sons, Inc., secções 2.10 e 6.3-6.4.

De preferência, cada um dos polinucleótidos de hibridação possui um comprimento que é pelo menos 25% (mais de preferência pelo menos 50% e mais de preferência pelo menos 75%) do comprimento do polinucleótido do presente invento com o qual híbrida, e possui pelo menos 60% de identidade de sequências (mais de preferência, pelo menos 75% de identidade; mais de preferência pelo menos 90% ou 95% de identidade) com o polinucleótido do presente invento com o qual híbrida, em que a identidade de sequências é determinada por comparação das sequências dos polinucleótidos da hibridação, quando alinhados de forma a tornar máxima a sobreposição e a identidade, minimizando ao mesmo tempo os intervalos da sequência.

O polinucleótido isolado do invento pode ser operacionalmente ligado a uma sequência de controlo da expressão, como sejam os vectores de expressão pMT2 ou pED descritos em Kaufman *et al.*, Nucleic Acids Res. 19, 4485-4490 (1991), de forma a produzir a proteína por via recombinante. Muitas sequências de controlo da expressão adequadas são conhecidas na área. Métodos gerais de expressão de proteínas recombinantes são igualmente conhecidos e estão exemplificados em R. Kaufman, Methods in Enzymology 185, 537-566 (1990). Como aqui definido "operacionalmente ligado" significa que o polinucleótido isolado do invento e

uma sequência de controlo da expressão estão situados dentro de um vector ou célula de forma que a proteína seja expressa pela célula hospedeira transformada (transfectada) com o polinucleótido/sequência de controlo da expressão.

Uma série de tipos de células pode ser usada como células hospedeiras adequadas para a expressão da proteína. Células hospedeiras de mamífero incluem, por exemplo, células COS de macaco, células de Ovário de Hamster Chinês (CHO), células de rim humano 293, células epidérmicas humanas A431, células humanas Colo205, células 3T3, células CV-1, outras linhas de células transformadas de primatas, células diplóides normais, estirpes celulares derivadas da cultura *in vitro* de tecido primário, explantes primários, células HeLa, células L de ratinho, células BHK, HL-60, U937, HaK ou Jurkat.

Como alternativa, pode ser possível produzir a proteína em eucariotas inferiores, tais como levedura, ou em procariotas, tais como bactérias. Estirpes de levedura potencialmente adequadas incluem *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, estirpes de *Kluyveromyces*, *Candida* ou qualquer estirpe de levedura capaz de expressar proteínas heterólogas. Estirpes bacterianas potencialmente adequadas incluem *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* ou qualquer estirpe bacteriana capaz de expressar proteínas heterólogas. Se a proteína for produzida em leveduras ou em bactérias, pode ser necessário modificar a proteína produzida, por exemplo através de

fosforilação ou glicosilação de locais adequados, de forma a obter a proteína funcional. Tais ligações covalentes podem ser conseguidas usando métodos químicos ou enzimáticos conhecidos.

A proteína pode também ser produzida através da ligação operacional do polinucleótido isolado do invento a sequências de controlo adequadas num ou mais vectores de expressão de insectos e empregando um sistema de expressão de insectos. Os materiais e métodos para os sistemas de expressão baculovírus/células de insecto são comercializados na forma de kit, *e.g.*, pela Invitrogen, San Diego, Califórnia, U.S.A. (o kit MaxBac®), e tais métodos são conhecidos na área, como descrito em Summers e Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin N° 1555 (1987). Como aqui é usado, uma célula de insecto capaz de expressar um polinucleótido do presente invento está "transformada".

A proteína do invento pode ser preparada através da cultura de células hospedeiras transformadas em condições de cultura adequadas para expressar a proteína recombinante. A proteína expressa resultante pode ser então purificada a partir de tal cultura (*i.e.*, a partir do meio de cultura ou extractos celulares), usando processos de purificação conhecidos, tais como filtração em gel e cromatografia de permuta iónica. A purificação da proteína pode também incluir uma coluna de afinidade contendo agentes que se ligarão à proteína; um ou mais passo com colunas passando através de resinas de afinidade, como

sejam concanavalina A-agarose, heparina-toyopearl® ou Cibacrom blue 3GA Sepharose®; um ou mais passos envolvendo cromatografia de interacção hidrofóbica usando resinas tais como éter fenílico, éter butílico ou éter propílico; ou cromatografia de imunoafinidade.

Como alternativa, a proteína do invento pode também ser expressa numa forma que facilitará a purificação. Por exemplo, pode ser expressa como uma proteína de fusão, como seja com a proteína de ligação a maltose (MBP), glutathione-S-transferase (GST) ou tio-redoxina (TRX). Os kits de expressão e purificação de tais proteínas de fusão são comercializados pela New England BioLabs (Beverly, MA), Pharmacia (Piscataway, NJ) e Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA), respectivamente. A proteína pode também ser marcada com um epitopo e subsequentemente purificada usando um anticorpo específico dirigido contra tal epitopo. Um desses epitopos ("Flag") é comercializado pela Eastman Kodak Company (New Haven, CT).

Ainda, um ou mais passos de cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa (RP-HPLC) empregando meios hidrofóbicos para RP-HPLC, e.g., gel de sílica tendo grupos metilo pendentos ou outros grupos alifáticos, podem ser empregues para uma maior purificação da proteína. Alguns ou a totalidade dos passos de purificação atrás referidos, em várias combinações, podem também ser empregues para proporcionar uma proteína recombinante isolada substancialmente homogénea. A proteína assim

purificada está substancialmente livre de outras proteínas de mamífero, e é definida de acordo com o presente invento como uma "proteína isolada".

A proteína do invento pode também ser expressa como um produto de animais transgênicos não humanos, *e.g.*, como um componente do leite de vacas, cabras, porcas ou ovelhas transgênicas que são caracterizadas por as células somáticas ou germinativas possuírem uma sequência nucleotídica codificadora da proteína.

A proteína pode também ser produzida através de síntese química convencional. Os métodos para a construção das proteínas do presente invento através de meios de síntese são conhecidos dos familiarizados com a matéria. As sequências proteicas construídas por síntese química, devido a partilharem características estruturais e/ou conformacionais primárias, secundárias ou terciárias com proteínas, podem possuir propriedades biológicas em comum, incluindo a actividade da proteína. Assim, podem ser empregues como substitutos, biologicamente ou imunologicamente activos, das proteínas naturais purificadas quando do rastreio de compostos terapêuticos e em processos imunológicos para o desenvolvimento de anticorpos.

As proteínas aqui proporcionadas também incluem proteínas caracterizadas por terem sequências de aminoácidos semelhantes às das proteínas purificadas, mas nas quais operaram modificações naturais ou então foram

deliberadamente manipuladas. Por exemplo, modificações nas sequências peptídicas ou de DNA podem ser feitas pelos familiarizados com a matéria usando técnicas conhecidas. As modificações com interesse nas sequências proteicas podem incluir a alteração, substituição, inserção ou deleção de um resíduo de aminoácido seleccionado na sequência codificadora. Por exemplo, um ou mais resíduos de cisteína podem ser eliminados ou substituídos por outros aminoácidos para alterar a conformação da molécula. Técnicas tais como alteração, substituição, inserção ou deleção são conhecidas dos familiarizados com a matéria (ver, e.g., Patente U.S. Nº 4518584). De preferência, tal alteração, substituição, inserção ou deleção mantém a actividade pretendida da proteína.

Outros fragmentos e derivados das sequências de proteínas mantendo a actividade proteica, na totalidade ou em parte, e podendo ser assim úteis para ensaios de rastreio ou outras metodologias imunológicas, podem também ser facilmente produzidos pelos familiarizados com a matéria face às descrições aqui feitas. Pretende-se que tais modificações estejam incluídas no presente invento.

UTILIZAÇÕES E ACTIVIDADE BIOLÓGICA

Os polinucleótidos e proteínas do presente invento podem apresentar uma ou mais utilizações ou actividades biológicas (incluindo as associadas aos ensaios aqui referidos) identificados abaixo. As utilizações ou

actividades descritas para as proteínas do presente invento podem ser proporcionadas através da administração ou uso de tais proteínas ou através da administração ou uso de polinucleótidos codificadores de tais proteínas (como seja, por exemplo, em terapias génicas ou vectores adequados para a introdução de DNA).

Utilizações de hGIL-19

Devido à sua homologia com IL-10, GIL-19/AE289 humana pode ser considerada um membro da família geral de citocinas e, como tal, pode apresentar actividades semelhantes a IL-10. As citocinas desempenham papéis importantes na saúde e doença e apresentam múltiplas indicações clínicas. Assim, esta molécula (e outras moléculas do presente invento) será útil como agonista em determinadas indicações clínicas e os antagonistas desta molécula serão úteis noutras situações clínicas, particularmente naquelas em que IL-10 actua como um agonista ou antagonistas de IL-10 actuem como um antagonista. A preferência do agonista ou do antagonista dependerá dos aspectos particulares da patologia da doença, assim como dos tipos de células envolvidos, da natureza do estímulo e do micro-ambiente celular.

Numa realização preferida, uma actividade hGIL-19 é pelo menos uma ou mais das seguintes actividades: (1) modulação, por exemplo antagonizando uma via de transdução de sinal (e.g. uma via dependente de GIL-19); (2) modulação

da produção e/ou secreção de citocinas (e.g. produção e/ou secreção de uma citocina pró-inflamatória); (3) modulação da produção e/ou secreção de linfocinas; (4) modulação da produção de moléculas de adesão e/ou adesão celular; (5) modulação da expressão ou actividade de factores de transcrição nuclear; (7) modulação da secreção de IL-1; (8) competição com receptores de outras citocinas; (9) competição com uma proteína membro da família de hGIL-19 para se ligar a um receptor de hGIL-19; (10) modulação da translocação nuclear do receptor de hGIL-10 internalizado ou de uma outra citocina ou receptor complexado com ligando, (11) modulação da proliferação, desenvolvimento ou diferenciação celular, por exemplo proliferação, desenvolvimento ou diferenciação estimulada por citocinas ou estimulada pela proteína hGIL-19 (e.g., de uma célula epitelial, por exemplo, uma célula epitelial escamosa do esófago ou de uma célula da pele, e.g., um queratinócito); (12) modulação da proliferação, desenvolvimento ou diferenciação celular de uma célula osteogénica (e.g. de uma célula precursora de osteoclastos, osteoclastos e/ou osteoblastos); (13) modulação da formação de osso, metabolismo ósseo e/ou homeostasia óssea (e.g., inibição da reabsorção óssea); (15) modulação de respostas imunes celulares; (16) modulação de acções pró-inflamatórias mediadas por citocinas (e.g., inibição da síntese de proteínas da fase aguda pelos hepatócitos, febre e/ou síntese de prostaglandinas, por exemplo síntese de PGE_2); e (17) promoção e/ou potenciação da cicatrização de feridas.

Considerando o seu aparente papel imunomodulador, as proteínas GIL-19/AE289 humanas podem actuar nos seguintes tipos celulares: células T, células B, células dendríticas, macrófagos/monócitos, neutrófilos, mastócitos, basófilos, eosinófilos, células apresentadoras de antigénio do sistema nervoso e células apresentadoras de antigénio do rim. Com base na sua homologia com IL-10, as proteínas GIL-19/AE289 humanas (ou agonistas ou antagonistas das mesmas) podem ter as seguintes actividades e usos:

(a) Regulação positiva das respostas imunes humerais e atenuação das reacções imunes mediadas por células;

(b) Função como um agente anti-inflamatório através da inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas;

(c) Modulação das respostas inflamatórias associadas a lesões, sepsia, doença gastrointestinal e cardiovascular, e inflamação após cirurgia:

(d) Tratamento de leucemia mielogénica aguda, linfoma non-Hodgkin, transplante de medula óssea para tratar o recipiente antes do transplante, transplante de medula óssea para tratar as células estaminais do dador antes do transplante e para melhorar a doença do enxerto versus hospedeiro após transplante de medula óssea;

(e) Tratamento de doenças auto-imunes mediadas

por células, tais como esclerose múltipla, diabetes, artrite reumatóide, miastenia grave, lúpus sistêmico eritematoso, nefrotoxicidade associada a glomerulonefrite, colite, doença de Crohn, pancreatite e asma.

Os agonistas de GIL-19/AE289 humana incluem, sem limitações, proteínas e fragmentos de GIL-19/AE289, seus mutantes de deleção e de adição; e péptidos e compostos de pequenas moléculas que interagem com o receptor ou outro alvo a que seja dirigida GIL-19/AE289 humana. Os antagonistas de GIL-19/AE289 incluem, sem limites, anticorpos dirigidos contra proteínas IL-19/AE289 humanas; formas solúveis do receptor ou outro alvo a que seja dirigido GIL-19/AE289; anticorpos dirigidos contra o receptor ou outro alvo contra o qual é dirigida GIL-19/AE289; e péptidos e compostos de pequenas moléculas que inibam ou interfiram com a interação de GIL-19/AE289 humana com o seu receptor ou outro alvo.

Usos e Ferramentas de Pesquisa

Os polinucleótidos proporcionados pelo presente invento podem ser usados pela comunidade científica para vários fins. Os polinucleótidos podem ser usados para expressar proteína recombinante para análise, caracterização ou utilização terapêutica; como marcadores de tecidos em que a correspondente proteína seja preferencialmente expressa (constitutivamente ou numa fase particular da diferenciação ou desenvolvimento de tecidos

ou em estados de doença); como marcadores de massa molecular em géis de Southern; como marcadores de cromossomas ou etiquetas (quando marcados) para identificar cromossomas ou para mapear posições de genes relacionados; para comparar com sequências de DNA endógenas de doentes para identificar potenciais alterações genéticas; como sondas para hibridar e assim descobrir novas sequências de DNA relacionadas; como fonte de informação para derivar sequências iniciadoras para PCR para impressões digitais genéticas; como sonda para "isolar por subtracção" sequências conhecidas no processo de descoberta de outros polinucleótidos novos; para selecção e preparação de oligómeros para a ligação a um "chip de genes" ou outro suporte, incluindo para a análise de padrões de expressão; para induzir anticorpos anti-proteína usando técnicas de imunização de DNA; e como antigénio para induzir anticorpos anti-DNA ou induzir uma outra resposta imune. Quando o polinucleótido codificar uma proteína que se liga, ou potencialmente se pode ligar, a uma outra proteína (como seja, por exemplo, numa interacção receptor-ligando), o polinucleótido pode também ser usado em ensaios de captura por interacção (como seja, por exemplo, os descritos em Gyuris *et al.*, 1993, *Cell* 75:791-803 e em Rossi *et al.*, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:8405-8410) para identificar polinucleótidos codificadores da outra proteína com a qual ocorre ligação ou para identificar inibidores da interacção de ligação.

As proteínas proporcionadas pelo presente invento

podem ser igualmente usadas em ensaios para determinar actividade biológica, incluindo num painel de múltiplas proteínas para rastreio de elevado número de amostras; para induzir anticorpos ou para induzir uma outra resposta imune; como um reagente (incluindo o reagente marcado) em ensaios projectados para determinar quantitativamente os níveis da proteína (ou seu receptor) em fluidos biológicos; como marcadores de tecidos em que a proteína correspondente é, de preferência, expressa (constitutivamente ou numa fase particular da diferenciação ou desenvolvimento de tecidos ou num estado de doença); e, certamente, para isolar os receptores ou ligandos correspondentes. Sempre que a proteína se ligue ou potencialmente se ligue a uma outra proteína (como seja, por exemplo, numa interacção receptor-ligando), a proteína pode ser usada para identificar a outra proteína com a qual ocorre ligação ou para identificar inibidores da interacção de ligação. As proteínas envolvidas nestas interacções de ligação podem também ser usadas para o rastreio de péptidos ou pequenas moléculas inibidoras ou agonistas da interacção de ligação.

Qualquer uma ou a totalidade destas ferramentas de pesquisa pode ser desenvolvida para se atingir o grau de pureza de reagente, ou o formato de kit, para a comercialização como produtos de investigação.

Os métodos para a realização das utilizações referidas são bem conhecidos dos familiarizados com a matéria. As referências que descrevem tais métodos incluem,

sem limites, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis eds., 1989 e "Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques", Academic Press Berger, S.L. e A.R. Kimmel eds., 1987.

Usos Nutricionais

Os polinucleótidos e proteínas do presente invento podem também ser usados como fontes ou suplementos nutritivos. Tais usos incluem, sem limites, a utilização como um suplemento de proteínas ou de aminoácidos, como fonte de carbono, como fonte de azoto e como fonte de açúcar. Em tais casos, a proteína ou polinucleótido do invento pode ser adicionado aos alimentos de um organismo particular, ou pode ser administrado como preparação sólida ou líquida separada, como seja sob a forma de pó, comprimidos, suspensões ou cápsulas. No caso dos microrganismos, a proteína ou polinucleótido do invento pode ser adicionado ao meio em que o microrganismo é cultivado.

Actividade de Citocina e Actividade de Proliferação/Diferenciação Celular

Uma proteína do presente invento pode apresentar actividade de citocina, actividade de proliferação celular (indutora ou inibidora) ou de diferenciação celular (indutora ou inibidora) ou pode induzir a produção de citocinas em determinadas populações celulares. Muitos factores

proteicos até agora descobertos, incluindo todas as citocinas conhecidas, têm apresentado actividade num ou mais ensaios de proliferação celular dependente de factores e, portanto, os ensaios servem como uma confirmação conveniente da actividade de citocina. A actividade de uma proteína do presente invento é evidenciada por qualquer um de uma série de ensaios de proliferação celular dependente de factores convencionais para linhas celulares incluindo, mas não estando limitado a 32D, DA2, DA1G, T10, B9, B9/11, BaF3, MC9/G, M+ (preB M+), 2E8, RB5, DA1, T1165, HT2, CTLL2, TF-1, Mo7e e CMK. A actividade de uma proteína do invento pode ser medida, entre outros, pelos seguintes métodos:

Os ensaios para a proliferação de células T ou timócitos incluem, sem limites, os descritos em: "Current Protocols in Immunology", Ed. por J. E. Coligan, A.M. Kruisbecek, D.H. Margulies, E. M. Shevach, W Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Capítulo 3, "*In vitro* assays for Mouse Lymphocyte Function" 3.1-3.19; Capítulo 7, "Immunologic studies in humans"); Takai *et al.*, J. Immunol. 137:3494-3500; Bertagnolli *et al.*, J. Immunol. 145:1706-1712, 1990; Bertagnolli *et al.*, Cellular Immunology 133 : 327-341, 1991 ; Bertagnolli, *et al.*, J. Immunol. 149 :3778-3783, 1992 ; Bowman *et al.*, J. Immunol. 152 :1756-1761, 1994.

Os ensaios para a produção de citocinas e/ou proliferação de células do baço, células dos nódulos

linfáticos ou timócitos incluem, sem limites, os descritos em: "Polyclonal T cell stimulation", Kruisbeek, A.M. e Shevach, E.M. em "Current Protocols in Immunology". J.E. Coligan eds. Vol. 1 pp.312.1-3.12.14, John Wiley and Sons, Toronto, 1994; e "Measurement of mouse and human Interferon γ ", Schreiber, R.D. em "Current Protocols in Immunology". J.E. Coligan eds. Vol. 1 pp. 6.8.1-6.8.8, John Wiley and Sons, Toronto. 1994.

Os ensaios para a proliferação e diferenciação de células hematopoiéticas e linfopoiéticas incluem, sem limites, os descritos em: "Measurement of Human and Murine Interleukin 2 and Interleukin 4", Bottomly, K., Davis, L.S. and Lipsky, P.E. em "Current Protocols in Immunology". J.E. Coligan eds. Vol 1 pp. 6.3.1-6.3.12, John Wiley and Sons, Toronto, 1991; deVries *et al.*, J. Exp. Med. 173:1205-1211, 1991; Moreau *et al.*, Nature 336:690-692, 1988; Greenberger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:2931-2983; "Measurement of Human and Murine Interleukin 6" - Nordan, R. em "Current Protocols in Immunology". J.E. Coligan eds. Vol. I pp. 6.6.1-6.6.5, John Wiley and Sons, Toronto. 1991; Smith *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:1857-1861, 1986; Medição de Interleucina 11 humana - Bennett, F. Giannotti, J., Clark, S.C. e Turner, K.J. Em Current Protocols in Immunology. J.E.e.a. Coligan eds. Vol. 1 pp. 6.15.1 John Wiley and Sons, Toronto. 1991; "Measurement of Human and Murine Interleukin 9" - Ciarletta, A., Giannotti, J., Clark, S.C. e Turner, K.J. em "Current Protocols in Immunology". J.E.e.a. Coligan eds. Vol 1 pp. 6.13.1, John Wiley and Sons, Toronto. 1991.

Os ensaios para respostas de clones de células T aos antígenos (que identificarão, entre outras, proteínas que afectam as interacções APC-células T, assim como os efeitos directos sobre as células T através da medição da proliferação e produção de citocinas) incluem, sem limites, os descritos em: "Current Protocols in Immunology", Ed por J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach, W Strober, Pub Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Capítulo 3, "In vitro assays for mouse lymphocyte function"; Capítulo 6, "Cytokines and their cellular receptors"; Capítulo 7, "Immunologic studies in Humans"); Weinberger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:6091-6095, 1980; Weinberger *et al.*, Eur. J. Immunol. 11:405-411, 1981; Takai *et al.*, J. Immunol. 137:3494-3500, 1986; Takai *et al.*, J. Immunol. 140:508-512, 1988.

Actividade de Estimulação ou Supressão Imune

Uma proteína do presente invento pode também apresentar actividade de estimulação imune ou de supressão imune, incluindo, sem limites, as actividades para as quais são aqui descritos ensaios. Uma proteína pode ser útil no tratamento de várias deficiências e alterações imunes (incluindo imunodeficiência combinada grave (SCID)), e.g., na regulação (positiva ou negativa) do crescimento e proliferação de linfócitos T e/ou B, assim como para afectar a actividade citolítica de células NK e outras populações celulares. Estas deficiências imunes podem ser

genéticas ou ser causadas por infecções virais (e.g., HIV) assim como bacterianas ou fúngicas, ou podem resultar de alterações auto-imunes. Mais especificamente, as doenças infecciosas causadas por infecção viral, bacteriana, fúngica ou outras podem ser tratadas usando uma proteína do presente invento, incluindo infecções por HIV, vírus das hepatites, herpesvírus, micobactérias, *Leishmania* spp., malária spp. e várias infecções fúngicas, tais como candidíase. Certamente, neste aspecto, uma proteína do presente invento pode também ser útil sempre que seja desejável um reforço do sistema imune em geral, i.e., no tratamento de cancro.

Alterações auto-imunes que podem ser tratadas usando uma proteína do presente invento incluem, por exemplo, doença de tecido conjuntivo, esclerose múltipla, lúpus sistémico eritematoso, artrite reumatóide, inflamação pulmonar auto-imune, síndrome de Guillaint-Barré, tiroidose auto-imune, diabetes melitus dependente de insulina, miastenia grave, doença de enxerto versus hospedeiro e doença inflamatória auto-imune do olho. Tal proteína do presente invento pode também ser útil no tratamento de reacções e condições alérgicas, tais como asma (particularmente asma alérgica) ou outros problemas respiratórios. Outras condições, em que se pretende supressão imune (incluindo, por exemplo, transplante de órgãos) podem também ser tratáveis usando uma proteína do presente invento.

Usando as proteínas do invento, pode também ser possível regular as respostas imunes numa série de formas. A regulação negativa pode ser na forma de inibição ou bloqueio de uma resposta imune já em marcha, ou pode envolver a prevenção da indução de uma resposta imune. As funções das células T activadas podem ser inibidas através da supressão das respostas de células T ou através da indução de tolerância específica em células T, ou ambas. A imuno-supressão das respostas de células T é, de um modo geral, um processo activo, não específico de antígeno, o qual requer a exposição contínua das células T ao agente supressor. A tolerância, que envolve a indução de não resposta ou anergia de células T, é distinta da imuno-supressão por ser, de um modo geral, específica de antígeno e persiste após ter cessado a exposição ao agente que confere tolerância. Operacionalmente, a tolerância pode ser demonstrada pela ausência de uma resposta de células T quando da re-exposição ao antígeno específico na ausência do agente que confere tolerância.

A regulação negativa ou prevenção de uma ou mais funções de antígeno (incluindo sem limites as funções de antígeno dos linfócitos B (tais como, por exemplo, B7)), e.g., prevenção da síntese de níveis elevados de linfocinas pelas células T activadas, será útil em situações de transplante de tecido, pele e órgãos e na doença de enxerto versus hospedeiro (GVHD). Por exemplo, o bloqueio da função das células T deverá resultar em destruição reduzida no transplante de tecidos. Tipicamente, em transplantes de

tecidos, a rejeição do transplante é iniciada através do seu reconhecimento como estranho pelas células T, seguido de uma reacção imune que destrói o transplante. A administração de uma molécula que iniba ou bloqueie a interacção do antigénio B7 dos linfócitos com um ou mais dos seus ligandos naturais em células imunes (como seja uma forma monomérica solúvel de um péptido tendo actividade B7-2 por si só ou conjuntamente com uma forma monomérica de um péptido tendo actividade de um outro antigénio dos linfócitos B (e.g., B7-1, B7-3) ou anticorpo de bloqueio) antes do transplante pode conduzir à ligação da molécula a um ou mais ligandos naturais nas células imunes sem transmitir o sinal co-estimulador correspondente. Desta forma, o bloqueio da função dos antigénios dos linfócitos B inibe a síntese de citocinas pelas células imunes, tais como células T, e assim actua como imuno-supressor. Ainda, a falta de co-estimulação pode também ser suficiente para induzir anergia das células T, induzindo assim tolerância num indivíduo. A indução de tolerância a longo prazo pelos reagentes de bloqueio de antigénios dos linfócitos B pode evitar a necessidade da administração repetida destes reagentes de bloqueio. Para se conseguir suficiente imuno-supressão ou tolerância num indivíduo, pode também ser necessário bloquear a função de uma combinação de antigénios dos linfócitos B.

A eficácia de reagentes de bloqueio particulares na prevenção da rejeição no transplante de órgãos ou GVHD pode ser avaliada usando modelos animais que sejam

predictivos da eficácia em humanos. Os exemplos de sistemas adequados que podem ser usados incluem enxertos cardíacos alogeneicos em ratos e enxertos xenogeneicos de células dos ilhéus pancreáticos em murganhos, ambos tendo sido usados para avaliar os efeitos imuno-supressores das proteínas de fusão CTLA4Ig *in vivo* como descrito em Lenschow *et al.*, Science 257:789-792 (1992) e Turka *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:11102-11105 (1992). Ainda, modelos murinos de GVHD (ver Paul ed., "Fundamental Immunology", Raven Press, New York, 1989, pp 846-847) podem ser usados para determinar o efeito do bloqueio da função de antígenos dos linfócitos B *in vivo* no desenvolvimento daquela doença.

O bloqueio da função de antígeno pode também ser terapeuticamente útil para o tratamento de doenças auto-imunes. Muitas alterações auto-imunes são o resultado da activação inadequada de células T que sejam reactivas contra o próprio tecido e que promove a produção de citocinas e de auto-anticorpos envolvidos na patologia das doenças. A prevenção da activação das células T auto-reactivas pode reduzir ou eliminar os sintomas da doença. A administração de reagentes que bloqueiam a co-estimulação de células T através da destruição das interações receptor:ligando de antígenos dos linfócitos B pode ser usada para inibir a activação de células T e prevenir a produção de auto-anticorpos ou citocinas derivadas de células T que possam estar envolvidas no processo de doença. Ainda, os reagentes de bloqueio podem induzir

tolerância específica de antígeno nas células T auto-reactivas, o que poderá conduzir ao alívio da doença a longo prazo. A eficácia dos reagentes de bloqueio na prevenção ou alívio de alterações auto-imunes pode ser determinada usando uma série de modelos animais, bem caracterizados, de doenças auto-imunes humanas. Exemplos incluem encefalite auto-imune murina experimental, lúpus eritematoso sistêmico em murganhos MRL/*Ipr/Ipr* ou murganhos híbridos NZB, artrite auto-imune murina por colagénio, diabetes melitus em murganhos NOD e ratos BB, e miastenia grave experimental murina (ver Paul ed., "Fundamental Immunology", Raven Press, New York, 1989, pp. 840-856).

A regulação positiva de uma função de antígeno (de preferência uma função de antígeno de linfócitos B), como um meio de regular positivamente as respostas imunes, pode também úteis em terapia. A regulação positiva das respostas imunes pode ser na forma de estimulação de uma resposta imune existente ou indução de uma resposta imune inicial. Por exemplo, a estimulação de uma resposta imune através da estimulação da função de antígeno dos linfócitos B pode ser útil nos casos de infecção viral. Ainda, as doenças virais sistêmicas tais como gripe, a constipação comum e a encefalite deverão ser aliviadas pela administração sistêmica de formas estimuladoras dos antígenos de linfócitos B.

Como alternativa, as respostas imunes anti-virais podem ser estimuladas num doente infectado através da

remoção das células T do doente, co-estimulação das células T *in vitro* com APCs expostas durante um curto período de tempo ao antígeno viral *in vitro*, expressando um péptido do presente invento ou conjuntamente com uma forma estimuladora de um péptido solúvel do presente invento, e re-introdução no doente das células T activadas *in vitro*. Um outro método de estimulação de respostas imunes anti-virais será isolar células infectadas a partir de um doente, transfectá-las com uma molécula de ácido nucleico codificador de uma proteína do presente invento como aqui descrito, de forma que as células expressem a totalidade ou uma parte da proteína na sua superfície, e reintrodução das células transfectadas no doente. As células infectadas serão agora capazes de produzir um sinal co-estimulador e assim activar as células T *in vivo*.

Numa outra aplicação, a regulação positiva ou estimulação da função de antígeno (de preferência função de antígeno de linfócitos B) pode ser útil na indução da imunidade contra tumores. Células tumorais (e.g., sarcoma, linfoma, leucemia, neuroblastoma, carcinoma), transfectadas com um ácido nucleico codificador de pelo menos um péptido do presente invento, podem ser administradas a um indivíduo para ultrapassar a tolerância específica de tumor no indivíduo. Caso se pretenda, a célula tumoral pode ser transfectada para expressar uma combinação de péptidos. Por exemplo, as células tumorais obtidas a partir de um doente podem ser transfectadas *ex vivo* com um vector de expressão que dirige a expressão de um péptido tendo actividade do

tipo B7-2 por si só, ou conjuntamente com um péptido tendo actividade do tipo B7-1 e/ou actividade do tipo B7-3. As células tumorais transfectadas são reintroduzidas no doente para dar origem à expressão dos péptidos na superfície da célula transfectada. Como alternativa, as técnicas de terapia génica podem ser usadas para atingir uma célula tumoral através de transfecção *in vivo*.

A presença do péptido do presente invento, tendo a actividade de um ou mais antigénios de linfócitos B, na superfície de células tumorais proporciona o sinal de co-estimulação das células T necessário para induzir uma resposta imune mediada por células T contra as células tumorais transfectadas. Ainda, as células tumorais que não possuam moléculas de MHC classe I ou MHC classe II, ou que não voltem a expressar quantidades suficientemente grandes de moléculas MHC classe I ou MHC classe II, podem ser transfectadas com ácido nucleico codificador da totalidade ou de parte (e.g., uma porção truncada sem domínio citoplasmático) de uma proteína da cadeia α de MHC classe I e de uma proteína microglobulina β_2 ou de uma proteína da cadeia α de MHC classe II e de uma proteína da cadeia β de MHC classe II para assim expressar proteínas de MHC classe I ou MHC classe II na superfície celular. A expressão do MHC classe I ou classe II adequado, com um péptido tendo a actividade de um antigénio de linfócitos B (e.g., B7-2, B7-3), induz uma resposta imune mediada por células T contra a célula tumoral transfectada. Facultativamente, um gene codificador de uma construção complementar da cadeia

codificadora que bloqueia a expressão de uma proteína associada a MHC classe II, como seja a cadeia invariante, pode também ser cotransfectado com um DNA codificador de um péptido tendo actividade de um antigénio de linfócitos B para promover a apresentação de antígenos associados a tumores e induzir imunidade específica de tumor. Assim, a indução de uma resposta imune mediada por células T num ser humano pode ser suficiente para ultrapassar a tolerância específica de tumor no indivíduo.

A actividade de uma proteína do invento pode ser medida, entre outros meios, através dos seguintes métodos:

Ensaaios adequados para citotoxicidade de timócitos ou esplenócitos incluem, sem limites, os descritos em: "Current Protocols in Immunology", Ed por J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach, W. Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Capítulo 3, "*In vitro* assays for Mouse Lymphocyte Function" 3.1-3.19; Capítulo 7, "Immunologic studies in Humans"); Herrman *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2488-2492, 1981; Herrmann *et al.*, J. Immunol. 128:1968-1974, 1982; Handa *et al.*, J. Immunol. 135:1564-1572, 1985; Takai *et al.*, J. Immunol. 137:3494-3500, 1986; Takai *et al.*, J. Immunol. 140 :508-512, 1988 ; Herrmann *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2488-2492, 1981; Herrmann *et al.*, J. Immunol. 128:1968-1974, 1982; Handa *et al.*, J. Immunol. 135:1564-1572, 1985; Takai *et al.*, J. Immunol. 137:3494-3500, 1986; Bowmanet *et al.*, J. Virology 61:1992-1998;

Takai *et al.*, J. Immunol. 140 :508-512, 1988 ; Bertagnolli *et al.*, Cellular Immunology 133 :327-341, 1991 ; Brown *et al.*, J. Immunol. 153 :3079-3092, 1994.

Ensaaios para respostas de imunoglobulinas dependentes de células T e mudança de isotipo (os quais identificarão, entre outros, proteínas que modulam as respostas de anticorpos dependentes de células T e que afectam os perfis Th1/Th2) incluem, sem limitação, os descritos em Maliszewski, J. Immunol. 144:3028-3033, 1990; e "Assays for B cell function: *In vitro* antibody production", Mond, J.J. and Brunswick, M. em "Current Protocols in Immunology". J.E. Coligan eds Vol 1 pp. 3.8.1-3.8.16, John Wiley and Sons, Toronto. 1994.

Ensaaios de reacções mistas para linfócitos (MLR) (os quais identificarão, entre outros, proteínas que geram predominantemente respostas Th1 e CTL) incluem, sem limites, os descritos em: "Current Protocols in Immunology", Ed por J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek D.H. Margulies, E.M. Shevach, W Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Capítulo 3, "*In vitro* assays for Mouse Lymphocyte Function" 3.1-3.19; Capítulo 7, "Immunologic studies in Humans"); Takai *et al.*, J. Immunol. 137:3494-3500, 1986; Takai *et al.*, J. Immunol. 140 :508-512, 1988 ; Herrmann *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2488-2492, 1981; Bertagnolli *et al.*, J. Immunol. 149:3778-3783, 1992.

Ensaaios dependentes de células dendríticas (os quais identificarão, entre outros, proteínas expressas pelas células dendríticas que activam células T naive) incluem, sem limites, os descritos em: Guery *et al.*, J. Immunol. 134:536-544, 1995; Inaba *et al.*, Journal of Experimental Medicine 173:549-559, 1991; Macatonia *et al.*, Journal of Immunology 154:5071-5079, 1995; Porgador *et al.*, Journal of Experimental Medicine 182:255-260, 1995; Nair *et al.*, Journal of Virology 67: 4062-4069, 1993; Huang *et al.*, Science 264:961-965, 1994; Macatonia *et al.*, Journal of Experimental Medicine 169:1255-1264, 1989; Bhardwaj *et al.*, Journal of Clinical Investigation 94:797-807, 1994; e Inaba *et al.*, Journal of Experimental Medicine 172:631-640, 1990.

Ensaaios para sobrevivência/apoptose de linfócitos (os quais identificarão, entre outros, proteínas que evitam apoptose após indução por super-antígenos e proteínas que regulam a homeostasia de linfócitos) incluem, sem limites, os descritos em: Darzynkiewicz *et al.*, Cytometry 13:795-808, 1992; Gorczyca *et al.*, Leukemia 7:659-670, 1993; Gorczyca *et al.*, Cancer Research 53:1945-1951, 1993; Itoh *et al.*, Cell 66:233-243, 1991; Zacharchuk, Journal of Immunology 145:4037-4045, 1990, Zamai *et al.*, Cytometry 14:891-897, 1993; Gorczyca *et al.*, International Journal of Oncology 1:639-648, 1992.

Ensaaios para proteínas que influenciam os passos iniciais da indução e desenvolvimento de células T incluem, sem limites, os descritos em: Antica *et al.*, Blood 84:111-

117, 1994; Fine *et al.*, Cellular Immunology 155:111-122, 1994; Galyet *et al.*, Blood 85:2770-2778, 1995; Toki *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7548-7551, 1991.

Actividade Reguladora da Hematopoiese

Uma proteína do presente invento pode ser útil na regulação da hematopoiese e, conseqüentemente, no tratamento de deficiências de células mielóides ou linfóides. Mesmo a actividade biológica marginal que suporte as células formadoras de colónias ou as linhas celulares dependentes de factores indica envolvimento na regulação de hematopoiese, *e.g.*, no suporte do crescimento e proliferação de células progenitoras eritróides, por si só ou em combinação com outras citocinas, indicando assim utilidade, por exemplo, no tratamento de várias anemias ou para usar conjuntamente com irradiação/quimioterapia para estimular a produção de precursores eritróides e/ou células eritróides; no suporte do crescimento e proliferação de células mielóides tais como granulócitos e monócitos/macrófagos (*i.e.*, actividade CSF tradicional) útil, por exemplo, conjuntamente com quimioterapia, para prevenir ou tratar conseqüente mielo-supressão; no suporte do crescimento e proliferação de megacarióticos e conseqüentemente de plaquetas, permitindo assim a prevenção ou tratamento de várias alterações de plaquetas, tais como trombocitopenia e, de um modo geral, para usar em lugar das transfusões de plaquetas ou como complemento das mesmas; e/ou no suporte do crescimento e proliferação de células estaminais

hematopoiéticas que possam sofrer maturação, dando origem a qualquer uma das células hematopoiéticas atrás referidas e, assim, apresentar utilidade terapêutica em várias alterações de células estaminais (tais como as geralmente tratadas com transplante, incluindo, sem limites, anemia aplástica e hemoglobinúria paroxística nocturna), assim como no repovoamento do compartimento de células estaminais após irradiação/quimioterapia, *in vivo* ou *ex vivo* (*i.e.*, conjuntamente com transplante de medula óssea ou com transplante de células progenitoras periféricas (homólogas ou heterólogas)) com células normais ou geneticamente manipuladas para a terapia génica.

A actividade de uma proteína do invento pode ser medida, entre outros meios, pelos seguintes métodos:

Estão referidos atrás ensaios adequados para a proliferação e a diferenciação de várias linhas hematopoiéticas.

Os ensaios para a diferenciação de células estaminais embrionárias (que identificarão, entre outras, proteínas que influenciam a hematopoiese na diferenciação embrionária) incluem, sem limites, os descritos em: Johansson *et al.* Cellular Biology 15:141-151, 1995; Keller *et al.*, Molecular and Cellular Biology 13:473-486, 1993; McClanahan *et al.*, Blood 81:2903-2915, 1993.

Os ensaios para a sobrevivência e diferenciação

de células estaminais (que identificarão, entre outras, proteínas que regulam a linfo-hematopoiese) incluem, sem limites, os descritos em: "Methylcellulose colony forming assays", Freshney, M.G. em "Culture of Hematopoietic Cells". R.I. Freshney, et al., eds. Vol. Pp. 265-268, Wiley-Liss, Inc., New York, NY 1994; Hirayama et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5907-5911, 1992; "Primitive hematopoietic colony forming cells with high proliferative potentia", McNiece, I.K. and Briddell, R.A. em "Culture of Hematopoietic Cells". R.I. Freshney et al., eds. Vol pp23-39, wiley-Liss, Inc., New York, N.Y. 1994; Neben et al., Experimental Hematology 22:353-359, 1994; "Cobblestone area forming cell assay", Ploemacher, R.E. em "Culture of Hematopoietic Cells". R.I. Freshney, et al., eds. Vol. Pp 1-21, Wiley-Liss, Inc., New York, NY 1994; "Long term bone marrow cultures in the presence of stromal cells", Spooncer, E., Dexter, M. And Allen, T. em "Culture of Hematopoietic Cells". R.I. Freshney, et al., eds Vol pp. 163-179, Wiley-Liss, Inc., New York, NY. 1994; "Long term culture initiating cell assay", Sutherland, H.J. em "Culture of hematopoietic Cells". R.I. Freshney, et al. Eds. Vol. Pp. 139-162, Wiley-Liss, Inc., New York, NY. 1994.

Atividade de Crescimento de Tecidos

Uma proteína do presente invento pode também ter utilidade em composições usadas para crescimento ou regeneração de osso, cartilagem, tendões, ligamentos e/ou

tecido nervoso, assim como para a cicatrização de feridas e reparação e substituição de tecidos e no tratamento de queimaduras, incisões e úlceras.

Uma proteína do presente invento, que induz crescimento de cartilagem e/ou osso, em circunstâncias em que o osso não é normalmente formado, tem aplicação na cicatrização de fracturas ósseas e destruição ou defeitos de cartilagem em seres humanos e outros animais. Tal preparação empregando uma proteína do invento pode ter uso profilático na redução de fracturas fechadas e expostas e também na melhoria da fixação de articulações artificiais. A formação *de novo* de osso, induzida por um agente osteogénico, contribui para a reparação de defeitos congénitos, induzidos por trauma ou defeitos craniofaciais induzidos por ressecção oncológica e também é útil na cirurgia plástica cosmética.

Uma proteína deste invento pode também ser usada no tratamento de doença periodontal e noutros processos de reparação dentária. Tais agentes podem proporcionar um ambiente para atrair células formadoras de osso, estimular o crescimento de células formadoras de osso ou induzir diferenciação de células progenitoras de células formadoras de osso. Uma proteína do invento pode também ser útil no tratamento de osteoporose ou osteoartrite, como seja através da estimulação da reparação de osso e/ou cartilagem ou através do bloqueio de inflamação ou de processos de destruição de tecidos (actividade de collagenase, actividade de osteoclastos, etc.) mediados por processos inflamatórios.

Uma outra categoria de actividade de regeneração de tecidos que pode ser atribuível à proteína do presente invento é a formação de tendão/ligamento. Uma proteína do presente invento, que induz a formação de tecido tipo tendão/ligamento ou outro tecido, nas circunstâncias em que tal tecido não é normalmente formado, tem aplicação na cicatrização de rupturas de tendões ou ligamentos, deformações e outros defeitos de tendões ou ligamentos em seres humanos e outros animais. Tal preparação, que emprega uma proteína indutora de um tecido tipo tendão/ligamento, pode ter utilização profilática na prevenção de lesões dos tendões ou ligamentos, assim como utilização numa melhor fixação de tendões ou ligamentos ao osso ou outros tecidos e na reparação de defeitos no tecido de tendões ou ligamentos. A formação de novo de tecido do tipo tendão/ligamento induzida por uma composição do presente invento contribui para a reparação de defeitos congénitos de tendões ou ligamentos, induzidos por trauma ou de outra origem, e é também útil na cirurgia plástica cosmética para ligação ou reparação de tendões ou ligamentos. As composições do presente invento podem proporcionar um ambiente para atrair células formadoras de tendões ou ligamentos, estimular o crescimento de células formadoras de tendões ou ligamentos, induzir diferenciação de progenitores das células formadoras de ligamentos ou induzir crescimento de células ou progenitores de tendões/ligamentos *ex vivo* para serem reintroduzidas *in vivo* para efectuar a reparação de tecidos. As composições

do invento podem também ser úteis no tratamento de tendinite, síndrome do túnel cárpico e outros defeitos de tendões ou ligamentos. As composições podem também incluir uma matriz adequada e/ou agentes de sequestro como veículo como é conhecido na área.

A proteína do presente invento pode também ser útil para a proliferação de células neuronais e para a regeneração de tecido nervoso e cerebral, *i.e.* para o tratamento de doenças do sistema nervoso central e periférico e neuropatias, assim como alterações mecânicas e traumáticas, as quais envolvem degeneração, morte ou trauma de células neuronais ou tecido nervoso. Mais especificamente, uma proteína pode ser usada no tratamento de doenças do sistema nervoso periférico, como sejam lesões dos nervos periféricos, neuropatia periférica e neuropatias localizadas e doenças do sistema nervoso central, tais como Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington, esclerose lateral amiotrófica e síndrome de Shy-Drager. Outras condições que podem ser tratadas de acordo com o presente invento incluem alterações mecânicas e traumáticas, tais como alterações da espinal-medula, traumatismos cranianos e doenças cerebrovasculares tais como acidentes cardiovasculares. As neuropatias periféricas resultantes da quimioterapia ou de outras terapias médicas podem também ser tratáveis usando uma proteína do invento.

As proteínas do invento podem também ser úteis para promover melhor, ou mais rápido, encerramento de

feridas não cicatrizantes, incluindo sem limites, úlceras de pressão, úlceras associadas a insuficiência vascular, feridas cirúrgicas e traumáticas, e similares.

Espera-se que uma proteína do presente invento possa também apresentar actividade de geração ou regeneração de outros tecidos, tais como órgãos (incluindo, por exemplo, pâncreas, fígado, intestino, rim, pele, endotélio), músculo (liso, esquelético ou cardíaco) e vascular (incluindo endotélio vascular) ou para a promoção do crescimento de células que constituem tais tecidos. Parte dos efeitos pretendidos pode ser através da inibição ou modulação de escaras fibróticas para permitir a regeneração de tecido normal. Uma proteína do invento pode também apresentar actividade angiogénica.

Uma proteína do presente invento pode também ser útil para a protecção do tubo digestivo ou regeneração e tratamento de fibrose do pulmão ou fígado, lesão de reperfusão em vários tecidos e condições resultantes da destruição sistémica por citocinas.

Uma proteína do presente invento pode também ser útil para promover ou inibir a diferenciação dos tecidos descritos atrás a partir de tecidos ou células precursoras; ou para inibição do crescimento dos tecidos descrito atrás.

A actividade de uma proteína do invento pode ser medida, entre outros meios, pelos seguintes métodos:

Os ensaios para a actividade de geração de tecido incluem, sem limites, os descritos em: Patente Internacional N° WO95/16035 (osso, cartilagem, tendão); Patente Internacional N° WO91/07491 (pele, endotélio).

Os ensaios para a actividade da cicatrização de feridas incluem, sem limites, os descritos em: Winter, Epidermal Wound Healing, pps. 71-112 (Maibach, HI e Rovee, DT, eds), Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago, como modificado por Eaglstein e Mertz, J. Invest. Dermatol 71:382-84 (1978).

Actividade de Activina/Inibina

Uma proteína do presente invento pode também apresentar actividade relacionada com activina ou inibina. As inibinas são caracterizadas pela sua capacidade para inibir a libertação da hormona estimuladora de folículo (FSH), enquanto as activinas são caracterizadas pela sua capacidade para estimular a libertação de hormonas estimuladora de folículos (FSH). Assim, uma proteína do presente invento, sozinha ou em heterodímeros com um membro da família das inibinas a, pode ser útil como contraceptivo, baseado na capacidade das inibinas para diminuir a fertilidade em mamíferos fêmea e diminuir a espermatogénese em mamíferos macho. A administração de quantidades suficientes de outras inibinas pode induzir infertilidade nestes mamíferos. Como alternativa, a proteína do invento, como

homodímero ou como heterodímero com outras subunidades proteicas do grupo de inibinas β , pode ser útil como fármaco indutor de fertilidade, baseado na capacidade das moléculas de activina em estimular a libertação de FSH por células da pituitária anterior. Ver por exemplo, Patente dos Estados Unidos 4798885. Uma proteína do invento pode também ser útil para o avanço do estabelecimento de fertilidade em mamíferos sexualmente imaturos, de forma a aumentar o desempenho reprodutor de animais domésticos, tais como vacas, ovelhas e porcos.

A actividade de uma proteína do invento pode ser, entre outros meios, medida pelos seguintes métodos:

Os ensaios para actividade de activina/inibina incluem, sem limites, os descritos em: Vale *et al.*, *Endocrinology* 91:562-572, 1972; Ling *et al.*, *Nature* 321:779-782, 1986; Vale *et al.*, *Nature* 321:776-779, 1986; Mason *et al.*, *Nature* 318:659-663, 1985; Forage *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:3091-3095, 1986.

Actividade Quimiotáctica/Quimiocinética

Uma proteína do presente invento pode ter actividade quimiotáctica ou quimiocinética (e.g., actua como uma citocina) para células de mamífero, incluindo, por exemplo, monócitos, fibroblastos, neutrófilos, células T, mastócitos, eosinófilos, células epiteliais e/ou endoteliais. Proteínas quimiotácticas e quimiocinéticas podem ser

usadas para mobilizar ou atrair uma população de células pretendida para um local de actuação pretendido. As proteínas quimiotácticas ou quimiocinéticas proporcionam vantagens particulares no tratamento de feridas e outros traumas de tecidos, assim como no tratamento de infecções localizadas. Por exemplo, a atracção de linfócitos, monócitos ou neutrófilos para tumores ou locais de infecção pode resultar em melhores respostas imunes contra o tumor ou agente infeccioso.

Uma proteína ou péptido possui actividade quimiotáctica para uma população de células particular se puder estimular, directamente ou indirectamente, a orientação ou movimento dirigido de tal população de células. De preferência, a proteína ou péptido possui a capacidade de directamente estimular o movimento dirigido de células. Se uma proteína particular possuir actividade quimiotáctica para uma população de células pode ser facilmente determinado empregando tal proteína ou péptido em qualquer ensaio conhecido de quimiotaxia celular.

A actividade de uma proteína do invento pode ser medida, entre outros meios, pelos seguintes métodos:

Os ensaios de actividade quimiotáctica (que identificarão proteínas que induzem ou previnem quimiotaxia) consistem em ensaios que quantificam a capacidade de uma proteína induzir a migração de células através de uma membrana, assim como a capacidade de uma proteína induzir a

adesão de uma população celular a uma outra população de células. Ensaaios adequados para o movimento e adesão incluem, sem limites, os descritos em: "Current Protocols in Immunology", Ed por J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, .M. Shevach, W. Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Capítulo 6.12, "Measurement of alpha and beta Chemokines" 6.12.-6.12.28; Taub *et al.* J. Clin. Invest. 95:1370-1376, 1995; Lind *et al.* APMIS 103:140-146, 1995; Muller *et al.* Eur. J. Immunol. 25 :1744-1748 ; Gruber *et al.* J. Of Immunol. 152 :5860-5867, 1994 ; Johnston *et al.* J. Of Immunol. 153:1762-1768, 1994.

Actividade Hemostática e Trombolítica

Uma proteína do invento pode também apresentar actividade hemostática ou trombolítica. Como resultado, espera-se que tal proteína seja útil no tratamento de várias alterações de coagulação (incluindo alterações hereditárias, tais como hemofilias) ou para aumentar a coagulação e outros acontecimentos hemostáticos no tratamento de feridas resultantes de trauma, cirurgia ou outras causas. Uma proteína do invento pode também ser útil para a dissolução ou inibição da formação de trombozes e para o tratamento e prevenção de condições resultantes das mesmas (como seja, por exemplo, enfarte de vasos do sistema cardíaco ou nervoso central (e.g., acidente cardiovascular)).

A actividade de uma proteína do invento pode ser medida, entre outros meios, pelos seguintes métodos:

Os ensaios de actividade hemostática e trombolítica incluem, sem limites, os descritos em: Linet *et al.*, J. Clin. Pharmacol. 26:131-140, 1986; Burdick *et al.*, Thromobosis Res. 45:413-419, 1987; Humphrey *et al.*, Fibrinolysis 5: 71-79 (1991); Schaub, Prostaglandins 35:467-474, 1988.

Actividade de Receptor/Ligando

Uma proteína do presente invento pode também apresentar actividade como receptor, ligando de receptor ou inibidor ou agonista de interacções receptor/ligando. Exemplos de tais receptores e ligandos incluem, sem limites, receptores de citocinas e os seus ligandos, cinases de receptores e os seus ligandos, fosfatases de receptores e os seus ligandos, receptores envolvidos nas interacções célula-célula e os seus ligandos (incluindo, sem limites, moléculas de adesão celular tais como selectinas, integrinas e os seus ligandos) e pares de receptor/ligando envolvidos na apresentação de antígenos, reconhecimento de antígenos e desenvolvimento das respostas imunes celular e humoral). Receptores e ligandos são igualmente úteis para o rastreio de potenciais inibidores, peptídicos ou de pequenas moléculas, da interacção relevante receptor/ligando. Uma proteína do presente invento (incluindo, sem limites, fragmentos de receptores e ligandos)

dos) pode ser por si só útil como inibidor das interacções receptor/ligando.

A actividade de uma proteína do invento pode ser medida, entre outros meios, pelos métodos que seguem:

Os ensaios de actividade receptor-ligando incluem, sem limites, os descritos em "Current Protocols in Immunology", Ed por J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach, W. Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Capítulo 7.28, "Measurement of cellular adhesion under static conditions" 7.28.1-7.28.22), Takai *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:6864-6868, 1987; Bierer *et al.*, J. Exp. Med. 168:1145-1156, 1988; Rosenstein *et al.*, J. Exp. Med. 169 :149-160 1989 ; Stoltenborg *et al.*, J. Immunol. Methods 175 :59-68m, 1994 ; Stitt *et al.*, Cell 80 :661-670, 1995.

Actividade Anti-Inflamatória

As proteínas do presente invento podem também apresentar actividade anti-inflamatória. A actividade anti-inflamatória pode ser conseguida proporcionando um estímulo às células envolvidas na resposta inflamatória, através da inibição ou promoção de interacções célula-célula (tais como, por exemplo, adesão celular) através da inibição ou promoção da quimiotaxia de células envolvidas no processo inflamatório, inibindo ou promovendo a extravasação celular, ou através da estimulação ou supressão da produção de

outros factores que mais directamente inibem ou promovem uma resposta inflamatória. As proteínas que apresentam tais actividades podem ser usadas para tratar condições inflamatórias (incluindo condições crónicas ou agudas) incluindo sem limites inflamação associada a infecção (como seja choque séptico, sépsia ou síndrome da resposta inflamatória sistémica (SIRS)), lesão de isquemia e reperfusão, letalidade por endotoxinas, artrite, rejeição hiperaguda mediada pelo complemento, nefrite, lesão do pulmão induzida por citocinas ou quimiocinas, colite, doença de Crohn ou resultante da produção excessiva de citocinas, tais como TNF ou IL-1. As proteínas do invento podem também ser úteis para tratar anafilaxia e hipersensibilidade a uma substância ou material antigénico.

Actividade de Caderina/Supressor da Invasão de Tumores

As caderinas são moléculas de adesão dependentes de cálcio que parecem desempenhar papéis importantes durante o desenvolvimento, particularmente na definição de tipos celulares específicos. A perda ou alteração da expressão normal de caderina pode conduzir a alterações nas propriedades de adesão celulares associadas ao crescimento de tumores e metástases. O mau funcionamento de caderina está também implicado noutras doenças humanas, tais como pênfigo vulgar e pênfigo foliáceo (doenças da pele auto-imunes causadoras de vesículas), doença de Chron e algumas anormalidades do desenvolvimento.

A superfamília das caderinas inclui mais de quarenta membros, cada um com um padrão de expressão distinto. Todos os membros da superfamília possuem em comum repetições extracelulares conservadas (domínios de caderina), mas são encontradas diferenças estruturais noutras partes da molécula. Os domínios de caderina ligam-se a cálcio para formar a sua estrutura terciária e, assim, o cálcio é necessário para mediar a sua adesão. Apenas alguns aminoácidos no primeiro domínio de caderina proporcionam a base da adesão homofílica; a modificação deste reconhecimento pode alterar a especificidade de uma caderina para que em vez de se reconhecer apenas a si própria, a molécula mutante possa também então ligar-se a uma caderina diferente. Ainda, algumas caderinas estão envolvidas na adesão heterofílica com outras caderinas.

A E-caderina, um membro da superfamília de caderinas, é expresso em células do tipo epitelial. Patologicamente, se a expressão de E-caderina for perdida num tumor, as células malignas tornam-se invasivas e o cancro metastiza. A transfecção de linhas celulares de cancro com polinucleótidos que expressam E-caderina reverteu as alterações associadas a cancro, fazendo passar as formas celulares alteradas a normais, restaurando a adesão das células umas às outras e ao seu substrato, diminuindo a velocidade de crescimento celular e reduzindo drasticamente o crescimento celular independente de ancoragem. Assim, a reintrodução da expressão de E-caderina

reverte carcinomas para uma fase menos avançada. É provável que outras caderinas possuam o mesmo papel supressor da invasão em carcinomas derivados de outro tipo de tecidos. Assim, as proteínas do presente invento com actividade de caderina e polinucleótidos do presente invento codificadores de tais proteínas, podem ser usados para tratar cancro. A introdução de tais proteínas ou polinucleótidos em células de cancro pode reduzir ou eliminar as alterações cancerosas observadas nestas células ao proporcionar expressão normal de caderina.

Também se demonstrou que as células de cancro expressam caderinas de um tipo de tecido diferente do da sua origem, permitindo assim que estas células invadam e metastizem num tecido diferente do corpo. As proteínas do presente invento com actividade de caderina e polinucleótidos do presente invento codificadores de tais proteínas podem substituir nestas células as caderinas inadequadamente expressas, restaurando as propriedades adesivas das células normais e reduzindo ou eliminando a tendência das células para metastizar.

Ainda, as proteínas do presente invento com actividade de caderina, e polinucleótidos do presente invento codificadores de tais proteínas, podem ser usadas para gerar anticorpos que reconhecem e se ligam a caderinas. Tais anticorpos podem ser usados para bloquear a adesão de caderinas de células tumorais inadequadamente

expressas, evitando que as células formem um tumor noutra local. Tal anticorpo anti-caderina pode também ser usado como marcador de grau, tipo patológico e prognóstico de um cancro, *i.e.* quanto mais avançado o cancro, menor expressão de caderina será observada e este decréscimo na expressão de caderina pode ser detectado pela utilização de um anticorpo de ligação a caderina.

Fragmentos de proteínas do presente invento com actividade de caderina, de preferência um polipéptido compreendendo um decapeptido do local de reconhecimento da caderina, e polinucleótidos do presente invento codificadores de tais fragmentos, podem também ser usados para bloquear a função de caderina através da ligação a caderinas e evitando que elas se liguem de forma a produzirem efeitos indesejáveis. Ainda, fragmentos de proteínas do presente invento com actividade de caderina, de preferência fragmentos solúveis de caderina truncada que são estáveis na circulação de doentes com cancro, e polinucleótidos codificadores de tais fragmentos proteicos, podem ser usados para alterar a adesão correcta célula-célula.

Os ensaios para a actividade adesiva e supressora de invasão da caderina incluem, sem limites, os descritos em: Hortsch *et al.*, J. Biol. Chem. 270 (32):18809-18817, 1995; Miyaki *et al.* Oncogene 11:2547-2552, 1995; Ozawa *et al.* Cell 63:1033-1038, 1990.

Actividade de Inibição de Tumores

Para além das actividades atrás descritas para o tratamento imunológico ou prevenção de tumores, uma proteína do invento pode apresentar outras actividades anti-tumorais. Uma proteína pode inibir o crescimento de tumores, directamente ou indirectamente (como seja, por exemplo, via citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC)). Uma proteína pode apresentar a sua actividade inibidora de tumores actuando sobre o tecido tumoral ou sobre tecido precursor de tumores, através da inibição da formação de tecidos necessários para suportar o crescimento de tumores (como seja, por exemplo, através da inibição da angiogénese), através da indução de outros factores, agentes ou tipos celulares que inibem o crescimento de tumores, ou através da supressão, eliminação ou inibição de factores, agentes ou tipos celulares que promovam o crescimento de tumores.

Outras actividades

Uma proteína do invento pode também apresentar uma ou mais das seguintes actividades ou efeitos adicionais: inibição do crescimento, infecção ou função ou morte de agentes infecciosos, incluindo, sem limites, bactérias, vírus, fungos e outros parasitas; afectando (suprimindo ou estimulando) as características do corpo, incluindo, sem limites, altura, peso, cor do cabelo, cor dos olhos, pele, proporção de gordura:músculo ou outra

pigmentação de tecido, ou tamanho ou forma de órgão ou parte do corpo (como seja, por exemplo, aumento ou diminuição do peito, alteração da forma do osso); afectando biorritmos ou ciclos ou ritmos circadianos; afectando a fertilidade dos indivíduos do sexo masculino ou feminino; afectando o metabolismo, catabolismo, anabolismo, processamento, utilização, armazenamento ou eliminação de gordura, lípido, proteína, açúcar, vitaminas, minerais, cofactores ou outros factores ou componentes nutricionais da dieta; afectando as características de comportamento, incluindo, sem limites, apetite, libido, pressão, cognição (incluindo alterações cognitivas), depressão (incluindo alterações depressivas) e comportamentos violentos; proporcionando efeitos analgésicos ou outros efeitos de redução das dores; promoção da diferenciação e crescimento de células estaminais embrionárias em linhagens diferentes das linhagens hematopoiéticas; actividade hormonal ou endócrina; no caso de enzimas, correcção de deficiências da enzima e tratamento de doenças relacionadas com deficiências; tratamento de alterações hiperproliferativas (tais como, por exemplo, psoríase); actividade do tipo imunoglobulina (como seja, por exemplo, a capacidade para ligar antigénios ou complemento); e a capacidade para actuar como antigénio numa composição de vacina para induzir uma resposta imune contra tal proteína ou um outro material ou entidade que dê reacção cruzada com tal proteína.

Administração e Dosagem

Uma proteína do presente invento (de qualquer

fonte, incluindo sem limites fontes recombinantes e não recombinantes) pode ser usada numa composição farmacêutica quando combinada com um veículo farmacêuticamente aceitável. Tal composição pode também conter (para além da proteína e de um veículo) diluentes, agentes de enchimento, sais, tampões, estabilizantes, solubilizantes e outros materiais conhecidos na área. O termo "farmacêuticamente aceitável" significa um material não tóxico que não interfere com a eficácia da actividade biológica dos ingredientes activos. As características do veículo dependerão da via de administração. A composição farmacêutica do invento pode também conter citocinas, linfocinas ou outros factores hematopoiéticos, tais como M-CSF, GM-CSF, TNF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IFN, TNF0, TNF1, TNF2, G-CSF, Meg-CSF, trombopoietina, factor de células estaminais e eritropoietina. A composição farmacêutica pode ainda conter outros agentes que estimulem a actividade da proteína ou desempenho da sua actividade ou uso no tratamento. Tais factores adicionais e/ou agentes podem ser incluídos na composição farmacêutica para produzir um efeito sinérgico com a proteína do invento ou para minimizar os efeitos secundários. Pelo contrário, a proteína do presente invento pode ser incluída em formulações de uma citocina particular, linfocina, outro factor hematopoiético, factor trombolítico ou anti-trombótico, ou agente anti-inflamatório para minimizar os efeitos secundários da citocina, linfocina, outro factor hematopoiético, factor trombolítico ou anti-trombótico, ou agente anti-inflamatório.

A proteína do presente invento pode ser activa em multímeros (e.g., heterodímeros ou homodímeros) ou complexos consigo própria ou com outras proteínas. Como resultado, as composições farmacêuticas do invento podem compreender uma proteína do invento na forma multimérica ou complexada.

A composição farmacêutica do invento pode ser na forma de um complexo das proteínas do presente invento, juntamente com antígenos proteicos ou peptídicos. O antígeno proteico e/ou peptídico transmitirá um sinal estimulador aos linfócitos B e T. Os linfócitos B responderão ao antígeno através do receptor das células T (TCR) após apresentação do antígeno por proteínas MHC. MHC e proteínas estruturalmente relacionadas, incluindo as codificadas pelos genes MHC classe I e classe II, em células hospedeiras servirão para apresentar o antígeno peptídico aos linfócitos T. Os componentes antigénicos poderão também ser fornecidos como complexos purificados MHC-peptido por si sós ou com moléculas co-estimuladoras que podem directamente sinalizar as células T. Como alternativa, anticorpos capazes de se ligarem a imunoglobulinas e outras moléculas na superfície de células B, assim como anticorpos capazes de ligarem o TCR e outras moléculas nas células T podem ser combinados com a composição farmacêutica do invento.

A composição farmacêutica do invento pode ser na

forma de um lipossoma, em que a proteína do presente invento é combinada, para além de outros veículos farmacêuticamente aceitáveis, com agentes amfipáticos tais como lípidos que existem na forma agregada como micelas, monocamadas insolúveis, cristais líquidos ou camadas lamelares em solução aquosa. Lípidos adequados para a formulação lipossomal incluem, sem limites, monoglicéridos, diglicéridos, sulfatidos, lisolecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares e similares. A preparação de tais formulações lipossomais está ao alcance dos familiarizados com a área, como descrito, por exemplo, na Patente U.S. Nº 4235871; Patente U.S. Nº 4501728; Patente U.S. Nº 4837028; e Patente U.S. Nº 4737323, todas aqui incluídas como referência.

Como aqui usado, o termo "quantidade terapeuticamente eficaz" significa a quantidade total de cada componente activo da composição farmacêutica, ou método, que seja suficiente para mostrar um benefício significativo para o doente, *i.e.*, tratamento, cicatrização, prevenção ou melhoria da condição médica relevante, ou um aumento na velocidade de tratamento, cicatrização, prevenção ou melhoria de tais condições. Quando aplicado a um ingrediente activo individual, administrado sozinho, o termo refere-se ao ingrediente por si só. Quando aplicado a uma combinação, o termo refere-se a quantidades combinadas dos ingredientes activos que resultam no efeito terapêutico, administrado em combinação, seriadamente ou simultaneamente.

Na aplicação do método de tratamento ou uso do presente invento, uma quantidade terapeuticamente eficaz da proteína do presente invento é administrada a um mamífero apresentando uma condição a ser tratada. A proteína do presente invento pode ser administrada, de acordo com o método do invento, sozinha ou em combinação com outras terapias tais como tratamentos que empregam citocinas, linfocinas ou outros factores hematopoiéticos. Quando co-administrados com uma ou mais citocinas, linfocinas ou outros factores hematopoiéticos, a proteína do presente invento pode ser administrada simultaneamente com as citocinas, linfocinas, outros factores hematopoiéticos, factores trombolíticos ou anti-trombóticos, ou sequencialmente. Se administrada sequencialmente, o médico assistente decidirá sobre a sequência adequada de administração da proteína do presente invento em combinação com citocinas, linfocinas, outros factores hematopoiéticos, factores trombolíticos ou anti-trombóticos.

A administração da proteína do presente invento usada na composição farmacêutica ou na realização do método do presente invento pode ser realizada numa variedade de formas convencionais, tais como ingestão oral, inalação, aplicação tópica ou injeção cutânea, subcutânea, intraperitoneal, parentérica ou intravenosa. É preferida a administração intravenosa ao doente.

Quando uma quantidade terapeuticamente eficaz da proteína do presente invento é administrada por via oral, a

proteína do presente invento estará na forma de um comprimido, cápsula, pó, solução ou elixir. Quando administrada na forma de comprimido, a composição farmacêutica do invento pode ainda conter um veículo sólido, como seja uma gelatina ou um adjuvante. O comprimido, cápsula e pó possuem entre cerca de 5 e 95% de proteína do presente invento e, de preferência, entre cerca de 25 e 90% de proteína do presente invento. Quando administrada na forma líquida, pode ser adicionado um veículo líquido como seja água, petróleo, óleos de origem animal ou vegetal, como seja óleo de amendoim, óleo mineral, óleo de soja ou óleo de sésamo, ou óleos sintéticos. A forma líquida da composição farmacêutica pode ainda conter solução de soro fisiológico, dextrose ou outra solução de açúcar, ou glicóis tais como etilenoglicol, propilenoglicol ou polietilenoglicol. Quando administrada na forma líquida, a composição farmacêutica possui entre cerca de 0,5 e 90% por peso de proteína do presente invento e, de preferência, entre cerca de 1 e 50% de proteína do presente invento.

Quando uma quantidade terapeuticamente eficaz de proteína do presente invento é administrado por injeção intravenosa, cutânea ou subcutânea, a proteína do presente invento estará na forma de uma solução aquosa, parentericamente aceitável, apirogénica. A preparação de tais soluções proteicas parenteralmente aceitáveis, tendo atenção ao pH, isotonicidade, estabilidade e similares, está dentro das capacidades dos familiarizados com a área. Uma composição farmacêutica preferida para injeção

intravenosa, cutânea ou subcutânea deverá conter, para além, da proteína do presente invento, um veículo isotónico como seja Cloreto de Sódio para Injecção, Solução de Ringer para Injecção, Solução de Dextrose para Injecção, Solução de Dextrose e Cloreto de Sódio para Injecção, Solução Lactada de Ringer para Injecção ou outro veículo conhecido na área. A composição farmacêutica do presente invento pode também conter estabilizantes, preservantes, tampões, anti-oxidantes ou outros aditivos conhecidos dos familiarizados com a área.

A quantidade de proteína do presente invento na composição farmacêutica do presente invento dependerá da natureza e gravidade da condição a ser tratada e da natureza de tratamentos anteriores a que o doente foi submetido. Finalmente, o médico assistente decidirá sobre a quantidade de proteína do presente invento com a qual tratar cada doente individualmente. Inicialmente, o médico assistente administrará doses baixas da proteína do presente invento e observará a resposta do doente. Doses mais elevadas da proteína do presente invento podem ser administradas até ser obtido o efeito terapêutico óptimo para o doente e, nessa altura, a dosagem deixa de ser aumentada. É considerado que as várias composições farmacêuticas usadas na realização do método do presente invento deverão conter cerca de 0,01 µg a cerca de 100 mg (de preferência cerca de 0,1 ng a cerca de 10 mg, mais de preferência cerca de 0,1 µg a cerca de 1 mg) de proteína do presente invento por Kg de peso de corpo.

A duração da terapia intravenosa usando a composição do presente invento variará, dependendo da gravidade da doença a ser tratada e da condição e potencial resposta idiossincrática de cada doente individual. É considerado que a duração de cada aplicação da proteína do presente invento será na gama de 12 a 24 horas de administração intravenosa contínua. Finalmente, o médico assistente decidirá sobre a duração adequada da terapia intravenosa usando a composição farmacêutica do presente invento.

A proteína do invento pode igualmente ser usada para imunizar animais para obter anticorpos policlonais e monoclonais que especificamente reagem com a proteína. Como aqui é usado, o termo "anticorpo" inclui, sem limites, um anticorpo policlonal, um anticorpo quimérico, um anticorpo de cadeia simples, um anticorpo com enxerto de CDR, um anticorpo humanizado ou seus fragmentos que se ligam à proteína indicada. Tal termo também inclui quaisquer outras espécies derivadas de um anticorpo ou sequência de anticorpo que sejam capazes de se ligar à proteína indicada.

Os anticorpos contra uma proteína particular podem ser produzidos pelos métodos conhecidos dos familiarizados com a área. Por exemplo, os anticorpos monoclonais podem ser produzidos através da geração de hibridomas produtores de anticorpos de acordo com métodos

conhecidos (ver por exemplo, Goding, 1983, "Monoclonal Antibodies: principles and practice", Academic Press Inc., New York; e Yokoyama, 1992, "Production of Monoclonal Antibodies" em "Current Protocols in Immunology", Unidade 2.5, Greene Publishing Assoc. and John Wiley & Sons). Os soros policlonais e anticorpos podem ser produzidos por inoculação de um mamífero com a proteína relevante, ou fragmentos da mesma, de acordo com métodos conhecidos. Fragmentos de anticorpos, receptores ou outros péptidos reactivos podem ser produzidos a partir dos anticorpos correspondentes por clivagem e recolha dos fragmentos pretendidos de acordo com métodos conhecidos (ver por exemplo, Godingm, *supra*; e Andrew *et al.*, 1992, "Fragmentation of Immunoglobulins" em "Current Protocols in Immunology", Unidadet 2.8, Greene Publishing Assoc. and John Wiley & Sons). Anticorpos quiméricos e anticorpos de cadeia simples podem ser igualmente produzidos de acordo com métodos recombinantes conhecidos (ver por exemplo, 5.169939, 5194594 e 5576184). Podem ser também preparados anticorpos humanizados, a partir de anticorpos murinos correspondentes, de acordo com métodos conhecidos (ver por exemplo, Patentes U.S. Nos 5530101, 5585089 e 5693762). Ainda, podem ser produzidos anticorpos humanos em animais não humanos, tais como murganhos que foram geneticamente alterados para expressar moléculas de anticorpos humanos (ver por exemplo Fishwild *et al.*, 1996. Nature Biotechnology 14:845-851; Mendez *et al.*, 1997, Nature Genetics 15:146-156 (erratum Nature Genetics 16:410); e Patentes U.S. 5877397 e 5625126). Tais anticorpos podem ser

obtidos usando como imunogénio a proteína total ou seus fragmentos. Os imunogénios peptídicos podem ainda conter um resíduo de cisteína no extremo carboxilo e serem conjugados com um hapteno, como seja hemocianina de lapa (KHL). Os métodos de síntese de tais péptidos são conhecidos, por exemplo como descrito em R.P. Merrifield, J.Amer. Chem. Soc. 85, 2149-2154 (1963); J.L. Krstenansky *et al.*, FEBS Lett. 211, 10 (1987).

Os anticorpos monoclonais que se ligam à proteína do invento podem ser úteis como agentes de diagnóstico para a imunodeteção da proteína. Os anticorpos monoclonais neutralizantes que se ligam à proteína podem igualmente ser fármacos úteis para condições associadas à proteína e também no tratamento de algumas formas de cancro, em que a expressão anormal de proteína esteja envolvida. No caso das células cancerosas ou leucémicas, os anticorpos monoclonais neutralizantes contra a proteína podem ser úteis na detecção e prevenção da disseminação metástica das células cancerosas, a qual pode ser mediada pela proteína.

Para as composições do presente invento que são úteis para a regeneração de osso, cartilagem, tendão ou ligamento, o método terapêutico inclui a administração tópica, sistémica ou local, como um implante ou dispositivo, da composição. Quando administrada, a composição terapêutica para usar neste invento é, certamente, numa forma apirogénica, fisiologicamente aceitável. Ainda, a composição pode ser, desejavelmente, encapsulada ou

injectada numa forma viscosa para introdução no local do osso, cartilagem ou tecido destruído. A administração tópica pode ser adequada para a cicatrização de feridas e reparação de tecidos. Agentes terapêuticos úteis, para além de uma proteína do invento, que podem ser facultativamente incluídos na composição como descrito atrás, podem, alternativamente ou adicionalmente, serem administrados simultaneamente ou sequencialmente com a composição nos métodos do invento. De preferência, para a formação de osso e/ou cartilagem, a composição incluirá uma matriz capaz de libertar a composição contendo a proteína no local do osso e/ou cartilagem danificada, proporcionando uma estrutura para o desenvolvimento de osso e cartilagem e, de forma óptima, capaz de ser reabsorvida pelo corpo. Tais matrizes podem ser formadas por materiais presentemente usados noutras aplicações médicas estabelecidas.

A escolha do material da matriz baseia-se na biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedades mecânicas, aspecto cosmético e propriedades de interface. A aplicação particular das composições definirá a formulação adequada. Potenciais matrizes para as composições podem ser sulfato de cálcio, fosfato tricálcico, hidroxiapatite, ácido poliláctico, ácido poliglicólico e polianidridos biodegradáveis e quimicamente definidos. Outros potenciais materiais são os biodegradáveis e biologicamente bem definidos, tais como osso ou colagénio dérmico. Outras matrizes são constituídas por proteínas puras ou componentes da matriz extracelular. Outras matrizes

potenciais são não biodegradáveis e bem definidas, como sejam hidroxiapatite vidrada, biovidro, aluminatos ou outras cerâmicas. As matrizes podem ser constituídas por combinações de qualquer um dos tipos de material atrás referidos, tais como ácido poliláctico e hidroxiapatite ou colagénio e fosfato tricálcico. As biocerâmicas podem ser alteradas na composição, como seja em cálcio-aluminato-fosfato e processamento para alterar o tamanho do poro, tamanho da partícula, forma da partícula e biodegradabilidade.

Presentemente, prefere-se um copolímero de 50:50 (mole peso) de ácido láctico e ácido glicólico na forma de partículas porosas, tendo diâmetros que variam entre 150 e 800 microns. Nalgumas aplicações, será útil utilizar um agente de sequestro, como seja carboximetilcelulose ou coágulo de sangue autólogo, para evitar que as composições proteicas se dissociem da matriz.

Uma família preferida de agentes de sequestro é os materiais celulósicos tais como alquilceluloses (incluindo hidroxialquilcelulose), incluindo metilcelulose, etilcelulose, hidroetilcelulose, hidroxipropilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose e carboximetilcelulose, os mais preferidos são os sais catiónicos de carboximetilcelulose (CMC). Outros agentes de sequestro incluem ácido hialurónico, alginato de sódio, óxido de polietilenoglicol, polímero de carboxivinilo e álcool polivinílico. A quantidade de agente de sequestro útil será 0,5-20 p%, de

preferência 1-10 p%, baseado no peso da formulação total, que representa a quantidade necessária para evitar a desabsorção da proteína da matriz de polímero e proporcionar manipulação adequada da composição, no entanto não deverá ser tanta que as células progenitoras sejam impedidas de infiltrarem a matriz, proporcionando assim a oportunidade da proteína contribuir para a actividade osteogénica das células progenitoras.

Noutras composições, as proteínas do invento podem ser combinadas com outros agentes benéficos para o tratamento de defeitos, feridas ou tecido de osso e/ou cartilagem em questão. Estes agentes incluem vários factores de crescimento, tais como factor de crescimento epidérmico (EGF), factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), factores de crescimento transformantes (TGF- α e TGF- β), e factor de crescimento tipo insulina (IGF).

As composições terapêuticas são também presentemente importantes para aplicações veterinárias. Particularmente animais domésticos e cavalos de sangue puro, para além de seres humanos, são doentes elegíveis para tal tratamento com proteínas do presente invento.

O regime de dosagem, de uma composição farmacêutica contendo a proteína a ser usada na regeneração de tecidos, será determinado pelo médico assistente considerando vários factores que modificam a acção das proteínas, e.g., quantidade de peso do tecido que se pretende formar,

local da lesão, condição do tecido destruído, tamanho da ferida, tipo de tecido destruído (e.g., osso), idade do doente, sexo e dieta, gravidade de qualquer infecção, tempo de administração e outros factores clínicos. A dosagem pode variar com o tipo de matriz usado na reconstituição e com a inclusão de outras proteínas na composição farmacêutica. Por exemplo, a adição de outros factores de crescimento conhecidos, tais como IGF I (factor de crescimento do tipo insulina I), à composição final, pode também afectar a dosagem. O progresso pode ser monitorizado pela avaliação periódica do crescimento e/ou reparação de tecido/osso, por exemplo, raios X, determinações histomorfométricas e marcação com tetraciclina.

Os polinucleótidos do presente invento podem também ser usados para a terapia génica. Tais polinucleótidos podem ser introduzidos nas células, *in vivo* ou *ex vivo*, para a expressão num mamífero. Os polinucleótidos do invento podem ser igualmente administrados por outros métodos conhecidos para introdução de ácido nucleico numa célula ou organismo (incluindo, sem limites, na forma de vectores virais ou DNA nu).

As células podem também ser cultivadas *ex vivo* para a expressão num indivíduo mamífero. Os polinucleótidos podem ser introduzidos *in vivo* ou *ex vivo* nas células para expressão num mamífero. Os polinucleótidos do invento podem também ser administrados por outros métodos conhecidos para introdução de ácido nucleico numa célula ou organismo

(incluindo, sem limites, na forma de vectores virais ou DNA nu).

As células podem também ser cultivadas *ex vivo* na presença de proteínas do presente invento de forma a proliferarem ou produzirem um efeito pretendido em tais células ou na sua actividade. As células tratadas podem ser então introduzidas *in vivo* para fins terapêuticos.

Este invento é ainda ilustrado pels exemplos que se seguem, que não deverão ser considerados limitantes. Os conteúdos da Listagem de Sequências são aqui incluídos.

EXEMPLOS

Identificação e caracterização do clone "hGIL-19/AE289"

Um polinucleótido do presente invento foi identificado como clone "hGIL-19/AE289". O clone hGIL-19/AE289 foi isolado de acordo com o método que se segue. Uma EST murina foi identificada a partir de uma biblioteca de cDNA murina, preparada a partir de esplenócitos activados com ConA e células dendríticas derivadas de medula óssea. A EST foi identificada usando métodos selectivos para cDNAs codificadores de proteínas secretadas (ver Pat. US N° 5536637). A sequência de EST murina foi usada para isolar o clone de tamanho completo murino a partir da biblioteca de cDNA correspondente. A análise da sequência do clone murino

revelou uma homologia significativa com interleucina 10 (IL-10).

Para isolar um homólogo humano do clone murino, foram produzidas sequências iniciadoras de PCR baseadas na região da sequência murina que apresentou homologia com IL-10. A utilização de tais sequências iniciadoras para amplificação numa biblioteca de PBMCs humanos produziu um produto de PCR de tamanho significativo. A análise da sequência do produto de PCR confirmou que era um homólogo do cDNA murino. Foram produzidos oligonucleótidos a partir da sequência do clone humano parcial e usados para isolar um clone humano de tamanho completo a partir de uma biblioteca de PBMCs.

hGIL-19/AE289 é um clone humano de tamanho completo, incluindo a sequência codificadora total de uma proteína secretada (também aqui referida como proteína "hGIL-19/AE289"). A análise da sua sequência de aminoácidos indicou que tem cerca de 23% de homologia com hIL-10. Baseado nos motivos de ligação a receptores putativos em IL-10, os três motivos com função análoga foram propostos para hGIL-19/AE289 através de modulação computacional. Estes são as regiões de SEQID NO:2 do resíduo 50 a 60, do resíduo 63 a 81 e do resíduo 168 a 177. As análises das bases de dados revelaram que hGIL-19/AE289 também apresenta níveis semelhantes de homologia com IL-10 de outras espécies.

A sequência nucleotídica de hGIL-19/AE289 como presentemente determinada está descrita em SEQ ID NO:1 e inclui uma cauda poli(A). A sequência de aminoácidos da proteína hGIL-19/AE289 correspondendo à sequência nucleotídica anterior está descrita em SEQ ID NO:2.

Caracterização da proteína hGIL-19/AE289

Linhas celulares que expressam e secretam estavelmente a proteína hGIL-19/AE289 completa foram criadas através da transfecção de células CHO com cDNA de hGIL-19/AE289 em vectores de expressão adequados. As células COS, transitoriamente transfectadas usando vectores de expressão hGIL-19/AE289 adequados, foram usadas para preparar proteína hGIL-19/AE289 para análise. As transfecções foram conseguidas usando o reagente comercial Lipofectmine (Gibco). É interessante que as células COS que expressam hGIL-19 não se descolam uniformemente, formando buracos na monocamada celular. O meio condicionado derivado de células COS transfectadas foi usado para demonstrar a actividade do tipo citocina para a proteína hGIL-19/AE289. A análise de transferências Western dos lisados celulares mostrou que Stat-3 se torna fosforilado (activado) numa linha celular derivada de tecido mesangial apresentando qualidades do tipo macrófago (MES-13; ver, Dumoutier *et al.*, (2000) *J. Immunology* 164:1814-1819) quando da exposição daquelas células a meio condicionado por células que expressam hGIL-19/AE289. Ainda, a fosforilação de Stat-3 é induzida em células COS não transfectadas tratadas com a proteína hGIL-19.

A análise electroforética de hGIL-19/AE289 (derivada das linhas celulares COS transfectadas aqui descritas) indicou que a proteína expressa existe numa gama de tamanhos. O tratamento da proteína hGIL-19 derivada de COS com N-glicanase, antes da electroforese, resulta numa única banda correspondendo à espécie com mobilidade mais elevada (e.g., peso molecular mais baixo) observada em hGIL-19/AE289 não tratada. Isto é consistente com os eventos de glicosilação propostos que podem ocorrer nos locais putativos de glicosilação ligada em N identificados na sequência de aminoácidos de hGIL-19/AE289 (resíduos de aminoácidos 54-56, 68-70, 97-99 e 176-178 de SEQ ID NO:2).

A sequenciação N-terminal de Edman determinou que extremo N da proteína hGIL-19/AE289 madura começa com o resíduo na posição 34 de SEQ ID NO:2 (alanina). Foram criados vectores de expressão que fundem uma cauda de afinidade de "6x histina" e uma marca de epitopo FLAG ao extremo N da proteína hGIL-19/AE289 madura. (A cauda de aminoácidos está apresentada em SEQ ID NO:3 e tem a seguinte sequência de aminoácidos:

MKFLVNVALVFMVYISYIYAGSGHHHHHGGSGDYKDDDDKAPISSHCR).

Estas Construções com marcas foram usadas para criar linhas celulares CHO de expressão estável e linhas celulares CHO de expressão transitória. As marcas proporcionam um meio conveniente de detecção de hGIL-19/AE289 (e.g., anticorpos

anti-6xhis; anticorpos anti-FLAG), e purificação da proteína a partir de meio condicionado (usando resina Ni^{+2}). A proteína GIL-19 humana purificada através desta marca, a partir de linhas celulares COS expressando hGIL-19/AE289, pôde ser usada para induzir a activação de Stat-3 em células MES-13.

A comparação dos transcritos de hGIL-19/AE289 em células Th1 e Th2 activadas (ver, por exemplo, Syrbe *et al.*, (1999) Springer Seminars in Immunopathology, 21:263-85) indicou um nível substancialmente superior de expressão de GIL-19 em células Th1 activadas relativamente a células Th2 activadas. A análise do mRNA de GIL-19 foi conseguida com ensaios de protecção da RNase.

Efeitos imunológicos de GIL-19

Os efeitos imunológicos de GIL-19 foram estudados num contexto de metazoário, através da introdução viral do cDNA de GIL-19 murino em murganhos. Um vector de adenovírus foi usado para expressar um cDNA de GIL-19 murina em murganhos fêmea C57/B6, com 8 semanas de idade, através da injeção de 5×10^{10} partículas virais. Os murganhos usados foram sacrificados nos dias 7 e 14 após injeção e comparados com murganhos testemunha injectados com tampão apenas ou com adenovírus expressando a proteína verde fluorescente (GFP). Nos dias 7 e e 14, foi observado que os pesos absolutos e relativos do timo tinham decrescido significativamente nos murganhos que expressavam GIL-19

murina viral. O peso médio absoluto do baço tinha decrescido no dia 14 e os pesos do fígado tinham aumentado ligeiramente no dia 7. Nos dias 7 e 14, era aparente uma atrofia generalizada do timo, assim como depleção linfóide (observada ao microscópio).

Ainda, existia uma série de efeitos hematológicos que eram aparentes no dia 7, incluindo decréscimo da contagem de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito. Estes efeitos, considerados em conjunto, indicaram anemia nos animais. Ainda, houve um aumento nas plaquetas assim como um aumento da contagem de células brancas devido a um aumento dos neutrófilos. Face a estas observações, não houve evidência de uma resposta regenerativa, o que indicou que os efeitos podem ser ao nível da medula óssea.

Ainda, houve um ligeiro decréscimo nos níveis da albumina no dia 7 e no dia 14. Uma causa possível para isto é a perda de pequenas moléculas através do rim ou do tubo digestivo.

Equivalentes

Os familiarizados com a área reconhecerão ou serão capazes de descobrir, usando não mais do que experimentação de rotina, muitos dos equivalentes de realizações específicas do invento aqui descritas. Tais equivalentes, pretende-se que sejam englobados pelas reivindicações que se seguem.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> GENETICS INSTITUTE

<120> PROTEÍNAS GIL-19/AE289 HUMANAS E POLINUCLEÓTIDOS CODIFICADORAS DAS MESMAS

<130> GIN-5358CPPC

<140>

<141>

<150> 60/131473

<151> 1999-04-28

<160> 2

<170> Patent In Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1177

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
ggccaaagag gectacaggt tctccttccc cagtcaccag ttgctcgagt tagaattgtc 60
tgcaatggcc gccctgcaga aatctgtgag ctctttcctt atggggaccc tggccaccag 120
ctgcctcctt ctcttggccc tcttggtaca gggaggaga gctgcgccc tcagctccc 180
ctgcaggctt gacaaqtcca acttcacgca gccctatata accaaccgca ccttcagct 240
ggctaaggag gctagcttgg ctgataacaa cacagacgtt cgtctcattg gggagaaact 300
gttcacacga gtcagtatga gtgagcgctg ctatctgatg aagcaggtgc tgaacttcac 360
ccttgaagaa gtgctgttcc ctcaatctga taggttccag ccttatatgc aggagggtgg 420
gcccttctctg gccaggctca gcaacaggct aagcacatgt catattgaag gtgatgacct 480
gcatatccag aggaatgtgc aaaagctgaa ggacacagtg aaaaagcttg gagagagtgg 540
agagatcaaa gcaattggag aactggattt gctgtttatg tctctgagaa atgcctgcat 600
ttgaccagag caaagctgaa aatgaataa ctaacccccc ttccctgcta gaataacaa 660
ctagatgccc caaagcgatt ttttttaacc aaaaggaaga tgggaagcca aactccatca 720
tgatgggtgg attccaaatg aacccctgcg ttagttacaa aggaasccaa tgccactttt 780
gtttataaga ccagaaggta gactttctaa gcatagatat ttattgataa catttcattg 840
taactggtgt tctatacaca gaaaacaatt tattttttaa ataattgtct ttttccataa 900
aaaagattac ttccattcc tttaggggaa aaaaccccta aatagcttca tgtttccata 960
atcagtaactt tatatttata aatgtattta ttattattat aagactgcat tttatttata 1020
tcattttatt aatatggatt tatttataga aacatcattc gatattgcta cttgagtgtg 1080
aggctaatat tgatatttat gacaataatt atagagctat aacatgttta tttgacctca 1140
ataaacactt ggaatcccta aaaaaaaaaa aaaaaaa 1177
```

<210> 2

<211> 179

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met	Ala	Ala	Leu	Gln	Lys	Ser	Val	Ser	Ser	Phe	Leu	Met	Gly	Thr	Leu	1	5	10	15
Ala	Thr	Ser	Cys	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Val	Gln	Gly	Gly	Ala	20	25	30	
Ala	Ala	Pro	Ile	Ser	Ser	His	Cys	Arg	Leu	Asp	Lys	Ser	Asn	Phe	Gln	35	40	45	
Gln	Pro	Tyr	Ile	Thr	Asn	Arg	Thr	Phe	Met	Leu	Ala	Lys	Glu	Ala	Ser	50	55	60	
Leu	Ala	Asp	Asn	Asn	Thr	Asp	Val	Arg	Leu	Ile	Gly	Glu	Lys	Leu	Phe	65	70	75	80
His	Gly	Val	Ser	Met	Ser	Gln	Arg	Cys	Tyr	Leu	Met	Lys	Gln	Val	Leu	85	90	95	
Asn	Phe	Thr	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Phe	Pro	Gln	Ser	Asp	Arg	Phe	Gln	100	105	110	
Pro	Tyr	Met	Gln	Glu	Val	Val	Pro	Phe	Leu	Ala	Arg	Leu	Ser	Asn	Arg	115	120	125	
Leu	Ser	Thr	Cys	His	Ile	Glu	Gly	Asp	Asp	Leu	His	Ile	Gln	Arg	Asn	130	135	140	
Val	Gln	Lys	Leu	Lys	Asp	Thr	Val	Lys	Lys	Leu	Gly	Glu	Ser	Gly	Glu	145	150	155	160
Ile	Lys	Ala	Ile	Gly	Glu	Leu	Asp	Leu	Leu	Phe	Met	Ser	Leu	Arg	Asn	165	170	175	
Ala	Cys	Ile																	

Lisboa, 9 de Janeiro de 2008

REIVINDICAÇÕES

1. Um polinucleótido compreendendo uma sequência nucleotídica seleccionada do grupo consistindo:

(a) na sequência nucleotídica de SEQ ID NO:1;

(b) na sequência nucleotídica de SEQ ID NO:1, desde o nucleótido 65 até ao nucleótido 601;

(c) na sequência nucleotídica de uma sequência codificadora da proteína de tamanho completo do clone hGIL-19/AE289, depositado com o número de acesso ATCC 207231;

(d) na sequência nucleotídica de uma sequência codificadora da proteína madura do clone HGIL-19/AE289, depositado com o número de acesso ATCC 207231;

(e) numa sequência nucleotídica codificadora de uma proteína, compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2;

(f) numa sequência nucleotídica codificadora de uma proteína, compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2, aproximadamente entre o aminoácido 34 e o aminoácido 179; e

(g) numa sequência nucleotídica codificadora de uma proteína compreendendo um fragmento da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2, o fragmento compreendendo uma sequência de aminoácidos seleccionada do grupo consistindo nos aminoácidos 50-60, 63-81 e 168-177 de SEQ ID NO:2.

2. O polinucleótido da reivindicação 1, em que

o referido polinucleótido está operacionalmente ligado a pelo menos uma sequência de controlo da expressão.

3. Uma célula hospedeira transformada com o polinucleótido da reivindicação 2.

4. A célula hospedeira da reivindicação 3, em que a referida célula é uma célula de mamífero.

5. Um processo para a produção de uma proteína codificada pelo polinucleótido da reivindicação 2, processo esse que compreende:

(a) crescimento de uma cultura de uma célula hospedeira transformada com o polinucleótido da reivindicação 2 num meio de cultura adequado; e

(b) purificação da referida proteína a partir da cultura.

6. Uma proteína produzida de acordo com o processo da reivindicação 5.

7. Um polinucleótido codificador da proteína da reivindicação 6.

8. O polinucleótido da reivindicação 7, em que o polinucleótido compreende a sequência codificadora da proteína de tamanho completo, ou madura, do clone hGIL-19/AE289, depositado com o número de acesso ATCC 207231.

9. Uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo:

- (a) na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2;
- (b) num fragmento da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2, o fragmento compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo nos aminoácidos 50-60, 63-81 e 168-177 de SEQ ID NO:2;
- (c) na sequência de aminoácidos codificada por uma sequência codificadora da proteína de tamanho completo do clone hGIL-19/AE289, depositado com o número de acesso ATCC 207231;
- (d) na sequência de aminoácidos codificada por uma sequência codificadora da proteína madura do clone hGIL-19/AE289, depositado com o número de acesso ATCC 207231; e
- (e) a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2, aproximadamente entre o aminoácido 34 e o aminoácido 179.

10. A proteína da reivindicação 9, em que a referida proteína compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2.

11. Uma composição compreendendo a proteína da reivindicação 9 e um veículo farmacêuticamente aceitável.

12. O polinucleótido da reivindicação 1, em que o polinucleótido compreende a sequência nucleotídica de SEQ ID NO:1.

13. O polinucleótido da reivindicação 1, em que o polinucleótido compreende a sequência nucleotídica de SEQ ID NO:1, entre o nucleótido 65 e o nucleótido 601.

14. O polinucleótido da reivindicação 1, em que o polinucleótido compreende a sequência nucleotídica de uma sequência codificadora da proteína de tamanho completo do clone hGIL-19/AE289, depositado com o número de acesso ATCC 207231.

15. O polinucleótido da reivindicação 14, em que a sequência codificadora da proteína de tamanho completo é codificada pela inserção de cDNA do clone hGIL-19/AE289, depositado com o número de acesso ATCC 207231.

16. O polinucleótido da reivindicação 1, em que o polinucleótido compreende a sequência nucleotídica de uma sequência codificadora da proteína madura de hGIL-19/AE289, depositado com o número de acesso ATCC 207231.

17. O polinucleótido da reivindicação 16, em que a sequência codificadora da proteína madura é codificada pela inserção de cDNA do clone hGIL-19/AE289, depositado com o número de acesso ATCC 207231.

18. O polinucleótido da reivindicação 1, em que o polinucleótido codifica uma proteína compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2.

19. O polinucleótido da reivindicação 1, em que o polinucleótido codifica uma proteína compreendendo um fragmento da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2, o fragmento compreendendo uma sequência de aminoácidos seleccionada do grupo consistindo nos aminoácidos 50-60, 63-81 e 168-177 de SEQ ID NO:2.

20. A proteína da reivindicação 9, em que a proteína compreende um fragmento da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2, o fragmento compreendendo uma sequência de aminoácidos seleccionada do grupo consistindo nos aminoácidos 50-60, 63-81 e 168-177 de SEQ ID NO:2.

21. A proteína da reivindicação 9, em que a proteína compreende a sequência de aminoácidos codificada por uma sequência de aminoácidos codificadora da proteína de tamanho completo do clone hGIL-19/AE287, depositado com o número de acesso ATCC 207231.

22. Um anticorpo ou seu fragmento que se liga a uma proteína da reivindicação 9, 10, 20 ou 39.

23. O anticorpo da reivindicação 22, que é um anticorpo neutralizante.

24. O anticorpo da reivindicação 22, que é seleccionado do grupo consistindo num anticorpo monoclonal, um anticorpo policlonal, um anticorpo quimérico, um anti-

corpo de cadeia simples, um anticorpo com enxerto de CDR e um anticorpo humanizado.

25. O anticorpo da reivindicação 22, que é um anticorpo humano.

26. O anticorpo da reivindicação 24 ou 25, que é um anticorpo monoclonal.

27. Utilização de um anticorpo de qualquer uma das reivindicações 22-26 para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento ou prevenção de artrite.

28. A utilização da reivindicação 27, em que a artrite é artrite reumatóide.

29. O polinucleótido da reivindicação 1, em que o polinucleótido compreende uma sequência de nucleótidos que codifica uma proteína tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2, aproximadamente entre os aminoácidos 34 e 179.

30. A proteína da reivindicação 21, em que a sequência codificadora da proteína de tamanho completo é codificada pela inserção de cDNA do clone hGIL-19/AE289, depositado com o número de acesso ATCC 207231.

31. A proteína da reivindicação 9 em que a proteína compreende a sequência de aminoácidos codificada

pela sequência codificadora da proteína madura do clone hGIL-19/AE289, depositado com o número de acesso ATCC 207231.

32. A proteína da reivindicação 31, em que a sequência codificadora da proteína madura é codificada pela inserção de cDNA do clone hGIL-19/AE289, depositado com o número de acesso ATCC 207231.

33. A proteína da reivindicação 9, em que a proteína compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2, aproximadamente entre os aminoácidos 34 e 179.

34. Um polinucleótido compreendendo uma sequência de nucleótido que híbrida em condições restritivas com SEQ ID NO:1 ou com a sua sequência complementar.

35. Uma proteína codificada por uma sequência nucleotídica que híbrida em condições altamente restritivas com a sequência complementar de SEQ ID NO:1.

36. Um polinucleótido codificador de um fragmento de uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo nos aminoácidos 50-60, 63-81 e 168-177 de SEQ ID NO:2.

37. Um fragmento de uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo nos aminoácidos 50-60, 63-81 e 168-177 de SEQ ID NO:2.

38. Uma composição compreendendo o anticorpo, ou seu fragmento, da reivindicação 22.

39. Uma proteína de fusão compreendendo a proteína da reivindicação 20 fundida com uma molécula veículo.

40. A proteína de fusão da reivindicação 39, em que a molécula veículo é uma imunoglobulina ou fragmento Fc de uma imunoglobulina.

41. A proteína de fusão da reivindicação 40, em que a proteína da reivindicação 20 é fundida com a molécula veículo através de uma sequência de ligação.

42. A proteína de fusão da reivindicação 40, em que a imunoglobulina é uma imunoglobulina IgG ou IgM.

43. A proteína de fusão da reivindicação 42, em que a imunoglobulina é uma imunoglobulina IgG.

Lisboa, 9 de Janeiro de 2008

Espécie: Mus moleculares Tecidos:Baço Tipo Celular:NA

```

1  GAATTCGGCC AAAGAGGCCT ACCTAAACAG GCTCTCCTCT CAGTTATCAA
51  CTGTTGACAC TTGTGCGATC TCTGATGGCT GTCCTGCAGA AATCTATGAG
101 TTTTTCCTT ATGGGGACTT TGGCCGCCAG CTGCCTGCTT CTCATTGCCC
151 TGTGGGCCCCA GGAGGCCAAAT GCGCTGCCCG TCAACACCCG GTGCAAGCTT
201 GAGGTGTCCA ACTTCCAGCA GCCATACATC GTCAACCGCA CCTTTATGCT
251 GGCCAAGGAG GCCAGCCTTG CAGATAACAA CACAGATGTC CGGCTCATCG
301 GGGAGAAACT GTTCCGAGGA GTCAGTGCTA AGGATCAGTG CTACCTGATG
351 AAGCAGGTGC TCAACTTCAC CCTGGAAGAC GTTCTGCTCC CCCAGTCAGA
401 CAGGTTCCAG CCCTACATGC AGGAGGTGGT GCCTTTCCTG ACCAAACTCA
451 GCAATCAGCT CAGCTCCTGT CACATCAGCG GTGACGACCA GAACATCCAG
501 AAGAATGTCA GAAGGCTGAA GGAGACAGTG AAAAAGCTTG GAGAGAGTGG
551 AGAGATCAAG GCGATTGGGG AACTGGACCT GCTGTTTATG TCTCTGAGAA
601 ATGCTTGCGT CTGAGCGAGA AGAAGCTAGA AAACGAAGAA CTGCTCCTTC
651 CTGCCTTCTA AAAAGAACAA TAAGATCCCT GAATGGACTT TTTTACTAAA
701 GGAAAGTGAG AAGCTAACGT CCATCATTAT TAGAAGATTY CACATGAAAC
751 CTGSGTCAGT TGAAAAAGAA AATAGTGTCA AGTTGTCCAT GAGACCAGAG
801 GTAGACTTGA TAACCACAAA GATTCATTGA CAATATTTTA TTGTCACTGA
851 TGATACAACA GAAAAATAAT GTACTTTAAA AAATTGTTTG AAAGGAGGTT
901 ACCTCTCATT CCTTTAGAAA AAAAGCTTAT GTAAC TTCAT TCCATAACC
951 AATATTTTAT ATATGTAAGT TTATTTATTA TAAGTATACA TTTTATTTAT
1001 GTCAGTTTAT TAATATGGAT TTATTTATAG AAACATTATC TGCTATTGAT
1051 ATTTAGTATA AGGCAAATAA TATTTATGAC AATAACTATG GAAACAAGAT
1101 ATCTTAGGCT TTAATAAACA CATGGATATC ATAAAAA AAAA
1151 AAAAAAAGC GGCCGC

```

Figura 1

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- US 5536637 A
- EP 0649484 B1
- US 5484784 A
- US 5487992 A
- US 5627059 A
- US 5631153 A
- US 5614396 A
- US 5616491 A
- US 5679523 A
- US 4518584 A
- WO 9516035 A
- WO 9505846 A
- WO 9107491 A
- US 4798885 A
- US 4235871 A
- US 4501728 A
- US 4637328 A
- US 4737323 A
- WO 5169339 A
- WO 5194594 A
- WO 5576184 A
- US 5530101 A
- US 5586089 A
- US 5693762 A
- US 5877397 A
- US 5625126 A
- WO 60131473 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- H.U. SARAGOVI et al. *BioTechnology*, 1992, vol. 10, 773-778
- R.S. MCDOWELL et al. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1992, vol. 114, 9245-9253
- ALBERT ; MORRIS. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1994, vol. 15 (7), 250-254
- LAVAROSKY et al. *Biochem. Mol. Med*, 1997, vol. 62 (1), 11-22
- HAMPEL. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 1998, vol. 58, 1-39
- PLASTERK. *Bioessays*, 1992, vol. 14 (9), 629-633
- ZWAAL et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90 (16), 7431-7435
- CLARK et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91 (2), 719-722
- MANSOUR et al. *Nature*, 1988, vol. 336, 348-352
- Local alignment statistics. ALTSCHUL ; GISH. *Methods in Enzymology*, 1996, vol. 266, 460-480
- ALTSCHUL et al. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 1990, vol. 215, 403-410
- GISH ; STATES. Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nature Genetics*, 1993, vol. 3, 266-272
- KARLIN ; ALTSCHUL. Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 5873-5877
- O'BRIEN ; SEUÁÑEZ. *Ann. Rev. Genet.*, 1988, vol. 22, 323-351
- O'BRIEN et al. *Nature Genetics*, 1993, vol. 3, 103-112
- JOHANSSON et al. *Genomics*, 1995, vol. 25, 682-690
- LYONS et al. *Nature Genetics*, 1997, vol. 15, 47-56
- O'BRIEN et al. *Trends in Genetics*, 1997, vol. 13 (10), 393-399
- CARVER ; STUBBS. *Genome Research*, 1997, vol. 7, 1123-1137
- SAMBROOK, J. ; E.F. FRITSCH ; T. MANIATIS. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc, 1995
- KAUFMAN et al. *Nucleic Acids Res.*, 1991, vol. 19, 4485-4490
- R. KAUFMAN. *Methods in Enzymology*, 1990, vol. 185, 537-566
- SUMMERS ; SMITH. *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555*. 1987
- GYURIS et al. *Cell*, 1993, vol. 75, 791-803
- ROSSI et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 94, 8405-8410
- *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- *Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques*. Academic Press, 1987

- Current Protocols in Immunology. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience
- TAKAI et al. *J. Immunol.*, 1986, vol. 137, 3494-3500
- BERTAGNOLLI et al. *J. Immunol.*, 1990, vol. 145, 1708-1712
- BERTAGNOLLI et al. *Cellular Immunology*, 1991, vol. 133, 327-341
- BERTAGNOLLI et al. *J. Immunol.*, 1992, vol. 149, 3778-3783
- BOWMAN et al. *J. Immunol.*, 1994, vol. 152, 1756-1761
- KRUISBEEK, A.M. ; SHEVACH, E.M. Current Protocols in Immunology. John Wiley and Sons, 1994, vol. 1, 3.12.1-3.12.14
- SCHREIBER, R.D. Current Protocols in Immunology. John Wiley and Sons, 1994, vol. 1, 6.8.1-6.8.8
- BOTTOMLY, K. ; DAVIS, L.S. ; LIPSKY, P.E. Current Protocols in Immunology. John Wiley and Sons, 1991, vol. 1, 6.3.1-6.3.12
- DEVRIES et al. *J. Exp. Med.*, 1991, vol. 173, 1205-1211
- MOREAU et al. *Nature*, 1988, vol. 336, 690-692
- GREENBERGER et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1983, vol. 80, 2931-2938
- NORDAN, R. Current Protocols in Immunology. John Wiley and Sons, 1991, vol. 1, 6.6.1-6.6.5
- SMITH et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1986, vol. 83, 1857-1861
- BENNETT, F. ; GIANNOTTI, J. ; CLARK, S.C. ; TURNER, K. J. Current Protocols in Immunology. John Wiley and Sons, 1991, vol. 1, 6.15.1
- CIARLETTA, A. ; GIANNOTTI, J. ; CLARK, S.C. ; TURNER, K.J. Current Protocols in Immunology. John Wiley and Sons, 1991, vol. 1, 6.13.1
- WEINBERGER et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 6091-6095
- WEINBERGER et al. *Eur. J. Immun.*, 1981, vol. 11, 405-411
- TAKAI et al. *J. Immunol.*, 1988, vol. 140, 508-512
- LENSCHOW et al. *Science*, 1992, vol. 257, 789-792
- TURKA et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 11102-11105
- Fundamental Immunology. Raven Press, 1989, 846-847
- Fundamental Immunology. Raven Press, 1989, 840-850
- HERRMANN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, vol. 78, 2488-2492
- HERRMANN et al. *J. Immunol.*, 1982, vol. 128, 1968-1974
- HANDA et al. *J. Immunol.*, 1985, vol. 135, 1564-1572
- BOWMAN et al. *J. Virology*, vol. 61, 1992-1998
- BROWN et al. *J. Immunol.*, 1994, vol. 153, 3079-3082
- MALISZEWSKI. *J. Immunol.*, 1990, vol. 144, 3028-3033
- MOND, J.J. ; BRUNSWICK, M. Current Protocols in Immunology. John Wiley and Sons, 1994, vol. 1, 3.8.1-3.8.16
- QUERY et al. *J. Immunol.*, 1995, vol. 154, 536-544
- INABA et al. *Journal of Experimental Medicine*, 1991, vol. 173, 549-559
- MACATONIA et al. *Journal of Immunology*, 1995, vol. 154, 5071-5079
- PORGADOR et al. *Journal of Experimental Medicine*, 1995, vol. 182, 255-260
- NAIR et al. *Journal of Virology*, 1993, vol. 67, 4062-4069
- HUANG et al. *Science*, 1994, vol. 264, 961-965
- MACATONIA et al. *Journal of Experimental Medicine*, 1989, vol. 169, 1255-1264
- BHARDWAJ et al. *Journal of Clinical Investigation*, 1994, vol. 94, 797-807
- INABA et al. *Journal of Experimental Medicine*, 1990, vol. 172, 631-640
- DARZYNKIEWICZ et al. *Cytometry*, 1992, vol. 13, 795-808
- GORCZYCA et al. *Leukemia*, 1993, vol. 7, 659-670
- GORCZYCA et al. *Cancer Research*, 1993, vol. 53, 1945-1951
- ITOH et al. *Cell*, 1991, vol. 66, 233-243
- ZACHARCHUK. *Journal of Immunology*, 1990, vol. 145, 4037-4045
- ZAMAI et al. *Cytometry*, 1993, vol. 14, 891-897
- GORCZYCA et al. *International Journal of Oncology*, 1992, vol. 1, 639-648
- ANTICA et al. *Blood*, 1994, vol. 84, 111-117
- FINE et al. *Cellular Immunology*, 1994, vol. 155, 111-122
- GALYET. *Blood*, 1995, vol. 85, 2770-2778
- TOKI et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 7548-7551
- JOHANSSON et al. *Cellular Biology*, 1995, vol. 15, 141-151
- KELLER et al. *Molecular and Cellular Biology*, 1993, vol. 13, 473-486
- MCCLANAHAN et al. *Blood*, 1993, vol. 81, 2903-2915
- FRESHNEY, M.G. et al. Culture of Hematopoietic Cells. Wiley-Liss, Inc, 1994, 265-288
- HIRAYAMA et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 5907-5911
- MCNIECE, I.K. ; BRIDDELL, R.A. et al. Culture of Hematopoietic Cells. Wiley-Liss, Inc, 1994, 23-39

- NEBEN et al. *Experimental Hematology*, 1994, vol. 22, 353-359
- PLOEMACHER, R.E. et al. *Culture of Hematopoietic Cells*. Wiley-Liss, Inc, 1994, 1-21
- SPOONCE, E. ; DEXTER, M. ; ALLEN, T. et al. *Culture of Hematopoietic Cells*. Wiley-Liss, Inc, 1994, 163-179
- SUTHERLAND, H.J. et al. *Culture of Hematopoietic Cells*. Wiley-Liss, Inc, 1994, 139-162
- WINTER. *Epidermal Wound Healing*. Year Book Medical Publishers, 71-112
- EAGLSTEIN ; MERTZ. *J. Invest. Dermatol*, 1978, vol. 71, 382-84
- VALE et al. *Endocrinology*, 1972, vol. 91, 562-572
- LING et al. *Nature*, 1986, vol. 321, 779-782
- VALE et al. *Nature*, 1986, vol. 321, 776-779
- MASON et al. *Nature*, 1985, vol. 318, 658-663
- FORAGE et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, vol. 83, 3091-3095
- TAUB et al. *J. Clin. Invest.*, 1995, vol. 95, 1370-1376
- LIND et al. *APMIS*, 1995, vol. 103, 140-146
- MULLER et al. *Eur. J. Immunol.*, vol. 25, 1744-1748
- GRUBER et al. *J. of Immunol.*, 1994, vol. 152, 5860-5867
- JOHNSTON et al. *J. of Immunol.*, 1994, vol. 153, 1762-1768
- LINET et al. *J. Clin. Pharmacol.*, 1986, vol. 26, 131-140
- BURDICK et al. *Thrombosis Res.*, 1987, vol. 45, 413-419
- HUMPHREY et al. *Fibrinolysis*, 1991, vol. 5, 71-79
- SCHAUB. *Prostaglandins*, 1988, vol. 35, 467-474
- TAKAI et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 6864-6868
- BIERER et al. *J. Exp. Med.*, 1988, vol. 168, 1146-1156
- ROSENSTEIN et al. *J. Exp. Med.*, 1989, vol. 169, 149-160
- STOLTENBORG et al. *J. Immunol. Methods*, 1994, vol. 175, 59-68
- STITT et al. *Cell*, 1995, vol. 80, 661-670
- HORTSCH et al. *J Biol Chem*, 1995, vol. 270 (32), 18809-18817
- MIYAKI et al. *Oncogene*, 1995, vol. 11, 2547-2552
- OZAWA et al. *Cell*, 1990, vol. 63, 1033-1038
- GODING. *Monoclonal antibodies: principles and practice*. Academic Press Inc, 1983
- Production of Monoclonal Antibodies. YOKOYAMA. *Current Protocols in Immunology*. Greene Publishing Assoc. and John Wiley & Sons, 1992
- Fragmentation of Immunoglobulins. ANDREW et al. *Current Protocols in Immunology*. Greene Publishing Assoc. and John Wiley & Sons, 1992
- FISHWILD et al. *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 845-851
- MENDEZ et al. *Nature Genetics*, 1997, vol. 15, 146-156
- *Nature Genetics*, vol. 16, 410
- R.P. MERRIFIELD. *J. Amer.Chem.Soc.*, 1963, vol. 85, 2149-2154
- J.L. KRSTENANSKY et al. *FEBS Lett.*, 1987, vol. 211, 10
- DUMOUTIER et al. *J. of Immunology*, 2000, vol. 164, 1814-1819
- SYRBE et al. *Springer Seminars in Immunopathology*, 1999, vol. 21, 263-85