



(11) Número de Publicação: PT 585681 E

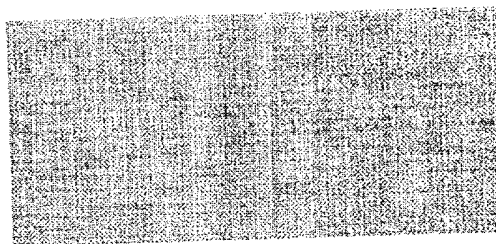
(51) Classificação Internacional: (Ed. 6)  
A61K038/17 A

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

|                                                                 |                                                                                                       |                      |
|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| (22) Data de depósito: 1993.08.12                               | (73) Titular(es):<br>HOECHST AKTIENGESSELLSCHAFT<br>D-65 926 - FRANKFURT/MAIN                         | DE                   |
| (30) Prioridade: 1992.08.31 DE 4228941<br>1993.07.05 DE 4322330 | (72) Inventor(es):<br>KARLHEINZ ENSSLE<br>ROLAND KURRLE<br>LEANDER LAUFFER<br>FRIEDRICH-ROBERT SEILER | DE<br>DE<br>DE<br>DE |
| (43) Data de publicação do pedido:<br>1994.03.09                | (74) Mandatário(s):<br>PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA<br>RUA DO PATROCÍNIO, 94 1350 LISBOA              | PT                   |
| (45) Data e BPI da concessão:<br>2001.06.20                     |                                                                                                       |                      |

(54) Epígrafe: UTILIZAÇÃO DO RECEPTOR DE IL-4 PARA TERAPIA, PROFILAXIA E DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS

(57) Resumo:



PTE 585681

f L A

## DESCRIÇÃO

### "UTILIZAÇÃO DO RECEPTOR DE IL-4 PARA TERAPIA, PROFILAXIA E DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS"

A terapia e a profilaxia de muitas doenças virais, parasitárias e bacterianas representa como sempre um grande problema. A presente invenção refere-se à utilização do receptor de IL-4 ou de derivados deste para a preparação de um medicamento para a terapia, a profilaxia e o diagnóstico destas doenças.

Numa doença viral, parasitária ou bacteriana é sabido que no respectivo decurso ocorrem alterações nas subpopulações dos linfócitos e dos monócitos. Estas alterações consistem por exemplo na ocorrência de proliferação das chamadas células auxiliares T do tipo 2 (no que se segue designadas por células TH2). As células T podem em geral ser divididas em subpopulações com base nos marcadores de superfície e com base na respectiva função. Deste modo os linfócitos auxiliares T possuem por exemplo moléculas superficiais CD4 e segregam citocinas após a sua activação.

Após estimulação em ratos, por exemplo com o antígeno bacteriano de *Brucella abortus* ou com *Mycobacterium tuberculosis*, encontram-se após clonagem de células auxiliares T principalmente clones que segregam linfoquinas, interferão gama e interleucina-2 mas poucos ou nenhuns que segregam interleucina-4, interleucina-5, interleucina-6 e interleucina-10 (células auxiliares T do tipo conhecido como TH1).

Após infecção de, por exemplo, ratos susceptíveis com agentes parasitários como *Leishmania major*, ocorrem na clonagem de células auxiliares T principalmente clones que produzem

f l A

interleuquina-4, interleuquina-5 e interleuquina-10 após proliferação, mas quantidades reduzidas ou não detectáveis de interleuquina-2 e interferão gama (células auxiliares T do tipo TH2) (Mosmann et al., Immunological Reviews 1991, n.º 123, 209-229; S. Romagnani, Immunology Today, 256-257, vol. 12, n.º 8 1991).

Esta ocorrência de proliferação de linfócitos TH2 foi já detectada em algumas doenças infecciosas em animais e em doentes humanos (Else e Grencis, Parasitology Today, vol. 7. n.º 11, 1991, pp. 313-316; Parasitology Today, vol. 7. n.º 10, 1991, p. 261) e reflecte-se também em parâmetros secundários. Deste modo, ratos infectados com Leishmania major mostram em geral uma produção reduzida de interferão gama, uma IgE no soro aumentada e eosinofilia.

Nos seres humanos afectados por exemplo por lepra lepromatósica, leishmaniose e esquistossomíase e infecções com Mycobacterium tuberculosis encontram-se em geral concentrações muito elevadas de IgE no soro destes doentes em comparação com o soro de pessoas normais. Nas infecções parasitárias observa-se frequentemente uma eosinofilia no decurso da doença.

Verificou-se agora que infecções que se caracterizam por meio da ocorrência de proliferação de células auxiliares T do tipo TH2 podem ser diagnosticadas e tratadas terapêuticamente e/ou profilacticamente com o auxílio do IL-4R ou de derivados deste.

O objecto da presente invenção é por conseguinte a utilização do receptor de IL-4 ou de derivados deste para a preparação de um medicamento para a terapia e/ou profilaxia ou para a preparação de um meio de diagnóstico para detectar infecções nas quais ocorre uma proliferação de células auxiliares T do tipo TH2.

Por "derivados" do IL-4R no sentido da presente invenção

f L A

entendem-se fracções, mutantes ou variantes equivalentes funcionais do IL 4R, em especial as fracções extracelulares do IL-4R, principalmente do ácido aminado 1 até aproximadamente ao 209 da proteína madura do receptor humano de IL-4 mas também os respectivos mutantes de glicosilação. Para a utilização de acordo com a presente invenção do receptor podem também ser empregues proteínas de fusão que contêm o IL-4R ou os seus derivados bem como outras proteínas ou fracções de proteínas, de preferência a fracção Fc de anticorpos (proteínas de fusão IL-4R/Fc). Para além disso, podem ser empregues o IL-4R ou derivados ou proteínas de fusão do mesmo em preparados de combinação para o diagnóstico, a terapia e/ou o tratamento profilático das doenças referidas, de preferência em combinação com interferão gama.

Também é vantajosa uma terapia em combinação com alérgenos purificados ou fracções destes.

Além disso é vantajosa uma terapia em combinação com interferão gama e/ou substâncias que bloqueiam a interacção da molécula de superfície das células CD40 com o seu ligando, o ligando da molécula de superfície das células CD40, de preferência uma variante solúvel da própria molécula de superfície CD40, como p. ex. uma proteína de fusão CD40-Ig correspondente à descrição que se segue ou os seus derivados.

Por "derivados" de uma variante solúvel da molécula de superfície CD40 no sentido da presente invenção compreende-se uma fracção ou variante funcional equivalente que bloqueia a interacção de CD40 celular com o ligando da molécula de superfície celular CD40.

Entre as doenças contam-se infecções, em especial infecções virais, bacterianas e parasitárias bem como infecções por fungos; de preferência infecções com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), por micobactérias, principalmente por *Mycobacterium leprae*, com *Listeria*, com protozoários,

f l A

principalmente dos géneros Leishmania e Plasmodium, com helmintos, principalmente dos géneros esquistossoma, Nippostrongylus e Heligmosomoides com Trichurida, Trichinella, Taenis (Cysticercus), Candida e Aspergillus.

As formas de aplicação são em geral diferentes nas diversas doenças. Deste modo, por exemplo, a aplicação tópica pode ser vantajosa em algumas doenças. Por exemplo, na conjuntivite é conveniente a aplicação de gotas oftálmicas, uma vez que as células TH2 patológicas podem principalmente ser detectadas topicamente.

Foi anteriormente descrito que o receptor humano de IL-4 é constituído no seu conjunto por 825 ácidos aminados (Idzerda, R.J. et al. (1990) J. Exp. Med. 171, 861-873). De acordo com Idzerda et al., retirados os 25 ácidos aminados N-terminais como peptídeo de sinal, o receptor de IL-4 humano maduro é constituído por 800 ácidos aminados e apresenta uma estrutura em três domínios que são 1) o domínio extracelular (207 ácidos aminados), 2) a região transmembrana (cerca de 24 ácidos aminados) e 3) o domínio citoplasmático (569 ácidos aminados). É especialmente vantajosa uma preparação do receptor de IL-4 por manipulação genética, uma vez que é possível deste modo obter sem mais as quantidades de substância necessárias para a terapia.

A preparação do IL-4R pode por exemplo ser efectuada de acordo com o pedido de Patente Internacional WO90/05183. Segundo este, prepara-se um banco genético de ADNc por exemplo da linha de células T designada por T22 e submete-se a busca com uma sonda de ADNs específica para IL-4R. Como sonda pode utilizar-se o ADNc de uma linha de células de rato híbrido subtraído descrito em WO90/05183. É possível no entanto utilizar também uma sonda de hibridação específica para IL-4R, por exemplo uma ou várias sondas de cerca de 20 nucleótidos de comprimento das posições 193 a 210, por exemplo, para busca do banco de ADNc. Após a verificação dos clones positivos de ADNc

f l A

específicos em relação a IL-4R, p. ex. por sequenciação, o ADN de IL-4R encontrado pode ser clonado em vectores de expressão adequados, p. ex. pCAV/NOT (W090/05183) e pode ser expresso integral ou parcialmente em células hospedeiras apropriadas, p. ex. células COS-7; BHK-21 ou CHO. Se se utiliza para a expressão apenas a fracção do ADNC que codifica para a região extracelular do receptor de IL-4, a região extracelular do receptor de interleuquina 4 em geral de células transfectadas é segregada para o meio de cultura. Para este fim, o ADNC é modificado por métodos de manipulação genética correspondentes ao estado da técnica de tal modo que após a sequência de codificação para a região extracelular de um receptor, ou a fracção pretendida deste, se introduz um codão de paragem e o ADNC modificado deste modo é clonado num vector de expressão apropriado (Maliszewski et al. (1990), J. Immunol. 144, 3028-3033; Dower et al. (1989), J. Immunol. 142, 4314). Em muitos casos, como p. ex. no caso do receptor de IL-4 murino, isolam-se ADNCs que codificam para uma forma segregada de ocorrência natural do receptor (Mosley et al. (1989), Cell 59, 335). Estes ADNCs podem então ser utilizados directamente para a preparação de vectores de expressão. A proteína segregada pode ser purificada a partir do meio de cultura por exemplo por meio de cromatografia de afinidade com ligandos ou cromatografia de afinidade imunológica utilizando anticorpos monoclonais (Maliszewski et al. (1990), J. Immunol. 144, 3028-3033). Conforme se encontra descrito no pedido de Patente Europeia EP-A1-0 464 533, podem-se preparar ainda por via de tecnologia genética proteínas de fusão entre o IL-4R ou derivados deste e outras proteínas, por exemplo com fracções de imunoglobulinas, p. ex. a fracção Fc de moléculas de anticorpos, e aquelas (doravante designadas por IL-4R/Fc) podem ser levadas a expressão. A vantagem das proteínas de fusão deste tipo reside em prolongamento do tempo de semi-vida e numa concentração e purificação mais fácil por meio de cromatografia de afinidade com proteína A-Sepharose.

Em virtude da purificação sem problemas por cromatografia

f. L. A.

de afinidade e das propriedades farmacocinéticas eventualmente melhoradas, a síntese de formas solúveis do receptor de IL-4 sob a forma de proteínas de fusão com imunoglobulinas é particularmente vantajosa.

A proteína CD40 é uma proteína de membrana do tipo I, isto é, é constituída por uma região extracelular (aminoterminal), uma região transmembrana e uma região citoplasmática (carboxi-terminal). O ADNc que codifica para CD40 pode ser isolado por exemplo a partir de um banco de ADNc de células Raji por meio do método de "Panning" (Stamenkovic, I. et al. (1989) EMBO J., vol. 8, pp. 1403-1410). A fim de provocar a expressão da proteína de membrana de um modo normal sob a forma solúvel, existem diversas possibilidades bem conhecidas dos especialistas. Por exemplo, é possível introduzir um codão de paragem por meio de uma reacção de cadeia de polimerase utilizando um iniciador de mutagénese na extremidade da sequência de ADNc que codifica para a região extracelular. O ADNc modificado deste modo codifica então para uma proteína CD40 que é segregada para fora das células como outras proteínas de secreção em virtude da falta de ancoragem à membrana (Fanslow, W.C. et al. (1992) J. Immunol., pp. 655-660). Pode também ser vantajosa a utilização de proteínas de fusão solúveis recombinantes com imunoglobulinas, cuja preparação é por exemplo descrita em EP-A-0 464 533. São em especial conhecidas da literatura proteínas de fusão CD40/Ig (Fanslow et al. (1992) J. Immunol., vol. 149, pp. 655-660 e Noelle et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 89, pp. 6550-6554). Em ambas as publicações são descritas proteínas de fusão CD40/Ig constituídas pela região extracelular de CD40 fundida aos domínios de charneira, CH2 e CH3 da cadeia pesada de uma molécula G1 de imunoglobulina humana. Para a preparação da construção de ADN correspondente, introduzem-se no ADNc de CD40 locais de corte por restrição por meio de reacções em cadeia de polimerase utilizando iniciadores mutagénicos (Fanslow et al., (1992) J. Immunol., vol. 149, pp. 655-660) ou utilizam-se locais de corte por restrição de ocorrência natural

no ADNC de CD40 (Noelle et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 89, pp. 6550-6554).

As formas solúveis de CD40 podem ser expressas como proteínas recombinantes em sistemas procarióticos ou eucarióticos conhecidos, de preferência porém em culturas de células de mamífero, e podem ser purificadas a partir dos sobrenadantes da cultura ou dos restos celulares por meio de métodos convencionais. Abstraindo de uma possível utilização terapêutica directa das moléculas solúveis de CD40, estas podem a partir de agora ser também empregues para a identificação de outras substâncias que bloqueiam a interacção de CD40 de membrana e de ligandos de CD40 e deste modo apresentam igualmente um potencial terapêutico. Isto pode ocorrer por exemplo em ensaios de ligação de receptores isentos de células (EP-A-0 488 170), em que as moléculas solúveis de CD40 são integradas numa fase sólida e a ligação de ligandos solúveis de CD40 é efectuada por meio de marcação ou de anticorpos adequados. Estes ensaios oferecem em virtude da sua possibilidade de automatização a possibilidade de investigar uma grande quantidade de substâncias no que se refere à sua interacção com CD40/ligandos de CD40 ("escrutínio de receptores").

Para os exemplos que se apresentam em seguida utilizaram-se as regiões extracelulares definidas em Idzerda et al. (1990, J. Exp. Med. 171, 861-873) ou Maliszewski et al. (1990, J. Immunol. 144, 3028-3033) ou as formas solúveis de ocorrência natural do receptor de IL-4 humano ou murino (daqui em diante designado por huIL-4R ou muIL-4R, respectivamente), que após dupla selecção com metotrexato e G418 (EP-A 0330 977) são segregadas sob a forma de proteínas solúveis para o meio de cultura pelas células BHK que expressam de forma estável e são purificadas por meio de cromatografia de imuno-afinidade. Para este fim utilizam-se proteínas de fusão receptor/imunoglobulina (EP-A1-0 464 533) que são constituídas pela região extracelular do receptor humano ou murino de IL-4 com domínios de charneira,

f. L. A.

CH2 e CH3 de uma molécula de IgG2b humana ou murina, respectivamente (Zettlmeier et al. (1990) ADN and Cell Biol. 9, 347-353) (daqui em diante designadas por huIL-4R/Fc e muIL-4R/Fc, respectivamente) e igualmente após expressão em células BHK são purificadas por meio de cromatografia de afinidade com proteína A-Sepharose.

A interleuquina-4 de cada espécie homóloga é neutralizada numa análise biológica por IL-4R e IL-4R/Fc com igual eficácia.- (Exemplo 1). Foi possível para além disso detectar a inibição de clones de células T humanas do tipo TH2 por meio de huIL-4R/Fc também *in vitro*. A IL-4 formada *in vitro* por meio deste clone foi neutralizada por huIL-4R/Fc. Daqui resulta como consequência uma redução da proliferação. Clones de controlo do tipo TH1 não foram influenciados no seu crescimento por huIL-4R/Fc (Exemplo 3).

Para além disso, verificou-se que a proteína huIL-4R/Fc pode reprimir *in vitro* a síntese induzida por IL-4 e também surpreendentemente a síntese específica em relação ao antigénio de IgE por meio das células mononucleares humanas do sangue periférico (Exemplo 2).

Surpreendentemente foi possível detectar para o receptor murino solúvel da interleuquina-4 um efeito terapêutico e profilático em infecções como por exemplo num modelo animal da listeriose murina e num modelo animal (rato) da infecção por *Cysticercus crassiceps*.

#### Exemplo 1

Actividade biológica das variantes humana e murina de IL-4R e IL-4R/Fc.

A actividade biológica foi medida por meio de uma análise biológica. A IL-4 liga-se fortemente de modo específico ao receptor de IL-4. A partir desta base, utilizou-se uma linha de

f. L. A.

células de origem murina e que apresenta nas membranas o receptor murino de IL-4. Esta linha de células foi transfectada com o gene completo para o receptor da interleuquina-4 humana. Os receptores de membrana murino e humano eram expressos de modo simultâneo funcionalmente por esta linha de células e a linha de células proliferou tanto na dependência da IL-4 murina como também da humana (Mosley et al., Cell, vol. 59, 335-348, 20 de Outubro de 1989).

Para a detecção de muIL-4R e de muIL-4R/Fc utilizou-se IL-4 murina (Quadro 1). A linha de células proliferou na dependência da IL-4 murina (Quadro 1). Quando se empregou interleuquina-4 de modo constante e se adicionou simultaneamente muIL-4R ou muIL-4R/Fc, resultou uma neutralização dependente da concentração da interleuquina-4. Uma vez que há pouca interleuquina-4 disponível para a linha de células, a proliferação retrocede. Uma proteína de controlo com a mesma fracção de Fc não apresenta este efeito. As diferenças nas inibições dependentes da concentração entre muIL-4R e muIL-4R/Fc no Quadro 1 são de atribuir aos diferentes pesos moleculares.

No Quadro 2 apresenta-se a bioactividade da interleuquina-4 humana e, de modo correspondente ao Quadro 1, o efeito de neutralização específica de huIL-4R ou huIL-4R/Fc.

As diferenças nas inibições dependentes da concentração entre huIL-4R e huIL-4R/Fc são de atribuir aos diferentes pesos moleculares.

### Exemplo 2

Isolaram-se células mononucleares humanas do sangue periférico. Cultivaram-se 5000 células por alvéolo numa placa de cultura de 96 alvéolos com 200 µl de meio de cultura de Iscove com 10 % de BSA durante 14 dias. No início não se utilizou qualquer aditivo para a cultura ou adicionaram-se

f L A

apenas 100 unidades SQ (segundo as instruções do fornecedor) de antígeno de ácaro (Derm. Pt., Art.º n.º Sq 503, Soc. Scherax, Hamburgo) ou antígeno de ácaro e 3 µg/ml de huIL-4R/Fc. Para controlo de Fc utilizou-se uma amostra com antígeno de ácaro e 3 µg/ml de TW1. TW1 é um anticorpo monoclonal humano com especificidade para o antígeno da raiva que apresenta o mesmo isótipo de huIL-4R/Fc. A preparação de TW1 foi levada a efeito de acordo com EP-0 445 625 A1. Em seguida separou-se o sobrenadante e ensaiou-se por ELISA em IgE humana. Verificou-se que a produção de IgE induzida por antígeno por meio de huIL-4R/Fc foi reprimida de modo específico (Quadro 3).

### Exemplo 3

Inibição da proliferação induzida por antígeno de clones de células T do subtipo TH2.

Isolaram-se clones de células T da pele de um doente com dermatite atópica. Uma fracção mais elevada dos clones segregaram após estimulação *in vitro* citocinas do tipo TH2 e apenas foi encontrada uma fracção reduzida de clones do tipo TH1. Os ensaios de proliferação foram efectuados em placas de microtitulação de 96 alvéolos com  $1 \times 10^4$  de células T clonadas e  $1 \times 10^5$  de PBL autólogos irradiados como células estimuladoras em meio de cultura de Iscove com 4 % de soro AB humano. A cultura foi levada a efeito durante 18 h com 0,5 µCi/concavidade de cultura de  $^3\text{H}$ -timidina em estufas de criação em atmosfera de  $\text{CO}_2$  a 37 °C. Após 18 h determinou-se a proliferação das células por meio da timidina incorporada. Para a produção de citocinas no sobrenadante, estimularam-se  $1 \times 10^6$ /ml de células T clonadas com meio de Iscove, 10 % de FCS e 10 µg/ml de concanavalina A em placas de cultura de 24 alvéolos. Os sobrenadantes foram retirados após 24 h de duração da cultura em estufas de criação em atmosfera de  $\text{CO}_2$  (37 °C). Ensaíram-se os sobrenadantes das culturas em análises biológicas no que se refere ao teor de interleuquina-2 humana e de interleuquina-4 humana. As análises biológicas foram baseadas em linhas de células que proliferam

f. L. A.

em dependência de interleuquina-2 humana ou de interleuquina-4 humana (Mosley et al. Cell, vol. 59, 335-348, 10 de Outubro de 1989). Nos sobrenadantes de um clone de TH2 não foi possível detectar qualquer IL-2, mas sim uma grande quantidade de IL-4. Por adição de 3 µg/ml de huIL-4R/Fc foi possível detectar em vez de 49 ng/ml de IL-4 apenas ainda 10 ng/ml de IL-4. Os sobrenadantes de um clone de TH1 continham em comparação muita IL-2, mas apenas pouca IL-4. A concentração de interleuquina-2 nos sobrenadantes do clone de TH1 não foi influenciada de modo significativo pela adição de huIL-4R/Fc durante a cultura. Em experiências de proliferação foi possível demonstrar que a proliferação do clone de TH2 é reprimida, ao contrário do que se passa com o clone de TH1, pela adição de 3 µg/ml de huIL-4R/Fc (Quadro 4). Além disso foi possível demonstrar que por adição de huIL-4R/Fc a proliferação específica em relação a um antigénio específica para ácaros do clone de TH2 é reprimida, mas não a do clone de TH1. Numa outra experiência foi possível demonstrar que a síntese de IgE induzida por antigénio de ácaro de uma mistura de um clone de TH2 com linfócitos B autólogos do mesmo doador pode ser reprimida por adição de huIL-4R/Fc.

#### Exemplo 4

Tratamento de uma infecção com *Cysticercus* (*Taenia*) *crassiceps* no rato com receptor de interleuquina-4 murina.

Para a experiência infectaram-se no dia 0 ratos NMRI com 15 a 25 g de peso corporal com 5 metacestóides simples por rato em 1 ml de PBS i.p. da estirpe de *Cysticercus* (*Taenia*) *crassiceps* MR-1. Utilizaram-se 10 animais por grupo da experiência. Um grupo não foi infectado para controlo (injecção de PBS sem metacestóides). Um grupo foi infectado, mas não foi tratado. Um grupo foi infectado e foi tratado nos dias -1, 0, 1, 7, 14, 20, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 63 com 100 µg em cada animal i.p. de muIL-4R. Um outro grupo foi infectado e foi tratado com huIL-4R como proteína de controlo de modo análogo ao do tratamento com muIL-4R. No dia 76 pesaram-se os animais e

f. L. A.

efectuou-se uma secção. Determinou-se em quais dos animais podiam ser encontrados na cavidade abdominal metacestóides. Nos animais positivos determinou-se o peso em húmido dos metacestóides encontrados por animal. No grupo que tinha sido tratado com o receptor da interleuquina-4 murina foi possível verificar uma redução nítida do peso total dos metacestóides (Quadro 5).

### Exemplo 5

Influência da muIL-4R sobre a infecção com *Candida albicans* murina

Infectaram-se ratos híbridos fêmeas (BALB/cCrxDBA/2Cr)F1 (CD2F1) com a estirpe altamente patogénica de *Candida albicans* CA-6 ( $5 \times 10^4$  células por via intravenosa) (dia 0 da experiência). Com início 24 horas antes da infecção cada animal recebeu 100 µg de muIL-4R em 250 µl de PBS por via intraperitoneal uma vez no dia -1, duas vezes em cada um dos dias 0 e 1 e uma vez em cada um dos dias 2 e 3. Os animais de controlo receberam em alternativa com o mesmo esquema albumina de soro de rato (MSA), huIL-4R ou PBS. Todos os animais que foram tratados com albumina de soro de rato (16 animais), huIL-4R (16 animais) e PBS (24 animais) desenvolveram uma infecção progressiva com *Candida* com um período de sobrevivência médio de 14 a 17 dias após infecção. Dos animais que foram tratados com muIL-4R (24 animais) sobreviveram 91,6 %. Estes animais sobreviventes foram infectados de novo 8 semanas após infecção com *Candida albicans* ( $10^6$  células). Todos os animais sobreviveram a esta nova infecção. Esta dose de infecção provocou em ratos normais não tratados uma infecção letal com períodos de sobrevivência de 2 a 3 dias após infecção.

f L A

Quadro 1

Bioactividade de receptores de IL-4 murina

Curva padrão de IL-4 murina

| ng/ml | CPM   | Desv. padr. |
|-------|-------|-------------|
| 100   | 46609 | 7,4         |
| 20    | 47809 | 8,1         |
| 0,4   | 43550 | 11,1        |
| 0,8   | 25534 | 7,9         |
| 0,16  | 8456. | 13,7        |
| 0,032 | 1987  | 10,7        |
| 0,064 | 901   | 12,4        |

1 ng/ml de IL-4 murina constante

| μg/ml   | Mu IL-4R |             | Mu IL-4R/Fc |             | Fc - controlo |             |
|---------|----------|-------------|-------------|-------------|---------------|-------------|
|         | CPM      | desv. padr. | CPM         | desv. padr. | CPM           | desv. padr. |
| 10      | 635      | 7,7         | 3844        | 35,7        | 34696         | 15,1        |
| 1       | 1285     | 17,1        | 3482        | 11,6        | 38452         | 6,0         |
| 0,1     | 7417     | 10,9        | 14408       | 6,2         | 39532         | 8,9         |
| 0,01    | 27038    | 2,3         | 32310       | 14,9        | 35308         | 3,1         |
| 0,001   | 33187    | 7,7         | 34658       | 7,5         | 39290         | 5,4         |
| 0,0001  | 31881    | 4,5         | 36931       | 14,1        | 38388         | 4,1         |
| 0,00001 | 36059    | 5,2         | 36719       | 5,3         | 40911         | 6,4         |
| 0,0     | 34112    | 5,5         | 37417       | 4,1         | 37663         | 14,5        |

(desvio padrão em %)

Quadro 2

Bioactividade de receptores de IL-4 humana

Curva padrão de IL-4 humana

| ng/ml | CPM    | desv. padr. |
|-------|--------|-------------|
| 100   | 134112 | 4,0         |
| 20    | 125877 | 3,0         |
| 4     | 127607 | 8,6         |
| 0,8   | 91743  | 4,7         |
| 0,16  | 45908  | 9,2         |
| 0,032 | 20898  | 3,9         |
| 0,064 | 12385  | 7,1         |

1 ng/ml de IL-4 humana constante

| ng/ml   | Hu IL-4R |             | Hu IL-4R/Fc |             | Fc - Controlo |             |
|---------|----------|-------------|-------------|-------------|---------------|-------------|
|         | CPM      | desv. padr. | CPM         | desv. padr. | CPM           | desv. padr. |
| 10      | 2770     | 32,9        | 3860        | 11,6        | 98001         | 3,3         |
| 1       | 7421     | 11,6        | 11480       | 6,0         | 96002         | 1,9         |
| 0,1     | 26508    | 2,3         | 37794       | 2,3         | 100637        | 4,8         |
| 0,01    | 62536    | 5,3         | 75391       | 2,2         | 95146         | 0,8         |
| 0,001   | 77769    | 7,1         | 90660       | 9,3         | 98835         | 0,2         |
| 0,0001  | 85739    | 3,7         | 95597       | 10,6        | 81495         | 20,7        |
| 0,00001 | 90227    | 5,3         | 96132       | 6,2         | 94356         | 2,0         |
| 0,0     | 92748    | 6,5         | 95139       | 4,9         | 95203         | 6,5         |

(desvio padrão em %)

1. 1. 1.

Quadro 3

Inibição da síntese de IgE específica de alérgeno

| Meio.    | 100 SQ U/ml de derm. pt. de alérgeno de ácaro | 3 µg/ml de  | 3 µg/ml de    |
|----------|-----------------------------------------------|-------------|---------------|
| Controlo | sem hu IL-4R/Fc                               | hu IL-4R/Fc | Fc - controlo |
| <0,09    | 1,23 (4,1)                                    | <0,09       | 1,17 (5,6)    |

Os dados são de IgE humana em ng/ml.

Entre parêntesis: desvio padrão em percentagem

f L A

Quadro 4

Clone de células T específicas em relação a ácaros da pele de um doente com dermatite atópica

|                                           | IL-2 autócrina<br>(U/ml, análise<br>biológica) | IL-4 autócrina<br>(ng/ml, análise<br>biológica) | IL-4 autócrina<br>(ng/ml, 3 µg/ml<br>hu IL-4R/Fc<br>por análise<br>biológica) | Proliferação    |
|-------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| TH2-clone 1141                            |                                                |                                                 |                                                                               |                 |
| 10 µg/ml ConcA -                          | < 25                                           | 49 (9)                                          | < 1                                                                           | Inibição        |
| 10 µg/ml ConcA<br>+3µg/ml hu IL-<br>4R/Fc | < 25                                           | 10 (8)                                          | < 1                                                                           |                 |
| TH1-Klcn 1150                             |                                                |                                                 |                                                                               |                 |
| 10 µg/ml ConcA                            | 97 (2)                                         | 18 (29)                                         | 8,8 (11)                                                                      | sem<br>inibição |
| 10 µg/ml ConcA<br>+3µg/ml hu IL-<br>4R/Fc | 88 (20)                                        | 10 (5)                                          | 6,3 (1 ~)                                                                     |                 |

(desvio padrão em %)

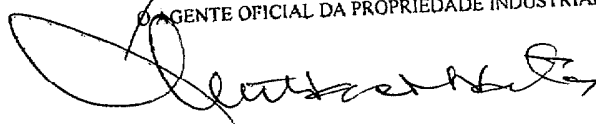
Quadro 5

Tratamento de uma infecção com *Cysticercus* (*Taenia*) *crassiceps* no rato com receptor de interleuquina-4 murina

| Tratamento com       | Peso corporal (gramas) | Carga de parasitas (gramas de peso húmido por cada animal) | Carga de parasitas (gramas de peso húmido por cada animal) |      |
|----------------------|------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------|
| muIL-4R              | 35,7                   | neg.                                                       | neg.                                                       |      |
|                      |                        | 0,1                                                        | neg.                                                       |      |
|                      |                        | 6,0                                                        | 7,5                                                        | 13,7 |
|                      |                        | neg.                                                       | 0,1                                                        |      |
|                      |                        | neg.                                                       | neg.                                                       |      |
| huIL-4R              | 35,9                   | < 0,1                                                      | neg.                                                       |      |
|                      |                        | < 0,1                                                      | neg.                                                       |      |
|                      |                        | 8,4                                                        | 6,3                                                        | 34,9 |
|                      |                        | 8,2                                                        | 5,7                                                        |      |
|                      |                        | 1,3                                                        | 5,0                                                        |      |
| Controlo de infecção | 35,8                   | 1,0                                                        | 5,8                                                        |      |
|                      |                        | neg.                                                       | 3,7                                                        |      |
|                      |                        | 2,7                                                        | 2,1                                                        | 31,6 |
|                      |                        | 7,2                                                        | 6,2                                                        |      |
|                      |                        | 1,0                                                        | 1,9                                                        |      |
| Controlo 0           | 34,5                   | -                                                          | -                                                          |      |

Lisboa, 10 de Setembro de 2001

AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL



## REIVINDICAÇÕES

1. Utilização do receptor de IL-4 (IL-4R) ou de um seu derivado para a preparação de um medicamento para terapia e profilaxia de infecções que se caracterizam pela ocorrência de proliferação de células auxiliares T do tipo TH2.
2. Utilização do IL-4R ou de um seu derivado para a preparação de um agente de diagnóstico para a detecção de infecções que se caracterizam pela ocorrência de proliferação de células auxiliares T do tipo TH2.
3. Utilização do IL-4R ou de um seu derivado de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por os derivados serem fracções, mutantes ou variantes do IL-4R.
4. Utilização do IL-4R ou de um seu derivado de acordo com a reivindicação 3, caracterizada por um derivado ser a região extracelular do IL-4R.
5. Utilização do IL-4R ou de um seu derivado de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por o receptor de IL-4 ou um seu derivado ser componente de uma proteína de fusão.
6. Utilização do IL-4R ou de um seu derivado de acordo com a reivindicação 5, caracterizada por a proteína de fusão conter o receptor de IL-4 ou um seu derivado e a fracção Fc de um anticorpo.
7. Utilização do IL-4R ou de um seu derivado de acordo com uma ou várias das reivindicações 1 a 6, caracterizada por a infecção ser uma infecção viral, bacteriana ou parasitária ou uma infecção por fungos.
8. Utilização do IL-4R ou de um seu derivado de acordo com uma ou várias das reivindicações 1 a 6, caracterizada por a

f l a

infecção ser uma infecção com retrovírus, plectomicetes, sacaromicetes, micobactérias, Listeria, protozoários, cestóides ou helmintos.

9. Utilização do IL-4R ou de um seu derivado de acordo com uma ou várias das reivindicações 1 a 6, caracterizada por a infecção ser uma infecção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), Mycobacterium leprae, Leishmania, Plasmodium, esquistossoma, Nippostrongylus, Trichurida, Trichinella, Taenia (Cysticercus), Candida, Aspergillus, Cyclophilida ou Heligmosomoides.
10. Utilização do IL-4R ou de um seu derivado de acordo com uma ou várias das reivindicações 1 a 6, caracterizada por o IL-4R ou um seu derivado ser utilizado num preparado de combinação.
11. Utilização do IL-4R ou de um seu derivado de acordo com a reivindicação 10, caracterizada por o preparado de combinação conter interferão gama.
12. Utilização do IL-4R ou de um seu derivado de acordo com a reivindicação 10, caracterizada por o preparado de combinação conter alérgenos ou fracções de alérgenos.
13. Utilização do IL-4R ou de um seu derivado de acordo com a reivindicação 10, caracterizada por o preparado de combinação conter uma ou várias substâncias que inibem a interacção do ligando da proteína de superfície das células CD40 com a proteína de superfície das células CD40.
14. Utilização do IL-4R ou de um seu derivado de acordo com a reivindicação 13, caracterizada por pelo menos uma das substâncias constituir um determinante solúvel da molécula de superfície CD40 ou um seu derivado.
15. Utilização do IL-4R ou de um seu derivado para a preparação

de um medicamento de acordo com uma ou várias das reivindicações 1 a 6 para aplicação tópica.

16. Utilização do IL-4R ou de um seu derivado para a preparação de um medicamento de acordo com a reivindicação 15 para aplicação intradérmica, subcutânea, dérmica, nasal ou pulmonar.

Lisboa, 10 de Setembro de 2001

O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

