República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0617515-5 A2**

BRPI0617515A2

(22) Data de Depósito: 24/10/2006
(43) Data da Publicação: 26/07/2011
(RPI 2116)

(51) Int.Cl.:
C12N 5/06 2010.01
C12N 5/16 2010.01
C12P 21/06 2010.01

(54) Título: **MIMETICORPOS, POLIPEPTÍDEOS, COMPOSIÇÕES, MÉTODOS E USOS DE GLP-2**

(30) Prioridade Unionista: 24/10/2005 US 60/729,704, 31/08/2006 US 60/824,160, 23/10/2006 US 60/862,487, 23/10/2006 US 60/862,487, 23/10/2006 US 60/862,487, 24/10/2005 US 60/729,704, 31/08/2006 US 60/824,160

(73) Titular(es): Centocor, INC.

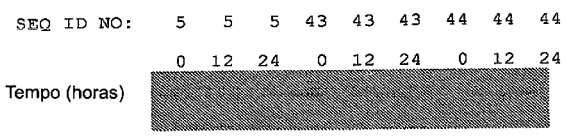
(72) Inventor(es): Audrey E. Baker, Beverly A. Moore, Jeffrey M. Palmer, Karyn O´Neil, Kristen Picha, Sarah Sague, Thomas Nesspor

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006060197 de 24/10/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/067828de 14/06/2007

(57) Resumo: MIMETICORPOS, POLI PEPTÍDEOS, COMPOSIÇÕES, MÉTODOS E USOS DE GLP-2 A presente invenção refere-se a mimeticorpos, polipeptídeos e ácidos nuclélcos de GLP-2 de mamífero são descritos. Métodos de utilizar os mimeticorpos e polipeptídeos para tratar doenças relacionadas a GLP-2 também são descritos.



PI - 0614015-5

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MIMETICORPOS, POLIPEPTÍDEOS, COMPOSIÇÕES, MÉTODOS E USOS DE GLP-2".**

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a polipeptídeos e mimeticorpos de GLP-2 de mamífero e seu uso como terapêuticos.

Antecedentes da Invenção

O peptídeo semelhante ao glucagon 2 (GLP-2) é um hormônio peptídico intestinotrófico de 33 aminoácidos gerado através de processamento pós-traducional de proglucagon (Orskov *et al.*, FEBS Lett. 247: 193–196 (1989); Hartmann *et al.*, Peptides 21: 73–80 (2000)). Em mamíferos, GLP-2 é liberado a partir de proglucagon no intestino e cérebro, mas não no pâncreas, como um resultado de expressão célula- específica de convertases de pró-hormônios nas células endócrinas do intestino (Dhanvantari *et al.*, Mol. Endocrinol. **10:** 342–355 (1996); Rothenberg *et al.*, Mol. Endocrinol. **10:** 334–341 (1996); Damholt *et al.*, Endocrinology **140:** 4800–4808 (1999); Holst, Trends Endocrinol Metab. 10: 229-235 (1999)). A análise de plasma de rato e humano usando uma combinação de cromatografia líquida de alta eficiência e anti-soros de GLP-2 sítio-específicos revela a presença de duas formas moleculares circulantes principais, GLP-2^{1-33} e GLP-2^{3-33} (Hartmann *et al.*, Supra; Brubaker *et al.*, Endocrinol. 138: 4837–4843 (1997); Hartmann *et al.*, J. Clin. Endocrinol. Metab. 85: 2884–2888 (2000)). GLP-2^{1-33} é clivado *in vivo* pela protease dipeptidil peptidase IV (DPP IV), que remove os dois primeiros resíduos, histidina e alanina (HA). O peptídeo GLP-2^{3-33} resultante é essencialmente inativo.

GLP-2 regula a motilidade gástrica, secreção de ácido gástrico, transporte de hexose intestinal e aumenta a função de barreira do epitélio intestinal (revisado em Drucker, J. Clin. Endocr. Metab. 86: 1759-1764 (2001)). Ele aumenta significativamente a área de superfície do epitélio mucoso através da estimulação de proliferação de célula da cripta e inibição de apoptose no enterócito e compartimentos da cripta (Drucker *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 7911–7916 (1996)). GLP-2 reduz a mortalidade e diminui a lesão mucosa, expressão de citocina e septicemia bacteriana na

inflamação do intestino delgado e grosso (Boushey *et al.*, Am. J. Physiol. 277: E937–E947 (1999); Prasad *et al.*, J. Pediatr. Surg. 35: 357–359 (2000)). GLP-2 também aumenta a absorção de nutrientes e a adaptação do intestino em roedores ou humanos com a síndrome do intestino curto (SBS) (Jeppesen *et al.*, Gastroenterology 120: 806-815 (2001)).

As ações de GLP-2 são transduzidas pelo receptor de GLP-2 (GLP-2R), um receptor acoplado à proteína G expresso em células endócrinas intestinais do estômago, intestino delgado, cólon assim como neurônios entéricos e miofibroblastos subendoteliais (Munroe *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 96: 1569–1573 (1999); Yusta *et al.*, Gastroenterology 119: 744–755 (2000); Bjerknes *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98: 12497-12502 (2001); Orskov et al., Regul. Pept. 124: 105-112 (2005)). A ativação direta da sinalização de GLP-2R em fibroblastos de rim de filhote de hamster transfectados que expressam o receptor de GLP-2 (células BHK-GLP-2R) confere resistência à apoptose induzida por cicloeximida (Yusta *et al.*, J. Biol. Chem. 275: 35345–35352 (2000)).

As propriedades citoprotetoras, reparadoras e de retenção de energia de GLP-2 sugerem que GLP-2 pode potencialmente ser útil para o tratamento de distúrbios humanos caracterizados por lesão e/ou disfunção do epitélio da mucosa intestinal. A lesão do epitélio da mucosa intestinal é vista em pacientes com doença inflamatória do intestino (IBD), incluindo Doença de Crohn e colite ulcerativa, e em pacientes com doenças auto-imunes que estão associadas com uma resposta inflamatória no intestino, tal como Doença Celíaca (revisada em Hanauer, New England J. Med. 334: 841-848 (1996)). Além disso, alguns fármacos quimioterápicos causam lesão ao epitélio intestinal que resulta em efeitos colaterais tóxicos que são limitantes da dose (Oster, Oncology 13: 41 (1999)). A permeabilidade intestinal aumentada também é relatada em casos de pancreatite aguda (Kouris *et al.*, Am. J. Surg. 181: 571-575 (2001)) e poderia contribuir para alergias alimentares por permitir o acesso de macromoléculas ao compartimento subendotelial (Troncone *et al.*, Allergy 49: 142-146 (1994)).

Como um importante hormônio regulatório da absorção de nutri-

entes, GLP-2 também é promissor no tratamento de pacientes com síndrome do intestino curto (SBS) (Drucker *et al.*, *Supra*; Rubin, Gastroenterol. 117:261-263 (1999); Nightingale, Gut 45: 478-479 (1999)). SBS é definida como má absorção resultante de perda anatômica ou funcional de uma extensão significativa do intestino delgado (revisado em Jeppesen, J. Nutr. 133: 3721-3724 (2003)). As causas da síndrome do intestino curto diferem entre adultos e crianças: em adultos, ela freqüentemente resulta após cirurgia para doença de Crohn ou infarto mesentérico; enquanto que em crianças, as causas mais comuns incluem enterocolite necrosante, gastrosquise, atresia e vólvulo (Platell *et al.*, World J. Gastroenterol. 8: 13-20 (2002)).

Teduglutida, um análogo do peptídeo de GLP-2 resistente a DPP-IV (em que alanina 2 é substituída por glicina (A2G)), está sendo desenvolvido para o tratamento potencial de doenças gastrointestinais (GI), incluindo SBS, doença de Crohn e distúrbios de GI pediátricos. Teduglutida também tem potencial para o tratamento de mucosite associada com quimioterapia para câncer e IBD. Entretanto, devido ao baixo peso molecular do peptídeo, a teduglutida é rapidamente depurada com uma meia-vida de menos do que 30 minutos. Conseqüentemente, a dosagem diária é necessária para manter o nível terapêutico (Shin *et al.*, Curr. Opin. Endocrin. Diabetes 12: 63-71 (2005)). Portanto, existe uma necessidade por uma GLP-2 modificada que supere a meia-vida curta enquanto mantém sua função e fornece desenvolvimento e produção fáceis.

Íleo inflamatório, a deficiência temporária da motilidade gastrointestinal coordenada após cirurgia invasiva ou lesão traumática, permanece um problema clínico importante, prolongando a permanência hospitalar e freqüentemente contribuindo para complicações médicas durante o período de recuperação (Holte & Kehlet, Br. J. Surg. 87: 1480-1493 (2000)). O íleo é caracterizado por esvaziamento gástrico retardado, dilatação do intestino delgado e cólon, distensão abdominal, perda dos padrões propulsores contráteis normais e incapacidade de evacuar gases ou fezes, levando ao desconforto prolongado do paciente (distensão abdominal, náusea, êmese).

Em indivíduos suscetíveis, tais como os mais velhos ou pacien-

tes com comprometimento cardiopulmonar, o íleo pode levar a complicações mais sérias, incluindo dilatação gástrica aguda, arritmia cardíaca, desconforto respiratório, pneumonia por aspiração, e falha de anastomoses cirúrgicas. Em casos severos, a perda prolongada da atividade contrátil de "limpeza" normal do trato GI pode contribuir para a super crescimento bacteriano e quebra da função de barreira do intestino, seguida por translocação bacteriana e entrada na circulação sistêmica (Anup & Balasubramanian, J. Surg. Res. 92: 291-300 (2000)). Isso por sua vez pode levar à endotoxemia, sepse, falência de múltiplos órgãos e finalmente morte, uma conseqüência para o qual os pacientes mais velhos são os mais suscetíveis. Mesmo na ausência de complicações, o retorno da função intestinal normal é um fator primordial que limita a liberação de pacientes do hospital, com íleo inflamatório aumentando a permanência hospitalar em 3 a 5 dias. Assim, os custos acumulados da morbidade aumentada e permanência hospitalar prolongada podem ser substanciais.

Fatores que contribuem para o desenvolvimento e manutenção de íleo incluem a ativação de reflexos inibitórios simpáticos centrais que liberam norepinefrina na parede intestinal, agentes inibitórios humorais, agentes anestésicos e analgésicos e mediadores inflamatórios (Livingston & Passaro, Dig. Dis. Sci. 35: 121-132 (1990); Bauer *et al.*, Curr. Opin. Crit. Care 8: 152-157 (2002)). Resultados de estudos com roedores sugerem que a inflamação dentro da parede do trato GI desempenha um papel central na iniciação e manutenção do íleo.

Estudos que empregam modelos de roedores de íleo pós-operatório demonstram que a muscularis externa é um compartimento altamente imunologicamente ativo. Normalmente, residentes dentro da muscular externa está um grupo impressionante de leucócitos comuns (Mikkelsen, Histol. Histopathol. 10: 719-736 (1995); Kalff *et al.*, Ann. Surg. 228: 652-663 (1998)). Os mais abundantes desses são os macrófagos residentes, que formam uma extensa rede de células do esôfago ao cólon e que estão prontos para defender o trato gastrointestinal de lesão e doença em potencial. Distúrbios do intestino durante a cirurgia abdominal ativam essa rede de ma-

crófagos, iniciando uma resposta inflamatória molecular local. Os macrófagos ativados liberam citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1β, TNFα) e quimiocinas (MCP-1) que suprimem a comunicação neuromuscular dentro da muscular e induzem a expressão de moléculas de adesão (ICAM-1, P-selectina) no endotélio vascular (Kalff *et al.*, J. Leukoc. Biol. 63: 683-691 (1998); Josephs *et al.*, J. Surg. Res. 86: 50-54 (1999); Kalff *et al.*, Gastroenterology 117: 378-387 (1999); Kalff *et al.*, Gastroenterology 118: 316-327 (2000); Wehner *et al.*, Surgery 137: 436-46 (2005)). Isso por sua vez leva à resposta inflamatória celular caracterizada pelo recrutamento de leucócitos (monócitos, neutrófilos, células T e células mastocitárias) da circulação sistêmica, em que há uma correlação positiva entre a magnitude do infiltrado celular inflamatório e a severidade do íleo (Kalff *et al.*, Surgery 126: 498-509 (1999)). Leucócitos infiltrantes liberam citocinas adicionais assim como prostaglandinas, óxido nítrico, proteases e espécies reativas de oxigênio que contribuem ainda para a disfunção neuromuscular (von Ritter *et al.*, Gastroenterology 97: 605-609 (1989); Bielefeldt & Conklin, Dig. Dis. Sci. 42: 878-884 (1997)).

Até hoje, há poucas opções disponíveis na clínica para o cuidado de íleo inflamatório. Pró-cinéticos tais como cisaprida e neostigmina foram mostrados melhorar a motilidade intestinal pós-operatória (Shibata & Toyoda, Surg. Today 28: 787-791 (1998)). Entretanto, resultados são inconsistentes e esses fármacos têm um risco aumentado de efeitos cardiovasculares adversos que provaram ser difíceis de prever em termos de severidade e suscetibilidade do paciente. Em estudos em animais, inibidores de COX-2 se mostraram protetores contra a falta de motilidade do intestino delgado (Schwarz *et al.*, Gastroenterology 121: 1354-1371 (2001)), mas tiveram pouco efeito sobre a falta de motilidade colônica (Turler *et al.*, Anal. Surg., 231(1): 56-66 (2002)). Estudos clínicos de fase I em seres humanos foram terminados comparando celecoxib e rofecoxib (Bouras *et al.*, Neurogastroenterol. Motil. 16: 729-735 (2004)), e nenhum agente foi descoberto melhorar a motilidade pós-operatória.

A rápida volta para alimentação oral após a cirurgia foi promovida como um meio de estimular a regulação hormonal normal de padrões de

motilidade. Ela foi descoberta acelerar o retorno de função intestinal e melhorar o conforto em um subgrupo de pacientes quando usada como parte de uma abordagem multimodal para reabilitação intestinal (Holte & Kehlet, Minerva. Anestesiol., 68(4): 152-156 (2002)). Entretanto, esse tratamento não resultou em uma redução significativa na duração da estadia hospitalar. Além disso, a estimulação adequada de padrões hormonais requer um limite de carga calórica que muitos pacientes são incapazes de tolerar.

Um dos fatores mais comuns que contribuem para o desenvolvimento de íleo prolongado é a administração de analgésicos opióides para alívio de dor pós-operatória. Os opióides exercem seus efeitos analgésicos por interagir com um ou mais dos três subtipos de receptor presentes em neurônios nos centros de processamento de dor do cérebro. Os analgésicos opióides mais comuns, tal como morfina, funcionam primariamente por ativar os receptores opióides μ (mu) e δ (delta). Entretanto, esses mesmos receptores também são expressos nos neurônios dentro do trato gastrointestinal que controlam a motilidade do intestino. A ativação dos receptores, na presença ou na ausência de íleo inflamatório, suprime significativamente a função contrátil gastrointestinal, causando estase intestinal e constipação. Adalor Corporation conduziu ensaios clínicos de Fase I e Fase II usando Alvimopan, um antagonista μ-OR perifericamente restrito e seletivo que não atravessa a barreira hemato-encefálica. Quando dado em conjunto com analgésicos opióides, Alvimopan evitou a supressão induzida por opióide da motilidade intestinal (Gonenne *et al.*, Clin. Gastroenterol. Hepatol. 3: 784-791 (2005)). Quando comparado com placebo, foi descoberto que Almivopan acelera o retorno da função do intestino e diminui a estadia no hospital em pacientes que estavam sofrendo íleo pós-operatório leve a moderado após terem sido submetidos à cirurgia abdominal (Viscusi *et al.*, Surg. Endosc. 20: 64-70 (2006)). Alvimopan não altera inflamação.

Até o momento, não há opções de tratamento seguras e confiáveis disponíveis para o tratamento de íleo inflamatório. Os remédios mais eficazes atualmente disponíveis são de natureza auxiliar ou melhoram os efeitos de composição da analgesia de opióide. Eles não tratam a inflama-

ção como a causa fundamental de íleo. Portanto, permanece uma necessidade médica não atingida.

Breve Descrição dos Desenhos

Figura 1 mostra a imagem de um gel de SDS-PAGE de variantes de substituição de Pro de mimeticorpo de GLP-2 (SEQ ID Nºs: 43 e 44) após incubação com lisado de célula U937.

Figura 2 mostra um aumento dose-dependente do peso úmido de raspagens mucosas de camundongos tratados com mimeticorpo de GLP-2 A2G.

Figura 3 mostra uma aceleração significativa do transito intestinal em camundongos tratados com o peptídeo A2G-GLP2. Significado estatístico determinado por teste de *t*-student não pareado.

Figura 4 mostra uma aceleração significativa do trânsito intestinal em camundongos tratados com o mimeticorpo de GLP-2 A2G. Significado estatístico determinado por teste de *t*-student não pareado.

Figura 5 mostra atenuação significativa do retardo no trânsito gastrointestinal associado com íleo inflamatório pós-operatório em camundongos tratados com mimeticorpo de GLP-2 A2g murino. Significado estatístico determinado por ANOVA seguido por teste de Bonferroni pós-hoc.

Figura 6 mostra as quantidades totais de muscularis intestinal com números aumentados de leucócitos contendo mieloperoxidase (MPO) após cirurgia abdominal. O tratamento com mimeticorpo de GLP-2 A2G murino reduziu significativamente o número de células infiltrantes, enquanto que IgG2a não teve nenhum efeito.

Figura 7 mostra o histograma com contagens celulares compiladas da Figura 6. Significado estatístico determinado por ANOVA seguido por teste de Bonferroni pós-hoc.

Sumário da Invenção

Um aspecto da invenção é um mimeticorpo que tem a fórmula genérica (II):

$$(GLP2RAg\text{-}Lk\text{-}V2\text{-}Hg\text{-}C_H2\text{-}C_H3)_{(t)}$$

(II)

em que GLP2RAg é um agonista de GLP-2R de mamífero, Lk é um polipeptídeo ou ligação química, V2 é uma porção de uma terminação-C de uma região variável de imunoglobulina, Hg é pelo menos uma porção de uma região de dobradiça variável de imunoglobulina, C_H2 é uma região constante C_H2 de cadeia pesada de imunoglobulina e C_H3 é uma região constante C_H3 de cadeia pesada de imunoglobulina e t é independentemente um inteiro de 1 a 10.

Outro aspecto da invenção é um mimeticorpo que compreende um polipeptídeo que tem a seqüência mostrada em SEQ ID Nº: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 42, 43, 44, 45, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 75, ou 77.

Outro aspecto da invenção é um polinucleotídeo que compreende um polinucleotídeo que tem a seqüência mostrada em SEQ ID Nº: 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 46, 47, 48, 49, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 76, ou 78 ou uma seqüência complementar.

Outro aspecto da invenção é um polinucleotídeo que compreende um polinucleotídeo que codifica a seqüência de aminoácido mostrada em SEQ ID Nº: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 42, 43, 44, 45, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 75, ou 77.

Outro aspecto da invenção é um polinucleotídeo que compreende um polipeptídeo que tem a seqüência mostrada em SEQ ID Nº: 52, 54, 55 ou 74.

Outro aspecto da invenção é um polinucleotídeo que compreende um polinucleotídeo que codifica a seqüência de aminoácido mostrada em SEQ ID Nº: 52, 54, 55, ou 74.

Outro aspecto da invenção é um método de reduzir os sintomas de, ou tratar um distúrbio caracterizada por lesão e/ou disfunção da epitélio da mucosa intestinal, que compreende administrar uma composição de polipeptídeo de GLP-2 ou uma composição de mimeticorpo de GLP-2 a um paciente necessitado disso.

Outro aspecto da invenção é um método de prevenir, reduzir os sintomas de, ou tratar íleo inflamatório, que compreende administrar uma composição de polipeptídeo de GLP-2 ou uma composição de mimeticorpo

de GLP-2 a um paciente necessitado disso.

Descrição Detalhada da Invenção

Todas as publicações, incluindo, mas não se limitando a patentes e pedidos de patente, citados nesse relatório estão incorporados aqui por referência como se completamente descritas. Códigos de aminoácido de uma letra são usados aqui como compreendendo por aqueles versados na técnica. A numeração de resíduos de aminoácido em regiões constantes de imunoglobulina se baseia no resíduo um sendo o aminoácido N-terminal em um domínio Fc de IgG1 ou IgG4 selvagem.

A presente invenção fornece construtos de proteína que têm as propriedades e atividades de GLP-2 de mamífero. Uma modalidade da invenção são construtos de proteína que mimetizam diferentes tipos de moléculas de imunoglobulina tais como IgA, IgD, IgE, IgG, ou IgM, e qualquer subclasse desses, tais como IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4, ou combinações desses, daqui em diante referidos como "mimeticorpos de GLP-2" ou simplesmente "mimeticorpos". Outra modalidade da invenção são polipeptídeos que são variantes de GLP-2 em que os polipeptídeos têm as propriedades e atividades da molécula selvagem. A invenção ainda fornece ácidos nucléicos que codificam mimeticorpos, polipeptídeos de GLP-2, vetores que contêm esses ácidos nucléicos, células hospedeiras, composições e métodos de fazer e usar mimeticorpos e polipeptídeos de GLP-2.

Mimeticorpos, polipeptídeos e composições de GLP-2

A presente invenção refere-se geralmente a polipeptídeos de mimeticorpos que tem a fórmula genérica (I):

$$(Pep\text{-}Lk\text{-}V2\text{-}Hg\text{-}C_H2\text{-}C_H3)_{(t)}$$

(I)

em que Pep é um polipeptídeo que tem uma propriedade biológica desejada, Lk é um polipeptídeo ou ligação química, V2 é uma porção de uma terminação-C de uma região variável de imunoglobulina, Hg é pelo menos uma porção de uma região de dobradiça de imunoglobulina, C_H2 é uma região cons-

tante C_H2 de cadeia pesada de imunoglobulina e C_H3 é uma região constante C_H3 de uma cadeia pesada de imunoglobulina e t é independentemente um inteiro de 1 a 10.

Mais particularmente, a presente invenção refere-se a polipeptídeos de mimeticorpo de GLP-2 que são capazes de, por ligação, ativar GLP-2R. Os polipeptídeos têm a fórmula genérica (II):

$$(GLP2RAg\text{-}Lk\text{-}V2\text{-}Hg\text{-}C_H2\text{-}C_H3)_{(t)}$$

(II)

em que GLP2RAg é um agonista de GLP-2R de mamífero, Lk é um polipeptídeo ou ligação química, V2 é uma porção de uma terminação-C de uma região variável de imunoglobulina, Hg é pelo menos uma porção de uma região de dobradiça de imunoglobulina, C_H2 é uma região constante C_H2 de cadeia pesada de imunoglobulina e C_H3 é uma região constante C_H3 de cadeia pesada de imunoglobulina e t é independentemente um inteiro de 1 a 10.

Como usado aqui, "agonista de GLP-2R" abrange qualquer molécula que, por ligação, ativa GLP-2R. Agonistas de GLP-2R incluem GLP-2 de mamífero selvagem e análogos peptídicos de GLP-2. Um peptídeo de GLP-2 selvagem exemplar tem a seqüência de aminoácido mostrada em SEQ ID Nº: 1. Sabe-se que certos resíduos de aminoácido em GLP-2 de ocorrência natural podem ser substituídos por outros resíduos de aminoácido com os análogos mantendo a propriedade de ligação a GLP-2R de GLP-2 selvagem. Por exemplo, Ala2 do peptídeo de GLP-2 humano selvagem pode ser substituído por Ser (A2S) ou Gly (A2G). As seqüências de aminoácido resultantes são mostradas em SEQ ID Nºs: 2 e 3, respectivamente.

Na presente invenção, foram desenvolvidos novos análogos de GLP-2 humano selvagem que funcionam como agonistas de GLP-2R. Seqüências de aminoácido desses análogos são mostradas em SEQ ID Nºs: 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, e 74 mostradas abaixo (mutações designadas contra GLP-2 selvagem). Esses análogos são úteis como componentes de GLP2RAg de um mimeticorpo.

SEQ ID Nº:	Seqüência de aminoácido	Mutações
50	HGDGSFSSDMSTILDNLAARDFINWLIQTKITD	A2G, D8S, E9D, N11S
51	HGDGSFSSDVSTILDNLAARDFINWLIQTKITD	A2G, D8S, E9D, M10V, N11S
52	HGDGSFSDEMNTYLDNLAARDFINWLIQTKITD	A2G, I13Y
53	HGDGSFSDEMNTILDGLAARDFINWLIQTKITD	A2G, N16G
54	HGDGSFSDEMNTILDNQAARDFINWLIQTKITD	A2G, L17Q
55	HGDGSFSDEMNTILDGQAARDFINWLIQTKITD	A2G, N16G, L17Q
56	HGDGSFSDEMNTILDNLAARDFIAWLIQTKITD	A2G, N24A
57	HGDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLVKGKITD	A2G, I27V, Q28K, T29G
74	HGDGSFSDEVNTILDNLAARDFINWLIQTKITD	A2G, M10V

Foi observado que peptídeos de GLP-2 podem se auto-associar a apresentar um problema para o desenvolvimento e fabricação de um candidato terapêutico homogêneo. Veja Publicação de Pedido de Patente US Nº 20040122210 A1. Como descrito nos Exemplos abaixo, os polipeptídeos que têm as seqüências de aminoácido mostradas em SEQ ID Nºs: 52, 54, 55 e 74 foram projetados para ser monoméricos em pH 7.5 e ter tendências helicoidais reduzidas. Conseqüentemente, esses análogos de peptídeo de GLP-2 humano seriam particularmente úteis em um construto de mimeticorpo ou como um peptídeo terapêutico nu.

Nos mimeticorpos da invenção, a porção ligante (Lk) fornece flexibilidade estrutural por permitir que o mimeticorpo tenha propriedades de ligação e orientações alternativas. Ligantes exemplares incluem ligações químicas não-peptídicas ou um a 20 aminoácidos ligados por ligações peptídicas, em que os aminoácidos são selecionados a partir dos 20 aminoácidos de ocorrência natural. A porção ligante pode incluir uma maioria de aminoácidos que são impedidos estericamente, tais como glicina, alanina e serina e inclui GS, GGGS (SEQ ID Nº: 19), GSGGGS (SEQ ID Nº: 20), e polímeros ou combinações desses. Outros ligantes exemplares dentro do escopo da invenção podem ter mais do que 20 resíduos e podem incluir resíduos diferentes de glicina, alanina e serina.

Nos mimeticorpos da invenção, V2 é uma porção de um domínio C-terminal de uma região variável de imunoglobulina tal como região variável de cadeia pesada. Uma seqüência de aminoácido de V2 exemplar é G-TLVTVSS (SEQ ID Nº: 21).

Foi mostrado que pode ocorrer O-glicosilação nos dois resíduos de Tyr na região V2, embora a extensão de glicosilação seja altamente dependente da linhagem da célula hospedeira e também possa ser influenciada por condições de cultura. O-glicanas podem agir para bloquear a agregação e proteólise, resultando em maior estabilidade *in vivo*. Entretanto, pode ser desejável abolir a O-glicosilação por causa da heterogeneidade e pobre reprodutibilidade. Conseqüentemente, uma seqüência de aminoácido de V2 alternativa exemplar é GALVAVSS (SEQ ID Nº: 22).

Nos mimeticorpos da invenção, Hg é uma porção do domínio de dobradiça de uma região variável de imunoglobulina tal como uma região variável de cadeia pesada. Seqüências de aminoácido de Hg exemplares incluem EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID Nº: 23),
EPKSADKTHTCPPCP (SEQ ID Nº: 24),
ESKYGPPCPSCP (SEQ ID Nº: 25),
ESKYGPPCPPCP (SEQ ID Nº: 26) e
CPPCP (SEQ ID Nº: 27).

Nos mimeticorpos da invenção, C_H2 é uma região constante C_H2 de cadeia pesada de imunoglobulina. Seqüências de aminoácido de C_H2 exemplares incluem:
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAK (SEQ ID Nº: 28),
APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAK (SEQ ID Nº: 29),
APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAK (SEQ ID Nº: 30) e

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAK (SEQ ID Nº: 31).

Nos mimeticorpos da invenção, C_H3 é uma região constante de C_H3 de cadeia pesada de imunoglobulina. Seqüências de aminoácido de C_H3 exemplares incluem: GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID Nº: 32) e GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSLGK (SEQ ID Nº: 33). Será reconhecido por aqueles versados na técnica que a região C_H3 dos mimeticorpos da invenção também pode ter seu aminoácido C-terminal clivado quando expresso em certos sistemas recombinantes.

Nos mimeticorpos da invenção, o sítio de ligação do receptor "scavenger" FcRn das moléculas de imunoglobulina é preservado na junção da região C_H2 e C_H3. Como a ligação de FcRn permite o retorno de imunoglobulina pinocitada de volta para o espaço extracelular, espera-se que a meia-vida de mimeticorpos de GLP-2 seja significativamente estendida com relação a peptídeos de GLP-2.

Em uma modalidade dos mimeticorpos da invenção, a estrutura monomérica (GLP2-Lk-V2-Hg-C_H2-C_H3) pode ser ligada a outros monômeros não-covalentemente ou por ligação covalente tal como, mas não limitado a, uma ligação de dissulfeto Cys-Cys.

Subclasses IgG1 e IgG4 diferem subclasses no número de cisteínas na região de dobradiça. Da mesma forma que a subclasse IgG1, há duas cisteínas na dobradiça de IgG4 que participam na ligação de dissulfeto entre cadeias pesadas. Entretanto, a cisteína na dobradiça de IgG1 que está normalmente envolvida na ligação de dissulfeto à cadeia leve está ausente na dobradiça de IgG4. Portanto, a dobradiça de IgG4 é menos flexível do que a dobradiça de IgG1.

Além disso, os dois isotipos diferem na sua habilidade de mediar a citotoxicidade dependente do complemento (CDC) e citotoxicidade dependente de anticorpo (ADCC). CDC é a lise de um alvo na presença de complemento. A ativação da via do complemento é iniciada pela ligação do primeiro componente ao sistema complemento (C1q) a uma molécula complexada com um antígeno cognato. IgG1 é um forte indutor da cascata do complemento e atividade de CDC subseqüente, enquanto que IgG4 tem pouca atividade indutora de complemento.

ADCC é uma reação mediada por células na qual células citotóxicas inespecíficas que expressam receptores Fc (FcRs) (por exemplo, células Natural Killer (NK), neutrófilos, e macrófagos) reconhecem anticorpo ligado a uma célula alvo e subseqüentemente causam lise da célula alvo. A subclasse IgG1 se liga com alta afinidade ao receptor Fc e contribui para ADCC, enquanto que IgG4 se liga apenas fracamente. A incapacidade relativa de IgG4 ativar funções efetoras é desejável já que torna possível a liberação do mimeticorpo às células sem morte celular.

Além disso, o sítio de ligação para o receptor seqüestrante FcRn está presente nos isotipos IgG4 e IgG1 e ambos têm características de ligação similares. Portanto, espera-se que as farmacocinéticas dos mimeticorpos IgG1 e IgG4 da invenção sejam similares.

A porção dobradiça-C_H2-C_H3 da região de imunoglobulina (Hg–C_H2– C_H3) também pode ser extensamente modificada para formar variantes de acordo com a invenção. Por exemplo, um ou mais sítios nativos que fornecem características estruturais ou atividade funcional que não são necessários pelas moléculas de mimeticorpo poderiam ser removidos. Esses sítios podem ser removidos, por exemplo, por substituir ou deletar resíduos inserir resíduos no sítio, ou truncar porções que contêm o sítio. Variantes de Hg-C_H2-C_H3 exemplares são discutidos abaixo.

1. Sítios envolvidos em formação de ligação de dissulfeto podem ser removidos por deleção ou substituição por outros aminoácidos nos mimeticorpos da invenção. Tipicamente, os resíduos de cisteína presentes nesses motivos são removidos ou substituídos. A remoção desses sítios po-

de evitar ligação de dissulfeto com outras proteínas que contêm cisteína presentes na célula hospedeira produtora de mimeticorpo ou ligação de dissulfeto intracadeia pesada em construtos baseados em IgG4, enquanto que ainda permite um domínio CH3-CH2-dobradiça dimérico que é mantido junto não-covalentemente.

A maioria dos anticorpos do tipo IgG, tal como IgG1, são moléculas homodiméricas formadas de duas cadeias pesadas (H) idênticas e duas cadeias leves (L) idênticas, tipicamente abreviadas como H_2L_2. Dessa forma, essas moléculas são geralmente bivalentes com relação à ligação de antígeno, isto é, ambos os braços de ligação ao antígeno (Fab) da molécula de IgG têm especificidade de ligação idêntica.

As cadeias pesadas do isotipo IgG4 contêm um motivo CPSC (SEQ ID Nº: 34) nas suas regiões de dobradiça capazes de formar ligações de dissulfeto inter- ou intracadeia, isto é, os dois resíduos de Cys no motivo CPSC podem fazer ligação de dissulfeto com os resíduos de Cys correspondentes na outra cadeia H (inter) ou os dois resíduos de Cys dentro de um dado motivo CPSC podem formar ligação de dissulfeto um com o outro (intra). Acredita-se que enzimas isomerase *in vivo* sejam capazes de converter ligações intercadeia de moléculas de IgG4 em ligações intracadeia e *vice-versa* (Aalberse & Schuurman, *Immunology 105*, 9-19 (2002)). Conseqüentemente, já que pares de HL nessas moléculas de IgG4 com ligações intracadeia pesada na região de dobradiça não são associados covalentemente um com o outro, eles podem se dissociar em monômeros de HL que então se reassociam monômeros de HL derivados de outras moléculas de IgG4 formando moléculas de IgG4 biespecíficas, heterodiméricas. Em um anticorpo de IgG biespecífico os dois Fabs da molécula de anticorpo diferem nos epítopos aos quais eles se ligam. Substituir Ser228 na região de dobradiça de IgG4 por Pro resulta em "comportamento semelhante à IgG1", isto é, as moléculas formam ligações de dissulfeto estáveis entre as cadeias pesadas e portanto, não são suscetíveis a troca de HL com outras moléculas de IgG4.

2. A H-C_H2-C_H3 pode ser modificada para tornar os mimeticorpos da invenção mais compatíveis com uma célula hospedeira selecionada.

Por exemplo, quando um mimeticorpo da invenção é expresso recombinantemente em uma célula bacteriana tal como *E. coli*, a seqüência Pro-Ala na dobradiça pode ser removida para evitar digestão pela enzima de *E. coli* prolina iminopeptidase.

3. Uma porção da região de dobradiça pode ser deletada ou substaituida por outros aminoácidos nos mimeticorpos da invenção para evitar heterogeneidade nos produtos expressos em uma célula hospedeira selecionada.

4. Um ou mais sítios de glicosilação podem ser removidos nos mimeticorpos da invenção. Resíduos que são tipicamente glicosilados (por exemplo, Asn) podem conferir atividade citolítica mediada por célula dependente de Fc ao mimeticorpo. Tais resíduos podem ser deletados ou substituídos por resíduos que não são glicosilados, tal como Ala.

5. Sítios envolvidos na interação com o complemento, tal como o sítio de ligação a C1q, são removidos nos mimeticorpos da invenção.

6. Sítios que afetam a ligação aos receptores Fc diferentes de um receptor de recuperação de FcRn podem ser removidos nos mimeticorpos da invenção. Por exemplo, os receptores Fc envolvidos na atividade de ADCC podem ser removidos nos mimeticorpos da invenção. Por exemplo, mutação de Leu234/Leu235 na região de dobradiça de IgG1 para L234A/L235A ou Phe234/Leu235 na região de dobradiça de IgG4 para P234A/L235A minimiza a ligação de FcR e reduz a habilidade da imunoglobulina mediar citotoxicidade dependente de complemento e ADCC.

Uma modalidade da presente invenção é um mimeticorpo de GLP-2 de acordo com a fórmula (II) em que a Hg-C_H2-C_H3 é da subclasse IgG4 e contém uma substituição Ser228Pro (S228P) e mutações P234A/L235A. As seqüências de polipeptídeo completas de mimeticorpos de GLP-2 exemplares que têm essas mutações e A2S e A2G na seqüência de peptídeo de GLP-2 são mostradas respectivamente em SEQ ID Nºs: 4 e 5. Essas seqüências contêm todos os domínios do construto do mimeticorpo, isto é, os domínios GLP2RAg-Lk-V2-Hg-C_H2-C_H3. Espera-se que esses construtos de mimeticorpo sejam uma população homogênea e estável que

não dispare funções efetoras mediadas por FcR. A substituição e mutações mostradas aqui são exemplares; domínios Hg-C_H2-C_H3 dentro do escopo dessa invenção podem incluir outras substituições, mutações e/ou deleções.

As seqüências de polipeptídeo parciais de outros mimeticorpos de GLP-2 baseados em A2G da invenção com comprimentos de ligantes variáveis são mostrados em SEQ ID Nºs: 6, 7, 8, 9, 10 e 11. Essas seqüências mostram todos os domínios com a exceção dos domínios C_H2 e C_H3. Será compreendido por aqueles versados na técnica que um domínio C_H2 e C_H3 poderia estar contido em um mimeticorpo funcional.

As seqüências de polipeptídeo parciais de outros mimeticorpos de GLP-2 exemplares da invenção baseados nos análogos de GLP-2 que têm as seqüências de aminoácido mostradas em SEQ ID Nºs: 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, e 57 são mostradas em SEQ ID Nºs: 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, e 65, respectivamente. Essas seqüências mostram todos os domínios com a exceção dos domínios C_H2 e C_H3. Será compreendido por aqueles versados na técnica que um domínio C_H2 e C_H3 poderia estar contido em um mimeticorpo funcional.

A presente invenção inclui mimeticorpos de GLP-2 que são capazes de, por ligação, ativar GLP-2R. Os mimeticorpos da presente invenção podem se ligar a GLP-2R com uma ampla faixa de afinidades. A afinidade de um mimeticorpo de GLP-2 por GLP-2R pode ser determinada experimentalmente usando qualquer método adequado, por exemplo, métodos usando instrumentação Biacore ou KinExA, ELISA e ensaios de ligação competitiva.

Os mimeticorpos e polipeptídeos de GLP-2 da presente invenção são úteis no tratamento de distúrbios ou sintomas caracterizados por inflamação, injúria e/ou disfunção do epitélio da mucosa intestinal. Efeitos de GLP-2 também são observados na formação e manutenção de osso, e em distúrbios mediados pelo sistema nervoso central devido ao seu papel como fator central de saciedade. Doenças ou sintomas que podem ser tratados usando mimeticorpos ou polipeptídeos de GLP-2 da invenção incluem, mas não são limitados a, doenças do GI, incluindo SBS, doença inflamatória do

intestino (IBD), doença de Crohn, colite, pancreatite, ileíte, íleo inflamatório (tanto pós operatório como por outras causas), mucosite associada com quimioterapia e/ou radioterapia, atrofia intestinal causada por nutrição parenteral total ou isquemia, distúrbios relacionados aos ossos tal como osteoporose, distúrbios relacionados com nutrientes incluindo obesidade, e distúrbios pediátricos do GI incluindo insuficiência intestinal devido à enterocolite necrosante em crianças recém-nascidas. Mimeticorpos ou polipeptídeos de GLP-2 da presente invenção também podem ser usados para prevenir, reduzir os sintomas de, e tratar íleo inflamatório.

Conseqüentemente, outro aspecto da presente invenção são composições farmacêuticas que compreendem pelo menos um mimeticorpo ou polipeptídeo de GLP-2 da invenção e um veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável conhecido na técnica. O veículo ou diluente pode ser uma solução, suspensão, colóide, ou pó.

Um mimeticorpo ou polipeptídeo da invenção é formulado como uma composição farmacêutica em uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz. O termo "quantidade eficaz" refere-se às quantidades de mimeticorpo ou polipeptídeo necessárias para terapia eficaz, isto é, o alívio parcial ou completo do sintoma ou distúrbio para o qual o tratamento foi buscado. Incluídos dentro da definição de terapia eficaz estão tratamentos profiláticos pretendidos para reduzir a probabilidade de início dos sintomas ou distúrbios descritos acima.

A composição pode compreender opcionalmente pelo menos um composto, proteína ou composição adicional útil para tratar os estados de doença discutidos aqui. Por exemplo, os mimeticorpos da invenção podem ser usados em combinação com glutamina ou outros suplementos nutricionais são contemplados para aumentar o peso corporal, auxiliar na cura intestinal ou melhorar a absorção de nutrientes. Além disso, combinações com agentes antiinflamatórios também são contempladas. O termo "em combinação com" como usado aqui e nas reivindicações significa que os agentes descritos podem ser administrados a um mamífero juntos em uma mistura, concomitantemente como agentes únicos ou seqüencialmente como agentes

únicos em qualquer ordem.

Ácidos nucléicos, vetores e linhagens celulares

Outro aspecto da presente invenção são moléculas de ácido nucleico isoladas que compreendem, complementares a ou tendo identidade significativa com, um polinucleotídeo que codifica pelo menos um mimeticorpo ou polipeptídeo de GLP-2 da invenção. Outros aspectos da presente invenção incluem vetores recombinantes que compreendem pelo menos um mimeticorpo ou polipeptídeo de GLP-2 isolado da invenção que codifica moléculas de ácido nucleico e linhagens celulares e organismos que são capazes de expressar as moléculas de ácido nucleico. Os ácidos nucléicos, vetores de expressão, e linhagens celulares também podem ser usados geralmente para produzir o mimeticorpo da invenção.

Em uma modalidade, as composições de ácido nucleico da invenção codificam polipeptídeos que têm seqüências de aminoácido idênticas ou substancialmente homólogas a qualquer uma de SEQ ID Nºs: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 42, 43, 44, 45, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 74, 75, e 77. Seqüências de ácido nucleico exemplares que codificam as seqüências de polipeptídeo mostradas em SEQ ID Nº: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 42, 43, 44, 45, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 75, e 77 são mostradas em SEQ ID Nº: 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 46, 47, 48, 49, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 76, e 78, respectivamente. Também são fornecidas variações alélicas dos ácidos nucléicos descritos acima.

Tipicamente, os ácidos nucléicos da presente invenção são usados em vetores de expressão para a preparação do mimeticorpo ou polipeptídeos de GLP-2 da invenção. Vetores dentro do escopo da invenção fornecem elementos necessários para expressão eucariótica, incluindo vetores direcionados por promotor viral, tais como vetores direcionados por promotor de CMV, por exemplo, pcDNA3.1, pCEP4 e seus derivados, vetores de expressão de Baculovírus, vetores de expressão de Drosophila e vetores de expressão que são direcionados por promotores de genes de mamífero, tais como promotores de gene de Ig humana. Outros exemplos incluem vetores de expressão procarióticos, tais como vetores direcionados por promotor de

T7, por exemplo, pET41, vetores direcionados por promotor de lactose e vetores direcionados por promotor de gene de arabinose.

A presente invenção também refere-se a linhagens celulares que expressam mimeticorpos ou polipeptídeos de GLP-2 da invenção. As células hospedeiras podem ser células procarióticas ou eucarióticas. Células eucarióticas exemplares são células de mamífero, tais como, mas não limitadas a, COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, HepG2, 653, SP2/0, NS0, 293, HeLa, mieloma, células de linfoma, ou qualquer outra derivadas dessas. O mais preferivelmente, as células hospedeiras são células HEK293, NS0, SP2/0 ou CHO. As linhagens celulares da presente invenção podem expressar estavelmente pelo menos um mimeticorpo de GLP-2. As linhagens celulares podem ser geradas por procedimentos de transfecção estável ou transitória que são bem conhecidos na técnica.

A presente invenção ainda fornece métodos para expressar pelo menos um mimeticorpo ou polipeptídeo de GLP-2 que compreende cultivar as linhagens celulares sob condições em que o mimeticorpo ou polipeptídeo GLP-2 seja expresso em quantidades detectáveis ou recuperáveis. A presente invenção também fornece métodos para gerar pelo menos um mimeticorpo ou polipeptídeo que compreende traduzir o mimeticorpo ou polipeptídeo de GLP-2 que codifica ácidos nucléicos sob condições *in vitro* ou *in situ*, tal que o mimeticorpo ou polipeptídeo de GLP-2 seja expresso em quantidades detectáveis ou recuperáveis. A presente invenção também abrange mimeticorpos ou polipeptídeos de GLP-2 produzidos pelos métodos acima.

Um mimeticorpo de GLP-2 pode ser recuperado e purificado por métodos bem conhecidos incluindo, mas não limitados a, purificação por proteína A, sulfato de amônio ou precipitação com etanol, extração com ácido, cromatografia por troca de ânion ou cátion, cromatografia de fosfocelulose, cromatografia por interação hidrofóbica, cromatografia de afinidade, cromatografia de hidroxilapatita, e cromatografia de lectina. Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) também pode ser empregada para purificação.

Alternativamente, um polipeptídeo derivado de GLP-2 da invenção pode ser preparado por técnicas de síntese química bem conhecidas daqueles versados na técnica. Polipeptídeos da invenção produzidos tanto por métodos recombinantes como químicos podem ser recuperados e purificados por métodos bem conhecidos daqueles versados na técnica.

Métodos de uso

Os mimeticorpos ou polipeptídeos de GLP-2 são úteis, *inter alia*, como reagentes de pesquisa e agentes terapêuticos. Em um aspecto, a presente invenção refere-se a um método de modificar as atividades biológicas de GLP-2 compreendendo fornecer pelo menos um mimeticorpo ou polipeptídeo de GLP-2 a um mamífero de que necessite disso. O mimeticorpo ou polipeptídeo de GLP-2 pode ativar cascatas de sinalização celular através de GLP-2R. Em particular, o mimeticorpo ou polipeptídeo de GLP-2 pode funcionar como um agonista de GLP-2R. O termo "agonista" é usado no sentido mais amplo e inclui uma molécula que é capaz de ativar, aumentar ou promover, diretamente ou indiretamente, parcialmente ou completamente uma ou mais atividades biológicas de GLP-2R.

A presente invenção também fornece métodos para reduzir os sintomas de, ou tratar pelo menos uma condição relacionada com GLP-2 que compreendem administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de pelo menos uma composição farmacêutica de mimeticorpo ou polipeptídeo de GLP-2 a um paciente que necessite disso. As condições e doenças adequadas para tratamento usando os métodos da presente invenção incluem, mas não são limitadas a, doenças do GI, incluindo SBS, doença de Crohn, e distúrbios pediátricos de GI, mucosite associada com quimioterapia de câncer, IBD, íleo inflamatório, e outras doenças e condições descritas acima.

GLP-2 interage preferivelmente com GLP-2R encontrado primariamente em neurônios do sistema nervoso entérico, e em células enteroendócrinas que contêm GLP-2 (Guan *et al.*, Gastroenterology 130: 150-164 (2006)). Uma das funções primárias de GLP-2 é promover a proliferação de células colunares nas criptas das vilosidades em que ela aumenta a renova-

ção de células epiteliais e cura de lesão da mucosa (Bulut *et al.*, Regul. Pept. 121: 137-43 (2004)), aumenta a função de barreira da mucosa (Benjamin *et al.*, Gut 47: 112-119 (2000)), e inibe a morte celular por apoptose (Brubaker & Drucker, Endocrinology 145: 2653-2659 (2004)). Esses efeitos foram mostrados ser neuralmente dependentes já que GLP-2R não é expresso em células epiteliais colunares da cripta (Bjerknes & Cheng, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98: 12497-12502 (2001)). A presença de GLP-2R em neurônios entéricos sugere que GLP-2 pode modificar a motilidade assim como interações neuro-imunes que desempenham um papel em inflamação intestinal.

Conseqüentemente, a presente invenção ainda fornece métodos de prevenir, reduzir os sintomas de, ou tratar íleo inflamatório, que compreendem administrar uma composição de polipeptídeo de GLP-2 ou uma composição de mimeticorpo de GLP-2 a um paciente que necessita disso. Como usado aqui, "íleo inflamatório" pode ser íleo de qualquer porção do trato gastrointestinal, por exemplo, o estômago, o intestino delgado, e/ou o cólon. Além disso, "íleo inflamatório" pode resultar de qualquer fator que cause íleo, por exemplo, cirurgia, incluindo cirurgia abdominal, tal como cirurgia de transplante ou cirurgia abdominal diferente de cirurgia de transplante, cirurgia do intestino, tal como ressecção de intestino, e cirurgia ortopédica; lesão traumática, por exemplo, quedas, acidente de automóvel, agressão pessoal, ou quaisquer seqüelas que resultem de lesão traumática, por exemplo, fraturas de membros, fraturas de costelas, fraturas da espinha, lesões torácicas, isquemia, hematomas retroperitoneais; inflamação intraperitoneal, por exemplo, sepse intra-abdominal, apendicite aguda, colecistite, pancreatite, cólica uretérica, pneumonia basal; infarto do miocárdio; distúrbios metabólicos; ou qualquer combinação desses.

Como descrito acima, a composição farmacêutica de mimeticorpo ou polipeptídeo de GLP-2 compreende uma quantidade eficaz de pelo menos um mimeticorpo ou polipeptídeo de GLP-2 e um veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável. A quantidade eficaz para uma dada terapia, curativa ou preventiva, dependerá geralmente de vários fatores, incluindo meios de administração, sítio alvo e outros medicamentos administrados.

Dessa forma, doses de tratamento precisarão ser tituladas para otimizar a segurança e eficácia.

Os métodos da presente invenção podem ainda compreender opcionalmente co-administração ou terapias de combinação com qualquer terapia padrão usada para tratar as doenças listadas acima.

O modo de administração pode ser qualquer via adequada para liberar a quantidade farmaceuticamente eficaz de mimeticorpo ou polipeptídeo GLP-2 da presente invenção a um hospedeiro. Por exemplo, o mimeticorpo ou polipeptídeo de GLP-2 pode ser liberado através de administração parenteral, tal como administração subcutânea, intramuscular, intradérmica, intravenosa ou intranasal, ou qualquer outro meio conhecido na técnica.

A presente invenção é ainda descrita com relação aos seguintes exemplos. Esses exemplos são meramente para ilustrar aspectos da presente invenção e não pretendem ser limitações dessa invenção.

Exemplo 1

Clonagem, Expressão e Purificação de mimeticorpos de GLP-2 em Células de Mamíferos

A seqüência de ácido nucléico que codifica GLP-2 A2S foi gerada em uma amplificação por PCR de duas etapas. A primeira rodada de amplificação foi realizada usando o iniciador direto 5'-CCAAAGTATACAGGCGCATAGCGATGGTTCTTTCTCTGATGAGATGAACACCATTCTTG-3' (SEQ ID Nº: 37) e o iniciador reverso 5'-TTGGTCTGAATCAACCAGTTTATAAAGTCTCGAGCGGCAAGATTATCAAGAATGGTGTTCATCTC-3' (SEQ ID Nº: 38). As temperaturas de desnaturação, anelamento e extensão foram de 96ºC, 48ºC, e 72ºC, respectivamente. Três ciclos de reações foram realizados.

Para a segunda rodada de amplificação, o iniciador direto incluiu um sítio de reconhecimento de enzima de restrição NotI e os iniciadores reversos incluiram um sítio de BamHI. A seqüência do iniciador direto é 5'-TTTGCGGCCGCCCAAAGTATACAGGCG-3' (SEQ ID Nº: 39) e o iniciador reverso é 5'-AAAGGATCCGTCAGTGATTTTGGTCTGAATCAACCAG-3' (SEQ ID Nº: 40). As temperaturas de desnaturação, anelamento e extensão

foram de 96ºC, 48ºC, e 60ºC, respectivamente. Três ciclos de reações foram realizados.

A seqüência de ácido nucleico que codifica GLP-2 A2G foi gerada pelo mesmo procedimento exceto que o iniciador direto usado na primeira rodada de amplificação é 5'-CCAAAGTATACAGGCGCATGGCGATGGTTCTTTCTCTGATGAGATGAACACCATTCTTG-3' (SEQ ID Nº: 41).

Os produtos de PCR amplificados (A2S e A2G GLP-2) foram clonados nos sítios NotI/BamHI de um promotor de CMV direcionado, vetor de expressão de IgG4 ΔCH1 humano, Ser para Pro, Ala/Ala usando procedimentos de clonagem padronizados.

Os mimeticorpos de IgG4 GLP-2 A2S e A2G foram transitoriamente expressos em células HEK293E e purificados a partir do meio condicionado usando cromatografia de afinidade de proteína A de acordo com procedimentos padronizados. O material eluído a partir da coluna de afinidade de proteína A foi ainda submetido a uma coluna de exclusão de tamanho para purificação adicional.

Os mimeticorpos de GLP-2 A2S e A2G foram analisados por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) e a cromatografia de exclusão de tamanho acoplada à análise de dispersão da luz estática (SEC-SLS). A migração dos mimeticorpos purificados em SDS-PAGE sob ambas as condições de desnaturação redutora e não redutora foi na faixa esperada. A análise por SEC-SLS mostrou uma proteína com um peso molecular de aproximadamente 123 KD que corresponde ao dímero dos mimeticorpos. Como os Mimeticorpos de GLP-2 migram como um monômero no gel de SDS-PAGE, a dimerização é através de interações não covalentes.

Exemplo 2

Ensaio de Expressão de cAMP

A fim de avaliar as atividades *in vitro* dos mimeticorpos de GLP-2, um ensaio de expressão de cAMP foi desenvolvido. Para se atingir esse objetivo, uma linhagem celular clonal que expressa GLP-2R humano mutado foi gerada pela transfecção de células HEK 293E. GLP-2R humano mutado

difere de GLP-2R humano selvagem (SEQ ID Nº:35) em três posições de aminoácidos dentro da região intracelular C-terminal (SEQ ID Nº: 36). O peptídeo de GLP-2 estimulou a expressão de cAMP nessa linhagem celular e a estimulação foi específica, já que um peptídeo de controle não estimulou a expressão de cAMP.

Os mimeticorpos de IgG4 GLP-2 A2S e A2G foram comparados com os peptídeos de GLP-2 correspondentes (A2S e A2G) quanto a sua habilidade de estimular a expressão de cAMP na linhagem celular recombinante. Resumidamente, as células foram incubadas com o mimeticorpo de GLP-2 ou peptídeo de GLP-2 individual por 30 minutos. A expressão de cAMP foi quantificada usando o cAMP Direct Screen System (Cat. No. CSD 200, Applied Biosystems, Bedford, MA). A EC_{50} para os peptídeos A2S e A2G é 0,5 nM e 0,8 nM, respectivamente; a EC_{50} para os peptídeos de A2S e A2G é 2,2 nM e 3,8 nM, respectivamente. Portanto, a potência dos mimeticorpos de GLP-2 nesse ensaio foi ~4 vezes menor do que o peptídeo.

Exemplo 3

Variantes de Mimeticorpos de GLP-2

Para investigar o efeito do comprimento do ligante sobre o mimeticorpo de GLP-2, diferentes construtos com várias extensões ligantes foram gerados. As seqüências da região central são mostradas abaixo na Tabela 1.

Essas variantes foram expressas transitoriamente em células HEK 293, purificadas e analisadas por SDS-PAGE. A análise por SEC-SLS mostrou um pico com um peso molecular de 65-70 kDa, correspondendo ao monômero dos mimeticorpos além daquele que corresponde ao dímero dos mimeticorpos. Foi observado que quanto maior a extensão de ligante, maior a proporção da população de monômeros.

Extensões de ligantes e variantes da região V2 foram testadas no ensaio de expressão de cAMP descrito no Exemplo 2. Os dados demonstraram que as atividades dos mimeticorpos de GLP-2, como medido por EC_{50}, se correlacionaram diretamente com a extensão do ligante, isto é, mimeticorpos com ligantes mais longos tem atividade maior (Tabela 1).

Tabela 1. Seqüências de aminoácidos do centro e EC_{50} de mimeticorpos de GLP-2 com extensão de ligante variável.

SEQ ID Nº:	Seqüência de aminoácido	EC_{50} (nM)
5*	HGDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITDGSGG GSGTLVTVSSESKYGPPCPPCP	5,1
6	HGDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQT-KITDGGGGSCPPCP	40
7	HGDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITDGGG GSGGGGSCPPCP	22,5
8	HGDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITDGGG GSGGGGSGGGGSCPPCP	12,7
9	HGDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITDGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSCPPCP	4,6
10	HGDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITDGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSCPPCP	2,1
11**	HGDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITDGSGG GSGALVAVSSESLYGPPCPPCP	3,1

* Apenas os aminoácidos de números 1-59 de SEQ ID Nº: 5 são mostrados na tabela.

** SEQ ID Nº: 11 mostra uma variante de região V2.

A fim de aumentar a estabilidade de mimeticorpos de GLP-2, várias variantes foram construídas nas quais os resíduos de aminoácidos nos sítios sensíveis à clivagem proteolítica na região V2 ou Hg foram substituídos por Pro. As seqüências da região central das variantes do mimeticorpo de GLP-2 são mostradas abaixo na Tabela 2.

Tabela 2. Seqüências de aminoácidos do centro e EC_{50} de mimeticorpos de GLP-2 com substituição de Pro.

SEQ ID Nº:	Seqüência de aminoácidos	EC_{50} (nM)
42	HGDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITDGSGGG SGALVPVSSESKYGPPCPPCP	3,6
43	HGDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITDGSGGG SGALVAVPSESKYGPPCPPCP	4,8
44	HGDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITDGSGGG SGALVAVSPESKYGPPCPPCP	7,7
45	HGDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITDGSGGG SGALVAVSSESKPGPPCPPCP	5,8

As variantes com substituição de Pro foram expressas transitoriamente em células HEK 293, purificadas e analisadas por SDS-PAGE. Os dados do ensaio de expressão de cAMP demonstraram que as atividades dessas variantes de mimeticorpos de GLP-2, como medido pela EC_{50}, são comparáveis àquelas do mimeticorpo A2G de GLP-2 (SEQ ID Nº:5).

As variantes com substituição de Pro purificadas foram incubadas com lisado de célula U397 na presença de comprimidos do inibidor de protease CompleteMini (Cat. Nº 1 836 153, Roche Applied Science, Indianapolis, IN) por 0, 12 ou 24 horas. Mais tarde, as variantes do mimeticorpo de GLP-2 foram purificadas usando "beads" de Proteína A e resolvidas em um gel de SDS-PAGE. Como mostrado na Figura 1, em comparação com o mimeticorpo de GLP-2 A2G (SEQ ID Nº:5), houve menos degradação nas variantes com substituição de Pro (SEQ ID Nº: 43 ou 44) no período de teste de 24 horas. Em conclusão, as variantes com substituição de Pro são mais resistentes à proteólise *in vitro.*

Exemplo 4

Mimeticorpo de GLP-2 Estimula o Ganho de Peso Mucoso no Intestino Delgado

Para demonstrar as atividades *in vivo* dos mimeticorpos de GLP-2, camundongos CD1 foram inoculados com os mimeticorpos de GLP-2 e

pontos de medição dentro do intestino delgado foram avaliados. Resumidamente, camundongos CD1 fêmeas foram inoculados diariamente com injeções subcutâneas de peptídeo de GLP-2 A2G (SEQ ID Nº: 3), mimeticorpo de IgG4 de GLP-2 A2G (SEQ ID Nº: 5) ou mimeticorpo de controle por 10 dias. Mais tarde, os camundongos foram sacrificados e os intestinos delgados foram removidos, lavados com salina e processados como descrito abaixo.

Especificamente, seções de 4 cm foram coletadas: (1) imediatamente distal ao piloro (duodeno), (2) iniciando a 2 cm distais do ligamento de Treitz (jejuno) e (3) imediatamente proximal ao ceco (íleo). O restante do intestino delgado entre ~6 cm distais ao ligamento de Treitz até 4 cm proximais ao ceco foi usado para preparar raspados de mucosa. Das extremidades proximal e distal do restante, uma distância igual foi removida até que restou uma seção de 15 cm, o remanescente foi cortado longitudinalmente, lavado e a camada mucosa foi removida usando a extremidade curta de uma lâmina de vidro de microscópio. O peso úmido dos segmentos intactos intestinais e da mucosa foi medido.

O peso dos raspados de mucosa retirados do segmento de 15 cm entre o jejuno e íleo de camundongos diferentes é mostrado na Figura 2. Para camundongos inoculados com mimeticorpo de GLP-2 A2G, um aumento dependente da dose no peso úmido da mucosa foi observado. Com 0,8 e 8 mg/kg (0,26 e 2,6 nmoles, respectivamente) o aumento foi estatisticamente significativo comparando com o mimeticorpo de controle ($p<0,0001$ e $p<0,0004$, respectivamente).

Um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,0001$) também foi visto em camundongos inoculados com 2,5 mg/kg (13,3 nmoles) de peptídeo de GLP-2 A2G. Em comparação, o mimeticorpo de GLP-2 A2G é eficaz *in vivo* em uma dose 50 vezes menor do que a do peptídeo de GLP-2 A2G (em base molar).

Exemplo 5

Farmacocinéticas de Mimeticorpo de GLP-2

Para medir a farmacocinética de mimeticorpos de GLP-2, ca-

mundongos CD1 foram inoculados intravenosamente ou subcutaneamente com 3 mg/kg de mimeticorpo de GLP-2 A2G (SEQ ID Nº: 5). Sangue foi coletado em diferentes períodos de tempo em tampão citrato contendo inibidores de protease para minimizar a possibilidade de degradação *ex vivo* e o plasma foi separado por centrifugação.

Um ensaio de fluorescência resolvido com o tempo (TRF) foi usado para medir o mimeticorpo ativo. Mimeticorpo ativo reflete a terminação-N intacta do peptídeo ainda acoplada à região Fc do mimeticorpo.

Com base nos experimentos de TRF, a meia-vida calculada do mimeticorpo de GLP-2 A2G em camundongos foi de 26,5 horas. Em contraste, a meia-vida relatada do peptídeo de GLP-2 em humanos é de 7,2 +/- 2 minutos (Hartmann *et al.*, J. Clin. Endocrinol. Metab. 85: 2884–2888 (2000)). Portanto, a meia-vida do mimeticorpo de GLP-2 A2G é mais do 200 vezes maior do que aquela do peptídeo de GLP-2.

Em um experimento similar, macacos cinomolgos foram inoculados intravenosamente com 1 mg/kg do mimeticorpo de GLP-2 A2G. Com base nos dados de TRF, a meia-vida calculada do mimeticorpo de GLP-2 A2G em macacos cinomolgos foi de 4,8 dias.

Exemplo 6

Farmacodinâmica de Mimeticorpo de GLP-2

Com base na sua farmacocinética estendida, espera-se que o mimeticorpo de GLP-2 tenha uma duração de resposta mais longa. Para avaliar a farmacodinâmica do mimeticorpo de GLP-2 A2G, camundongos foram dosados diariamente, em dias alternados, semanalmente ou apenas uma vez no início do estudo. Para controlar a manipulação dos animais, nos dias em que os camundongos não receberam mimeticorpo de GLP-2 A2G, eles foram injetados com o mimeticorpo de controle negativo, isto é, a estrutura da imunoglobulina do mimeticorpo sem o peptídeo de GLP-2. As doses do mimeticorpo de GLP-2 A2G e o controle negativo foram 4 mg/kg (1,3 nmol/kg) para todos os grupos. A duração do estudo foi de 11 dias e o tecido foi processado como descrito no Exemplo 4.

Camundongos dosados com o mimeticorpo de GLP-2 A2G uma

vez por semana tiveram um aumento significativo do peso da mucosa em comparação ao mimeticorpo de controle. A diferença foi mais pronunciada quando o mimeticorpo de GLP-2 A2G foi administrado todos os dias, ou em dias alternados. Padrão similar foi observado com relação ao peso líquido da seção de intestino delgado. Tanto no duodeno como no jejuno, um aumento significativo no peso sobre o mimeticorpo de controle foi visto com todos os regimes exceto para o experimento de dose única.

Exemplo 7

Mutações em GLP-2 Evitam Dimerização de Peptídeo

Peptídeo de GLP-2 selvagem (SEQ ID Nº: 1) dimeriza em alta concentração. Por exemplo, em PBS (pH 7,5), GLP-2 existe como um monômero a 0,4 mg/mL, mas como uma mistura de monômeros (cerca de 20%) e dímero reversivelmente auto-associado (cerca de 80%) a 2 mg/mL (dados não mostrados). A auto-associação impõe um desafio ao desenvolvimento e fabricação de um terapêutico homogêneo.

Foram desenhados análogos de peptídeo (SEQ ID Nºs: 52, 54, 55, e 74) que retêm a atividade biológica de GLP-2 selvagem e existem como um monômero em alta concentração. GLP-2 (A2G, L17Q) (SEQ ID Nº: 54) e GLP-2 (A2G, N16G, L17Q) (SEQ ID Nº: 55) foram sintetizados e purificados para >95% de pureza. Os peptídeos GLP-2 (SEQ ID Nº: 1), GLP-2 (A2G) (SEQ ID Nº: 3), e GLP-1 (SEQ ID Nº: 79) foram incluídos como controles na caracterização dos análogos.

Peso molecular da solução dos peptídeos foi medido por SEC-SLS. Resumidamente, soluções de peptídeo em PBS (pH 7.5) a 0,4 a 2,0 mg/mL foram refracionadas em uma coluna de peptídeo Superdex (Amersham Pharmacia). Os picos eluídos foram monitorados por difração de luz estática a 690 nm e o peso molecular da solução foi determinado a UV 280 nm usando o pacote de programas Astra (Wyatt Inc.).

A 1 mg/ml, GLP-1 eluiu como um único pico com peso molecular dentro do tamanho de monômero esperado. GLP-2 e GLP-2 (A2G) apresentaram distribuições similares dos picos de dímero e monômero superpostos. Ambos os peptídeos análogos GLP-2 (A2G, L17Q) e GLP-2 (A2G, N16G,

L17Q) eluiram como picos únicos com peso molecular consistente principalmente com peptídeo monomérico.

As estruturas secundárias de peptídeos testados foram determinadas usando 0,2 mg/mL de soluções de peptídeo em PBS. Resumidamente, os espectros de CD foram coletados em triplicata em intervalos de 1 nm a 25°C em célula de extensão de trajetória de 0,1 cm. Estruturas secundárias foram determinadas pelo ajuste de espectro de CD usando o programa de espectro de CD (CD Spectra Deconvolution Software 2.1). Todos os peptídeos testados continham picos que correspondiam a presença de alfa hélices. Entretanto, o conteúdo de alfa hélice nos peptídeos análogos GLP-2 (A2G, L17Q) e GLP-2(A2G, N16G, L17Q) foi de ~17%, similar àquele de GLP-1, e menor do que aquele de GLP-2 e GLP-2 (A2G) (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de estrutura helicoidal e espiral aleatória em peptídeos de GLP

Estrutura	GLP-2	GLP-2 (A2G)	GLP-2 (A2G, L17Q)	GLP-2 (A2G, N16G, L17Q)	GLP-1
Hélice	19,6%	20,7%	16,9%	17,0%	16,8%
Espiral aleatória	37,9%	37,1%	41,8%	41,4%	41,9%

Além disso, trifluoroetanol (TFE) é conhecido por induzir formação de hélice em peptídeos (Soennichsen *et al.*, Biochemistry 31: 8791 (1992)). Conseqüentemente, a análise de tendência helicoidal usando TFE foi realizada. Resumidamente, os peptídeos testados foram diluídos para 0,2 mg/mL em PBS (pH 7.5) contendo 0, 1, 5, 15, 33 ou 50% de TFE. Os espectros de CD foram coletados e gráficos de CD foram gerados após calcular a média dos dados, subtração de tampão e uniformização da curva. Os valores de tendência helicoidal foram obtidos a partir da elipticidade de resíduo média (MRE) a 222 nm versus gráficos de % de TFE. A concentração de TFE que efetuou uma transformação de 50% do espectro de CD a 222 nm foi usada como uma medida da tendência helicoidal.

Os resultados mostraram que GLP-2 e GLP-2 (A2G) apresentaram maior tendência helicoidal, requerendo ~16% de TFE para transforma-

ção para sinal de hélice máximo. Em comparação, GLP-1 teve menor tendência helicoidal, requerendo >20% de TFE para a transformação helicoidal. De forma significativa, os peptídeos análogos GLP-2 (A2G, L17Q) e GLP-2 (A2G, N16G, L17Q) requerem >20% de TFE para transformação helicoidal, tendo uma semelhança mais próxima a GLP-1 do que GLP-2. Portanto, a substituição L17Q diminuiu o potencial de formação de hélice do peptídeo de GLP-2.

Exemplo 8

Mutações em GLP-2 Evitam a Dimerização do Mimeticorpo

Seqüências de ácido nucléico que codificam mimeticorpos de GLP-2 com análogos A2G, L17Q (SEQ ID Nº: 75) e A2G, N16G, L17Q (SEQ ID Nº: 77), foram gerados usando o kit QuickChange XL da Stratagene. Essas variantes de mimeticorpos foram transitoriamente expressas em células HEK 293E e purificadas seguindo os procedimentos do Exemplo 1.

Com base na análise de SEC-SLS, o mimeticorpo de GLP-2 (A2G, N16G, L17Q) exibiu um peso molecular consistente com monômero, enquanto que o mimeticorpo de GLP-2 (A2G, L17Q) exibiu um peso molecular que refletia uma mistura de monômero e dímero.

Exemplo 9

Atividade *In vitro* de Mimeticorpos Análogos de GLP-2

A atividade *in vitro* de análogos de GLP-2 foi testada em um ensaio de expressão de cAMP. Esse ensaio foi baseado no cAMP Direct Screen System de Applied Biosystems utilizando uma linhagem celular que expressa huGLP-2R mutada em células HEK 293E. O peptídeo em concentrações que variam de 0,01 nM a 1,0 uM em PBS com BSA 0,5% foi adicionado a ~50.000 células suspensas em placas de 96 poços. Após uma incubação de 30 minutos a 37ºC, Tampão de Lise seguido por reagentes de luminescência (Applied Biosystems) foi adicionado de acordo com os procedimentos do fabricante (Applied Biosystems Luminescence protocol: cAMP-Screen Direct System). A luminescência foi quantificada usando um analisador de cintilação líquida TopCount (PerkinElmer) e os dados foram processados usando o programa Softmax (Molecular Devices Corporation). Os valores de

EC-50 obtidos dos gráficos de níveis de cAMP versus a concentração de peptídeo estão listados na Tabela 5 abaixo.

Tabela 5: Valores de EC-50 de peptídeos de GLP-2 obtidos a partir de gráficos de cAMP versus a concentração de peptídeo

Estruturas	GLP-2 selvagem	GLP-$2_{(A2G)}$	GLP-$2_{(A2G, N16G, L17Q)}$	GLP-$2_{(A2G, L17Q)}$
Valores de EC50 de cAMP *in Vitro* (nM)	1,6	1,9	3,5	5,2

Os dados indicam apenas 2x e 3x menos atividade de GLP-$2_{(A2G,N16G, L17Q)}$ e GLP-$2_{(A2G, L17Q)}$, respectivamente, em relação a GLP-2 selvagem.

Exemplo 10

Peptídeo A2G-GLP-2 Acelera o Trânsito do GI Superior

Para testar os efeitos de A2G-GLP-2 sobre o trânsito gastrointestinal superior em camundongos normais, camundongos foram designados aleatoriamente em 2 grupos (14 animais por grupo de teste). Cada grupo recebeu diariamente uma injeção subcutânea (volume total de 200 ml) de peptídeo GLP-2-A2G (50 µg/camundongo) ou veículo de salina tamponada com fosfato por 10 dias consecutivos.

No dia do estudo, o transito gastrointestinal superior foi medido usando a técnica do corante de carmim. Camundongos foram alimentados com uma ração de teste de 0,25 mL de uma solução a 6% (p/v) de pó de cochinila carmim misturado em metilcelulose a 0,5% (p/v) administrada intragastricamente por um tubo de alimentação curvo de 18 gauge. Após a administração da ração de teste oral, os camundongos foram recolocados em suas gaiolas. Vinte minutos após a administração da ração marcadora, os camundongos foram rapidamente sacrificados por deslocamento cervical e o trato gastrointestinal completo foi retirado começando do cólon distal e trabalhando em direção ao piloro gástrico. O intestino retirado foi alinhado em paralelo a uma régua com escala métrica linear tomando cuidado para evitar o encolhimento do órgão. A distância linear atravessada pelo corante carmim através do intestino delgado foi medida junto com o comprimento

total do intestino delgado. O trânsito gastrointestinal superior foi expresso como o percentual do intestino delgado inteiro atravessado pelo corante carmim durante o período de teste de 20 minutos: % do intestino delgado atravessado = [distância atravessada pelo corante através do intestino delgado (cm) / comprimento total do intestino delgado (cm) x 100]. Como mostrado na Figura 3, o tratamento com A2G-GLP-2 levou a uma aceleração do trânsito gastrointestinal superior.

Exemplo 11

Mimeticorpo de GLP-2 Acelera o Trânsito de GI Superior

Para testar os efeitos do mimeticorpo de GLP-2 sobre o trânsito gastrointestinal superior em camundongos normais, os camundongos foram designados aleatoriamente em 2 grupos (4 animais por grupo). Cada grupo recebeu uma única injeção de mimeticorpo de GLP-2 A2G (SEQ ID Nº: 5) (4 mg/kg) ou de IgG4 de controle negativo 4 dias antes da medida do trânsito gastrointestinal.

No dia do estudo, o trânsito gastrointestinal superior foi medido usando o método FITC-dextrano. Esse método fornece tanto a medida do trânsito gastrointestinal como uma leitura do padrão de distribuição da ração de teste ao longo do trato gastrointestinal. Os camundongos foram alimentados com uma ração de teste de 150 ml de solução de FITC-dextrano (5 mg/ml de dextrano de peso molecular 70.000 conjugado com isotiocianato de fluoresceína em 0,5% de metilcelulose/água deionizada), administrada intragastricamente por um tubo de alimentação curvo de calibre 18. Após a administração oral da ração de teste com FITC-dextrano, os camundongos foram recolocados em suas gaiolas, Foi mostrado que um período de teste de 30 min era a duração ótima para detectar o trânsito acelerado, enquanto que um período de teste de 45 min era ótimo para detectar o trânsito retardado. Após o período de teste apropriado, os camundongos foram sacrificados pela exposição a dióxido de carbono. O trato gastrointestinal completo desde o esfíncter esofagiano inferior até o cólon terminal foi removido. Os segmentos do intestino foram abertos ao longo da borda mesentérica. O tecido e os conteúdos luminais do estômago, 10 segmentos iguais de intestino

delgado, o ceco e 3 segmentos iguais do cólon foram colocados em tubos Eppendorf individuais contendo 1 ml de PBS. O tecido foi vigorosamente misturado em um vortex table-top, e os materiais sólidos foram precipitados por centrifugação. Alíquotas do sobrenadante clarificado foram lidas em duplicata em um leitor de fluorescência de placa de 96 poços para quantificar a magnitude do sinal fluorescente em cada segmento de intestino. Esses valores foram usados para calcular o Centro Geométrico (GC), que é definido como a distribuição média ponderada do sinal fluorescente ao longo do trato gastrointestinal: GC = $\sum$ (% do sinal fluorescente total por segmento x número de segmentos)/100. Valores maiores representam taxas mais rápidas de trânsito em uma escala de 1 a 15. Como mostrado na Figura 4, uma única dose do tratamento com mimeticorpo de GLP-2 levou a uma aceleração do trânsito gastrointestinal superior. A mudança induzida pelo mimeticorpo no padrão de distribuição de FITC-dextrano é mostrada no painel superior. Há uma marcação diminuída no estômago, e uma mudança global da massa do marcador para segmentos mais distais do intestino delgado. O GC é calculado no painel inferior para comparação estatística. Camundongos normais exibem um GC = 6 após um teste de duração de 30 minutos e isso ficou inalterado pelo tratamento com o esqueleto de IgG4. O tratamento com o mimeticorpo de GLP-2 aumentou o GC para 7,5.

Exemplo 12

Mimeticorpo de GLP-2 Atenua a Motilidade GI Prejudicada Associada com Íleo Inflamatório Pós-Operatório

Devido a imunogenicidade de IgG4 humana em camundongos, um mimeticorpo de GLP-2 de murino, isto é, um peptídeo A2G-GLP2 humano em um esqueleto de IgG2a de murino (SEQ ID Nº: 80) foi usado nos seguintes experimentos.

Para testar os efeitos do mimeticorpo de GLP-2 sobre a motilidade de GI prejudicada associada com íleo inflamatório pós-operatório, camundongos foram randomizados em 3 grupos (8 animais por grupo) e tratados com 2 mg/kg de mimeticorpo A2G-GLP2 de murino, IgG2a ou PBS. Uma hora mais tarde, os camundongos foram submetidos à laparotomia e mani-

pulação do intestino delgado. Resumidamente, camundongos CD-1 machos foram anestesiados com isoflurano inalado e preparados para cirurgia. O abdome foi raspado e tratado com solução anti-séptica. O animal foi então coberto com um campo cirúrgico. O abdome foi aberto através de laparotomia medial e o intestino delgado inteiro foi exteriorizado sobre o campo estéril. Usando dois aplicadores com pontas de algodão, umedecidos, estéreis, o intestino delgado foi gentilmente comprimido ao longo de sua extensão a partir do ligamento de Treitz até a junção íleo-cecal. O intestino delgado foi então recolocado em sua cavidade e a incisão fechada e suturada. Mais tarde, os camundongos foram recolocados em suas gaiolas. Um quarto grupo de 8 animais serviu como controles naive.

Todos os camundongos receberam uma ração de teste oral de FITC-dextrano 48 horas após a operação. O trânsito gastrointestinal foi determinado 45 minutos após a alimentação oral. Como mostrado na Figura 5, os controles naive exibiram um trânsito normal de 45 minutos (GC = 8,2). A cirurgia abdominal levou a um retardo significativo no trânsito gastrointestinal em animais tratados com PBS. O tratamento com IgG2a não teve efeito sobre o retardo no trânsito induzido cirurgicamente, enquanto que o tratamento com mimeticorpo A2G-GLP-2 de murino levou a uma melhora significativa no trânsito.

Exemplo 13

Mimeticorpo de GLP-2 Reduz a Inflamação Celular Associada com Íleo Inflamatório Pós-Operatório

Para testar os efeitos do mimeticorpo de GLP-2 sobre a inflamação celular, íleo inflamatório pós-operatório foi induzido em camundongos como descrito no Exemplo 12. A histoquímica com mieloperoxidase foi realizada em tecidos coletados do intestino delgado médio dos camundongos 48 h após a operação.

Resumidamente, segmentos do intestino delgado médio foram coletados dos tubos de centrífuga descritos no Exemplo 12. Preparados de membrana da camada muscular foram preparadas por fixar o tecido estendido em uma placa de Petri coberta com Sylgard® e esticar o tecido para 2

vezes seu comprimento e 1,5 vezes sua largura. A mucosa foi removida por dissecção precisa. Preparados de membrana da muscularis foram então fixados com etanol 100% por uma hora, lavados 3 vezes com PBS, e incubados por 20 minutos em PBS contendo 0,1% de peróxido de hidrogênio e 1 mg/mL de reagente de Hanker-Yates. Após uma segunda lavagem com PBS, os preparados de membrana foram montados sobre lâminas de vidro, cobertos com lamínula, e visualizados em um microscópio ótico. Leucócitos contendo mieloperoxidase foram contados em 6 a 8 campos de visão óticos adjacentes a 200X e as contagens celulares médias foram calculadas e registradas.

Preparados de membrana representativos da muscularis intestinal corados para atividade de mieloperoxidase (MPO) usando reagente de Hanker-Yates são mostrados na Figura 6. Pontos pretos representam leucócitos MPO-positivos infiltrando a camada muscular do intestino delgado. Poucas células MPO-positivas foram encontradas em tecido colhido de camundongos naive. Um aumento acentuado no número de leucócitos infiltrantes foi descoberto em camundongos tratados com PBS antes de serem submetidos a manipulação cirúrgica do intestino delgado. Tratamento com IgG2a não teve efeito sobre os números de células infiltrantes. Em contraste, o tratamento com mimeticorpo A2G-GLP-2 de murino reduziu significativamente o número de células infiltrantes. As contagens celulares estão compiladas na Figura 7 para comparação estatística.

A presente invenção agora estando completamente descrita, será claro para um versado na técnica que muitas alterações e modificações podem ser feitas a ela sem desconsiderar o espírito ou escopo das reivindicações anexas.

Listagem de Seqüência

<110> CENTOCOR, INC.

<120> Mimeticorpos, Polipeptídeos, Composições, Métodos e Usos de GLP-2

<130> CEN5115PCT

<140> 11/552,408

<141> 2006-10-24

<150> 60/729704

<151> 2005-10-24

<150> 60/824160

<151> 2006-08-31

<150> 60/862487

<151> 2006-10-23

<160> 80

<170> FastSEQ para Windows Versão 4.0

<210> 1

<211> 33

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

His Ala Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30

Asp

<210> 2

<211> 33

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> variante GLP-2

<400> 2

His Ser Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30

Asp

<210> 3

<211> 33

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> variante GLP-2

<400> 3

His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30

Asp

<210> 4

<211> 275

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 4

His Ser Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30

Asp Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu
35 40 45

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
50 55 60

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Asp Thr Leu Met
65 70 75 80

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
85 90 95

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
100 105 110

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
115 120 125
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
130 135 140
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
145 150 155 160
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
165 170 175
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
180 185 190
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
195 200 205
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
210 215 220
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val
225 230 235 240
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
245 250 255
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
260 265 270
Leu Gly Lys
275

<210> 5
<211> 276
<212> PRT
<213> Seqüência Artificial
<220>
<223> Mimeticorpo
<400> 5

His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15

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

Ser Leu Gly Lys

275

<210> 6

<211> 43

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 6

His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn

1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr

20 25 30

Asp Gly Gly Gly Gly Ser Cys Pro Pro Cys Pro

35 40

<210> 7

<211> 48

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 7

His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn

1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr

20 25 30

Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Cys Pro Pro Cys Pro

35 40 45

<210> 8

<211> 53

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 8

His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30

Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
35 40 45

Cys Pro Pro Cys Pro
50

<210> 9

<211> 58

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 9

His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30

Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
35 40 45

Gly Gly Gly Gly Ser Cys Pro Pro Cys Pro
50 55

<210> 10

<211> 63

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 10

His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30

Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
35 40 45

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Cys Pro Pro Cys Pro
50 55 60

<210> 11

<211> 59

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 11

His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30

Asp Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ala Leu Val Ala Val Ser Ser Glu
35 40 45

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
50 55

<210> 12

<211> 831

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 12

catggcgatg gttctttctc tgatgagatg aacaccattc ttgataatct tgccgctcga 60

gactttataa actggttgat tcagaccaaa atcactgacg gatccggtgg aggctccggt 120

accttagtca ccgtctcctc agagtccaaa tatggtcccc catgcccacc atgcccggcg 180

cctgaggccg ccgggggacc atcagtcttc ctgttccccc caaaacccaa ggacactctc 240

atgatctccc ggacccctga ggtcacgtgc gtggtggtgg acgtgagcca ggaagacccc 300

gaggtccagt tcaactggta cgtggatggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg 360

cgggaggagc agttcaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 420

gactggctga acggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaaggcct cccgtcctcc 480

atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagcctcgag agccacaggt gtacaccctg 540

cccccatccc aggaggagat gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 600

ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 660

aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caggctaacc 720

gtggacaaga gcaggtggca ggaggggaat gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 780

ctgcacaacc actacacaca gaaaagcttg tccctgtctc tgggtaaatg a 831

<210> 13

<211> 129

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 13

catggcgatg gttctttctc tgatgagatg aacaccattc ttgataatct tgccgctcga 60

gactttataa actggttgat tcagaccaaa atcactgacg gaggaggtgg atcctgccca 120

ccatgcccg 129

<210> 14

<211> 144

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 14

catggcgatg gttctttctc tgatgagatg aacaccattc ttgataatct tgccgctcga 60

gactttataa actggttgat tcagaccaaa atcactgacg gaggaggtgg atccggtggt 120

ggcggcagtt gcccaccatg cccg 144

<210> 15

<211> 159

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 15

catggcgatg gttctttctc tgatgagatg aacaccattc ttgataatct tgccgctcga 60

gactttataa actggttgat tcagaccaaa atcactgacg gaggaggtgg atccggcggt 120

ggcggatctg gtggtggcgg cagttgccca ccatgcccg 159

<210> 16

<211> 174

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 16

catggcgatg gttctttctc tgatgagatg aacaccattc ttgataatct tgccgctcga 60

gactttataa actggttgat tcagaccaaa atcactgacg gaggaggtgg atccggtgga 120

ggaggctcag gcggtggcgg atctggtggt ggcggcagtt gcccaccatg cccg 174

<210> 17

<211> 189

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 17

catggcgatg gttctttctc tgatgagatg aacaccattc ttgataatct tgccgctcga 60

gactttataa actggttgat tcagaccaaa atcactgacg gaggaggtgg atccggcgga 120

ggaggttccg gtggaggagg ctcaggcggt ggcggatctg gtggtggcgg cagttgccca 180

ccatgcccg 189

<210> 18

<211> 177

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 18

catggcgatg gttctttctc tgatgagatg aacaccattc ttgataatct tgccgctcga 60

gactttataa actggttgat tcagaccaaa atcactgacg gatccggtgg aggctccggt 120

gccttagtcg ccgtctcctc agagtccaaa tatggtcccc catgcccacc atgcccg 177

<210> 19

<211> 4

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Ligante

<400> 19

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 20

<211> 6

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Ligante

<400> 20

Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 21

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> variante V2

<400> 22

Gly Ala Leu Val Ala Val Ser Ser

1 5

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro

1 5 10

<210> 26

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Cys Pro Pro Cys Pro

1 5

<210> 28

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
100 105 110

<210> 29
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 29

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
100 105 110

<210> 30
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 30

Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
35 40 45
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60
Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95
Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
100 105 110

<210> 31
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 31

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30
Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
35 40 45
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60
Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95
Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
100 105 110

<210> 32
<211> 107
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

<210> 33

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
1 5 10 15

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
100 105

<210> 34
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 34
Cys Pro Ser Cys
1

<210> 35
<211> 553
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 35
Met Lys Leu Gly Ser Ser Arg Ala Gly Pro Gly Arg Gly Ser Ala Gly
1 5 10 15
Leu Leu Pro Gly Val His Glu Leu Pro Met Gly Ile Pro Ala Pro Trp
20 25 30
Gly Thr Ser Pro Leu Ser Phe His Arg Lys Cys Ser Leu Trp Ala Pro
35 40 45
Gly Arg Pro Phe Leu Thr Leu Val Leu Leu Val Ser Ile Lys Gln Val
50 55 60
Thr Gly Ser Leu Leu Glu Glu Thr Thr Arg Lys Trp Ala Gln Tyr Lys
65 70 75 80
Gln Ala Cys Leu Arg Asp Leu Leu Lys Glu Pro Ser Gly Ile Phe Cys
85 90 95
Asn Gly Thr Phe Asp Gln Tyr Val Cys Trp Pro His Ser Ser Pro Gly
100 105 110
Asn Val Ser Val Pro Cys Pro Ser Tyr Leu Pro Trp Trp Ser Glu Glu
115 120 125

Ser Ser Gly Arg Ala Tyr Arg His Cys Leu Ala Gln Gly Thr Trp Gln
130 135 140
Thr Ile Glu Asn Ala Thr Asp Ile Trp Gln Asp Asp Ser Glu Cys Ser
145 150 155 160
Glu Asn His Ser Phe Lys Gln Asn Val Asp Arg Tyr Ala Leu Leu Ser
165 170 175
Thr Leu Gln Leu Met Tyr Thr Val Gly Tyr Ser Phe Ser Leu Ile Ser
180 185 190
Leu Phe Leu Ala Leu Thr Leu Leu Leu Phe Leu Arg Lys Leu His Cys
195 200 205
Thr Arg Asn Tyr Ile His Met Asn Leu Phe Ala Ser Phe Ile Leu Arg
210 215 220
Thr Leu Ala Val Leu Val Lys Asp Val Val Phe Tyr Asn Ser Tyr Ser
225 230 235 240
Lys Arg Pro Asp Asn Glu Asn Gly Trp Met Ser Tyr Leu Ser Glu Met
245 250 255
Ser Thr Ser Cys Arg Ser Val Gln Val Leu Leu His Tyr Phe Val Gly
260 265 270
Ala Asn Tyr Leu Trp Leu Leu Val Glu Gly Leu Tyr Leu His Thr Leu
275 280 285
Leu Glu Pro Thr Val Leu Pro Glu Arg Arg Leu Trp Pro Arg Tyr Leu
290 295 300
Leu Leu Gly Trp Ala Phe Pro Val Leu Phe Val Val Pro Trp Gly Phe
305 310 315 320
Ala Arg Ala His Leu Glu Asn Thr Gly Cys Trp Thr Thr Asn Gly Asn
325 330 335
Lys Lys Ile Trp Trp Ile Ile Arg Gly Pro Met Met Leu Cys Val Thr
340 345 350
Val Asn Phe Phe Ile Phe Leu Lys Ile Leu Lys Leu Leu Ile Ser Lys
355 360 365
Leu Lys Ala His Gln Met Cys Phe Arg Asp Tyr Lys Tyr Arg Leu Ala
370 375 380

Lys Ser Thr Leu Val Leu Ile Pro Leu Leu Gly Val His Glu Ile Leu
385 390 395 400
Phe Ser Phe Ile Thr Asp Asp Gln Val Glu Gly Phe Ala Lys Leu Ile
405 410 415
Arg Leu Phe Ile Gln Leu Thr Leu Ser Ser Phe His Gly Phe Leu Val
420 425 430
Ala Leu Gln Tyr Gly Phe Ala Asn Gly Glu Val Lys Ala Glu Leu Arg
435 440 445
Lys Tyr Trp Val Arg Phe Leu Leu Ala Arg His Ser Gly Cys Arg Ala
450 455 460
Cys Val Leu Gly Lys Asp Phe Arg Phe Leu Gly Lys Cys Pro Lys Lys
465 470 475 480
Leu Ser Glu Gly Asp Gly Ala Glu Lys Leu Arg Lys Leu Gln Pro Ser
485 490 495
Leu Asn Ser Gly Arg Leu Leu His Leu Ala Met Arg Gly Leu Gly Glu
500 505 510
Leu Gly Ala Gln Pro Gln Gln Asp His Ala Arg Trp Pro Arg Gly Ser
515 520 525
Ser Leu Ser Glu Cys Ser Glu Gly Asp Val Thr Met Ala Asn Thr Met
530 535 540
Glu Glu Ile Leu Glu Glu Ser Glu Ile
545 550

<210> 36
<211> 553
<212> PRT
<213> Seqüência Artificial
<220>
<223> Variante GLP 2R
<400> 36

Met Lys Leu Gly Ser Ser Arg Ala Gly Pro Gly Arg Gly Ser Ala Gly
1 5 10 15

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

Ala Asn Tyr Leu Trp Leu Leu Val Glu Gly Leu Tyr Leu His Thr Leu
275 280 285
Leu Glu Pro Thr Val Leu Pro Glu Arg Arg Leu Trp Pro Arg Tyr Leu
290 295 300
Leu Leu Gly Trp Ala Phe Pro Val Leu Phe Val Val Pro Trp Gly Phe
305 310 315 320
Ala Arg Ala His Leu Glu Asn Thr Gly Cys Trp Thr Thr Asn Gly Asn
325 330 335
Lys Lys Ile Trp Trp Ile Ile Arg Gly Pro Met Met Leu Cys Val Thr
340 345 350
Val Asn Phe Phe Ile Phe Leu Lys Ile Leu Lys Leu Leu Ile Ser Lys
355 360 365
Leu Lys Ala His Gln Met Cys Phe Arg Asp Tyr Lys Tyr Arg Leu Ala
370 375 380
Lys Ser Thr Leu Val Leu Ile Pro Leu Leu Gly Val His Glu Ile Leu
385 390 395 400
Phe Ser Phe Ile Thr Asp Asp Gln Val Glu Gly Phe Ala Lys Leu Ile
405 410 415
Arg Leu Phe Ile Gln Leu Thr Leu Ser Ser Phe His Gly Phe Leu Val
420 425 430
Ala Leu Gln Tyr Gly Phe Ala Asn Gly Glu Val Lys Ala Glu Leu Arg
435 440 445
Lys Tyr Trp Val Arg Phe Leu Leu Ala Arg His Ser Gly Cys Arg Ala
450 455 460
Cys Val Leu Gly Lys Asp Phe Arg Phe Leu Gly Lys Cys Pro Lys Lys
465 470 475 480
Leu Ser Glu Gly Asp Gly Ala Glu Lys Leu Arg Lys Leu Gln Pro Ser
485 490 495
Leu Asn Ser Gly Arg Leu Leu His Leu Ala Met Arg Gly Leu Ala Asp
500 505 510
Val Gly Ala Gln Pro Gln Gln Asp His Ala Arg Trp Pro Arg Gly Ser
515 520 525

Ser Leu Ser Glu Cys Ser Glu Gly Asp Val Thr Met Ala Asn Thr Met
530 535 540

Glu Glu Ile Leu Glu Glu Ser Glu Ile
545 550

<210> 37

<211> 59

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 37

ccaaagtata caggcgcata gcgatggttc tttctctgat gagatgaaca ccattcttg 59

<210> 38

<211> 65

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 38

ttggtctgaa tcaaccagtt tataaagtct cgagcggcaa gattatcaag aatggtgttc 60

atctc 65

<210> 39

<211> 27

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 39

tttgcggccg cccaaagtat acaggcg 27

<210> 40

<211> 37

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 40

aaaggatccg tcagtgattt tggtctgaat caaccag 37

<210> 41

<211> 59

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 41

ccaaagtata caggcgcatg gcgatggttc tttctctgat gagatgaaca ccattcttg 59

<210> 42

<211> 59

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 42

His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30

Asp Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ala Leu Val Pro Val Ser Ser Glu
35 40 45

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
50 55

<210> 43

<211> 59

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 43

His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30

Asp Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ala Leu Val Ala Val Pro Ser Glu
35 40 45

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
50 55

<210> 44

<211> 59

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 44

His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30

Asp Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ala Leu Val Ala Val Ser Pro Glu
35 40 45

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
50 55

<210> 45

<211> 59

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 45

His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30

Asp Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ala Leu Val Ala Val Ser Ser Glu
35 40 45

Ser Lys Pro Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
50 55

<210> 46

<211> 177

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 46

catggcgatg gttctttctc tgatgagatg aacaccattc ttgataatct tgccgctcga 60

gactttataa actggttgat tcagaccaaa atcactgacg gatccggtgg aggctccggt 120

gccttagtcc ccgtctcctc agagtccaaa tatggtcccc catgcccacc atgcccg 177

<210> 47

<211> 176

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 47

atggcgatgg ttctttctct gatgagatga acaccattct tgataatctt gccgctcgag 60

actttataaa ctggttgatt cagaccaaaa tcactgacgg atccggtgga ggctccggtg 120

ccttagtcgc cgtcccctca gagtccaaat atggtccccc atgcccacca tgcccg 176

<210> 48

<211> 177

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 48

catggcgatg gttctttctc tgatgagatg aacaccattc ttgataatct tgccgctcga 60

gactttataa actggttgat tcagaccaaa atcactgacg gatccggtgg aggctccggt 120

gccttagtcg ccgtctcccc agagtccaaa tatggtcccc catgcccacc atgcccg 177

<210> 49

<211> 177

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 49

catggcgatg gttctttctc tgatgagatg aacaccattc ttgataatct tgccgctcga 60

gactttataa actggttgat tcagaccaaa atcactgacg gatccggtgg aggctccggt 120

gccttagtcg ccgtctcctc agagtccaaa cctggtcccc catgcccacc atgcccg 177

<210> 50

<211> 33

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Variante GLP-2

<400> 50

His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Ser Asp Met Ser Thr Ile Leu Asp Asn

1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr

20 25 30

Asp

<210> 51

<211> 33

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Variante GLP-2

<400> 51

His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Ser Asp Val Ser Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30

Asp

<210> 52

<211> 33

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Variante GLP-2

<400> 52

His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Tyr Leu Asp Asn
1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30

Asp

<210> 53

<211> 33

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Variante GLP-2

<400> 53

His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Gly
1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30

Asp

<210> 54

<211> 33

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Variante GLP-2

<400> 54

His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15

Gln Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30

Asp

<210> 55

<211> 33

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Variante GLP-2

<400> 55

His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30

Asp

<210> 56

<211> 33

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Variante GLP-2

<400> 56

His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15
Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Ala Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30
Asp

<210> 57
<211> 33
<212> PRT
<213> Seqüência Artificial
<220>
<223> Variante GLP-2
<400> 57
His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15
Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Val Lys Gly Lys Ile Thr
20 25 30
Asp

<210> 58
<211> 59
<212> PRT
<213> Seqüência Artificial
<220>
<223> Mimeticorpo
<400> 58
His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Ser Asp Met Ser Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15
Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30
Asp Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu
35 40 45
Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
50 55

<210> 59

<211> 59

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 59

His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Ser Asp Val Ser Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30

Asp Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu
35 40 45

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
50 55

<210> 60

<211> 59

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 60

His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Tyr Leu Asp Asn
1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30

Asp Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu
35 40 45

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
50 55

<210> 61

<211> 59

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 61

His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Gly
1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30

Asp Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu
35 40 45

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
50 55

<210> 62

<211> 59

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 62

His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15

Gln Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30

Asp Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu
35 40 45

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
50 55

<210> 63

<211> 59

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 63

His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30

Asp Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu
35 40 45

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
50 55

<210> 64

<211> 59

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 64

His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Ala Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30

Asp Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu
35 40 45

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
50 55

<210> 65

<211> 59

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 65

His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Val Lys Gly Lys Ile Thr
20 25 30

Asp Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu
35 40 45

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
50 55

<210> 66

<211> 177

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 66

catggcgatg gttctttctc tagtgacatg tcgaccattc ttgataatct tgccgctcga 60

gactttataa actggttgat tcagaccaaa atcactgacg gatccggtgg aggctccggt 120

accttagtca ccgtctcctc agagtccaaa tatggtcccc catgcccacc atgcccg 177

<210> 67

<211> 177

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 67

catggcgatg gttctttctc tagtgacgtc tcgaccattc ttgataatct tgccgctcga 60

gactttataa actggttgat tcagaccaaa atcactgacg gatccggtgg aggctccggt 120

accttagtca ccgtctcctc agagtccaaa tatggtcccc catgcccacc atgcccg 177

<210> 68

<211> 177

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 68

catggcgatg gttctttctc tgatgagatg aacacctatc ttgataatct tgccgctcga 60

gactttataa actggttgat tcagaccaaa atcactgacg gatccggtgg aggctccggt 120

accttagtca ccgtctcctc agagtccaaa tatggtcccc catgcccacc atgcccg 177

<210> 69

<211> 177

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 69

catggcgatg gttctttctc tgatgagatg aacaccattc ttgatggtct tgccgctcga 60

gactttataa actggttgat tcagaccaaa atcactgacg gatccggtgg aggctccggt 120

accttagtca ccgtctcctc agagtccaaa tatggtcccc catgcccacc atgcccg 177

<210> 70

<211> 177

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 70

catggcgatg gttctttctc tgatgagatg aacaccattc ttgataatca ggccgctcga 60

gactttataa actggttgat tcagaccaaa atcactgacg gatccggtgg aggctccggt 120

accttagtca ccgtctcctc agagtccaaa tatggtcccc catgcccacc atgcccg 177

<210> 71

<211> 177

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 71

catggcgatg gttctttctc tgatgagatg aacaccattc ttgatggcca ggccgctcga 60

gactttataa actggttgat tcagaccaaa atcactgacg gatccggtgg aggctccggt 120

accttagtca ccgtctcctc agagtccaaa tatggtcccc catgcccacc atgcccg 177

<210> 72

<211> 177

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 72

catggcgatg gttctttctc tgatgagatg aacaccattc ttgataatct tgccgctcga 60

gactttatag cctggttgat tcagaccaaa atcactgacg gatccggtgg aggctccggt 120

accttagtca ccgtctcctc agagtccaaa tatggtcccc catgcccacc atgcccg 177

<210> 73

<211> 177

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Mimeticorpo

<400> 73

catggcgatg gttctttctc tgatgagatg aacaccattc ttgataatct tgccgctcga 60

gactttataa actggttggt taagggcaaa atcactgacg gatccggtgg aggctccggt 120

accttagtca ccgtctcctc agagtccaaa tatggtcccc catgcccacc atgcccg 177

<210> 74

<211> 33

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Peptídeo GLP-2 com mutação M10V, A2G

<400> 74

His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Val Asn Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15
Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile
20 25 30
Thr Asp

<210> 75
<211> 276
<212> PRT
<213> Seqüência Artificial
<220>
<223> Seqüência de aminoácido de mimeticorpo GLP-2 com mutação L17Q, A2G
<400> 75
His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15
Gln Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30
Asp Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu
35 40 45
Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
50 55 60
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
65 70 75 80
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
85 90 95
Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
100 105 110
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
115 120 125
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
130 135 140

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
145 150 155 160
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
165 170 175
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
180 185 190
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
195 200 205
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
210 215 220
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
225 230 235 240
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
245 250 255
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
260 265 270
Ser Leu Gly Lys
275

<210> 76

<211> 828

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Seqüência de aminoácido de mimeticorpo GLP-2 com mutação L17Q, A2G

<400> 76

catggcgatg gttctttctc tgatgagatg aacaccattc ttgataatca ggccgctcga 60
gactttataa actggttgat tcagaccaaa atcactgacg gatccggtgg aggctccggt 120
accttagtca ccgtctcctc agagtccaaa tatggtcccc catgcccacc atgcccggcg 180
cctgaggccg ccgggggacc atcagtcttc ctgttccccc caaaacccaa ggacactctc 240
atgatctccc ggacccctga ggtcacgtgc gtggtggtgg acgtgagcca ggaagacccc 300
gaggtccagt tcaactggta cgtggatggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg 360
cgggaggagc agttcaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 420

gactggctga acggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaaggcct cccgtcctcc 480

atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagcctcgag agccacaggt gtacaccctg 540

cccccatccc aggaggagat gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 600

ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 660

aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caggctaacc 720

gtggacaaga gcaggtggca ggaggggaat gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 780

ctgcacaacc actacacaca gaaaagcttg tccctgtctc tgggtaaa 828

<210> 77

<211> 276

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Seqüência de aminoácido de mimeticorpo GLP-2 com mutação L17Q, N16G, A2G

<400> 77

His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30

Asp Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu
35 40 45

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
50 55 60

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
65 70 75 80

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
85 90 95

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
100 105 110

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
115 120 125

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
130 135 140

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
145 150 155 160
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
165 170 175
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
180 185 190
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
195 200 205
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
210 215 220
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
225 230 235 240
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
245 250 255
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
260 265 270
Ser Leu Gly Lys
275

<210> 78
<211> 828
<212> DNA
<213> Seqüência Artificial
<220>
<223> Seqüência de aminoácido de mimeticorpo GLP-2 com mutação L17Q, N16G, A2G
<400> 78

catggcgatg gttctttctc tgatgagatg aacaccattc ttgatggcca ggccgctcga 60
gactttataa actggttgat tcagaccaaa atcactgacg gatccggtgg aggctccggt 120
accttagtca ccgtctcctc agagtccaaa tatggtcccc catgcccacc atgcccggcg 180
cctgaggccg ccgggggacc atcagtcttc ctgttccccc caaaacccaa ggacactctc 240
atgatctccc ggacccctga ggtcacgtgc gtggtggtgg acgtgagcca ggaagacccc 300
gaggtccagt tcaactggta cgtggatggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg 360
cgggaggagc agttcaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 420

gactggctga acggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaaggcct cccgtcctcc 480

atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagcctcgag agccacaggt gtacaccctg 540

cccccatccc aggaggagat gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 600

ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 660

aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caggctaacc 720

gtggacaaga gcaggtggca ggaggggaat gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 780

ctgcacaacc actacacaca gaaaagcttg tccctgtctc tgggtaaa 828

<210> 79

<211> 30

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Seqüência de aminoácido de mimeticorpo GLP-1

<400> 79

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

20 25 30

<210> 80

<211> 280

<212> PRT

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Peptídeo A2G-GLP2 humano em esqueleto IgG2a murino

<400> 1

His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn

1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr

20 25 30

Asp Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Glu

35 40 45

Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala
50 55 60
Pro Asn Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile
65 70 75 80
Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val
85 90 95
Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val
100 105 110
Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp
115 120 125
Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln
130 135 140
Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp
145 150 155 160
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val
165 170 175
Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr
180 185 190
Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu
195 200 205
Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr
210 215 220
Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr
225 230 235 240
Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr
245 250 255
Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys
260 265 270
Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
275 280

REIVINDICAÇÕES

1. Mimeticorpo de acordo com a fórmula (II):

$$(GLP2RAg\text{-}Lk\text{-}V2\text{-}Hg\text{-}C_H2\text{-}C_H3)_{(t)}$$

(II)

em que GLP2RAg é um agonista de GLP-2R de mamífero, Lk é uma ligação de polipeptídeo ou química, V2 é uma porção de uma terminação-C de uma região variável de imunoglobulina, Hg é pelo menos uma porção de uma região de dobradiça variável de imunoglobulina, C_H2 é uma região constante C_H2 de cadeia pesada de imunoglobulina e C_H3 é uma região constante C_H3 de cadeia pesada de imunoglobulina e t é independentemente um número inteiro de 1 a 10.

2. Mimeticorpo de acordo com a reivindicação 1, em que GLP2RAg tem a seqüência de aminoácido de SEQ ID Nº: 2, 3, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, ou 74.

3. Mimeticorpo de acordo com a reivindicação 1, em que Hg, C_H2 e C_H3 são da subclasse IgG1.

4. Mimeticorpo de acordo com a reivindicação 3, em que Cys220 de Hg é substituída por Ala, e Leu234 e Leu235 de C_H2 são mutadas para Ala234 e Ala235.

5. Mimeticorpo de acordo com a reivindicação 1, em que Hg é da subclasse IgG4, e C_H2 e C_H3 são da subclasse IgG1.

6. Mimeticorpo de acordo com a reivindicação 1, em que Hg, C_H2 e C_H3 são da subclasse IgG4.

7. Mimeticorpo de acordo com a reivindicação 6, em que Ser228 de Hg é substituída por Pro e Phe234 e Leu235 de C_H2 são mutadas para Ala234 e Ala235.

8. Mimeticorpo de acordo com a reivindicação 1, em que o mimeticorpo se liga ao receptor de GLP-2.

9. Mimeticorpo que compreende um polipeptídeo que tem a seqüência mostrada em SEQ ID Nº: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 42, 43, 44, 45, 58,

59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 75, ou 77.

10. Polinucleotídeo que codifica um mimeticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9.

11. Polinucleotídeo que compreende um polinucleotídeo que tem a seqüência mostrada em SEQ ID Nº: 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 46, 47, 48, 49, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 76, ou 78 ou uma seqüência complementar.

12. Polinucleotídeo que compreende um polinucleotídeo que codifica a seqüência de aminoácido mostrada em SEQ ID Nº: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 42, 43, 44, 45, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 75, ou 77.

13. Vetor que compreende o polinucleotídeo como definido na reivindicação 11 ou 12.

14. Linhagem celular que expressa um mimeticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9.

15. Linhagem celular que compreende o vetor como definido na reivindicação 13.

16. Linhagem celular de acordo com a reivindicação 15, em que a linhagem celular são células HEK293, NSO, SP2/0 ou CHO.

17. Método para produzir um polipeptídeo que compreende as etapas de cultivar a linhagem celular como definida na reivindicação 16, e purificar o polipeptídeo expresso.

18. Composição farmacêutica que compreende uma quantidade eficaz de pelo menos um mimeticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, e um veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável.

19. Método de modificar a atividade biológica de GLP-2 em um mamífero que compreende administrar a composição farmacêutica como definida na reivindicação 18, ao mamífero.

20. Método de reduzir os sintomas de, ou tratar pelo menos uma condição ou distúrbio relacionado com GLP-2, que compreende administrar a composição farmacêutica como definida na reivindicação 18, a um paciente que necessita disso.

21. Método de acordo com a reivindicação 20, em que a condi-

ção ou distúrbio relacionado a GLP-2 é um distúrbio gastrointestinal, um distúrbio relacionado aos ossos, ou um distúrbio relacionado a nutrientes.

22. Método de acordo com a reivindicação 21, em que o distúrbio gastrointestinal é síndrome do intestino curto, doença intestinal inflamatória, doença de Crohn, colite, pancreatite, ileíte, mucosite, ou atrofia intestinal.

23. Método de acordo com a reivindicação 21, em que o distúrbio gastrointestinal é um distúrbio gastrointestinal pediátrico.

24. Método de acordo com a reivindicação 21, em que o distúrbio relacionado aos ossos é osteoporose.

25. Método de acordo com a reivindicação 21, em que o distúrbio relacionado a nutrientes é obesidade.

26. Método de prevenir, reduzir os sintomas de, ou tratar íleo inflamatório, que compreende administrar uma composição farmacêutica como definida na reivindicação 18, a um paciente que necessita disso.

27. Polipeptídeo que compreende um polipeptídeo que tem a seqüência mostrada em SEQ ID Nº: 52, 54, 55, ou 74.

28. Composição farmacêutica que compreende uma quantidade eficaz de polipeptídeo como definido na reivindicação 27, e um veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável.

29. Método de modificar a atividade biológica de GLP-2 em um mamífero que compreende administrar a composição farmacêutica como definida na reivindicação 28, ao mamífero.

30. Método de reduzir os sintomas de, ou tratar pelo menos uma condição ou distúrbio relacionado a GLP-2, que compreende administrar a composição farmacêutica como definida na reivindicação 28, a um paciente que necessita disso.

31. Método de prevenir, reduzir os sintomas de, ou tratar íleo inflamatório, que compreende administrar a composição farmacêutica como definida na reivindicação 28, a um paciente que necessita disso.

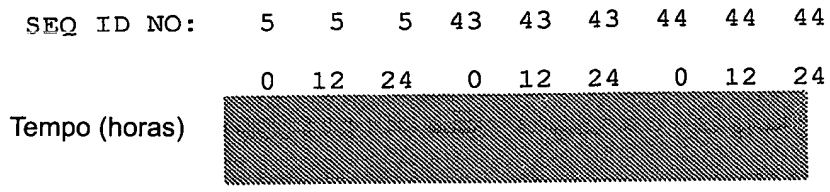


FIG.1

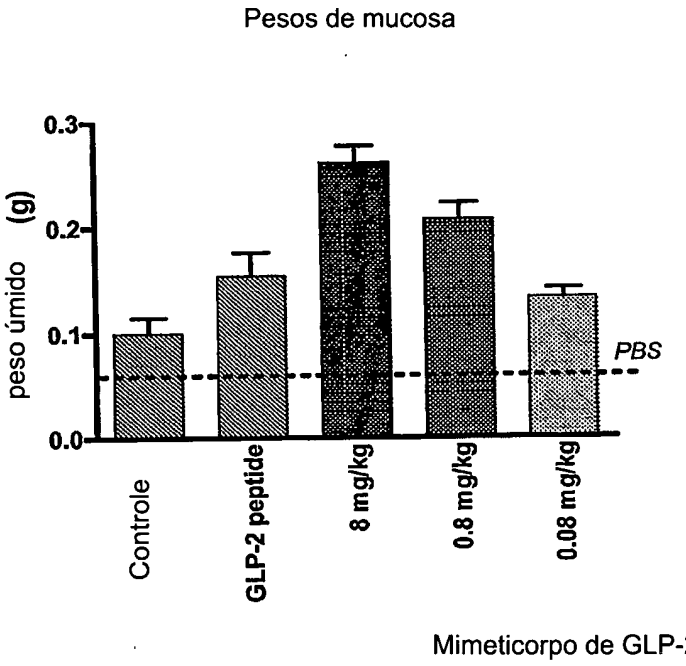

Pesos de mucosa
peso úmido (g)
0.3
0.2
0.1
0.0
PBS
Controle
GLP-2 peptide
8 mg/kg
0.8 mg/kg
0.08 mg/kg
Mimeticorpo de GLP-2 A2G

FIG.2

Trânsito do intestino delgado foi significativamente aumentado por A2G-GLP-2
(50 μg/camundongo / dia x 10 dias)

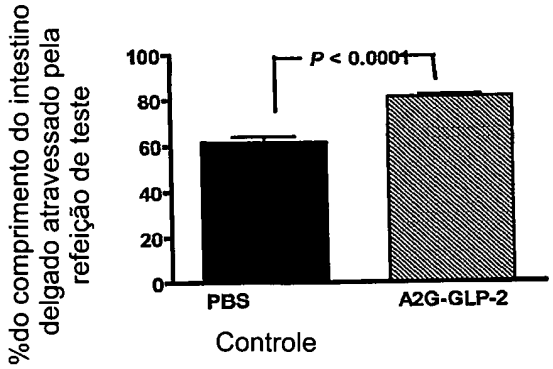
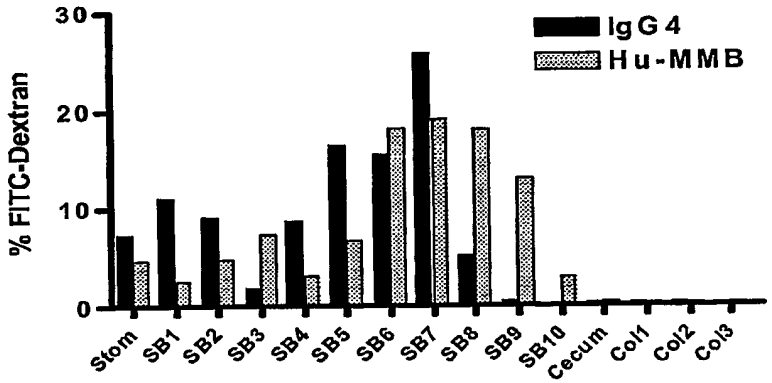


FIG.3

Padrão de distribuição de FITC-Dextran 4 dias
após o tratamento com MMB humano
(Massa de 4mg/kg)



Trânsito realizado no dia 4 após tratamento com
MMB completamente humano (massa de 4mg/kg)

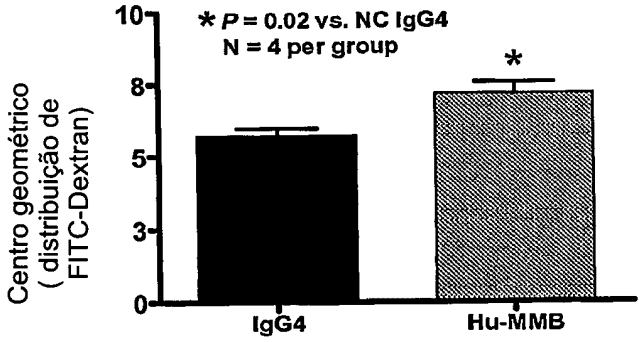


FIG.4

Trânsito de MMB-Mu (2mg/kg) 1 hr antes da cirurgia medido 48 hr pós-op

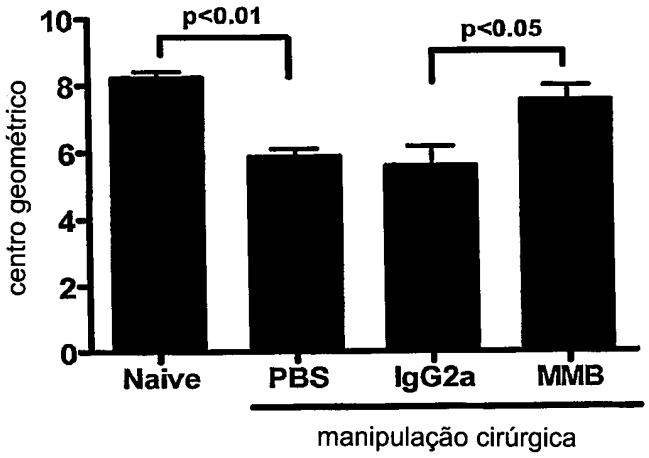


FIG.5

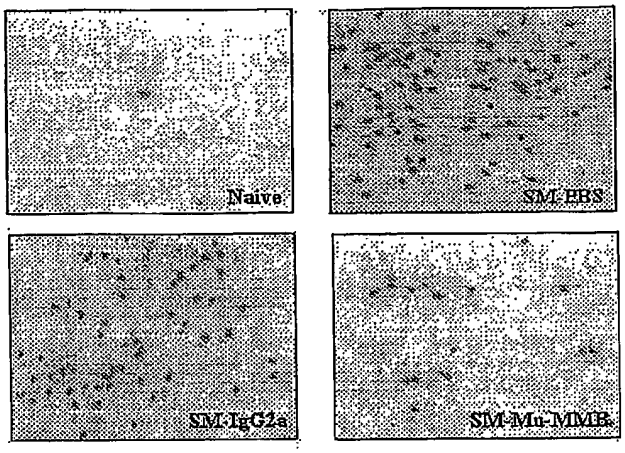


FIG.6

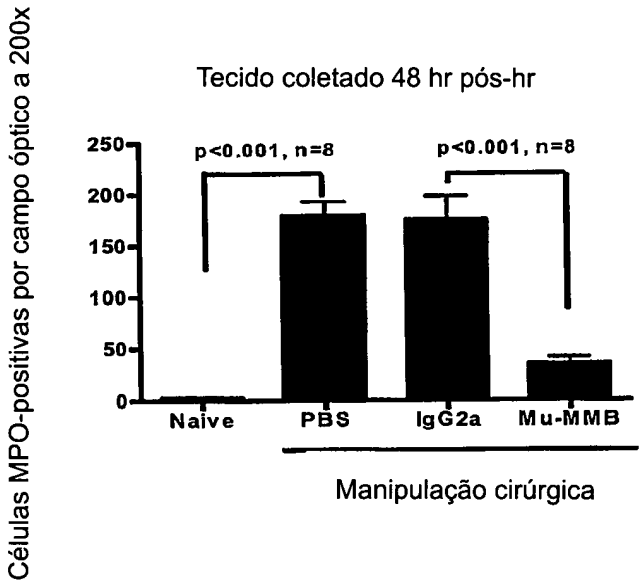

Células MPO-positivas por campo óptico a 200x
Tecido coletado 48 hr pós-hr
250
200
150
100
50
0
p<0.001, n=8
p<0.001, n=8
Naive
PBS
IgG2a
Mu-MMB
Manipulação cirúrgica

FIG.7

PI 0617515-5

RESUMO

Patente de Invenção: **"MIMETICORPOS, POLIPEPTÍDEOS, COMPOSIÇÕES, MÉTODOS E USOS DE GLP-2".**

A presente invenção refere-se a mimeticorpos, polipeptídeos e ácidos nucléicos de GLP-2 de mamífero são descritos. Métodos de utilizar os mimeticorpos e polipeptídeos para tratar doenças relacionadas a GLP-2 também são descritos.