

(11) Número de Publicação: **PT 1007672 E**

(51) Classificação Internacional:

C12N 15/12 (2007.10) **C07K 14/47** (2007.10)
G01N 33/50 (2007.10) **A61K 38/17** (2007.10)
A61K 48/00 (2007.10) **C12N 5/10** (2007.10)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1998.04.27**

(30) Prioridade(s):

(43) Data de publicação do pedido: **2000.06.14**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.02.28**
052/2008

(73) Titular(es):

LABORATOIRES SERONO SA
CENTRE INDUSTRIEL 1267 COINSINS, VAUDCH

(72) Inventor(es):

CARLO RICCARDI

IT

(74) Mandatário:

MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA
RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **ZÍPERES DE LEUCINA INDUZIDOS POR GLUCOCORTICÓIDES COMO MODULADORES INTRACELULARES DE VIAS DA MORTE CELULAR APOPTÓTICA**

(57) Resumo:

ZÍPERES DE LEUCINA INDUZIDOS POR GLUCOCORTICÓIDES COMO MODULADORES INTRACELULARES DE VIAS DA MORTE CELULAR APOPTÓTICA.

RESUMO

"ZÍPERES DE LEUCINA INDUZIDOS POR GLUCOCORTICÓIDES COMO MODULADORES INTRACELULARES DE VIAS DA MORTE CELULAR APOPTÓTICA"

Uma sequência de DNA que codifica uma proteína relacionada com a família de ziperes de leucina induzidos por glucocorticóides (GILR), respectivas isoformas, fragmentos ou análogos, em que a referida GILR, respectivas isoformas, fragmentos ou análogos são capazes de inibir a apoptose e de estimular a actividade de linfócitos, proteínas GILR, respectivas isoformas, análogos, fragmentos e derivados codificados pela sequência de DNA acima mencionada, sua preparação e utilizações.

DESCRIÇÃO

"ZÍPERES DE LEUCINA INDUZIDOS POR GLUCOCORTICÓIDES COMO MODULADORES INTRACELULARES DE VIAS DA MORTE CELULAR APOPTÓTICA"

Área da Invenção

A presente invenção situa-se genericamente na área dos moduladores da morte celular apoptótica e suas utilizações em aplicações terapêuticas para inibir ou para intensificar a apoptose, consoante o desejado, dependendo da doença e de ser ou não desejado matar as células doentes ou salvar as células doentes de morte celular apoptótica. Especificamente, a presente invenção diz respeito a novos genes que codificam novas proteínas pertencentes à família de zíperes de leucina, que são capazes de inibir a apoptose mediada pelo sistema CD3/TCR ou pelo sistema Fas/Fas-L, e que também são capazes de estimular a activação de linfócitos.

Em particular, a presente invenção diz respeito a uma nova proteína e ao gene que codifica para aquela denominados GILR, sua preparação e utilizações, bem como quaisquer isoformas, análogos, fragmentos e derivados de GILR, sua preparação e utilizações.

Contexto da Invenção e Técnica Anterior

A apoptose (morte celular programada) é um processo intracelular importante que desempenha um papel importante no desenvolvimento de células e tecidos normais, bem como no controlo do crescimento neoplástico (Cohen, 1993; Osborne e Schwartz, 1994; Wyllie *et al.*, 1980; Kerr *et al.*, 1972; Bursch *et al.*, 1992).

Alguns estímulos podem induzir ou inibir a morte celular programada por activação de moléculas envolvidas na

sinalização e execução da apoptose, que actuam em diferentes níveis, incluindo a membrana, citoplasma e núcleo celulares. Destas salientam-se as moléculas intracelulares, incluindo alguns factores de transcrição, que se verificou regularem o crescimento celular. Em particular, proteínas da família zíperes de leucinas, tais como, por exemplo, MYC, FOS e JUN, conseguem modular a morte celular (Shi *et al.*, 1992; Smeyne *et al.*, 1993; Goldstone e Lavin, 1994).

A apoptose também é importante no desenvolvimento de células T (Dent *et al.*, 1990; Ju *et al.*, 1995; MacDonald e Lees, 1990). Em particular, a selecção negativa deve-se a apoptose activada pela interacção do antigene (Ag) com o complexo receptor de células T (TCR)/CD3 (Smith *et al.*, 1989). O envolvimento do complexo TCR/CD3, quer por APCs que apresentam o péptido antigénico quer por anticorpo anti-CD3, desencadeia uma série de acontecimentos de activação, tais como, por exemplo, a expressão do sistema Fas/Ligando do Fas (Fas/Fas-L), que pode induzir apoptose em timócitos, células T maduras e hibridomas de células T (Alderson *et al.*, 1995; Dhein *et al.*, 1995; Ju *et al.*, 1995; Jenkinson *et al.*, 1989; Webb *et al.*, 1990; Yang *et al.*, 1995). Por exemplo, o desencadeamento desses acontecimentos de activação em hibridomas de células T conduz a paragem do ciclo celular, seguida de apoptose. Esta morte celular induzida por activação (AICD, Kabelitz *et al.*, 1993) requer a interacção do Fas com Fas-L (Alderson *et al.*, 1995; Itoh *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 1995).

Foi mostrado que outros estímulos, como citoquinas e hormonas glucocorticóides (GCH), também são reguladores críticos do desenvolvimento de células T (Migliorati *et al.*, 1993; Nieto *et al.*, 1990; Nieto e Lopez-Rivas, 1989;

Cohen e Duke, 1984; Wyllie, 1980). Por exemplo, a dexametasona (DEX), uma GCH sintética que, por si própria, induz apoptose em hibridomas de células T e em linfócitos T normais, consegue inibir a AICD induzida pelo desencadeamento do complexo TCR/CD3 (Zacharchuk *et al.*, 1990). Esta inibição pode dever-se à prevenção da expressão induzida pela activação do Fas e Fas-L (Yang *et al.*, 1995).

Relativamente ao sistema Fas/Fas-L acima mencionado, deve notar-se que o Fas também foi denominado receptor FAS ou FAS-R, bem como CD95. Por motivos de simplicidade, este receptor será denominado "Fas" daqui em diante, e o seu ligando, como referido acima, será denominado "Fas-L" daqui em diante.

O Fas é um membro da superfamília de receptores do TNF/NGF e partilha homologia com alguns receptores da superfície celular, incluindo o receptor p55 do TNF e o receptor do NGF (ver, por exemplo, Boldin *et al.*, 1995a e 1995b). O Fas medeia a morte celular por apoptose (Itoh *et al.*, 1991) e parece actuar como selector negativo de células T auto-reativas; isto é, durante a maturação de células T, o Fas medeia a morte apoptótica de células T que reconhecem auto-antigenes. Foi mostrado que mutações no gene Fas, como as mutações *lpr* em ratinhos, são responsáveis por uma perturbação de linfoproliferação em ratinhos que se assemelha à doença autoimune humana lúpus eritematoso sistémico (SLE; Watanabe-Fukunaga *et al.*, 1992). A molécula Fas-L é, aparentemente, uma molécula associada à superfície celular transportada, entre outras, por células T assassinas (ou linfócitos T citotóxicos - CTLs), e assim, quando esses CTLs contactam células contendo Fas, são capazes de induzir morte celular apoptótica das células que contêm Fas. Suplementarmente, foi preparado um anticorpo monoclonal específico para o Fas

que é capaz de induzir morte celular apoptótica em células que contêm o Fas, incluindo células de ratinho transformadas por cDNA que codifica o Fas humano (ver, por exemplo, Itoh *et al.*, 1991).

Se bem que alguns dos efeitos citotóxicos dos linfócitos sejam mediados por interacção do Fas-L produzido por linfócitos com o Fas de ocorrência disseminada, também se verificou que várias outras células normais, para além dos linfócitos T, expressam o Fas na sua superfície e podem ser mortas pelo desencadeamento deste receptor. Suspeita-se que a indução descontrolada desse processo de morte contribua para danos em tecidos em certas doenças, por exemplo, a destruição de células do fígado em hepatite aguda. Em conformidade, encontrar modos de restringir a actividade citotóxica do Fas poderá ter potencial terapêutico.

Inversamente, uma vez que também se verificou que certas células malignas e células infectadas com o HIV contêm Fas na sua superfície, anticorpos contra o Fas, ou o próprio Fas-L, poderão ser utilizados para desencadear efeitos citotóxicos mediados pelo Fas nestas células e, assim, proporcionar um meio para combater essas células malignas ou células infectadas com o HIV (ver, por exemplo, Itoh *et al.*, 1991). Em consequência, descobrir ainda outros modos de intensificar a actividade citotóxica do Fas também poderá ter potencial terapêutico.

Como referido acima, o Fas está relacionado com um dos receptores do TNF, nomeadamente o receptor p55 do TNF. O TNF (TNF- α e TNF- β ; como utilizado daqui em diante, "TNF" referir-se-á a ambos) exerce muitos efeitos em células (ver, por exemplo, Wallach, D. (1986), em: "Interferon 7" (editor Ion Gresser), páginas 83 - 122, Academic Press, Londres, e Beutler e Cerami (1987)).

O TNF exerce os seus efeitos por ligação aos seus receptores, o receptor p55 do TNF e o receptor p75 do TNF. Alguns dos efeitos induzidos pelo TNF são benéficos para o organismo, tais como, por exemplo, destruição de células tumorais e de células infectadas com vírus e aumento de actividades antibacterianas de granulócitos. Deste modo, o TNF contribui para a defesa do organismo contra tumores e agentes infecciosos e contribui para a recuperação de lesões.

Assim, o TNF pode ser utilizado como agente antitumoral e anti-infeccioso.

No entanto, o TNF também pode exercer efeitos prejudiciais. Por exemplo, a super-produção de TNF pode desempenhar um papel patogénico em várias doenças, incluindo, entre outras, choque séptico (Tracey *et al.*, 1986), perda excessiva de peso (caquexia), danos em tecidos em doenças reumáticas (Beutler e Cerami, 1987), danos em tecidos em reacções enxerto-versus-hospedeiro (Piquet *et al.*, 1987) e danos em tecidos em inflamação, para nomear apenas alguns dos efeitos patogénicos do TNF.

Os efeitos citocidas acima do TNF são mediados maioritariamente pelo receptor p55 do TNF na maior parte das células estudadas até à data, cuja actividade depende da integridade do domínio intracelular deste receptor (ver, por exemplo, Brakebusch *et al.*, 1992; Tartaglia *et al.*, 1993). Adicionalmente, estudos mutacionais indicam que os relacionados Fas e receptor p55 do TNF medeiam processos de sinalização intracelular, acabando por resultar em morte celular via regiões distintas nos seus domínios intracelulares (ver também, por exemplo, Itoh e Nagata, 1993). Estas regiões, também designadas "domínios de morte", presentes nestes dois receptores têm semelhança de sequências. Os "domínios de morte" do Fas e receptor p55 do

TNF são capazes de se auto-associarem, o que é aparentemente importante para promover a agregação dos receptores necessária para iniciar a sinalização intracelular (ver, por exemplo, Song *et al.*, 1994; Wallach *et al.*, 1994; Boldin *et al.*, 1995a, b), e que, para níveis elevados da expressão dos receptores, pode resultar no desencadeamento da sinalização independente de ligandos (Boldin *et al.*, 1995a, b).

Estudos recentes indicaram que os efeitos citotóxicos mediados pelo Fas e pelo receptor p55 do TNF envolvem uma via de sinalização intracelular que inclui algumas interações proteína-proteína, conduzindo desde a ligação ligando-receptor inicial até à activação final de funções efectoras enzimáticas, e que incluem interações proteína-proteína não enzimáticas que estão envolvidas na iniciação da sinalização para morte celular (ver também, por exemplo, Nagata e Golstein, 1995; Vandenabeele *et al.*, 1995, e Boldin *et al.*, 1995a, b). Aparentemente, a ligação do Fas-L trimérico e do TNF aos seus receptores resulta na interacção dos domínios intracelulares destes receptores, que é aumentada por uma propensão das regiões ou motivos dos domínios de morte para se auto-associarem (Boldin *et al.*, 1995a, b), e induziu a ligação de pelo menos duas outras proteínas citoplasmáticas (que também se podem ligar entre si) aos domínios intracelulares destes receptores, nomeadamente a proteína MORT-1 (também denominada FADD), que se liga ao Fas (ver Boldin *et al.*, 1995b; Chinnaiyan *et al.*, 1995; Kischkel *et al.*, 1995), e a proteína TRADD, que se liga ao receptor p55 do TNF (ver Hsu *et al.*, 1995; Hsu *et al.*, 1996). Também foi identificada uma terceira dessas proteínas intracelulares, denominada RIP (ver Stanger *et al.*, 1995), que se liga aos domínios intracelulares do Fas e do receptor p55 do TNF. A RIP também pode interagir com a

TRADD e MORT-1. Assim, estas três proteínas intracelulares permitem uma "conversa cruzada" funcional entre o Fas e o receptor p55 do TNF. As interações entre estes receptores e suas proteínas associadas (MORT-1, TRADD, RIP) ocorrem através dos motivos dos "domínios de morte" presentes em cada um destes receptores e proteínas.

Assim, os motivos dos "domínios de morte" do receptor p55 do TNF e do Fas, bem como das suas três proteínas associadas MORT-1, RIP e TRADD, parecem ser os sítios de interações proteína-proteína. As três proteínas MORT-1, RIP e TRADD interagem com os domínios intracelulares do receptor p55 do TNF e Fas pela ligação dos seus domínios de morte aos dos receptores, e para a RIP e TRADD, os seus domínios de morte também se auto-associam, apesar da MORT-1 diferir neste aspecto por o seu "domínio de morte" não se auto-associar. Em conformidade, pareceria que a interação entre as três proteínas MORT-1, RIP e TRADD é uma parte importante da modulação global da sinalização intracelular mediada por estas proteínas. A interferência na interação entre estas três proteínas intracelulares resultará na modulação dos efeitos causados por esta interação. Por exemplo, a inibição da ligação da TRADD à MORT-1 pode modular a interação Fas-receptor p55 do TNF. Da mesma forma, a inibição da RIP para além da inibição acima da ligação da TRADD à MORT-1 pode modular suplementarmente a interação Fas-receptor p55 do TNF.

Estudos recentes também implicaram um grupo de tiol-proteases citoplasmáticas, que estão estruturalmente relacionadas com a protease CED3 de *Caenorhabditis elegans* e com a enzima conversora de interleuquina-1 β (ICE) de mamífero, no início de vários processos fisiológicos de morte celular (revisto em Kumar, 1995, e Henkart, 1996). Também têm surgido algumas indicações de que protease(s)

desta família pode(m) participar na citotoxicidade celular induzida pelo Fas e receptores do TNF. Verificou-se que inibidores peptídicos específicos das proteases e duas proteínas codificadas por vírus que bloqueiam a sua função, a proteína crmA da varíola bovina e a proteína p53 de Baculovírus, conferem protecção a células contra esta citotoxicidade celular (Enari *et al.*, 1995; Los *et al.*, 1995; Tewari *et al.*, 1995; Xue *et al.*, 1995; Beidler *et al.*, 1995). A clivagem rápida de certas proteínas celulares específicas, aparentemente mediada por protease(s) da família CED3/ICE, pôde ser demonstrada em células pouco após a estimulação do Fas ou receptores do TNF (o receptor p55 do TNF e o receptor p75 do TNF).

Uma dessas proteases e várias isoformas respectivas (incluindo inibidoras) designada MACH, que é uma proteína de ligação à MORT-1 e que serve para modular a actividade da MORT-1 e, assim, do Fas e receptor p55 do TNF, e que também pode actuar independentemente da MORT-1, foi recentemente isolada, clonada e caracterizada e as suas utilizações possíveis também foram descritas, como é apresentado em pormenor na candidatura internacional N° PCT/US96/10521 e numa publicação recente (Boldin *et al.*, 1996). Outra dessas proteases e várias isoformas respectivas (incluindo inibidoras), designada Mch4, também foi recentemente isolada e caracterizada (Fernandes-Alnemri *et al.*, 1996; Srinivasula *et al.*, 1996). Esta proteína Mch4 também é uma proteína de ligação à MORT-1 que serve para modular a actividade da MORT-1 e assim, provavelmente, também do Fas e receptor p55 do TNF, e que também pode actuar independentemente da MORT-1.

Além disso, também foi recentemente descoberto que, para além das actividades de citotoxicidade celular acima mencionadas e respectiva modulação mediada pelos vários

receptores e suas proteínas de ligação, incluindo Fas, receptor p55 do TNF, MORT-1, TRADD, RIP, MACH e Mch4, alguns destes receptores e suas proteínas de ligação também estão envolvidos na modulação da actividade do factor de transcrição nuclear NF- κ B, que é um mediador-chave da sobrevivência ou viabilidade celular, sendo responsável pelo controlo da expressão de muitos genes de respostas imunológicas e inflamatórias. Por exemplo, verificou-se que o TNF- α pode realmente estimular a activação do NF- κ B e, assim, o TNF- α é capaz de induzir dois sinais em células, um que induz morte celular e outro que protege as células contra indução de morte ao induzir a expressão de genes via o NF- κ B (ver Beg e Baltimore, 1996; Wang *et al.*, 1996; Van Antwerp *et al.*, 1996). Também foi relatado um efeito dual semelhante para o Fas (ver a referência a este efeito como apresentado em Van Antwerp *et al.*, 1996, acima). Em consequência, parece que existe um equilíbrio delicado entre morte celular e sobrevivência celular por estimulação de vários tipos de células com TNF- α e/ou o Fas-L, em que o resultado final da estimulação depende de qual é a via intracelular estimulada em maior extensão, a que conduz à morte celular (usualmente por apoptose) ou a que conduz à sobrevivência celular via activação do NF- κ B.

Adicionalmente, foi recente e suplementarmente esclarecida a possível via pela qual membros da família de receptores do TNF/NGF activam o NF- κ B (ver Malinin *et al.*, 1997, e as várias referências relevantes aí apresentadas). Em resumo, vários membros da família de receptores do TNF/NGF são capazes de activar o NF- κ B através de uma proteína adaptadora comum, Traf2. Uma proteína quinase esclarecida de novo, denominada NIK (ver acima Malinin *et al.*, 1997), é capaz de se ligar à Traf2 e de estimular a

actividade do NF- κ B. De facto, foi mostrado (ver Malinin *et al.* acima mencionado) que a expressão em células de mutantes da NIK deficientes em quinases faz com que as células sejam incapazes de apresentar estimulação do NF- κ B de um modo endógeno normal e também faz com que a célula apresente um bloqueio da indução da actividade do NF- κ B pelo TNF, via o receptor p55 do TNF ou Fas, e um bloqueio da indução do NF- κ B pela TRADD, RIP e MORT-1 (que são proteínas adaptadoras que se ligam a estes receptores p55 do TNF e/ou Fas). Todos os receptores p55 do TNF e p75 do TNF e Fas, e suas proteínas adaptadoras MORT-1, TRADD e RIP, ligam-se directa ou indirectamente à Traf2, que, pela sua capacidade de ligação à NIK, aparentemente modula a indução do NF- κ B.

É sentida desde há muito a necessidade de proporcionar uma forma de modular a resposta celular ao FAS-L e ao TNF. Por exemplo, nas situações patológicas mencionadas acima, quando o Fas-L ou TNF for super-expresso ou estiver presente em quantidades excessivas de qualquer outra forma, ou quando o Fas ou, pelo menos, o receptor p55 do TNF for super-activado ou super-expresso, seria desejável inibir os efeitos citocidas induzidos pelo Fas-L ou TNF, e que, noutras situações, por exemplo, em células tumorais ou aplicações de cura de feridas, seria desejável intensificar o efeito do TNF, ou, no caso do Fas, em células tumorais ou células infectadas com o HIV, seria desejável intensificar o efeito mediado pelo Fas. Para esta finalidade tentaram-se algumas abordagens, dirigidas para os próprios receptores (para intensificar ou para inibir a sua actividade ou quantidade, consoante o caso) ou dirigidas às vias de sinalização, como mencionado acima, nas quais estes receptores ou suas proteínas associadas desempenham um

papel (para intensificar ou para inibir as actividades ou quantidades dos receptores ou suas proteínas associadas, consoante o caso).

No entanto, até à data não foi esclarecido o papel de hormonas glucocorticóides (GCH) na regulação da apoptose de linfócitos, em particular o papel que a GCH desempenha na indução da expressão de genes, cujo(s) produto(s) pode(m) modular a apoptose em células T (e possivelmente também noutras células), cuja modulação pode ser exercida por interacção directa ou indirecta com, ou outros meios de modulação das vias de sinalização intracelular mediadas pelo Fas ou mediadas pelo associado/relacionado receptor p55 do TNF conducentes a morte celular (por apoptose, na qual estão envolvidas várias proteases, como referido acima) ou conducentes a sobrevivência celular (via indução da activação do NF- κ B, como referido acima).

Resumo da Invenção

Um objectivo da presente invenção consiste em esclarecer o papel de hormonas glucocorticóides (GCH) na regulação da apoptose de linfócitos; em particular, esclarecer o(s) gene(s) ou produto(s) genético(s) induzido(s) por GCH que consegue(m) modular a apoptose em células T ou noutras células. Assim, um objectivo da presente invenção consiste em proporcionar novo(s) gene(s) que é(são) induzido(s) por GCH, cujo(s) produto(s) pode(m) modular a apoptose em células T ou noutras células.

Outro objectivo da presente invenção consiste em proporcionar novas proteínas, incluindo todas as respectivas isoformas, análogos, fragmentos ou derivados, que são codificadas pelo(s) novo(s) gene(s) induzido(s) por GCH, cujas proteínas, isoformas, análogos, fragmentos ou derivados podem modular a apoptose em células T ou noutras

células. Estas novas proteínas, isoformas, análogos, fragmentos ou derivados podem modular a apoptose por modulação da actividade de sinalização do Fas ou do receptor p55 do TNF intracelularmente de um modo directo ou indirecto, ou podem modular a apoptose de uma forma inteiramente independente do Fas e/ou independente do receptor p55 do TNF, por modulação da actividade de outros mediadores intracelulares da apoptose. Deve entender-se que a modulação da apoptose pode ser uma intensificação/aumento da morte celular apoptótica ou uma inibição da morte celular apoptótica, em que estes são os modos possíveis de modulação directa da apoptose, seja através das vias mediadas pelo Fas ou receptor p55 do TNF (inclusivamente todas as proteínas/enzimas associadas nestas vias, como mencionado acima) ou através de outras vias envolvendo outros mediadores intracelulares da apoptose.

A modulação indirecta da apoptose deve ser entendida, por exemplo, como indução, por modos directos ou indirectos, de vias da sobrevivência celular (isto é, indução da activação do NF- κ B ou outras vias semelhantes relacionadas com a sobrevivência celular), cujas vias de sobrevivência celular contrariam essencialmente vias apoptóticas.

Antagonistas (por exemplo, anticorpos, péptidos, compostos orgânicos ou mesmo algumas isoformas, análogos, fragmentos ou derivados) das acima referidas novas proteínas, respectivas isoformas, análogos, fragmentos ou derivados podem ser utilizados para inibir a sua actividade no processo de sinalização intracelular no qual estão envolvidos e, assim, inibir a apoptose; ou, inversamente, para intensificar a apoptose (inibir a sobrevivência celular), consoante o desejado e dependendo da actividade da proteína, isoforma, análogos, fragmento ou derivado,

cuja actividade se pretende que seja inibida pelo antagonista. Por exemplo, se uma nova proteína, isoforma, análogo, fragmento ou derivado da invenção intensificar a apoptose, então esse antagonista servirá para bloquear este papel intensificador e acabará por bloquear ou reduzir a morte celular via apoptose. Da mesma forma, se uma nova proteína, isoforma, análogo, fragmento ou derivado da invenção inibir a apoptose, então esse antagonista servirá para bloquear esta actividade inibidora e acabará por intensificar ou aumentar a apoptose, isto é, resultará em morte celular acrescida.

Outro objectivo da presente invenção consiste em utilizar as novas proteínas, respectivas isoformas, análogo, fragmentos e derivados para isolar e caracterizar proteínas ou factores adicionais que podem estar envolvidos na modulação induzida por GCH da apoptose (isto é, produto(s) induzido(s) por GCH da expressão de genes capazes de modular a apoptose em células T e noutras células), cuja modulação pode ocorrer como referido acima. Por exemplo, podem ser isoladas outras proteínas que podem interagir com as novas proteínas da invenção e influenciar a sua actividade, ou podem ser isolados outros receptores ou mediadores intracelulares suplementarmente a montante ou a jusante do(s) processo(s) de sinalização com os quais interagem as novas proteínas da presente invenção e, em consequência, em cuja função também estão envolvidas as novas proteínas da invenção.

Além disso, um objectivo da presente invenção consiste em utilizar as acima mencionadas novas proteínas, isoformas, análogos, fragmentos e derivados como antígenos para a preparação de anticorpos policlonais e/ou monoclonais para aquelas. Por sua vez, os anticorpos podem ser utilizados, por exemplo, para a purificação das novas

proteínas de diferentes fontes, como extractos celulares ou linhas de células transformadas. Estes anticorpos também podem ser utilizados para fins de diagnóstico, por exemplo, para identificar perturbações relacionadas com o funcionamento anormal de efeitos celulares induzidos por GCH e/ou mediados pelos processos de sinalização nos quais as novas proteínas da invenção desempenham um papel, tais como, por exemplo, as vias apoptóticas mediadas pelo Fas e/ou o receptor p55 do TNF, ou vias de sobrevivência celular envolvendo a indução da activação do NF- κ B, ou qualquer outra via semelhante onde esse(s) produto(s) induzido(s) pela GCH desempenhe(m) um papel.

Outro objectivo da invenção consiste em proporcionar composições farmacêuticas compreendendo as acima referidas novas proteínas, isoformas, análogos, fragmentos ou derivados, bem como composições farmacêuticas compreendendo os anticorpos acima referidos.

De acordo com a presente invenção, um novo gene e uma nova proteína codificada por este gene foram identificados e isolados. O novo gene foi designado GILR (de gene Relacionado com a família de zíperes de Leucina Induzidos por Glucocorticóides), que codifica um novo membro da família de zíperes de leucina. Também pode utilizar-se, como sinónimo, a designação GILZ (gene de Zíper de Leucina Induzido por Glucocorticóides). A proteína GILR do ratinho é uma proteína com 137 resíduos de aminoácidos caracterizada por ter quatro resíduos leucina (nas posições 76, 83, 90 e 97 - ver Fig. 2 e ID SEQ NO: 2) espalhados por 7 aminoácidos e um resíduo asparagina (na posição 87 - ver Fig. 2 e ID SEQ NO: 2) no domínio zíper de leucina (ver Fig. 4). O novo gene GILR e o produto que codifica, que é a nova proteína GILR, foram identificados e isolados após o tratamento de células com dexametasona (DEX). A DEX é uma

hormona glucocorticóide bem conhecida e, em consequência, o gene GILR e a proteína GILR representam, respectivamente, um novo gene e proteína induzidos por glucocorticóides. Suplementarmente, parece que o gene GILR é induzido em timócitos e células T periféricas e também se verifica que é expresso em linfócitos normais do timo, baço e nodos linfáticos. Detectou-se pouca ou nenhuma expressão do gene GILR noutros tecidos não linfóides, incluindo cérebro, rim e fígado.

Utilizando como sonda o GILR murino previamente clonado, o homólogo humano do GILR foi clonado e sequenciado (ver Fig. 13 e ID SEQ NO: 5), demonstrando o nível elevado de conservação desta sequência.

No que se refere à actividade biológica da nova proteína GILR, os resultados experimentais indicam que esta proteína tem pelo menos uma actividade importante, que é a sua capacidade para proteger selectivamente células T da apoptose. Mais especificamente, a expressão de GILR protege selectivamente células T da apoptose induzida por tratamento das células T com anticorpo monoclonal (mAb) anti-CD3, mas não por tratamento com outros estímulos apoptóticos. Este efeito anti-apoptótico específico está correlacionado com a inibição da expressão do Fas e Fas-L.

Em conformidade, a expressão de GILR também pode servir para modular, se bem que indirectamente, outras vias intracelulares, como referido acima, nas quais está envolvido o Fas, por exemplo, os processos apoptóticos comuns ao Fas e ao receptor p55 do TNF onde estão envolvidas as suas proteínas e enzimas associadas (por exemplo, MORT-1, TRADD, RIP, MACH, Mch4), que acabam por causar morte celular por apoptose. Em consequência, a GILR, ao inibir especificamente a expressão do Fas e Fas-L, também pode inibir vias nas quais o Fas actua em conjunto

com o receptor p55 do TNF, devido à "conversa cruzada" entre estes receptores mediada pelas proteínas acima referidas que se ligam a estes dois receptores. Assim, se bem que a expressão de GILR possa servir para inibir a expressão do Fas e Fas-L de uma forma directa e numa extensão acentuada, a expressão de GILR também pode servir para inibir a actividade de sinalização intracelular do receptor p55 do TNF, não obstante de um modo indirecto e possivelmente em menor extensão. Adicionalmente, como mencionado acima, o Fas também está envolvido na indução da activação do NF- κ B e, assim, a expressão de GILR que inibe a expressão do FAS também servirá, possivelmente, para reduzir esta actividade do Fas, apesar de ter, aparentemente, menos efeitos prejudiciais para as células uma vez que, maioritariamente, o bloqueio da apoptose mediada pelo Fas serve para salvar as células de morte celular em maior extensão do que aquela em que a activação do NF- κ B salva as células.

Considerando o que foi acima exposto também acontece, por exemplo, que, quando for desejado matar células, por exemplo, células tumorais ou infectadas com o HIV, então será desejável inibir a expressão de GILR, ao passo que, inversamente, quando for desejado proteger células, por exemplo, células do fígado em pacientes com hepatite, então será desejado aumentar a expressão de GILR ou aumentar a sua actividade. Outras utilizações de GILR e o controlo da sua expressão serão aqui apresentados abaixo mais pormenorizadamente.

Tal como é aqui pormenorizado abaixo, por comparação de células não tratadas e tratadas com DEX (por exemplo, timócitos murinos, apesar de se poderem utilizar igualmente quaisquer timócitos e/ou células T periféricas e/ou outros linfócitos de mamífero, como os obtidos de humanos),

empregando a técnica de sonda de subtração, foi possível identificar, isolar e clonar o novo gene GILR da presente invenção.

A nova proteína GILR da invenção, considerando o que foi acima mencionado e como aqui apresentado abaixo, é um modulador da apoptose em linfócitos, em geral, e, em particular e aparentemente, é um inibidor da apoptose mediada pelo Fas (e Fas-L), especialmente em linfócitos T.

A sequenciação do novo gene e proteína GILR revelou que estes são novos, com base em comparações das sequências de nucleótidos e aminoácidos GILR (ver Fig. 2 e 13) com sequências conhecidas em várias bases de dados.

Estas comparações revelaram alguma homologia entre estas sequências GILR e quaisquer sequências conhecidas.

As proteínas que exibem o maior grau de homologia são hDIP (Vogel *et al.*, 1996) e TSC-22 humana (Jay *et al.*, 1996) (Fig. 15). Todas contêm um domínio zíper de leucina semelhante (Fig. 4). Estas duas proteínas foram mal caracterizadas como potenciais factores de transcrição, com uma distribuição disseminada em diferentes tecidos. A este respeito, a GILR exhibe um perfil de expressão e actividade claramente distintos, como será demonstrado nos exemplos.

Em resumo, com base no que foi mencionado acima e considerando também as propriedades biológicas da família de zíperes de leucina, da qual a GILR é um membro, em geral a GILR pode ser utilizada para estimular a actividade de linfócitos e para salvar células de morte celular apoptótica. Obviamente, a GILR também pode ser utilizada como sonda para isolar outras moléculas que se ligam à GILR e que podem servir para modular a sua actividade ou podem estar envolvidas, de qualquer outra forma, em processos de sinalização intracelular.

Em conformidade, a presente invenção proporciona uma sequência de DNA que codifica uma proteína relacionada com a família de zíperes de leucina induzidos por glucocorticóides (GILR), respectivas isoformas, fragmentos ou análogos, em que a referida GILR, respectivas isoformas, fragmentos ou análogos são capazes de inibir a apoptose e estimular a actividade de linfócitos.

Especificações da sequência de DNA da invenção incluem:

(a) uma sequência de cDNA derivada da região codificadora de uma proteína GILR nativa;

(b) sequências de DNA capazes de hibridizar para uma sequência de (a) em condições moderadamente restritas e que codificam uma proteína GILR biologicamente activa, e

(c) sequências de DNA que são degeneradas, em resultado do código genético, com sequências de DNA definidas em (a) e (b) e que codificam uma proteína GILR biologicamente activa.

Outras especificações da sequência de DNA acima são sequências que compreendem pelo menos parte da sequência de DNA representada na ID SEQ NO: 1 e que codificam pelo menos uma proteína GILR activa, isoforma, análogo ou fragmento, bem como uma sequência de DNA que codifica uma proteína GILR, isoforma, análogo ou fragmento possuindo pelo menos parte da sequência de aminoácidos representada na ID SEQ NO: 2.

Outras especificações da sequência de DNA acima são sequências que compreendem pelo menos parte da sequência de DNA representada na ID SEQ NO: 5 e que codificam pelo menos uma proteína GILR humana activa, isoforma, análogo ou fragmento, bem como uma sequência de DNA que codifica uma proteína GILR humana, isoforma, análogo ou fragmento

possuindo pelo menos parte da sequência de aminoácidos representada na ID SEQ NO: 6.

A presente invenção também proporciona um vector que compreende qualquer uma das sequências de DNA acima.

Os vectores da presente invenção estão aptos a serem expressos numa célula-hospedeiro eucariótica ou a serem expressos numa célula-hospedeiro procariótica.

Em conformidade, a presente invenção também proporciona células-hospedeiro eucarióticas ou procarióticas transformadas contendo qualquer um dos vectores acima.

Noutro aspecto da invenção é proporcionada uma proteína GILR, respectiva isoforma, fragmento, análogos funcionais ou derivados codificados por qualquer uma das sequências de DNA acima, cuja proteína, respectiva isoforma, fragmento, análogos e derivados são capazes de inibir a apoptose e de estimular a actividade de linfócitos.

Especificações das proteínas acima, etc., da invenção incluem uma proteína GILR, respectiva isoforma, fragmento, análogos e derivados em que a referida proteína, isoforma, análogos, fragmentos e derivados têm pelo menos parte da sequência de aminoácidos ID SEQ NO: 2 ou da sequência de aminoácidos ID SEQ NO: 6.

A presente invenção também proporciona um método para produzir a proteína GILR, respectiva isoforma, fragmento, análogos ou derivados, que compreende fazer crescer as células-hospedeiro transformadas em condições adequadas para a expressão da referida proteína, análogos ou derivados, realizar modificações pós-tradução consoante o necessário para obter a referida proteína, fragmentos, análogos ou derivados e isolar a referida proteína, fragmentos, análogos ou derivados expressos.

Noutro aspecto são proporcionados anticorpos ou respectivos fragmentos activos ou derivados específicos para a proteína GILR, isoforma, fragmento, análogos ou derivados da invenção.

As sequências de DNA acima e proteínas GILR, etc., codificadas por aquelas da invenção têm muitas utilizações possíveis; em conformidade, a presente invenção também proporciona os métodos seguintes. Deve salientar-se que outras utilizações terapêuticas da GILR, suas isoformas, análogos, fragmentos e derivados, bem como anticorpos contra aquela e outros antagonistas da actividade da GILR, por exemplo, péptidos, também estão abrangidos no âmbito da presente invenção, como apresentado na descrição pormenorizada da invenção ou como surge da revelação aqui apresentada abaixo. Em conformidade, o que se apresenta a seguir é meramente representativo dos vários métodos revelados.

(i) Um método para a inibição da apoptose em células, mediada pelo sistema Fas/Fas-L, sistema CD3/TCR ou outros mediadores intracelulares da apoptose, que compreende tratar as referidas células com uma ou mais proteínas GILR, isoformas, análogos, fragmentos ou derivados, em que o referido tratamento das referidas células compreende introduzir nessas células as referidas uma ou mais proteínas, isoformas, análogos, fragmentos ou derivados numa forma adequada para a sua introdução intracelular, ou introduzir nas referidas células uma sequência de DNA que codifica as referidas uma ou mais proteínas, isoformas, análogos, fragmentos ou derivados na forma de um vector adequado que contém essa sequência, em que o referido vector é capaz de proceder à inserção da referida sequência nas referidas células de um modo tal que essa sequência seja expressa nessas células.

(ii) Um método como em (i) acima para a inibição da apoptose em células, cujo tratamento de células compreende introduzir nessas células uma sequência de DNA que codifica a referida proteína GILR, isoformas, análogos, fragmentos ou derivados na forma de um vector adequado que contém essa sequência, em que o referido vector é capaz de proceder à inserção da referida sequência nas referidas células de um modo tal que essa sequência seja expressa nessas células.

(iii) Um método como em (i) ou (ii) acima, cujo tratamento das referidas células é feito por transfecção dessas células com um vector de vírus animal recombinante, que compreende os passos seguintes:

(a) construir um vector de vírus animal recombinante contendo uma sequência que codifica uma proteína da superfície viral (ligando) que é capaz de se ligar a um receptor específico da superfície celular na superfície das referidas células a serem tratadas, e uma segunda sequência que codifica uma proteína seleccionada de entre a proteína GILR, isoformas, análogos, fragmentos e derivados, que, quando expressa nessas células, é capaz de inibir a apoptose, e

(b) infectar as referidas células com o referido vector de (a).

(iv) Um método para intensificar a apoptose em células por inibição da actividade de proteínas GILR nessas células, que compreende tratar as referidas células com anticorpos ou respectivos fragmentos activos ou derivados, cujo tratamento é feito por aplicação nas referidas células de uma composição adequada que contém os referidos anticorpos, respectivos fragmentos activos ou derivados.

(v) Um método para intensificar a apoptose em células por inibição da actividade de proteínas GILR nessas células, que compreende tratar as referidas células com uma

sequência oligonucleotídica que codifica uma sequência anti-sentido para pelo menos parte da sequência de DNA que codifica uma proteína GILR, em que a referida sequência oligonucleotídica é capaz de bloquear a expressão da proteína GILR.

(vi) Um método como em (v) acima, em que a referida sequência oligonucleotídica é introduzida nas referidas células via um vírus de (iii) acima, em que a referida segunda sequência desse vírus codifica a referida sequência oligonucleotídica.

(vii) Método para o tratamento de células tumorais ou células infectadas com o HIV ou outras células doentes, para intensificar a apoptose nessas células inibindo nessas células a actividade de proteínas GILR, que compreende:

(a) construir um vector de vírus animal recombinante contendo uma sequência que codifica uma proteína da superfície viral que é capaz de se ligar a um receptor específico da superfície de células tumorais ou receptor da superfície de células infectadas com o HIV ou receptor contido noutras células doentes e uma sequência que codifica uma proteína mutante GILR inactiva, em que a referida proteína mutante, quando expressa nessas células tumorais, infectadas com o HIV ou doentes, é capaz de inibir a actividade da GILR endógena normal e de intensificar a apoptose nessas células, e

(b) infectar as referidas células tumorais ou infectadas com o HIV ou outras células doentes com o referido vector de (a).

(viii) Um método para intensificar a apoptose em células por inibição da actividade de proteínas GILR nessas células, que compreende aplicar o procedimento de ribozima no qual um vector que codifica uma sequência de ribozima, capaz de interagir com uma sequência de mRNA celular que

codifica uma proteína GILR, é introduzido nas referidas células numa forma tal que permite a expressão da referida sequência de ribozima nessas células, e em que, quando a referida sequência de ribozima é expressa nessas células, interage com a referida sequência de mRNA celular e procede à clivagem dessa sequência de mRNA, resultando na inibição da expressão a referida proteína GILR nas referidas células.

(ix) Um método para intensificar a apoptose em células por inibição da actividade de proteínas GILR nessas células, que compreende introduzir nessas células um péptido que é capaz de se ligar à GILR endógena normal nessas células e inibir a sua actividade, desse modo intensificando a apoptose.

(x) Um método para isolar e identificar proteínas, que são proteínas do tipo GILR pertencentes à família de zíperes de leucina ou que são proteínas capazes de se ligar directamente à GILR, que compreende aplicar o procedimento de dois híbridos de levedura no qual uma sequência que codifica a referida GILR está contida num vector híbrido e uma sequência de uma biblioteca de cDNA ou DNA genómico está contida no segundo vector híbrido, em que os vectores são depois utilizados para transformar células-hospedeiro de levedura e as células transformadas positivas são isoladas, seguido de extracção do referido segundo vector híbrido para obter uma sequência que codifica uma proteína que se liga à referida GILR.

(xi) Um método como em qualquer um dos acima, em que a referida proteína é pelo menos uma das isoformas da GILR, respectivos análogos, fragmentos e derivados.

Ainda noutro aspecto da presente invenção são proporcionadas várias composições farmacêuticas que são particularmente úteis para implementar pelo menos alguns

dos métodos acima da invenção. Em consequência, o que se descreve a seguir é apenas um número representativo de possíveis composições farmacêuticas de acordo com a presente invenção, em que outras possíveis composições/formulações no âmbito da presente invenção são apresentadas na revelação pormenorizada seguinte ou claramente provêm daquelas:

a) uma composição farmacêutica para inibir a apoptose em células ou para estimular a activação de linfócitos, que compreende, como ingrediente activo, pelo menos uma proteína GILR, seus fragmentos biologicamente activos, respectivos análogos, derivados ou misturas;

b) uma composição farmacêutica para inibir a apoptose em células ou para estimular a activação de linfócitos, que compreende, como ingrediente activo, um vector de vírus animal recombinante que codifica uma proteína capaz de se ligar a um receptor da superfície celular e que codifica pelo menos uma proteína GILR, isoforma, fragmentos activos ou análogos;

c) uma composição farmacêutica para intensificar a apoptose em células por inibição da actividade da GILR nessas células, que compreende, como ingrediente activo, uma sequência oligonucleotídica que codifica uma sequência anti-sentido da sequência de mRNA da proteína GILR;

d) uma composição farmacêutica para intensificar a apoptose em células por inibição da actividade da GILR nessas células, que compreende, como ingrediente activo, uma proteína GILR mutante inactiva ou sequência de DNA que codifica a referida proteína GILR mutante inactiva, em que o referido mutante da GILR, quando introduzido ou expresso nessas células, inibe a actividade da proteína GILR endógena normal;

e) uma composição farmacêutica para intensificar a apoptose em células por inibição da actividade da GILR nessas células, que compreende, como ingrediente activo, um péptido capaz de se ligar ao sítio activo ou ao domínio zíper de leucina da GILR e, desse modo, inibir a actividade da GILR endógena normal em células.

Descrição Breve das Figuras

A Figura 1 (A, B) mostra reproduções de autorradiogramas que apresentam os resultados da análise da expressão de GILR em vários tecidos e os efeitos da indução por glucocorticóides (dexametasona - DEX) da expressão de GILR em vários tecidos, em que a Fig. 1A mostra a expressão de mRNA de GILR em órgãos de ratinho. O RNA total foi extraído, separado em gel de agarose e transferido para um filtro de nitrocelulose. O filtro foi hibridizado com uma sonda de cDNA de GILR etiquetada por tradução por cortes, foi lavado, submetido a autorradiografia e exposto durante 8 dias. Cada via foi carregada com 2 µg de RNA total. A Fig. 1B mostra o efeito da Dexametasona na indução de GILR. As células não foram tratadas (vias 1, 3, 5) ou foram tratadas (vias 2, 4, 6) com 100 nM/L de DEX durante 3 horas. O RNA total (25 µg) foi extraído, submetido a electroforese num gel e transferido para um filtro de nitrocelulose. O filtro foi hibridizado com cDNA de GILR etiquetado e foi exposto durante 24 horas. Figura 1A, vias 1 até 9: Baço, Rim, Medula óssea, Coração, Fígado, Cérebro, Pulmão, Nodos linfáticos, Timo. Figura 1B, vias 1 até 6: Nodos linfáticos, nodos linfáticos + DEX, Timo, Timo + DEX, Baço, Baço + DEX.

A Figura 2 representa esquematicamente as sequências de nucleótidos e (aminoácidos) polipeptídica deduzida do gene e proteína GILR de ratinho.

A Figura 3 (A, B, C) mostra reproduções de autorradiogramas que apresentam os resultados da expressão de cDNA de GILR, em que: a Fig. 3A mostra a expressão de cDNA de GILR inserido num vector Bluescript (via 1, controlo de lisato de reticulócitos de coelho; via 2, controlo de vector vazio; via 3, vector com cDNA de GILR (sentido)) no qual os transcritos expressos foram traduzidos num lisato de reticulócitos de coelho na presença de [³⁵S]Met; a Fig. 3B mostra uma coloração "Western" na qual se utilizou anti-soro policlonal de coelho para a análise de coloração "Western" de uma proteína de fusão GILR construída e expressa como pormenorizado aqui abaixo (via 1, soro pré-imunológico; via 2, Ab anti-GILR), e a Fig. 3C mostra a análise de coloração "Western" da proteína GILR realizada utilizando soro pré-imunológico de coelho (via 1, timócitos não tratados; via 2, timócitos tratados com DEX 100 nM) ou Ab anti-GILR (via 3, timócitos não tratados; via 4, timócitos tratados com DEX).

A Figura 4 é uma representação esquemática da comparação do motivo zíper de leucina na fase de leitura aberta do cDNA de GILR murino com os de outros membros da família de zíperes de leucina.

A Figura 5 (A, B) mostra reproduções de autorradiogramas que apresentam os resultados da análise de protecção de RNase da expressão de mRNA de GILR em clones transfectados, em que se mostra na Fig. 5A, nas vias 1, 2, clones transfectados com controlos pcDNA3 vazios; vias 3-8, clones transfectados com cDNA de GILR; via 9, controlo de tRNA; via 10, controlo de sonda não digerida, e a Fig. 5B mostra, na via 1, controlo de sonda não digerida; vias 2-4, clones transfectados com controlos pcDNA3 vazios; vias 5-7, clones transfectados com cDNA de GILR; via 8, controlo de

tRNA. Em cada via carregaram-se 20 μg de RNA. A Fig. 5C mostra esquematicamente a construção na qual o fragmento que a sonda anti-sentido iria proteger por digestão com RNase específica de filamentação simples.

A Figura 6 mostra uma representação em gráfico de barras dos resultados que demonstram a protecção de morte induzida por TCR de clones transfectados de 3D0. Células 3D0 foram transfectadas por electroporação com 15 μg de pcDNA3 linearizado ou 15 μg de vector pcDNA3 linearizado que expressa o cDNA de GILR. Para a indução da apoptose, as células foram cultivadas durante 20 horas em placas revestidas com anti-CD3 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Avaliou-se a percentagem de morte celular por medição do teor de DNA de núcleos isolados corados com iodeto de propídio. Os dados apresentados são representativos de três experiências independentes.

A Figura 7 (A - D) consiste em representações em gráfico de barras dos resultados da análise da apoptose induzida por outros estímulos em clones transfectados de 3D0, em que a Fig. 7A mostra os resultados obtidos com factor trófico removido; a Fig. 7B mostra os resultados obtidos com irradiação U.V. (100 J/m^2); a Fig. 7C mostra os resultados obtidos com DEX (100 mM/L), e a Fig. 7D amostra os resultados obtidos com anticorpo monoclonal (mAb) anti-Fas (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Todos os grupos foram tratados durante 20 horas. Mediu-se a morte celular como indicado acima relativamente à Fig. 6 e como aqui referido abaixo.

A Figura 8 (A, B) mostra representações em gráfico de barras dos resultados da expressão de Fas e Fas-L em clones transfectados de 3D0. Células 3D0 transfectadas com vector vazio ou com pcDNA3 de GILR foram desencadeadas com mAb

anti-CD3 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 20 horas e foram analisadas quanto à expressão do Fas (Fig. 8A) e Fas-L (Fig. 8B).

A Figura 9 (A, B) mostra reproduções de autorradiogramas que apresentam a expressão de mRNA de Fas em clones transfectados. A Fig. 9A mostra a expressão de mRNA de Fas em clones transfectados com pcDNA3 vazio não tratado (vias 1, 3, 5, 7, 9), com pcDNA3 vazio tratado com anticorpo monoclonal anti-CD3 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 20 horas (vias 2, 4, 6, 8, 10), com cDNA de GILR não tratado (vias 11, 13, 15, 17, 19) e com cDNA de GILR tratado com anticorpo monoclonal anti-CD3 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 20 horas não tratado (vias 12, 14, 16, 18, 20). A Fig. 9B mostra a análise de protecção de RNase da expressão de mRNA de Fas-L nos clones transfectados. Sonda não digerida de Fas-L (via 1) ou β -actina (via 2); clones transfectados com pcDNA3 vazio não tratado (vias 3, 5, 7, 16, 18) ou tratado com anticorpo monoclonal anti-CD3 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 20 horas (vias 4, 6, 8, 17, 19) com cDNA de GILR e não tratado (vias 9, 11, 13, 20, 22) e com cDNA de GILR e depois tratado com anticorpo monoclonal anti-CD3 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 20 horas (vias 10, 12, 14, 21, 23); tRNA (via 15). Em cada via carregaram-se 20 μg de RNA. O comprimento do mRNA anti-sentido protegido do fragmento de Fas-L é 184 pares de bases.

A Figura 10 (A, B) mostra reproduções de autorradiogramas que apresentam os resultados do efeito de diferentes agentes na modulação da expressão de mRNA de GILR. A Fig. 10A mostra que anti-CD3 modula negativamente e anti-CD2 modula positivamente a expressão de GILR. Células 3D0 foram cultivadas em placas de 96 cavidades com meio isoladamente, revestidas com anti-CD3 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e ou anticorpo monoclonal anti-CD2 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e ou anticorpo

monoclonal anti-CD2 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Via 1 = controlo; via 2 = anti CD3 + anti CD2; via 3 = anti-CD2; via 4 = anti CD3. A Fig. 10B mostra que a ciclosporina inibe a modulação negativa conduzida por anti-CD3 da expressão de GILZ. Células 3D0 foram cultivadas em placas revestidas com anti-CD3 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) na presença ou na ausência de ciclosporina (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Em 10A e 10B, a expressão de GILR foi avaliada por coloração "Northern". Em cada via carregaram-se 20 μg de RNA. Via 1 = controlo; via 2 = anti CD3; via 3 = Ciclosporina; via 4 = anti CD3 + ciclosporina.

A Figura 11 (A, B) mostra os resultados da indução da expressão de GILR por anti-CD3 com ou sem tratamento com Dexametasona. A Figura 11A mostra uma análise de coloração "Western" da proteína GILR em extractos celulares nucleares de timócitos não tratados (via 1), timócitos cultivados em placas revestidas com anti-CD3 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 3 horas (via 2), timócitos tratados com Dexametasona 100 nM durante 3 horas (via 3) e timócitos cultivados em placas revestidas com anti-CD3 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 3 horas e tratados, durante o mesmo período de tempo, com Dexametasona 100 nM. A quantidade de proteína carregada em cada via é comparada com um sinal obtido com um anticorpo contra a β tubulina. A Figura 11B mostra um autorradiograma de uma análise de coloração "Northern" de mRNA de GILR, que compara timócitos não tratados (via 1), timócitos cultivados em placas revestidas com anti-CD3 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 3 horas (via 2), timócitos tratados com Dexametasona 100 nM durante 3 horas (via 3) e timócitos cultivados em placas revestidas com anti-CD3 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 3 horas e tratados, durante o mesmo período de tempo, com Dexametasona 100 nM. O filtro foi hibridizado com cDNA de GILR etiquetado e foi exposto para autorradiografia durante 48 horas. A quantidade de RNA

total (25 μ g) carregada em cada via, processada no gel e transferida para o filtro é comparada com o sinal obtido com cDNA de β -actina etiquetado.

A Figura 12 (A, B) mostra os resultados da expressão e da localização da proteína GILR. A Figura 11A é uma análise de imunocoloração proteica da proteína GILR. Clones de 3D0 foram transfectados com o vector vazio pcDNA3: extractos da proteína nucleares (via 1) e citoplasmáticos (via 3) foram purificados, carregados no gel e transferidos para o filtro. Os extractos da proteína nucleares e citoplasmáticos de clones de 3D0 transfectados com cDNA de GILR estão apresentados na via 2 e via 4, respectivamente. A Figura 11B é uma análise de imunocoloração proteica da proteína β tubulina nos mesmos extractos.

A Figura 13 representa esquematicamente as sequências de nucleótidos e (aminoácidos) polipeptídica deduzida do gene e proteína GILR humanos.

A Figura 14 mostra a comparação entre as sequências de cDNA de GILR de ratinho (MAIÚSCULAS) e GILR humano (minúsculas).

A Figura 15 mostra o alinhamento das sequências proteicas da GILR de ratinho (mG) em comparação com a GILR humana (hG), DIP humana (hD; Vogel *et al.*, 1996; número de acesso da Swiss-Prot Q99576) e TSC-22 humana (hT; Jay *et al.*, 1996; número de acesso da Swiss-Prot Q15714). Os resíduos que são idênticos à GILR de ratinho estão marcados com (=), ao passo que os resíduos que são homólogos estão marcados com (-).

Deve notar-se que todas as figuras acima também estão descritas e são referidas no Exemplo aqui apresentado abaixo.

Descrição Pormenorizada da Invenção

De acordo com a presente invenção foi isolado um novo membro da família zíperes de leucina, designado GILR. O cDNA que codifica o GILR foi identificado, clonado e sequenciado, a proteína codificada por este cDNA foi expressa e a sua sequência de aminoácidos foi deduzida da sequência de cDNA. O gene GILR representa um gene cuja transcrição é regulada por hormonas glucocorticóides (GCH), como evidenciado pela sua indução pela GCH sintética dexametasona (DEX), e também representa um desses genes regulados por GCH cuja expressão está envolvida na modulação da apoptose de linfócitos T.

A proteína GILR (ver Figs. 2, 4 e 13) tem boa homologia com todos os outros membros da família de zíperes de leucina, especialmente no domínio zíper de leucina, incluindo pelo menos alguma homologia com a proteína TSC-22, cuja função ainda não foi definida mas que também foi mostrado que é induzida por tratamento com DEX (Shibanuma *et al.*, 1992, Jay *et al.*, 1996). Quatro resíduos leucina na GILR espalhados por 7 aminoácidos (nas posições 76, 83, 90 e 97) e um resíduo asparagina (na posição 87) no domínio zíper de leucina são compatíveis com a estrutura canónica zíper de leucina da família.

No entanto, tal como a TSC-22, a GILR não parece conter o domínio básico canónico que se encontra na maior parte dos factores de transcrição e que é essencial para a ligação a DNA.

Além disso, ao contrário de outras moléculas zíperes de leucina (Goldstone e Lavin, 1994; Hope e Struhl, 1987; Nicholas *et al.*, 1991; Yamamoto *et al.*, 1988), tanto a TSC-22 como a GILR têm um tamanho relativamente pequeno (comprimento total, respectivamente, de 143 e 137 aminoácidos), o que sugere que estas duas podem representar

uma nova família de proteínas zíper de leucina de baixo peso molecular. Suplementarmente, a proteína GILR tem um domínio, que se estende desde o resíduo 59 até ao resíduo 138, que é idêntico à proteína hDIP (Vogel *et al.*, 1996), cuja função ainda não foi definida.

O mRNA de GILR é claramente detectável, por coloração "Northern", em timócitos, células do baço e nodos linfáticos isolados de fresco, e a expressão de mRNA e proteína é induzida em tecidos linfóides, como timócitos, baço e nodos linfáticos, por tratamento com DEX (ver Fig. 1). Apesar destes resultados poderem sugerir que este gene é maioritariamente expresso em linfócitos T, não pode excluir-se a expressão noutros tecidos (incluindo aqueles onde se detectou expressão fraca ou nula de mRNA: medula óssea, coração, pulmão, fígado, cérebro e rim) em contextos peculiares, tais como, por exemplo, durante processos inflamatórios e regeneração de tecidos ou na presença de sinais específicos para tecidos. De qualquer modo, o padrão de expressão de GILR é peculiar comparado com as proteínas zíperes de leucina de baixo peso molecular mais semelhantes: detectou-se mRNA de TSC-22, utilizando coloração "Northern", de forma bastante ubíqua em diferentes tecidos quando o seu nível foi comparado com o da tubulina em tecidos de ratinho (Shibanuma *et al.*, 1992) e humanos (Jay *et al.*, 1996), a análise do padrão de expressão do gene hDIP por hibridização combinada Transcriptase Reversa - Reacção em Cadeia de Polimerase revelou uma expressão significativa do gene hDIP em níveis comparáveis em cada um dos tecidos investigados, compreendendo o coração, pulmão, estômago, sangue, pâncreas e outros (Vogel *et al.*, 1996). Também a localização subcelular é diferente entre a GILR, que é claramente

nuclear (Fig. 11), e a TSC-22, que pode ser nuclear e citoplasmática (Shibanuma *et al.*, 1992).

Os resultados obtidos após experiências de transfecção indicam que o gene GILR é capaz de inibir a apoptose de células T induzida por tratamento com mAb anti-CD3. Pelo contrário, os mesmos clones transfectados são protegidos somente numa extensão significativamente menor contra a morte celular programada induzida por outros agentes apoptóticos típicos, tais como DEX, irradiação com UV, privação de nutrientes do soro ou desencadeamento do Fas por mAb anti-Fas com ligações cruzadas.

Por exemplo, foi previamente mostrado que a DEX induz apoptose em linfócitos T, incluindo timócitos e hibridomas de células T, e inibe a morte celular activada por desencadeamento do complexo CD3/TCR (Cohen e Duke, 1984; Yang *et al.*, 1995). Estes resultados indicam que a GILR é específica em contrariar a morte de células T activada por desencadeamento do complexo CD3/TCR e pode contribuir, em parte, para a inibição induzida por DEX da apoptose activada por CD3/TCR.

Este efeito protector faz surgir a questão do(s) possível(possíveis) mecanismo(s) da inibição induzida por GILR da apoptose. Os presentes resultados indicam que a inibição da apoptose, associada à super-expressão de GILR, está correlacionada com a inibição da super-expressão do Fas e expressão de Fas-L induzida por tratamento com mAb anti-CD3 (Figs. 8, 9 e Tabela II). Uma possibilidade é a GILR interagir com outras moléculas, presentemente desconhecidas, que estão envolvidas na activação da expressão dos genes Fas e Fas-L.

A GILR pode interagir com sinal(sinais), induzidos por desencadeamento de TCR/CD3 em linfócitos activados, ou

directamente com factores de transcrição envolvidos na regulação da transcrição dos genes Fas e Fas-L.

Além disso, o aumento da expressão de GILR, após a interacção DEX/células T, sugere que este gene poderá estar envolvido na regulação da morte de linfócitos. De facto, foi sugerido que a GCH pode participar na regulação da selecção de células T e contribuir, juntamente com outros estímulos (tais como interacção Ag/TCR, citocinas e moléculas co-acessórias), para a rede de selecção complexa envolvida no controlo da sobrevivência de células T (Migliorati *et al.*, 1993; Nieto *et al.*, 1990; Nieto e Lopez-Rivas, 1989; Cohen e Duke, 1984; Wyllie, 1980).

Assim, os resultados experimentais, de acordo com a presente invenção, descrevem a identificação de um gene que codifica para uma nova molécula, GILR, da família de Zíperes de leucina que pode estar envolvida na regulação da morte celular.

Em consequência, a presente invenção diz respeito, num aspecto, a novas proteínas GILR que são capazes de mediar ou modular a via da morte celular ou apoptose mediada por Fas intracelular e possivelmente também vias de sobrevivência celular nas quais o Fas desempenha um papel, como foi aqui pormenorizado acima. Esta GILR parece ser um inibidor da apoptose activada pelo desencadeamento do complexo CD3/TCR, bem como um inibidor da expressão de Fas/Fas-L, e, assim, a GILR pode desempenhar um papel chave no resgate de células da morte celular.

Mais particularmente, de acordo com a presente invenção, foi revelada uma nova proteína GILR que está envolvida na via da morte celular intracelularmente e também pode estar envolvida em vias de sobrevivência de células intracelulares. Assim, a regulação ou controlo da actividade da GILR pode regular qualquer uma ou ambas estas

vias, ou mesmo a ligação do TNF ou ligando do Fas aos seus receptores (para o TNF, o p55-R em particular), que se sabe activarem vias da morte celular e sobrevivência celular, em que a extensão da activação de uma via, em comparação com a outra, determina possivelmente o resultado final, por exemplo, dos acontecimentos intracelulares induzidos pelo complexo CD3/TCR, TNF ou ligando do Fas, isto é, se a célula morre ou sobrevive. Uma vez que a GILR parece afectar (isto é, inibir) directamente a expressão de Fas/Fas-L, parece estar mais directamente relacionada com a protecção das células da morte celular. Assim, a proteína GILR da presente invenção representa um modulador ou mediador intracelular importante, especialmente no que se refere à apoptose.

Devido à capacidade única do Fas, CD3/TCR e receptores do TNF para causarem morte celular, bem como a capacidade dos receptores do TNF para desencadearem várias outras actividades que danificam tecidos, uma função aberrante destes receptores pode ser particularmente prejudicial para o organismo. De facto, foi mostrado que tanto uma função excessiva como deficiente destes receptores contribui para as manifestações patológicas de várias doenças. Identificar moléculas que participam na regulação da expressão e na actividade de sinalização destes receptores e descobrir formas de modular a função destas moléculas são uma chave potencial para novas abordagens terapêuticas para estas doenças. Considerando o presumível papel importante da GILR na toxicidade do Fas e possivelmente também do receptor p55 do TNF, devido à inter-relação ou conversa cruzada entre o Fas e o receptor p55 do TNF parece ser particularmente importante conceber fármacos que consigam bloquear a função citotóxica do Fas, CD3/TCR e outros mediadores acima mencionados, possivelmente aumentando a expressão de GILR

ou aumentando de qualquer outra forma a quantidade de GILR. Isto permitiria intensificar/aumentar o resgate de células da morte celular naqueles estados patológicos em que a morte celular deve ser reduzida, por exemplo, em inflamação, várias doenças autoimunes e afins, em que se procura uma sobrevivência celular acrescida.

Inversamente, quando for desejado matar células, por exemplo, células cancerosas, células infectadas com o HIV e afins, será desejável aumentar os efeitos citotóxicos do Fas, CD3/TCR, receptor p55 do TNF (e suas proteínas associadas, tais como, por exemplo, MORT-1, MACH, Mch4, TRADD), e isto reduzindo a expressão ou quantidade de GILR.

Todavia, deve notar-se que as evidências experimentais apresentadas quanto à função da GILR (isto é, inibição da apoptose de células T, especificamente a induzida por tratamento com mAb anti-CD3 e activada pelo desencadeamento do complexo CD3/TCR, bem como inibição da expressão de Fas/Fas-L) diferenciam claramente a GILR dos outros elementos da mesma família de zíperes de leucina. Tal como foi demonstrado mais recentemente, a transfecção de um vector de expressão de TSC-22 induz morte celular apoptótica numa linha de células de carcinoma gástrico humano por activação da via de sinalização do TGF- β para apoptose (Ohta et al., 1997).

A presente invenção também diz respeito à sequência de DNA que codifica uma proteína GILR e às proteínas GILR codificadas pelas sequências de DNA.

Além disso, a presente invenção também diz respeito às sequências de DNA que codificam isoformas, análogos, fragmentos e derivados biologicamente activos da proteína GILR e às isoformas, análogos, fragmentos e derivados codificados por aquelas. A preparação desses análogos, fragmentos e derivados é feita por procedimentos comuns

(ver, por exemplo, Sambrook *et al.*, 1989), nos quais, nas sequências de DNA que codificam a proteína GILR, um ou mais codões podem ser deletados, adicionados ou substituídos por outros, dando origem a análogos com pelo menos um resíduo de aminoácido alterado relativamente à proteína nativa.

Das sequências de DNA acima da invenção que codificam uma proteína GILR, isoforma, análogo, fragmento ou derivado, também estão incluídas, como uma especificação da invenção, sequências de DNA capazes de hibridizar com uma sequência de cDNA derivada da região codificadora de uma proteína GILR nativa, em que essa hibridização é realizada em condições moderadamente restritas e em que as referidas sequências de DNA aptas a hibridizar codificam uma proteína GILR biologicamente activa. Em consequência, estas sequências de DNA aptas a hibridizar incluem sequências de DNA com homologia relativamente elevada com a sequência de cDNA de GILR nativa e, como tal, representam sequências do tipo GILR que podem ser, por exemplo, sequências derivadas naturalmente que codificam as várias isoformas da GILR ou sequências de ocorrência natural que codificam proteínas pertencentes a um grupo de sequências do tipo GILR que codificam uma proteína com a actividade da GILR. Suplementarmente, estas sequências também podem incluir, por exemplo, sequências produzidas por síntese de ocorrência não natural que são semelhantes à sequência de cDNA de GILR nativa mas que incorporam algumas modificações desejadas. Em consequência, essas sequências sintéticas incluem todas as possíveis sequências que codificam análogos, fragmentos e derivados da GILR, todos os quais têm a actividade da GILR.

Para obter as várias sequências do tipo GILR de ocorrência natural acima referidas podem empregar-se procedimentos comuns de rastreio e isolamento de amostras

de DNA ou RNA derivadas naturalmente de vários tecidos, utilizando como sonda o cDNA de GILR natural ou respectiva porção (ver, por exemplo, os procedimentos comuns apresentados em Sambrook *et al.*, 1989).

Da mesma forma, para preparar as várias sequências sintéticas do tipo GILR acima referidas que codificam análogos, fragmentos ou derivados da GILR podem utilizar-se alguns procedimentos comuns, tal como é aqui pormenorizado abaixo respeitante à preparação desses análogos, fragmentos e derivados.

Um polipéptido ou proteína "substancialmente correspondente" à proteína GILR inclui não só a proteína GILR mas também polipéptidos ou proteínas análogos da GILR.

Análogos que correspondem substancialmente à proteína GILR são aqueles polipéptidos nos quais um ou mais aminoácidos da sequência de aminoácidos da proteína GILR foram substituídos por outros aminoácidos, deletados e/ou inseridos, desde que a proteína resultante exiba actividade biológica substancialmente igual ou superior à da proteína GILR à qual corresponde.

Para corresponder substancialmente à proteína GILR, as alterações feitas na sequência de proteínas GILR, tais como isoformas, são, em geral, relativamente pequenas. Apesar do número de alterações poder ser superior a dez, preferivelmente não se fazem mais do que dez alterações, mais preferivelmente não mais do que cinco e muito preferivelmente não mais do que três dessas alterações.

Não obstante ser possível utilizar qualquer técnica para descobrir proteínas potencialmente biologicamente activas que correspondam substancialmente a proteínas GILR, uma dessas técnicas consiste em utilizar técnicas de mutagénese convencionais no DNA que codifica a proteína, resultando nalgumas modificações. Em seguida, as proteínas

expressas por esses clones podem ser rastreadas quando à sua capacidade para se ligarem à GILR e modularem a actividade da GILR por modulação/mediação das vias intracelulares acima mencionadas.

Alterações "conservativas" são aquelas alterações que não se espera que alterem a actividade da proteína e são habitualmente as primeiras a serem rastreadas, pois não se espera que alterem substancialmente a dimensão, carga ou configuração da proteína e, assim, não se espera que alterem as suas propriedades biológicas.

Substituições conservativas de proteínas GILR incluem um análogo em que pelo menos um resíduo de aminoácido do polipéptido foi substituído, de forma conservativa, por um aminoácido diferente. Essas substituições são preferivelmente feitas de acordo com a lista seguinte apresentada na Tabela A, cujas substituições podem ser determinadas por experimentação de rotina, para conferir propriedades estruturais e funcionais modificadas de uma molécula polipeptídica sintetizada mantendo a actividade biológica característica da proteína GILR.

Tabela A

<u>Resíduo</u>	<u>Substituição</u>
<u>Original</u>	<u>Exemplificativa</u>
Ala	Gly,Ser
Arg	Lys
Asn	Gln,His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Ala,Pro
His	Asn,Gln
Ile	Leu,Val
Leu	Ile,Val
Lys	Arg,Gln,Glu
Met	Leu,Tyr,Ile
Phe	Met,Leu,Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp,Phe
Val	Ile,Leu

Alternativamente, outro grupo de substituições da proteína GILR consiste naquelas em que pelo menos um resíduo de aminoácido do polipéptido foi removido e um resíduo diferente foi inserido no seu lugar de acordo com a Tabela B seguinte. Os tipos de substituições que podem ser feitas no polipéptido podem basear-se na análise das frequências de alterações de aminoácidos entre uma proteína homóloga de uma espécie diferente, como as apresentadas na Tabela 1-2 de Schulz *et al.*, G.E., "Principles of Protein Structure", Springer-Verlag, Nova Iorque, NI, 1798, e Figs.

3 - 9 de Creighton, T.E., "Proteins: Structure and Molecular Properties", W.H. Freeman & Co., San Francisco, CA, 1983. Com base nessa análise, substituições conservativas alternativas são definidas aqui como permutas dentro de um dos cinco grupos seguintes.

TABELA B

1. Resíduos alifáticos, não polares ou ligeiramente polares pequenos: Ala, Ser, Thr (Pro, Gly);
2. Resíduos polares com carga negativa e suas amidas: Asp, Asn, Glu, Gln;
3. Resíduos polares com carga positiva: His, Arg, Lys;
4. Resíduos não polares alifáticos grandes: Met, Leu, Ile, Val (Cys), e
5. Resíduos aromáticos grandes: Phe, Tyr, Trp.

Os três resíduos de aminoácidos entre parênteses acima desempenham papéis especiais na arquitetura das proteínas. Gly é o único resíduo sem qualquer cadeia lateral e, assim, confere flexibilidade à cadeia. No entanto, isto tende a promover a formação de uma estrutura secundária diferente de uma hélice α . Pro, devido à sua geometria invulgar, restringe fortemente a cadeia e tende geralmente a promover estruturas do tipo volta β , apesar de, nalguns casos, Cys poder ser capaz de participar na formação de ligações dissulfureto, que é importante para o dobramento das proteínas.

De notar que Schulz *et al.*, *supra*, reúnem os Grupos 1 e 2 acima. De notar também que Tyr, devido ao seu potencial de formação de ligações de hidrogénio, tem uma afinidade importante com Ser, e Thr, etc.

Substituições de aminoácidos conservativas de acordo com a presente invenção, por exemplo, como apresentado acima, são conhecidas na área e é de esperar que mantenham as propriedades biológicas e estruturais do polipéptido após a substituição de aminoácidos. A maior parte das deleções e substituições de acordo com a presente invenção são aquelas que não produzem alterações radicais nas características da molécula proteica ou polipeptídica. "Características" é definido de um modo não inclusivo, para definir alterações na estrutura secundária, por exemplo, hélice α ou folha β , e alterações na actividade biológica, por exemplo, inibição pela GILR da apoptose mediada por CD3/TCR, Fas e outros mediadores.

Exemplos da produção de substituições de aminoácidos em proteínas que podem ser utilizadas para obter análogos das proteínas GILR para utilização na presente invenção incluem quaisquer passos de métodos conhecidos, como apresentado nas patentes U.S. RE 33 653, 4 959 314, 4 588 585 e 4 737 462, atribuídas a Mark *et al.*; 5 116 943, atribuída a Koths *et al.*; 4 965 195, atribuída a Namen *et al.*; 4 879 111, atribuída a Chong *et al.*, e 5 017 691, atribuída a Lee *et al.*, e proteínas substituídas com lisina apresentadas na patente U.S. N° 4 904 584 (Shaw *et al.*).

Para além de substituições conservativas discutidas acima, que não alteram significativamente a actividade da proteína GILR, pretende-se que pertençam ao âmbito da invenção substituições conservativas ou alterações menos conservativas e mais aleatórias conducentes a um aumento da actividade biológica dos análogos de proteínas GILR.

Quando se desejar confirmar o efeito exacto da substituição ou deleção, o experimentado na área apreciará que os efeitos da(s) substituição(substituições), deleção(deleções), etc., serão avaliados por ensaios de

ligação e morte celular de rotina. O rastreio utilizando esses testes comuns não envolve experimentação desnecessária.

Análogos de GILR aceitáveis são aqueles que retêm pelo menos a capacidade de inibir a apoptose induzida por CD3/TCR e/ou Fas, ou, alternativamente, aqueles análogos que não têm essa actividade inibidora e que, ao invés, são antagonistas competidores de moléculas GILR normais. Esses antagonistas são úteis em situações em que se deseja intensificar a apoptose.

Desse modo podem produzir-se análogos com um denominado efeito negativo dominante, nomeadamente um análogo deficiente na inibição da apoptose induzida por CD3/TCR ou expressão de Fas/Fas-L. Além disso, podem produzir-se análogos com um denominado efeito positivo dominante, que têm uma capacidade de GILR superior ao normal para inibir a apoptose induzida por CD3/TCR ou Fas/Fas-L, em que estes são particularmente úteis quando se desejar intensificar a sobrevivência celular em certos casos, como mencionado acima.

Ao nível genético, estes análogos são geralmente preparados por mutagénese dirigida a sítios de nucleótidos no DNA que codifica a proteína GILR, desse modo produzindo DNA que codifica o análogo, e, em seguida, sintetizando o DNA e expressando o polipéptido em cultura de células recombinantes. Os análogos exibem tipicamente uma actividade biológica qualitativa igual ou acrescida relativamente à proteína de ocorrência natural. Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publications e Wiley Interscience, Nova Iorque, NI, 1987-1995; Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NI, 1989.

Pode preparar-se uma proteína GILR de acordo com o exposto aqui, ou uma sequência de nucleótidos alternativa que codifica o mesmo polipéptido mas que difere da sequência natural devido a alterações permitidas pela degenerescência conhecida do código genético, por mutagenese específica para sítios de DNA que codifica um análogo anteriormente preparado ou uma versão nativa de uma proteína GILR. A mutagenese específica para sítios permite produzir análogos utilizando sequências oligonucleotídicas específicas que codificam a sequência de DNA da mutação desejada, bem como um número suficiente de nucleótidos adjacentes para proporcionar uma sequência de "primer" de dimensão e complexidade da sequência suficientes para formar uma hélice dupla estável de ambos os lados da junção de deleção a ser atravessada. Tipicamente é preferido um "primer" com cerca de 20 até 25 nucleótidos de comprimento, com cerca de 5 até 10 nucleótidos de complementação de cada lado da sequência a ser alterada. Em geral, a técnica de mutagenese específica para sítios é bem conhecida na área, como exemplificado por publicações tais como Adelman *et al.*, *DNA* 2: 183 (1983), cuja divulgação é aqui incorporada por referência.

Como será apreciado, a técnica de mutagenese específica para sítios emprega tipicamente um vector fágico que existe nas formas de filamentação simples e filamentação dupla. Vectores típicos úteis em mutagenese dirigida a sítios incluem vectores tais como o fago MI3, por exemplo, como revelado por Messing *et al.*, *Third Cleveland Symposium on Macromolecules and Recombinant DNA*, Editor A. Walton, Elsevier, Amsterdão (1981), cuja divulgação é aqui incorporada por referência. Estes fagos estão facilmente disponíveis comercialmente e a sua utilização é geralmente bem conhecida dos experimentados na

área. Alternativamente, podem empregar-se vetores plasmídicos que contêm uma origem da replicação de um fago de filamentação simples (Veira *et al.*, *Meth. Enzymol.* 153: 3, 1987) para obter DNA de filamentação simples.

Em geral, a mutagênese dirigida a sítios de acordo com a presente é realizada obtendo-se primeiramente um vector de filamentação simples que inclui, na sua sequência, uma sequência de DNA que codifica o polipéptido relevante. Um "primer" oligonucleotídico com a sequência mutada desejada é preparado sinteticamente por síntese automatizada de DNA/oligonucleótido. Em seguida, este "primer" é hibridizado com o vector que contém a sequência proteica de filamentação simples e é sujeito a enzimas de polimerização de DNA, como o fragmento de Klenow de polimerase I de *E. coli*, para completar a síntese do filamento que contém a mutação. Assim, uma sequência mutada e o segundo filamento contém a mutação desejada. Este vector heteroduplex é então utilizado para transformar células apropriadas, tais como células JM101 de *E. coli*, e seleccionam-se clones que incluem vetores recombinantes contendo o arranjo da sequência mutada.

Depois de seleccionado um desses clones, a sequência da proteína GILR mutada pode ser removida e colocada num vector apropriado, em geral um vector de transferência ou expressão do tipo que pode ser empregue para a transfecção de um hospedeiro apropriado.

Em conformidade, o gene ou ácido nucleico que codifica para uma proteína GILR também pode ser detectado, obtido e/ou modificado, *in vitro*, *in situ* e/ou *in vivo*, utilizando técnicas conhecidas de amplificação de DNA ou RNA, como PCR e síntese oligonucleotídica química. A PCR permite amplificar (aumentar o número) sequências de DNA específicas por reacções de DNA polimerase repetidas. Esta

reação pode ser utilizada como substituto da clonagem; tudo o que é necessário é um conhecimento da sequência do ácido nucleico.

Para realizar PCR concebem-se "primers" que são complementares à sequência de interesse. Em seguida, os "primers" são gerados por síntese de DNA automatizada.

Uma vez que se podem conceber "primers" para hibridizarem para qualquer parte do gene, podem criar-se condições para que possam ser tolerados emparelhamentos defeituosos no emparelhamento de bases complementares.

A amplificação destas regiões com emparelhamentos defeituosos pode conduzir à síntese de um produto mutagenizado que gera um péptido com propriedades novas (isto é, mutagénese dirigida a sítios). Ver também, por exemplo, Ausubel, *supra*, Capítulo 16. Acoplado à síntese de DNA complementar (cDNA), utilizando transcriptase reversa, com PCR, também pode utilizar-se RNA como material de partida para a síntese do domínio extracelular de um receptor da prolactina sem clonagem.

Além disso, podem conceber-se "primers" de PCR de modo a incorporarem novos sítios de restrição ou outras características, tais como codões de terminação nas extremidades do segmento genético a ser amplificado. Esta colocação de sítios de restrição nas extremidades 5' e 3' da sequência genética amplificada permite conceber especificamente segmentos genéticos que codificam a proteína GILR, ou respectivo fragmento, para a ligação de outras sequências e/ou sítios de clonagem em vectores.

O método de PCR e outros métodos de amplificação de RNA e/ou DNA são bem conhecidos na área e podem ser utilizados de acordo com a presente invenção sem experimentação desnecessária, com base nos ensinamentos e directrizes aqui apresentados. Métodos conhecidos de

amplificação de DNA ou RNA incluem, mas não se limitam a reacção em cadeia de polimerase (PCR) e processos de amplificação relacionados (ver, por exemplo, patentes U.S. N°s 4 683 195, 4 683 202, 4 800 159, 4 965 188, atribuídas a Mullis *et al.*; 4 795 699 e 4 921 794, atribuídas a Tabor *et al.*; 5 142 033, atribuída a Innis; 5 122 464, atribuída a Wilson *et al.*; 5 091 310, atribuída a Innis; 5 066 584, atribuída a Gyllensten *et al.*; 4 889 818, atribuída a Gelfand *et al.*; 4 994 370, atribuída a Silver *et al.*; 4 766 067, atribuída a Biswas; 4 656 134, atribuída a Ringold, e Innis *et al.*, editores, "PCR Protocols: A Guide to Method and Applications") e amplificação mediada por RNA que emprega RNA anti-sentido para a sequência-alvo como modelo para a síntese de DNA de filamentação dupla (patente U.S. N° 5 130 238, atribuída a Malek *et al.*, com a marca registada NASBA), e PCR imunológica que combina a utilização de amplificação de DNA com etiquetagem de anticorpos (Ruzicka *et al.*, *Science* 260: 487 (1993); Sano *et al.*, *Science* 258: 120 (1992); Sano *et al.*, *Biotechniques* 9: 1378 (1991)).

De um modo análogo, podem preparar-se fragmentos biologicamente activos de proteínas GILR (por exemplo, os de qualquer uma das GILR ou suas isoformas) como referido acima relativamente aos análogos de proteínas GILR. Fragmentos adequados de proteínas GILR são aqueles que retêm a actividade da GILR, como mencionado acima. Em conformidade, podem preparar-se fragmentos de proteínas GILR com um efeito negativo dominante ou positivo dominante, como mencionado acima relativamente aos análogos. Deve notar-se que estes fragmentos representam uma classe especial dos análogos da invenção; nomeadamente, são porções definidas de proteínas GILR derivadas da sequência da proteína GILR completa (por exemplo, de

qualquer uma das GILR ou suas isoformas), em que cada uma dessas porções ou fragmentos tem qualquer uma das actividades desejadas acima referidas. Esse fragmento pode ser, por exemplo, um péptido.

De modo semelhante, podem preparar-se derivados por modificações comuns dos grupos laterais de um ou mais resíduos de aminoácidos da proteína GILR, seus análogos ou fragmentos, ou por conjugação da proteína GILR, seus análogos ou fragmentos, a outra molécula, por exemplo, um anticorpo, enzima, receptor, etc., como é bem conhecido na área. Em conformidade, o termo "derivados", tal como é aqui utilizado, abrange derivados que podem ser preparados a partir dos grupos funcionais que ocorrem como cadeias laterais nos resíduos ou nos grupos N- ou C-terminais, por meios conhecidos na área, e estão incluídos na invenção. Derivados podem ter fracções químicas, como resíduos hidrato de carbono ou fosfato, desde que essa fracção tenha uma actividade biológica igual ou mais elevada do que as proteínas GILR.

Por exemplo, derivados podem incluir ésteres alifáticos dos grupos carboxilo, amidas dos grupos carboxilo por reacção com amoníaco ou com aminas primárias ou secundárias, derivados N-acilo de grupos amino livres dos resíduos de aminoácidos formados com fracções acilo (por exemplo, grupos alcanoílo ou arilo carbocíclico) ou derivados O-acilo de grupos hidroxilo livres (por exemplo, dos resíduos serilo ou treonilo) formados com fracções acilo.

Pretende-se que o termo "derivados" inclua apenas aqueles derivados que não alteram um aminoácido em outro dos vinte aminoácidos habitualmente de ocorrência natural.

GILR é uma proteína ou polipéptido, isto é, uma sequência de resíduos de aminoácidos. Pretende-se que

esteja incluído no âmbito desses polipéptidos um polipéptido que consiste numa sequência maior que inclui a sequência completa de uma proteína GILR, de acordo com as definições aqui apresentadas, desde que as adições não afectem as características básicas e novas da invenção, isto é, desde que retenham ou aumentem a actividade biológica da proteína GILR ou possam ser clivados dando origem a uma proteína ou polipéptido com a actividade biológica da proteína GILR. Assim, por exemplo, pretende-se que a presente invenção inclua proteínas de fusão da proteína GILR com outros aminoácidos ou péptidos.

A nova proteína GILR, seus análogos, respectivos fragmentos e derivados, têm algumas utilizações possíveis, por exemplo, as seguintes:

(i) A proteína GILR, suas isoformas, análogos, fragmentos e derivados podem ser utilizados para intensificar/aumentar a inibição da apoptose mediada ou induzida por CD3/TCR, Fas/Fas-L ou quaisquer outros mediadores relacionados com a apoptose mencionados acima. Essa inibição da apoptose é particularmente desejável em casos tais como, por exemplo, danos em tecidos em choque séptico, rejeição enxerto-versus-hospedeiro, hepatite aguda e várias doenças autoimunes e inflamatórias, nos quais se deseja bloquear a morte celular apoptótica mediada por Fas/Fas-L, CD3/TCR ou quaisquer outros mediadores. Assim, considerando as propriedades biológicas da família de zíperes de leucina à qual pertence a GILR e o conhecimento funcional da própria GILR, a GILR, suas isoformas, análogos, fragmentos ou derivados podem ser utilizados para estimular a actividade de linfócitos e intensificar o resgate de células da morte celular por apoptose.

Isto pode ser conseguido, por exemplo, introduzindo nas células GILR ou qualquer uma das suas isoformas,

análogos, fragmentos ou derivados adequados por procedimentos comuns conhecidos *per se*. Da mesma forma, é possível construir uma proteína de fusão adequada (em que esta é um desses derivados da GILR), compreendendo a sequência zíper de leucina e/ou rica em prolina da GILR, e introduzindo esta proteína de fusão nas células por procedimentos comuns, em cujas células a proteína de fusão exercerá os seus efeitos, por exemplo, por interacção com outras proteínas intracelulares, conduzindo a inibição intensificada da apoptose.

Há alguns modos possíveis para introduzir em células a proteína GILR, isoformas, análogos, fragmentos e derivados (incluindo a proteína de fusão acima). Por exemplo, é preferível introduzir essa GILR especificamente em células, tais como linfócitos T, nas quais os sistemas CD3/TCR e/ou Fas/Fas-L são expressos e estão activos na indução da apoptose. Um modo de consegui-lo consiste em preparar um vírus animal recombinante, por exemplo, derivado de Vacínia, em cujo DNA viral serão introduzidos pelo menos os dois genes seguintes: (i) o gene que codifica um ligando que se liga a proteínas da superfície celular especificamente expressas pelas células, por exemplo, os que estão presentes na superfície de linfócitos T, de modo que o vector de vírus recombinante seja capaz de se ligar a esses linfócitos T, e (ii) o gene GILR que codifica a proteína GILR. Assim, a expressão da proteína de ligação à superfície celular (ligando) na superfície do vírus irá dirigir o vírus especificamente para os linfócitos T, após o que a sequência codificadora de GILR será introduzida nas células via o vírus e, depois de expressa, irá inibir a apoptose nestas células. De um modo análogo, plasmídeos encapsulados, conhecidos na área, também podem ser utilizados para dirigir especificamente plasmídeos/vectores

codificadores de GILR para as células nas quais a cápsula permite especificidade do direccionamento e o DNA plasmídico contém a sequência codificadora da GILR a ser expressa nas células. A construção desses vírus animais recombinantes ou plasmídeos encapsulados é feita por procedimentos comuns (ver, por exemplo, Sambrook et al., 1989).

Outra possibilidade de introduzir em células sequências de DNA codificadoras de GILR, incluindo suas isoformas, análogos, fragmentos e derivados (incluindo as proteínas de fusão acima referidas) toma a forma de oligonucleótidos que podem ser absorvidos pelas células e expressos aí. Esse método é preferível quando as células a serem tratadas, por exemplo, linfócitos T, são tratadas *in vitro* com o objecto de reintroduzir essas células tratadas (resgatadas) novamente no paciente. Da mesma forma, também é possível preparar, por exemplo, uma proteína GILR solúvel e introduzi-la em células T *in vitro*, ou introduzir os vectores virais ou plasmídeos encapsulados acima mencionados que codificam a GILR em células T *in vitro*, para dar origem a níveis acrescidos de GILR ou expressão de GILR nestas células, e depois reintroduzi-las no paciente.

De modo semelhante, por exemplo, linfócitos T podem ser tratados *in vitro* com um péptido que imita a actividade da GILR (por exemplo, inibição da apoptose) nos casos em que é desejado inibir a apoptose, por exemplo, em doenças inflamatórias e autoimunes, ou hepatite aguda ou afins.

Também deve notar-se que proteínas da família de zíperes de leucina, à qual pertence a GILR, também parecem ter a capacidade para estimular a actividade de linfócitos (para além da capacidade da GILR para inibir a apoptose). Assim, em certas situações nas quais é mais importante a activação de linfócitos do que a inibição da apoptose, a

GILR também pode ser utilizada para estimular linfócitos. Por exemplo, verificou-se que, em certas doenças neoplásticas (cancros) e de imunodeficiência (incluindo SIDA), os pacientes têm linfócitos T que não respondem ou que respondem em níveis baixos, como em vários linfócitos T que se infiltram em tumores. Assim, não obstante ser desejado matar as células tumorais ou infectadas com o HIV induzindo apoptose acrescida nestas células (por exemplo, inibindo realmente a GILR especificamente nestas células doentes), não é todavia menos desejável (se não for mais desejável) estimular especificamente a activação de linfócitos T nestes pacientes, cujos linfócitos T, quando activados, poderão ser mais eficazes no combate às células tumorais ou a ultrapassar a imunodeficiência causada pela infecção com o HIV. Assim, nessas situações, seria desejável aumentar a quantidade de GILR ou de expressão de GILR nesses linfócitos T *in vivo* ou *in vitro*, o que pode ser conseguido por qualquer uma das vias mencionadas acima. As células T tratadas *in vitro* serão então novamente transferidas para o paciente.

Este modo de combater células doentes por estimulação de linfócitos foi utilizado noutros sistemas nos quais era crucial proporcionar co-estimulação de células T. Esta abordagem de utilização da GILR, suas isoformas, análogos, fragmentos e derivados para tratar células, para estimular a activação de células T e também, ao mesmo tempo, para permitir que estas células resistam à apoptose (devido a níveis elevados de GILR nas células tratadas) é particularmente útil, por exemplo, em melanomas, nos quais as células tumorais matam linfócitos T citotóxicos através da interacção com o sistema Fas/Fas-L.

O tratamento directo de células, diferentes de linfócitos T, com a GILR, suas isoformas, análogos,

fragmentos ou derivados por métodos *in vitro*, dos vários modos possíveis como referido acima, também é importante em várias outras doenças. Por exemplo, em hepatite aguda, células do fígado morrem via apoptose mediada pela expressão do sistema Fas/Fas-L, cuja expressão do sistema Fas/Fas-L parece induzir e manter a doença (ver Galle *et al.*, 1995). O aumento dos níveis de GILR ou da expressão de GILR especificamente nestas células do fígado doentes deverá proporcionar um modo eficaz de tratar esta doença.

(ii) Inversamente, em muitos casos poderá ser desejável inibir a estimulação de células imunológicas e aumentar a morte celular apoptótica mediada pelo Fas/Fas-L, CD3/TCR ou outros mediadores. Por exemplo, em várias aplicações antitumorais, anti-HIV, anti-inflamatórias, as células doentes podem ser especificamente mortas aumentando os níveis de apoptose induzida, por exemplo, expressão acrescida do sistema Fas/Fas-L. Em consequência, nesses casos será desejável inibir especificamente a expressão ou níveis de GILR nestas células e, deste modo, reduzir a inibição da expressão do sistema Fas/Fas-L para dar origem, por fim, a níveis mais elevados da expressão do sistema Fas/Fas-L e níveis mais elevados de morte celular via apoptose.

Para inibir a expressão ou actividade de GILR nessas células há alguns modos possíveis. É possível introduzir nas células, por procedimentos comuns, oligonucleótidos com a sequência codificadora anti-sentido para a proteína GILR, o que bloquearia eficazmente a tradução de mRNAs que codificam GILR, desse modo bloqueando a expressão de GILR e conduzindo a níveis aumentados de expressão do sistema Fas/Fas-L e apoptose.

Esses oligonucleótidos podem ser introduzidos nas células utilizando a abordagem de vírus recombinante acima,

em que a segunda sequência transportada pelo vírus é a sequência oligonucleotídica.

Outra possibilidade é utilizar anticorpos específicos para a proteína GILR, para inibir a sua actividade intracelular.

Ainda outro modo de inibir a actividade da GILR é a abordagem de ribozimas recentemente desenvolvida. As ribozimas são moléculas de RNA catalíticas que procedem especificamente à clivagem de RNAs. As ribozimas podem ser manipuladas para proceder à clivagem de RNAs-alvo de escolha, por exemplo, os mRNAs que codificam a proteína GILR da invenção. Essas ribozimas terão uma sequência específica para o mRNA da proteína GILR e serão capazes de interagir com aquele (ligação complementar), seguindo-se a clivagem do mRNA, o que resulta num decréscimo (ou perda completa) da expressão da proteína GILR, em que o nível de expressão decrescida depende do nível da expressão da ribozima na célula-alvo. Para introduzir ribozimas nas células de escolha pode utilizar-se qualquer vector adequado, por exemplo, vectores plasmídicos, de vírus animal (retrovírus), que são habitualmente utilizados para esta finalidade (ver também (i) acima, em que o vírus tem, como segunda sequência, um cDNA que codifica a sequência da ribozima de escolha). (Quanto a artigos de revisão, métodos, etc., respeitantes a ribozimas ver Chen *et al.*, 1992; Zhao e Pick, 1993; Shore *et al.*, 1993; Joseph e Burke, 1993; Shimayama *et al.*, 1993; Cantor *et al.*, 1993; Barinaga, 1993; Crisell *et al.*, 1993, e Koizumi *et al.*, 1993).

Além disso, para inibir a expressão da GILR também é possível introduzir em células, pelos vários modos mencionados acima, uma proteína GILR mutada ou sequência de DNA que codifica uma GILR mutada, em que a referida GILR

mutada competirá com a GILR normal nestas células e inibirá eficazmente a actividade da GILR normal.

Da mesma forma, também é possível inibir a actividade da GILR em células tratando essas células com um péptido que se liga ao domínio zíper de leucina da GILR, desse modo inibindo a actividade da GILR. Esse péptido pode ser preparado por meios comuns e ser introduzido nas células por procedimentos comuns.

(iii) A proteína GILR, seus análogos, fragmentos ou derivados também podem ser utilizados para isolar, identificar e clonar outras proteínas da mesma classe, isto é, as pertencentes à família de zíperes de leucina ou aquelas que se ligam à GILR e que estão envolvidas nos processos de sinalização intracelular, por exemplo, inibição da apoptose. Nesta aplicação pode utilizar-se a técnica de sonda de subtracção referida acima (e pormenorizada abaixo no Exemplo 1), ou pode utilizar-se um sistema recentemente desenvolvido que emprega hibridização "Southern" não restrita seguida de clonagem por PCR (Wilks *et al.*, 1989). Na publicação de Wilks *et al.* é descrita a identificação e clonagem de duas proteínas tirosina-quinases putativas aplicando hibridização "Southern" não restrita seguida de clonagem por PCR com base na sequência conhecida do motivo de quinase, uma sequência de quinase concebida. Esta abordagem pode ser utilizada, de acordo com a presente invenção, empregando a sequência da proteína GILR para identificar e clonar as sequências de proteínas relacionadas, incluindo proteínas de ligação à GILR. Da mesma forma, pode empregar-se o agora comum e bem conhecido sistema de dois híbridos de levedura para isolar e clonar especificamente aquelas proteínas capazes de se ligarem especificamente à GILR.

(iv) Ainda outra abordagem para utilizar a proteína GILR, ou seus análogos, respectivos fragmentos ou derivados da invenção consiste em utilizá-los em métodos de cromatografia de afinidade para isolar e identificar outras proteínas ou factores aos quais são capazes de se ligar, por exemplo, outras proteínas ou factores envolvidos no processo de sinalização intracelular. Nesta aplicação, a proteína GILR, seus análogos, respectivos fragmentos ou derivados da presente invenção podem ser individualmente ligados a matrizes de cromatografia de afinidade e depois contactados com extractos celulares ou proteínas ou factores isolados que se suspeita estarem envolvidos no processo de sinalização intracelular. Após o procedimento de cromatografia de afinidade, as outras proteínas ou factores que se ligam à proteína GILR, ou seus análogos, respectivos fragmentos ou derivados da invenção podem ser eluídos, isolados e caracterizados.

(v) Como mencionado acima, a proteína GILR, ou seus análogos, respectivos fragmentos ou derivados da invenção também podem ser utilizados como imunogenes (antigenes) para produzir anticorpos específicos para aqueles. Estes anticorpos também podem ser utilizados para a purificação da proteína GILR (por exemplo, GILR ou qualquer uma das suas isoformas) de extractos celulares ou de linhas de células transformadas produtoras da proteína GILR, ou seus análogos ou fragmentos. Além disso, estes anticorpos podem ser utilizados em diagnóstico, para identificar perturbações relacionadas com o funcionamento anormal da proteína GILR.

Também deve notar-se que o isolamento, identificação e caracterização da proteína GILR da invenção podem ser efectuados utilizando qualquer um dos bem conhecidos procedimentos comuns de rastreio. Por exemplo, um destes

procedimentos de rastreio, a técnica de sonda de subtracção, foi utilizado como é aqui apresentado abaixo. Também pode utilizar-se o sistema de dois híbridos de levedura (ver, por exemplo, Boldin *et al.*, 1995a, b, e referências aí citadas). Da mesma forma, como referido acima e abaixo, podem empregar-se outros procedimentos, como cromatografia de afinidade, procedimentos de hibridização de DNA, etc., bem conhecidos na área, para isolar, identificar e caracterizar a proteína GILR da invenção ou para isolar, identificar e caracterizar proteínas, factores, receptores adicionais, etc., que são capazes de se ligar às proteínas GILR da invenção.

Tal como foi aqui apresentado acima, a proteína GILR pode ser utilizada para gerar anticorpos específicos para proteínas GILR, por exemplo, GILR e suas isoformas. Estes anticorpos ou respectivos fragmentos podem ser utilizados como é aqui apresentado abaixo em pormenor, devendo entender-se que, nestas aplicações, os anticorpos ou respectivos fragmentos são específicos para proteínas GILR.

Com base nas descobertas de acordo com a presente invenção, segundo as quais a GILR é um modulador (inibidor) da expressão do Fas/Fas-L e do sistema CD3/TCR e, assim, pode mediar/modular vias da morte celular (apoptose), é importante conceber fármacos que possam intensificar ou inibir a actividade da GILR, consoante o desejado. Há muitas doenças onde esses fármacos podem ser uma grande ajuda. Entre outras, hepatite aguda, na qual os danos agudos no fígado parecem reflectir a morte das células do fígado mediada por Fas/Fas-L; morte celular induzida por doença autoimune, como a morte das células β de Langerhans do pâncreas, que resulta em diabetes; morte de células em rejeição de enxertos (por exemplo, rim, coração e fígado); morte de oligodendrócitos no cérebro em esclerose múltipla,

e suicídio de células T inibidas por SIDA, que causa a proliferação do vírus da SIDA e, assim, a doença da SIDA. Nesses casos é desejado intensificar a actividade da GILR, como referido acima, e deste modo bloquear a actividade do Fas/Fas-L e reduzir a morte celular. No entanto, noutros casos, como mencionado acima, é desejável bloquear a actividade da GILR para, por fim, aumentar a morte celular.

Relativamente a esses inibidores, é possível que uma ou mais das possíveis isoformas da GILR possam servir de inibidores "naturais" da actividade da GILR e, conseqüentemente, estas podem ser empregues como os acima referidos inibidores específicos da GILR. Da mesma forma, proteínas GILR mutantes e outras substâncias, como péptidos, compostos orgânicos, anticorpos, etc., também podem ser rastreados para se obterem fármacos específicos que sejam capazes de inibir a actividade da GILR, por exemplo, péptidos capazes de se ligar ao domínio zíper de leucina da GILR.

Um exemplo não limitativo da concepção e rastreio de inibidores peptídicos da GILR baseia-se em estudos prévios de inibidores peptídicos da ICE ou proteases do tipo ICE, a especificidade da ICE para o substrato e estratégias de análise de epítomos utilizando síntese de péptidos. Verificou-se que o requisito mínimo para uma clivagem eficiente do péptido pela ICE envolve quatro aminoácidos à esquerda do sítio de clivagem, com uma forte preferência para o ácido aspártico na posição P_1 e sendo suficiente metilamina à direita da posição P_1 (Sleath *et al.*, 1990; Howard *et al.*, 1991; Thornberry *et al.*, 1992). Adicionalmente, o péptido substrato fluorogénico (um tetrapéptido), acetil-Asp-Glu-Val-Asp-a-(4-metilcumaril-7-amida), abreviado Ac-DEVD-AMC, corresponde a uma sequência na poli(ADP-ribose) polimerase (PARP) que se verificou ser

clivada em células logo após estimulação com Fas, bem como outros processos apoptóticos (Kaufmann, 1989; Kaufmann *et al.*, 1993; Lazebnik *et al.*, 1994), e é eficazmente clivado pelas proteases CPP32 (um membro da família de proteases CED3/ICE) e MACH.

Uma vez que o resíduo Asp na posição P₁ do substrato parece ser importante, tetrapéptidos com Asp como quarto resíduo de aminoácido e várias combinações de aminoácidos nas primeiras três posições de resíduos podem ser rapidamente rastreados quanto à ligação ao sítio activo das proteases utilizando, por exemplo, o método desenvolvido por Geysen (Geysen, 1985; Geysen *et al.*, 1987), onde um grande número de péptidos em suportes sólidos foi rastreado quanto a interacções específicas com anticorpos. Pode detectar-se a ligação da GILR a péptidos específicos por uma variedade de métodos de detecção bem conhecidos dos experimentados na área, como etiquetagem radioactiva da GILR, etc. Verificou-se que este método de Geysen é capaz de testar pelo menos 4000 péptidos por dia.

De modo semelhante, a região de ligação exacta ou região de homologia que determina o sítio activo da GILR ou o seu domínio zíper de leucina pode ser esclarecida e depois podem rastrear-se péptidos que possam servir para bloquear o sítio activo ou domínio, por exemplo, péptidos sintetizados com uma sequência semelhante à do sítio activo ou região do domínio zíper, ou complementares a estes, que podem competir com a GILR natural.

Uma vez que poderá ser vantajoso conceber inibidores peptídicos que inibam selectivamente interacções da GILR sem interferirem noutros processos celulares fisiológicos, a reunião de péptidos que se ligam à GILR num ensaio como o descrito acima também pode ser sintetizada na forma de um péptido substrato fluorogénico para testar a ligação

selectiva a outras proteínas com a finalidade de seleccionar apenas os específicos para a GILR. Em seguida, péptidos que se determinou serem específicos para a GILR podem ser modificados para intensificar a permeabilidade celular e intensificar a apoptose por inibição da GILR reversível ou irreversivelmente. Thornberry *et al.* (1994) relataram que um tetrapéptido(aciloxi)metilcetona Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-CH₂OC (O)-[2,6-(CF₃)₂]Ph era um inactivador potente da ICE. De modo semelhante, Miligan *et al.* (1995) relataram que inibidores tetrapeptídicos com um grupo clorometilcetona (irreversivelmente) ou aldeído (reversivelmente) inibiram a ICE. Adicionalmente, foi mostrado que um benziloxicarboxil-Asp-CH₂OC (O)-2,6-diclorobenzeno (DCB) inibiu a ICE (Mashima *et al.*, 1995). Em conformidade, de um modo análogo, tetrapéptidos que se ligam selectivamente à GILR podem ser modificados, por exemplo, com um grupo aldeído, clorometilcetona, (aciloxi)metilcetona ou um grupo CH₂OC (O)-DCB para criar um inibidor peptídico da actividade da GILR.

Além disso, para melhorar a permeabilidade, os péptidos podem, por exemplo, ser quimicamente modificados ou derivatizados para aumentar a sua permeabilidade através da membrana celular e facilitar o transporte desses péptidos através da membrana e para o citoplasma.

Muranishi *et al.* (1991) relataram a derivatização da hormona libertadora de tirotropina com ácido láurico para formar um derivado lauroílo lipófilo com boas características de penetração através de membranas celulares. Zacharia *et al.* (1991) também relataram a oxidação de metionina em sulfóxido e a substituição da ligação peptídica pelo seu isoéster cetometileno (COCH₂), para facilitar o transporte de péptidos através da membrana celular. Estas são apenas algumas das modificações e

derivados conhecidos que pertencem ao âmbito dos praticantes da área.

Suplementarmente, inibidores na forma de fármacos ou peptídicos capazes de inibir a actividade da GILR e intensificar a morte celular via apoptose podem ser conjugados ou complexados com moléculas que facilitam a entrada na célula.

A Patente U.S. 5 149 782 revela a conjugação de uma molécula, a ser transportada através da membrana celular, a um agente de combinação membranar, como polipéptidos fusogénicos, polipéptidos formadores de canais iónicos, outros polipéptidos membranares e ácidos gordos de cadeia longa, por exemplo, ácido mirístico, ácido palmítico. Estes agentes de combinação membranar inserem os conjugados moleculares na bicamada lipídica de membranas celulares e facilitam a sua entrada no citoplasma.

Low *et al.*, Patente U.S. 5 108 921, revêem métodos disponíveis para a distribuição transmembranar de moléculas, tais como, mas não se limitando a estas, proteínas e ácidos nucleicos, pelo mecanismo de actividade endocítica mediada por receptores. Estes sistemas de receptores incluem aqueles que reconhecem a galactose, manose, manose-6-fosfato, transferrina, asialo-glicoproteína, transcobalamina (vitamina B₁₂), α -2 macroglobulinas, insulina e outros factores de crescimento peptídicos, como factor de crescimento epidérmico (EGF). Low *et al.* ensinam que receptores de nutrientes, como receptores para biotina e folato, podem ser vantajosamente utilizados para intensificar o transporte através da membrana celular devido à localização e multiplicidade de receptores de biotina e folato nas superfícies membranares da maior parte das células, e processos associados de transporte transmembranar mediado por receptores. Assim, um

complexo formado entre um composto a ser distribuído no citoplasma e um ligando, como biotina ou folato, é contactado com uma membrana celular contendo receptores de biotina ou folato para iniciar o mecanismo de transporte transmembranar mediado por receptores e, desse modo, permitir a entrada do composto desejado na célula.

Sabe-se que a ICE tem capacidade para tolerar substituições liberais na posição P₂, e esta tolerância quanto a substituições liberais foi explorada para desenvolver uma etiqueta de afinidade potente e altamente selectiva contendo uma cauda de biotina (Thornberry *et al.*, 1994). Consequentemente, a posição P₂ e, possivelmente, o terminal N do inibidor tetrapeptídico podem ser modificados ou derivatizados, tal como com a adição de uma molécula de biotina, para aumentar a permeabilidade destes inibidores peptídicos através da membrana celular.

Adicionalmente, é conhecido na área que a fusão de uma sequência peptídica desejada a uma sequência peptídica líder/de sinal para criar um "péptido quimérico" permitirá que esse "péptido quimérico" seja transportado para o citoplasma através da membrana celular.

Como será apreciado pelos experimentados na área dos péptidos, pretende-se que os inibidores peptídicos da interacção da GILR de acordo com a presente invenção incluam fármacos ou inibidores péptido-miméticos, que também podem ser rapidamente rastreados quanto à ligação à GILR para conceber inibidores talvez mais estáveis.

Também será apreciado que os mesmos meios para facilitar ou intensificar o transporte de inibidores peptídicos através de membranas celulares, como discutido acima, também são aplicáveis à GILR ou suas isoformas, bem como a outros péptidos e proteínas derivados daquelas, como

referido acima, que exercem os seus efeitos intracelularmente.

No que se refere aos anticorpos mencionados aqui, pretende-se que o termo "anticorpo" inclua anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais (mAbs), anticorpos quiméricos, anticorpos anti-idiotípicos (anti-Id) para anticorpos que podem ser etiquetados em forma solúvel ou ligada, bem como respectivos fragmentos, produzidos por qualquer técnica conhecida, tal como, mas não se limitando a clivagem enzimática, síntese de péptidos ou técnicas recombinantes.

Os anticorpos policlonais são populações heterogéneas de moléculas de anticorpos derivadas do soro de animais imunizados com um antigene. Um anticorpo monoclonal contém uma população substancialmente homogénea de anticorpos específicos para antígenos, cuja população contém sítios de ligação de epítomos substancialmente semelhantes. Os mAbs podem ser obtidos por métodos conhecidos dos experimentados na área. Ver, por exemplo, Kohler e Milstein, *Nature* 256: 495-497 (1975); Patente U.S. Nº 4 376 110; Ausubel *et al.*, editores, Harlow e Lane "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory (1988), e Colligan *et al.*, editores, "Current Protocols in Immunology", Greene Publishing Assoc. e Wiley Interscience, N.I. (1992-1996), em que o conteúdo destas referências é aqui incorporado por referência na sua totalidade. Esses anticorpos podem pertencer a qualquer classe de imunoglobulinas, incluindo IgG, IgM, IgE, IgA, GILD e quaisquer subclasses destas. Um hibridoma que produza um mAb da presente invenção pode ser cultivado *in vitro*, *in situ* ou *in vivo*. A produção de títulos elevados de mAbs *in vivo* ou *in situ* torna-os nos métodos de produção presentemente preferidos.

Anticorpos quiméricos são moléculas em que diferentes porções são derivadas de diferentes espécies animais, tais como aqueles em que a região variável deriva de um mAb murino e uma região constante de imunoglobulina humana. Os anticorpos quiméricos são maioritariamente utilizados para reduzir a imunogenicidade por aplicação e para aumentar o rendimento da produção, por exemplo, em que mAbs murinos têm rendimentos mais elevados a partir de hibridomas mas maior imunogenicidade em humanos, de modo que se utilizam mAbs quiméricos humano/murino. Anticorpos quiméricos e métodos para a sua produção são conhecidos na área (Cabilly *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 3273-3277 (1984); Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 6851-6855 (1984); Boulianne *et al.*, *Nature* 312: 643-646 (1984); Cabilly *et al.*, Candidatura de Patente Europeia 125023 (publicada em 14 de Novembro de 1984); Neuberger *et al.*, *Nature* 314: 268-270 (1985); Taniguchi *et al.*, Candidatura de Patente Europeia 171496 (publicada em 19 de Fevereiro de 1985); Morrison *et al.*, Candidatura de Patente Europeia 173494 (publicada em 5 de Março de 1986); Neuberger *et al.*, Candidatura PCT WO 8601533 (publicada em 13 de Março de 1986); Kudo *et al.*, Candidatura de Patente Europeia 184187 (publicada em 11 de Junho de 1986); Sahagan *et al.*, *J. Immunol.* 137: 1066-1074 (1986); Robinson *et al.*, Candidatura de Patente Internacional N° WO 8702671 (publicada em 7 de Maio de 1987); Liu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 3439-3443 (1987); Sun *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 214-218 (1987); Better *et al.*, *Science* 240: 1041-1043 (1988), e Harlow e Lane "Antibodies: A Laboratory Manual", *supra*).

Um anticorpo anti-idiotípico (anti-Id) é um anticorpo que reconhece determinantes únicos geralmente associados ao sítio de ligação de antígenos de um anticorpo. Pode

preparar-se um anticorpo Id imunizando um animal da mesma espécie e tipo genético (por exemplo, estirpe de ratinho) como fonte do mAb para o qual se quer preparar um anti-Id. O animal imunizado reconhecerá e responderá aos determinantes idiotípicos do anticorpo imunizador produzindo um anticorpo para estes determinantes idiotípicos (o anticorpo anti-Id). Ver, por exemplo, Patente U.S. N° 4 699 880, que é aqui inteiramente incorporado por referência.

O anticorpo anti-Id também pode ser utilizado como "imunogene" para induzir uma resposta imunológica ainda noutro animal, produzindo um denominado anticorpo anti-anti-Id. O anti-anti-Id pode ser idêntico, no que se refere aos epítomos, ao mAb original que induziu o anti-Id.

Assim, ao utilizar anticorpos para os determinantes idiotípicos de um mAb é possível identificar outros clones que expressam anticorpos de especificidade idêntica.

Em conformidade, mAbs gerados contra as proteínas GILR, respectivos análogos, fragmentos ou derivados, da presente invenção podem ser utilizados para induzir anticorpos anti-Id em animais adequados, tais como ratinhos BALB/c. Utilizam-se células do baço desses ratinhos imunizados para produzir hibridomas anti-Id que segregam mAbs anti-Id. Suplementarmente, os mAbs anti-Id podem ser acoplados a um transportador, como hemocianina de lapa californiana (KLH), e utilizados para imunizar ratinhos BALB/c adicionais. O soro destes ratinhos conterà anticorpos anti-anti-Id que têm as propriedades de ligação do mAb original específico para um epítomo da proteína GILR acima, ou respectivos análogos, fragmentos e derivados.

Assim, os próprios epítomos idiotípicos, ou "idiotipos", dos mAbs anti-Id são estruturalmente semelhantes ao epítomo a ser avaliado, como proteína GRB-A.

Também se pretende que o termo "anticorpo" inclua moléculas intactas e respectivos fragmentos, tais como, por exemplo, Fab e $F(ab')_2$, capazes de se ligarem ao antigene. Os fragmentos Fab e $F(ab')_2$ não têm o fragmento Fc do anticorpo intacto, são eliminados mais rapidamente da circulação e podem exibir menos ligação inespecífica a tecidos do que um anticorpo intacto (Wahl *et al.*, *J. Nucl. Med.* 24: 316-325 (1983)).

Será apreciado que Fab e $F(ab')_2$ e outros fragmentos dos anticorpos úteis na presente invenção podem ser utilizados para a detecção e quantificação da proteína GILR de acordo com os métodos revelados aqui para moléculas de anticorpos intactas. Esses fragmentos são tipicamente produzidos por clivagem proteolítica, utilizando enzimas como papaína (para produzir fragmentos Fab) ou pepsina (para produzir fragmentos $F(ab')_2$).

Diz-se que um anticorpo é "capaz de se ligar" a uma molécula se for capaz de reagir especificamente com a molécula, desse modo ocorrendo ligação da molécula ao anticorpo. Com o termo "epítopo" pretende-se referir aquela porção de qualquer molécula à qual um anticorpo é capaz de se ligar e que também pode ser reconhecida por esse anticorpo. Epítopos ou "determinantes antigénicos" consistem habitualmente em agrupamentos de superfície quimicamente activos de moléculas, tais como aminoácidos ou cadeias laterais de açúcares, e têm características estruturais tridimensionais específicas, bem como características de carga específicas.

Um "antigene" é uma molécula ou uma porção de uma molécula à qual um anticorpo é capaz de se ligar, que é adicionalmente capaz de induzir um animal a produzir anticorpos capazes de se ligarem a um epítopo desse antigene. Um antigene pode ter um ou mais do que um

epítopo. Pretende-se que a reacção específica referida acima indique que o antigene irá reagir, de modo altamente selectivo, com o seu anticorpo correspondente e não com a pluralidade de outros anticorpos que podem ser evocados por outros antigenes.

Os anticorpos, incluindo fragmentos de anticorpos, úteis na presente invenção podem ser utilizados para detectar, quantitativa ou qualitativamente, a proteína GILR numa amostra, ou para detectar a presença de células que expressam a proteína GILR da presente invenção. Isto pode ser conseguido por técnicas de imunofluorescência, empregando um anticorpo etiquetado de forma fluorescente (ver abaixo), acopladas a detecção por microscopia de luz, citometria de fluxo ou fluorometria.

Os anticorpos (ou respectivos fragmentos) úteis na presente invenção podem ser empregues histologicamente, como em microscopia de imunofluorescência ou imunoeléctronica, para detecção *in situ* da proteína GILR da presente invenção. Pode efectuar-se detecção *in situ* removendo um espécime histológico de um paciente e fornecendo a esse espécime o anticorpo etiquetado da presente invenção. O anticorpo (ou fragmento) é preferivelmente fornecido aplicando ou dispondo o anticorpo (ou fragmento) etiquetado sobre uma amostra biológica. Utilizando esse procedimento é possível determinar não só a presença da proteína GILR mas também a sua distribuição no tecido examinado.

Utilizando a presente invenção, os habitualmente experimentados perceberão facilmente que qualquer um de uma grande variedade de métodos histológicos (como procedimentos de coloração) pode ser modificado para se efectuar essa detecção *in situ*.

Esses ensaios para a proteína GILR da presente invenção compreendem, tipicamente, incubar uma amostra biológica, como um fluido biológico, um extracto de tecido, células recolhidas de fresco, como linfócitos ou leucócitos, ou células que foram incubadas em cultura de tecidos, na presença de um anticorpo etiquetado detectável capaz de identificar a proteína GILR, e detectar o anticorpo por qualquer uma de algumas técnicas bem conhecidas na área.

A amostra biológica pode ser tratada com um suporte ou transportador em fase sólida, como nitrocelulose, ou outro suporte ou transportador sólido que seja capaz de imobilizar células, partículas celulares ou proteínas solúveis. Em seguida, o suporte ou transportador pode ser lavado com tampões adequados, seguido de tratamento com um anticorpo etiquetado detectável de acordo com a presente invenção, como referido acima. O suporte ou transportador em fase sólida pode ser seguidamente lavado com o tampão uma segunda vez, para remover anticorpo não ligado. A quantidade de etiqueta ligada nesse suporte ou transportador sólido pode então ser detectada por meios convencionais.

Por "suporte em fase sólida", "transportador em fase sólida", "suporte sólido", "transportador sólido", "suporte" ou "transportador" pretende-se designar qualquer suporte ou transportador capaz de se ligar a antígenos ou anticorpos. Suportes ou transportadores bem conhecidos incluem vidro, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, amilases do nylon, celuloses naturais e modificadas, poliácridamidas, gabros e magnetite. Para as finalidades da presente invenção, a natureza do transportador pode ser solúvel nalguma extensão ou insolúvel. O material de suporte pode ter virtualmente

qualquer configuração estrutural possível, desde que a molécula acoplada seja capaz de se ligar a um antigene ou anticorpo. Assim, a configuração do suporte ou transportador pode ser esférica, como numa esférula, cilíndrica, como na superfície interna de um tubo de teste ou a superfície externa de uma vareta. Alternativamente, a superfície pode ser plana, como uma folha, tira de teste, etc.

Suportes ou transportadores preferidos incluem esférulas de poliestireno. Os experimentados na área conhecerão muitos outros transportadores adequados para a ligação de anticorpos ou antigenes, ou serão capazes de identificá-los utilizando experimentação de rotina.

A actividade de ligação de um dado lote de anticorpos da invenção, como referido acima, pode ser determinada de acordo com métodos bem conhecidos. Os experimentados na área serão capazes de determinar condições operativas e de ensaio óptimas para cada determinação empregando experimentação de rotina.

Outros passos, tais como lavagem, agitação forte, agitação suave, filtração e afins, podem ser adicionados aos ensaios, como é habitual ou for necessário para a situação particular.

Um dos modos de etiquetar de forma detectável um anticorpo de acordo com a presente invenção consiste em ligá-lo a uma enzima e utilizá-lo num imunoensaio enzimático (EIA). Esta enzima, por sua vez, quando exposta posteriormente a um substrato apropriado, irá reagir com o substrato de modo tal que produzirá uma fracção química que pode ser detectada, por exemplo, por meios espectrofotométricos, fluorométricos ou visuais. Enzimas que podem ser utilizadas para etiquetar o anticorpo de forma detectável incluem, mas não se limitam a estas,

malato desidrogenase, nuclease de estafilococos, delta-5-esteróide isomerase, desidrogenase do álcool de levedura, alfa-glicerofosfato desidrogenase, triose fosfato isomerase, peroxidase de rábano bravo, fosfatase alcalina, asparaginase, glucose oxidase, beta-galactosidase, ribonuclease, urease, catalase, glucose-6-fosfato desidrogenase, glucoamilase e acetilcolinesterase. A detecção pode ser feita por métodos colorimétricos que empregam um substrato cromogénico para a enzima. A detecção também pode ser feita por comparação visual da extensão da reacção enzimática de um substrato em comparação com padrões preparados de modo semelhante.

A detecção pode ser feita utilizando qualquer um de uma variedade de outros imunoensaios.

Por exemplo, ao etiquetar os anticorpos ou fragmentos de anticorpos de forma radioactiva é possível detectar a R-PTPase utilizando um radioimunoensaio (RIA). Pode encontrar-se uma boa descrição de RIA em "Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology", de Work, T. S., *et al.*, North Holland Publishing Company, N.I. (1978), referindo-se particularmente o capítulo intitulado "An Introduction to Radioimmune Assay and Related Techniques", de Chard, T., incorporado aqui por referência. O isótopo radioactivo pode ser detectado por meios tais como um contador g ou um contador de cintilações ou por autorradiografia.

Também é possível etiquetar um anticorpo de acordo com a presente invenção com um composto fluorescente. Quando o anticorpo etiquetado de forma fluorescente é exposto a luz com o comprimento de onda apropriado, a sua presença pode ser detectada devido à fluorescência. De entre os compostos de etiquetagem fluorescente mais habitualmente utilizados contam-se isotiocianato de fluoresceína, rodamina,

ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldeído e fluorescamina.

O anticorpo também pode ser etiquetado de forma detectável utilizando metais que emitem fluorescência, tais como ^{152}E , ou outros da série dos lantanídeos. Estes metais podem ser ligados ao anticorpo utilizando grupos quelantes de metais, como ácido dietilenotriaminopentacético (ETPA).

O anticorpo também pode ser etiquetado de forma detectável acoplado-o a um composto quimioluminescente. Em seguida determina-se a presença do anticorpo marcado de forma quimioluminescente detectando a presença de luminescência que surge no decurso de uma reacção química. Exemplos de compostos de etiquetagem quimioluminescente particularmente úteis são luminol, isoluminol, éster de acridínio teromático, imidazolo, sal de acridínio e éster oxalato.

Da mesma forma, pode utilizar-se um composto bioluminescente para etiquetar o anticorpo da presente invenção. A bioluminescência é um tipo de quimioluminescência presente em sistemas biológicos, na qual uma proteína catalítica aumenta a eficiência da reacção quimioluminescente. Determina-se a presença de uma proteína bioluminescente detectando a presença de luminescência. Compostos bioluminescentes importantes para fins de etiquetagem são luciferina, luciferase e aequorina.

Uma molécula de anticorpo da presente invenção pode ser adaptada para utilização num ensaio imunométrico, também conhecido como ensaio de "dois sítios" ou "em sanduíche". Num ensaio imunométrico típico, uma quantidade de anticorpo (ou fragmento de anticorpo) não etiquetado é ligada a um suporte ou transportador sólido e adiciona-se uma quantidade de anticorpo solúvel etiquetado de forma detectável para permitir a detecção e/ou quantificação do

complexo ternário formado entre o anticorpo na fase sólida, antigene e anticorpo etiquetado.

Ensaio imunométrico típico e preferido incluem ensaios "directos", nos quais o anticorpo ligado à fase sólida é primeiramente contactado com a amostra a ser testada, para extrair o antigene da amostra por formação de um complexo binário anticorpo em fase sólida-antigene. Após um período de incubação adequado, o suporte ou transportador sólido é lavado, para remover o resíduo da amostra de fluido, incluindo antigene que não reagiu, se existir, e depois é contactado com a solução que contém uma quantidade desconhecida de anticorpo etiquetado (que funciona como "molécula repórter"). Após um segundo período de incubação, para permitir que o anticorpo etiquetado complexa com o antigene ligado ao suporte ou transportador sólido através do anticorpo não etiquetado, o suporte ou transportador sólido é lavado uma segunda vez, para remover o anticorpo etiquetado que não reagiu.

Noutro tipo de ensaio "em sanduíche", que também pode ser útil com os antígenos da presente invenção, utilizam-se os denominados ensaios "simultâneo" e "reverso". Um ensaio simultâneo envolve um único passo de incubação, pois o anticorpo ligado ao suporte ou transportador sólido e o anticorpo etiquetado são ambos adicionados ao mesmo tempo à amostra a ser testada. Depois de completada a incubação, o suporte ou transportador sólido é lavado, para remover o resíduo da amostra de fluido e anticorpo etiquetado não complexado. Seguidamente determina-se a presença de anticorpo etiquetado associado ao suporte ou transportador sólido como se faria num ensaio em sanduíche "directo" convencional.

No ensaio "reverso" utiliza-se a adição em passos à amostra de fluido primeiramente de uma solução de anticorpo

etiquetado, seguida da adição de anticorpo não etiquetado ligado a um suporte ou transportador sólido após um período de incubação adequado. Após uma segunda incubação, a fase sólida é lavada de modo convencional, para libertá-la do resíduo da amostra a ser testada e da solução de anticorpo etiquetado que não reagiu. Depois determina-se o anticorpo etiquetado associado a um suporte ou transportador sólido tal como nos ensaios "simultâneo" e "directo".

As proteínas GILR da invenção podem ser produzidas por qualquer procedimento comum de DNA recombinante (ver, por exemplo, Sambrook *et al.*, 1989, e Ausubel *et al.*, 1987-1995, *supra*) no qual células-hospedeiro eucarióticas ou procarióticas adequadas bem conhecidas na área são transformadas com vectores eucarióticos ou procarióticos apropriados contendo as sequências que codificam para as proteínas. Em conformidade, a presente invenção também diz respeito a esses vectores de expressão e hospedeiros transformados para a produção das proteínas da invenção. Tal como foi mencionado acima, estas proteínas também incluem os seus análogos, fragmentos e derivados biologicamente activos e, assim, os vectores que os codificam também incluem vectores que codificam análogos e fragmentos destas proteínas, e os hospedeiros transformados incluem aqueles que produzem esses análogos e fragmentos. Os derivados destas proteínas, produzidos pelos hospedeiros transformados, são os derivados produzidos por modificação comum das proteínas ou seus análogos ou fragmentos.

A presente invenção também se refere a composições farmacêuticas compreendendo vectores de vírus animais recombinantes que codificam as proteínas GILR, cujo vector também codifica uma proteína da superfície do vírus capaz de se ligar a proteínas de superfície de uma célula-alvo específica (por exemplo, linfócitos, células cancerosas,

etc.) para dirigir a inserção das sequências proteicas GILR para o interior das células. Outras composições farmacêuticas da invenção compreendem, como ingrediente activo, (a) uma sequência oligonucleotídica que codifica uma sequência anti-sentido da sequência proteica GILR, ou (b) fármacos que bloqueiam a actividade da GILR.

Composições farmacêuticas de acordo com a presente invenção incluem uma quantidade suficiente do ingrediente activo para cumprir o seu objectivo pretendido. Adicionalmente, as composições farmacêuticas podem conter transportadores adequados farmacêuticamente aceitáveis, compreendendo excipientes e auxiliares que facilitam o processamento dos compostos activos, em preparações que podem ser utilizadas farmacêuticamente e que podem estabilizar essas preparações para administração ao sujeito necessitado, como é bem conhecido dos experimentados na área.

A invenção será agora descrita mais pormenorizadamente no seguinte Exemplo não limitativo e nas figuras adjuntas. Deve notar-se que todos os variados procedimentos, a menos que indicado em contrário, são procedimentos comuns na área ou são procedimentos óbvios para todos os experimentados na área em virtude da sua publicação, como notado em publicações disponíveis de forma generalizada. Da mesma forma, todos os variados reagentes, células, etc. (isto é, "materiais") também estão facilmente disponíveis para todos os experimentados na área, adquirindo-os aos vários fabricantes ou preparando-os por procedimentos comuns.

Exemplo 1: Identificação, Isolamento, Clonagem e Caracterização do gene GILR e da proteína GILR

1. Materiais e Métodos

a) Células e condições de cultura

Obtiveram-se timócitos de ratinhos C3H/HeN com 3 até 5 semanas de idade da Charles River (Milão, Itália). As suspensões de células foram lavadas, filtradas e ajustadas para uma concentração de 8×10^6 células/mL em meio completo. As células foram incubadas a 37°C isoladamente ou com 100 nM/L de DEX (Sigma, St. Louis, Mo) durante 3 horas. Para experiências de transfecção utilizou-se uma sub-linha CD3+, CD4+, CD2+, CD44+, obtida no nosso laboratório, da linha de células T de hibridoma de ratinho específica para OVA (3D0; Ayroldi *et al.*, 1995) mantida em suspensão em meio RPMI 1640 suplementado com FCS 10% e tampão HEPES 10 µM. As células foram centrifugadas, em instantes pré-estabelecidos, a 200g durante 10 minutos, foram lavadas e ajustadas para as concentrações desejadas.

b) Preparação de RNA

Isolou-se RNA citoplasmático total de timócitos utilizando o protocolo de Chirgwin (Chirgwin *et al.*, 1979). Obteve-se RNA poliadenilado como previamente descrito (Maniatis *et al.*, 1989).

c) Construção da biblioteca

Construiu-se uma biblioteca de cDNA clonado direccionalmente utilizando RNA citoplasmático poliadenilado de timócitos cultivados durante 3 horas na presença de DEX, de acordo com o protocolo de Maniatis (ver Maniatis *et al.*, 1989). Em resumo, obteve-se um primeiro filamento de cDNA com uma reacção reversa utilizando um "primer" oligo (dT) (10 µg) e 7 µg de RNA di-poliadenilado. Para monitorizar a síntese incluiu-se na mistura reaccional

[³²P] dCTP 20 μ Ci (3000 Ci/mmol). Sintetizou-se um segundo filamento de cDNA de acordo com os procedimentos descritos por Gubler e Hoffman (Gubler e Hoffman, 1983). O cDNA foi submetido a ligação de extremidades planas utilizando polimerase T4 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemanha) e depois foi metilado com EcoRI metilase (Boehringer Mannheim). Os agentes de ligação de EcoRI foram ligados ao cDNA com DNA ligase T4 (New England Biolabs, Beverly, MA) a 16°C durante 12 horas. Após a ligação dos agentes de ligação, a reacção foi inactivada por aquecimento para 68°C e incubação a esta temperatura durante 15 minutos. A suspensão de cDNA foi precipitada em etanol e purificada numa coluna CL4B (Invitrogen BV, San Diego, CA).

O cDNA foi inserido em braços λ gt11 utilizando adaptadores de EcoRI seguindo o protocolo do fabricante (Invitrogen). Os clones recombinantes ($0,25 \times 10^4$ p.f.u./ μ L) foram rastreados por hibridização com a sonda de subtracção (ver abaixo).

d) Procedimento de sonda de subtracção e rastreio da biblioteca

Para construir a sonda subtraída, uma cópia biotinilada da reunião não induzida de mRNA (10 μ g) e cDNA etiquetado com ³²P do mRNA induzido (1 μ g) foram co-precipitados em etanol. O precipitado foi seco e dissolvido em 2 x tampão de hibridização. A amostra foi aquecida a 100°C durante 1 minuto e depois foi incubada a 68°C durante 24 horas. Para separar sequências não hibridizadas das hibridizadas, a reacção foi diluída 10 até 15 vezes com tampão de ligação de estreptavidina e foi incubada com estreptavidina durante 10 minutos à temperatura ambiente. Realizaram-se duas extracções com fenol-clorofórmio. Após a precipitação, a sonda de cDNA etiquetado foi novamente

suspensa em 50 μL de água esterilizada e foi utilizada directamente como sonda de subtracção para o rastreio da biblioteca de cDNA.

Filtros de nitrocelulose (Amersham Life Science International PLC, Buckinghamshire, Inglaterra), com os quais se obtiveram lâminas de coloração contendo 5×10^4 clones, foram hibridizados em 5 x SSC, 5 x solução de Denhardt, SDS 1%, 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de tRNA (Sigma) e pirofosfato de sódio 20 mM (pH 6,8) a 42°C durante 12 horas e a lavagem final foi realizada em 0,2 x SSC, SDS 0,1% a 65°C durante 30 minutos.

e) Análise de coloração "Northern"

As quantidades indicadas (ver "Descrição Breve das Figuras" acima) de RNA citoplasmático total (que variaram entre 2 μg - 25 μg de RNA/via nos géis, como referido relativamente às figuras em "Descrição Breve das Figuras" aqui acima) foram separadas em géis de agarose 1,2% e transferidas para filtros de nitrocelulose (Scheicher and Schuell, Dassel, Alemanha). Sondas de DNA foram etiquetadas com ^{32}P utilizando o estojo de tradução por cortes da Boehringer Mannheim e seguindo as instruções do fabricante. A hibridização foi efectuada durante a noite. Os filtros foram lavados três vezes em 0,2 x SSC com SDS 0,5% a 37°C, seguido de duas lavagens a 65°C.

f) Técnica de extensão do "primer"

A extensão do "primer" foi feita de acordo com o procedimento de Maniatis (Maniatis *et al.*, 1989). O "primer" de DNA etiquetado de forma radioactiva (105 cpm), complementar à sequência desde o nucleótido na posição 298 até ao nucleótido na posição 327 do gene GILR (ver Fig. 2), foi misturado com 20 μg de mRNA de timócitos tratados com DEX durante 3 horas.

g) Determinação da sequência de DNA

Sequenciaram-se clones de cDNA utilizando DNA polimerase T₇ (estojo Sequenase, U.S. Biochemical Corp.) em conjunção com "primers" oligonucleotídicos 20- e 21-meros sintetizados particularmente para esta finalidade (complementares à sequência de cDNA) e "primers" complementares às sequências de sítios de clonagem plasmídicas. Obtiveram-se sequências com sobreposição para ambos os filamentos do cDNA. As sequências de cDNA derivaram de clones isolados do rastreo da biblioteca de cDNA.

Todos os procedimentos de análise de sequências e identificação de motivos estruturais foram feitos com o programa de "software" PC/Gene (Intelligenetics, Inc.). Pesquisaram-se os bancos de dados de ácidos nucleicos da GenBank e EMBL e o banco de dados de proteínas Swiss-Prot mais actualizados, pela Internet, utilizando o programa FASTA de Pearson e Lippman.

h) Tradução *in vitro*

O RNA foi traduzido *in vitro* utilizando um lisato de reticulócitos de coelho (Promega), pelo procedimento recomendado nas instruções do fabricante, na presença de [³⁵S]metionina (Amersham) e os produtos foram analisados por SDS-PAGE 15%. Após a realização de electroforese, o gel foi fixado e submetido a autorradiografia.

i) Preparação de anti-soro de coelho anti-ratinho e análise de coloração "Western"

Preparou-se um anti-soro policlonal de coelho que reconhece GILR com a sequência de uma proteína de fusão que contém a sequência de aminoácidos completa da GILR fundida a glutathione S-transferase (GST; Pharmacia). A proteína de fusão com GST foi expressa em *Escherichia coli* (*E. coli*), foi induzida com isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG)

1 mM e purificada com esférulas de glutationa (GSH)-agarose como previamente descrito (Tan *et al.*, 1994). Utilizou-se esta preparação para imunizar coelhos brancos da Nova Zelândia (1 mg/coelho).

Após 4 semanas, administrou-se intravenosamente uma injeção de reforço de 0,2 mg de proteína e recolheu-se sangue 1 semana mais tarde para a preparação de anti-soro. Purificou-se o anti-soro utilizando uma proteína de fusão imobilizada num firo de nitrocelulose de acordo com o protocolo de Maniatis (Maniatis *et al.*, 1989). O anti-soro foi utilizado para análise de coloração "Western" de proteínas extraídas de timócitos tratados com ou sem DEX, como previamente descrito (Ayroldi *et al.*, 1997). Para a coloração "Western", timócitos de ratinho (5×10^6 /amostra) foram submetidos a lise por incubação, durante 30 minutos em gelo, em 300 μ L de tampão de lise (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,15, EDTA 5 mM, PMSF 100 mM, Leupeptina 2,5 mM, Aprotinina 2,5 mM). Após centrifugação a 15 000 rpm durante 15 minutos, os grânulos foram lavados três vezes com tampão de lise frio, estiveram em ebulição durante 3 minutos e depois foram analisados por electroforese em géis de SDS-PAGE 10%, seguido de transferência para nitrocelulose (Bioblot-NC, Costar), durante 5 horas a 250 mA a 4°C, em 25 mM Tris/glicina, pH 8,3, e metanol 20% v/v. Bloquearam-se os sítios de ligação inespecífica por imersão da membrana em reagente bloqueador 5% em solução salina tamponada com Tris Tween (TBS-T) durante 1 hora à temperatura ambiente.

As membranas foram incubadas com anti-soro policlonal para a GILR diluído 1:10000 durante 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem com tampão TBS-T, as membranas foram sondadas, durante 1 hora à temperatura ambiente, com anticorpo de ovelha anti-coelho etiquetado com HRP diluído 1:5000 (Amersham), depois foram incubadas com reagentes de

coloração "Western" ECL (Amersham) e expostas a hiperfilme-ECL (Amersham) durante 15 segundos.

j) Transfecções de células cultivadas

A sequência codificadora do cDNA de GILR (874 pares de bases - ver Fig. 2) foi clonada num plasmídeo pcDNA3 (Invitrogen) para expressão em células de mamífero. Células 3D0 foram transfectadas por electroporação (300 mA, 960 μ F) com 15 μ g de vector pcDNA3 linearizado (clones de controlo) ou 15 μ g de vector pcDNA3 linearizado que expressa o cDNA de GILR. Trinta e seis horas após a transfecção, as células foram cultivadas em meio que continha 0,8 mg/g de forma activa de G418 (GIBCO-BRL, Life Technologies, Paisley, Escócia) e 100 μ L da suspensão de células foram plaqueados em placas de 96 cavidades (4 para cada transfecção). Passados 15 - 20 dias não mais do que 15% das cavidades tinha células vivas em crescimento. Estas células sobreviventes foram consideradas clones e foram analisadas, num ensaio de protecção de RNase, quanto à expressão de GILR exógena (Vito *et al.*, 1996).

k) Análise de protecção de RNase (RPA)

Construiu-se a sonda para RPA por PCR utilizando o "primer" Directo CCATCTGGGTCCACTCCAGT (localizado em GILR, 763 - 782 pares de bases - ver Fig. 2 e ID SEQ NO: 3) e o "primer" Reverso AGGACAGTGGGAGTGGCACC (localizado em pcDNA3 - ver Fig. 5C e ID SEQ NO: 4). O produto de PCR (244 pares de bases) foi clonado num vector pCRII utilizando o estojo de Clonagem TA (Invitrogen). Sequenciou-se o produto desta clonagem para excluir qualquer possibilidade de uma mutação pontual. O DNA plasmídico foi linearizado com Xba I (New England Biolabs) e foi transcrito com RNA polimerase T₇ (GIBCO-BRL) na presença de [α ³²P]UTP 50 μ M. Após purificação em gel, a sonda (2 x 10⁵ cpm) foi hibridizada

para RNA total (20 µg) durante a noite a 60°C. Efectuou-se digestão com RNase utilizando uma solução de RNase A (Boehringer Mannheim) (40 µg/mL) e RNase T₁ (GIBCO-BRL) (1,5 U/µL) a 37°C durante 15 minutos. Os produtos não digeridos foram tratados com fenol-clorofórmio, foram precipitados com etanol e carregados num gel de sequenciação de poliacrilamida desnaturante. Efectuou-se exposição a autorradiografia durante 2 dias.

l) Formação de ligações cruzadas do anticorpo e tratamento de células

Deixou-se aderir mAb de hamster anti-ratinho CD3ε (clone 145-2C11; Pharmingen, San Diego, CA), a 1 µg/cavidade (= 1 µg/mL de anticorpo anti-CD3) a placas de 96 cavidades de fundo plano de ligação elevada (Costar, Cambridge, MA) a 4°C em 100 µL de PBS. Passadas 20 horas, as placas revestidas com mAb foram lavadas e os clones transfectados foram plaqueados a 1 x 10⁵ células/cavidade e foram incubados a 37°C durante 20 horas. Como controlo utilizaram-se mAbs IgG 2b de rato anti-ratinho do isotipo correspondente (clone R 35-38, Pharmingen).

Para avaliar a morte mediada por Fas, células 3D0 (1 x 10⁶) foram incubadas à temperatura ambiente durante 30 minutos com 10 µg/mL do anticorpo para o Fas (de hamster anti-ratinho, clone Jo2; Pharmingen), depois foram lavadas e plaqueadas em cavidades revestidas com um anticorpo para a imunoglobulina G de hamster (5 µg/cavidade; Pharmingen).

Em experiências seleccionadas, uma porção das células T foi tratada com Ciclosporina (Calbiochem, San Diego, CA) na presença ou ausência de anticorpos monoclonais com ligações cruzadas.

m) Irradiação de UV, tratamento com DEX e privação de nutrientes

Nalgumas experiências, clones transfectados com pcDNA3 vazio ou cDNA de GILR foram expostos a diferentes doses de raios UV de um UV Stratalinker (modelo 1800; Stratagene, La Jolla, CA).

Alíquotas de 2 mL de clones transfectados (1×10^6 /mL) foram incubadas com DEX ou sujeitas a condições de privação (FCS 1%). Avaliou-se a apoptose passadas 20 horas como descrito abaixo.

n) Análise de citometria de fluxo

Uma única suspensão (1×10^6 células/amostra) foi incubada durante 30 minutos em gelo em 50 μ L de tampão de coloração (PBS mais FCS 5%) que continha 10 μ g/mL de mAb de hamster anti-Fas de ratinho directamente conjugado a R-ficoeritrina (PE) ou IgG de hamster conjugado a PE (controlo do isotipo).

Ambos os mAbs foram adquiridos à Pharmingen. As células também foram coradas com anticorpo policlonal de coelho dirigido contra um péptido correspondente aos aminoácidos 260 - 279 com mapeamento no terminal carboxi do Fas-L humano (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) ou com anticorpo (ab) de isotipo correspondente, e com conjugado de IgG anti-coelho FITC, fragmento F(ab')₂ (Sigma) como reagente do segundo passo.

Todos os clones foram corados com α CD3 de hamster anti-ratinho directamente conjugado com fluoresceína (Pharmingen). Calculou-se a mediana ou percentagem de histogramas de Fas e Fas-L utilizando o "software" de investigação de Lysis II (Becton-Dickinson, Mountain View, E.U.A.).

o) Avaliação da apoptose por solução de iodeto de propídio

Mediu-se a apoptose por citometria de fluxo como descrito noutra parte (Nicoletti *et al.*, 1991). Após a cultura, as células foram centrifugadas e os grânulos foram novamente suspensos de forma suave em 1,5 mL de solução hipotónica de iodeto de propídio (PI, 50 µg/mL em citrato de sódio 0,1% mais Triton X-100 0,1%). Mantiveram-se os tubos durante a noite a 4°C no escuro. Mediu-se a fluorescência de PI de núcleos individuais por citometria de fluxo utilizando o equipamento comum FACScan (Becton Dickinson). Os núcleos percorreram um feixe de luz laser de Argon de 488 nm. Para recolher a fluorescência vermelha devido à coloração de DNA com PI utilizou-se um espelho dicróide de 560 nm (DM 570) e um filtro passa-banda de 600 nm (largura de banda 35 nm). Os dados foram registados em escala logarítmica num computador Hewlett Packard (HP 9000, modelo 310; Palo Alto, CA). Calculou-se a percentagem de núcleos de células apoptóticas (pico de DNA sub-diplóide no histograma de fluorescência de DNA) com "software" de investigação FACScan específico (Lysis II).

p) Análise de interleuquina-2 (IL-2)

Testaram-se sobrenadantes de clones não tratados ou tratados com anti-CD3 durante 18 horas quanto à sua concentração de IL-2 por ELISA de dois sítios, utilizando como reagente primário o anticorpo monoclonal JES6-1A12 e como reagente secundário anticorpo monoclonal biotinilado S4B6. Os dois anticorpos foram adquiridos à Pharmingen. O título de IL-2 (Média +/- Desvio Padrão de amostras repetidas) foi expresso em picogramas por mililitro, calculado com referência a curvas-padrão construídas com quantidades conhecidas de IL-2. O limite de sensibilidade foi, aproximadamente, 20 pg/mL.

q) Extractos nucleares e citoplasmáticos

Extraíram-se proteínas nucleares de 2×10^7 células. As células foram lavadas com PBS gelado e células empacotadas foram novamente suspensas em 1 mL de tampão hipotónico (HEPES 25 mM, KCl 50 mM, NP-40 0,5%, Ditiotretitol 0,1 mM, 10 µg/mL de Leupeptina, 20 µg/mL de Aprotinina e 1 mM de solução de PMSF em etanol. Após 10 minutos de incubação em gelo, os sobrenadantes que continham proteínas citoplasmáticas foram separados dos grânulos nucleares por centrifugação. Em seguida, os grânulos nucleares foram lavados com tampão hipotónico sem NP-40 e foram novamente suspensos em 10 µL de tampão de lise (HEPES 25 mM, KCl 2 mM, Ditiotretitol 0,1 mM, Leupeptina 10 µg/mL, Aprotinina 20 µg/mL e PMSF 1 mM). Após 15 minutos de incubação em gelo, os lisatos foram diluídos com 10 volumes de tampão de diluição (HEPES 25 mM, Ditiotretitol 0,1 mM, Leupeptina 10 µg/mL, Aprotinina 20 µg/mL e PMSF 1 mM e glicerol 20%) e foram clarificados numa microcentrifugadora pré-arrefecida durante 30 minutos a 14 000 x g antes da carga.

r) Isolamento de GILR humana

O homólogo humano da GILR murina foi isolado de uma biblioteca de cDNA de linfócitos humanos λgt 11 (Clontech, Palo Alto, CA, E.U.A.). Utilizou-se como sonda cDNA de GILR murino etiquetado com ^{32}P . Filtros de nitrocelulose (Amersham), obtidos por coloração de lâminas contendo 5×10^4 clones, foram hibridizados em 5 x SSC, 5 x solução de Denhardt, SDS 1%, 100 µg/µL de tRNA (SIGMA) e pirofosfato de sódio 20 mM (pH 6,8) a 42°C durante 12 horas, e a lavagem final foi feita em 0,2 x SSC, SDS 0,1 a 65°C durante 30 minutos. De filtros repetidos identificaram-se cinquenta candidatos possíveis, tendo sido suplementarmente rastreados como descrito (D'Adamio et al., 1997). Vários

clones derivados do terceiro rastreamento foram isolados e digeridos com EcoRI, e as inserções de cDNA de cerca de 2000 pares de bases foram subclonadas em pcDNA3. Após extração e purificação com o método de lise alcalina (Maniatis *et al.*, 1989), os DNAs plasmídicos de vários clones foram sequenciados utilizando DNA polimerase T7 em conjunção com os "primers" Sp6 e T7 complementares às sequências de sítios de clonagem plasmídicas e com "primers" oligonucleotídicos sintetizados particularmente para essa finalidade (20 e 23 bases de comprimento).

Obtiveram-se sequências com sobreposição para ambos os filamentos do cDNA.

II. RESULTADOS

a) Isolamento do cDNA de GILR de ratinho

Para estudar o papel de hormonas glucocorticóides na regulação da apoptose de linfócitos procedeu-se ao isolamento de mRNA induzido por 3 horas de tratamento com a hormona glucocorticóide sintética dexametasona (DEX, 100 nM) em timócitos isolados de fresco. Ao comparar os cDNAs de células não tratadas e tratadas com DEX, pela técnica de sonda de subtração como referido acima, identificaram-se alguns mRNAs super-expressos nas células tratadas. Por sequenciação dos vários cDNAs detectáveis verificou-se que um deles (designado "GILR": gene Relacionado com a família de zíperes de Leucina Induzido por Glucocorticóides) tem alguma homologia (40% de semelhança) com a sequência aparentemente não relacionada de TSC-22 de ratinho (Shibanuma *et al.*, 1992) e hDIP (Vogel *et al.*, 1996), em que esta homologia não é muito importante uma vez que, e isto é mais importante, a sequência GILR não exibiu homologia com outras sequências presentes nas bases de dados EMBL e Genbank.

b) Expressão de GILR em tecidos: indução em linfócitos

T

Realizaram-se experiências para examinar e definir a expressão de GILR em diferentes tecidos. Os resultados indicaram que mRNA de GILR foi claramente detectável, por coloração "Northern" (8 dias de exposição), em timócitos, células do baço e nodos linfáticos isolados de fresco, ligeiramente detectável em medula óssea, rim e pulmão, e não detectável no fígado, coração e cérebro, sugerindo que o gene é maioritariamente expresso em tecidos linfóides (Fig. 1A).

Realizaram-se experiências para testar o possível efeito do tratamento com DEX em tecido linfóide. Os resultados indicam que a expressão de GILR foi claramente aumentada por tratamento com DEX em timócitos e linfócitos frescos de tecidos linfóides periféricos, incluindo o baço e nodos linfáticos (Fig. 1B). Estes resultados diferenciam claramente a GILR dos elementos mais semelhantes da família de zíperes de leucina hDIP (Vogel *et al.*, 1996) e TSC-22 (Shibanuma *et al.*, 1992), ambos expressos de forma ubíqua.

c) A proteína codificada por GILR é uma proteína pertencente à família de zíperes de leucina

Para isolar um cDNA de GILR completo rastreou-se uma biblioteca de cDNA de linfócitos do timo utilizando uma sonda isolada (1100 pares de bases) obtida com o procedimento de sonda de subtração (ver acima). Isolaram-se vários clones; 3 deles tinham 1972 pares de bases de comprimento e exibiram a mesma sequência. Uma vez que a análise de coloração "Northern" (Fig. 1A) indicou que o mRNA de GILR tinha cerca de 1,97 kb de comprimento, pensou-se que estes clones representam cDNAs completos. Isto foi confirmado por experiências realizadas empregando a técnica de extensão de "primers" (resultados não mostrados).

A sequenciação de nucleótidos dos 3 clones de cDNA acima mencionados que codificam para GILR revelou a presença de uma única fase de leitura aberta (ORF), começando na posição de nucleótido número 206 e prolongando-se até um codão de terminação TAA na posição 617 (Fig. 2).

O codão de iniciação ATG putativo, na posição 206, está rodeado por uma sequência (GAACCATGA) que está de acordo com a sequência de consenso para a iniciação da tradução em eucariotas (Kozak, 1989). O codão de terminação é seguido de uma região não traduzida 3' de 1355 pares de bases. Está presente um sinal de poliadenilação 45 pares de bases a 5' da cauda poli-A.

A sequência de aminoácidos de GILR exhibe homologias significativas com moléculas que pertencem à família de zíperes de leucina (Fig. 4 e 15; Shibamura *et al.*, 1992; Yamamoto *et al.*, 1988; Nicholas *et al.*, 1991; Hope e Struhl, 1987; Lamph *et al.*, 1988).

A proteína codificada de forma putativa pelo mRNA de GILR é uma proteína zíper de leucina com 138 resíduos de aminoácidos (Fig. 2). Estão presentes quatro resíduos de leucina nas posições de triplete 431 - 433, 452 - 454, 473 - 475 e 494 - 496, uma asparagina na posição 464 - 466, que é compatível com uma estrutura de zíper de leucina (sublinhado na Fig. 2) e presumivelmente capaz de formar dímeros.

Suplementarmente, uma região (os aminoácidos básicos estão sublinhados na Fig. 2), que possivelmente representa um domínio de ligação de DNA, está presente na extremidade N-terminal, ao passo que uma região PAR, rica em prolina e resíduos ácidos, está presente na região da extremidade C-terminal.

Com base nestas características, a GILR pode ser classificada como uma proteína zíper de leucina. O peso molecular previsto da proteína madura putativa, antes de modificações pós-tradução suplementares, é cerca de 17 000 Da. O peso molecular da proteína nativa é cerca de 17 000 Da (17 kDa), como indicado por experiências de tradução *in vitro* do cDNA clonado (Fig. 3A) e por experiências de análise de coloração "Western" utilizando um anti-soro de coelho preparado contra a proteína GILR traduzida *in vitro* (Fig. 3C). Utilizou-se o anti-soro para detectar um produto celular da GILR em timócitos normais não tratados ou tratados com DEX (6 horas de tratamento). Em particular, detectou-se com este anti-soro uma banda de massa molecular de aproximadamente 17 kDa no extracto proteico de timócitos tratados com DEX, mas não de timócitos não tratados, numa análise de coloração "Western" (Fig. 3C). A Figura 3B mostra que este anti-soro reconhece a proteína de fusão traduzida *in vitro*. Em particular, o anti-soro revela a proteína de fusão com GST ou a proteína GILR intacta obtida por digestão com trombina de acordo com o protocolo da Pharmacia.

Realizaram-se outras experiências para avaliar se a proteína e mRNA GILR poderiam ser induzidos por tratamento com DEX e se este efeito poderia ser modulado por co-estimulação com mAb anti-CD3 (Fig. 11). Os resultados de uma experiência representativa de coloração "Western" mostram que a proteína GILR é induzida em timócitos por tratamento com DEX (via 3) ou anti-CD3 mais DEX (via 4), ao passo que é regulada negativamente por tratamento com mAb anti-CD3 isoladamente (via 2) (Fig. 11A). Obtiveram-se resultados semelhantes quando se avaliou a expressão de mRNA de GILR. A experiência de coloração "Northern" mostrou, de facto, que o mRNA de GILR é regulado

negativamente por tratamento com mAb anti-CD3 (Figura 11B) (via 2), é induzido por tratamento com DEX (via 3) ou anti-CD3 mais DEX (via 4). Obtiveram-se resultados semelhantes com células do baço e de nodos linfáticos (não mostrado).

Para definir a localização subcelular de GILR avaliaram-se os níveis de GILR no núcleo e no citoplasma de clones transfectados com vector vazio ou com o cDNA de GILR. A Figura 12A mostra que é detectável GILR nas proteínas nucleicas extraídas de um clone transfectado com cDNA de GILR, mas não no citoplasma ou no núcleo e citoplasma de clone de controlo. Utilizou-se anticorpo anti- β tubulina para controlar a possível contaminação dos núcleos com material citoplasmático. Os resultados apresentados na Figura 12B indicam que está presente β -tubulina no extracto proteico citoplasmático de clones de controlo (via 3) e transfectados com GILR (via 4), mas não nos extractos nucleares (vias 1 e 2).

d) A expressão de GILR, em células T transfectadas, confere resistência a apoptose induzida por TCR/CD3 mas não a morte celular induzida por outros estímulos

Membros da família de zíperes de leucina estão envolvidos na activação de linfócitos e são capazes de induzir ou inibir a apoptose (Smeyne et al., 1993; Goldstone e Lavin, 1994). Para testar os possíveis efeitos da expressão de GILR na apoptose, uma linha de células T de hibridoma, 3D0, foi transfectada, em que esta linha de células 3D0, como outros hibridomas de células T, tem sido amplamente utilizada na investigação de apoptose induzida por anticorpos anti-CD3 (Ayroldi et al., 1995; Vito et al., 1996). Efectuou-se esta transfecção com um vector de expressão no qual o cDNA de GILR é expresso sob o controlo do promotor de CMV. Foi previamente mostrado que a apoptose induzida pelo anticorpo anti-CD3 em células 3D0 depende do

sistema Fas/Fas-L (Yang *et al.*, 1995). Nessas transfecções também se utilizou o vector vazio (controlo pcDNA3) como controlo. Após selecção com antibiótico G418, clones de células foram rastreados quanto à expressão de GILR por análise de protecção de RNase (Fig. 5). Para cada transfecção, 9 clones foram testados e utilizados para caracterização funcional. Adicionalmente, 6 clones não transfectados normais (nuc/1-6) foram testados como controlos suplementares.

Os resultados mostraram que todos os clones de células que super-expressam GILR (clones GILR/1-9) foram variavelmente resistentes a apoptose induzida pelo mAb anti-CD3 (apoptose entre 5% e 10%), com $P < 0,0001$, em comparação com os clones de controlo de pcDNA3 (clones pcDNA3/1-9, apoptose entre 45% e 60%). Não foram detectáveis diferenças significativas entre clones de pcDNA3 e clones normais não transfectados (clones nuc/1-6, apoptose entre 45 e 60%) (Fig. 6). Para excluir um possível efeito do gene GILR na expressão membranar de TCR/CD3, que poderia, por si próprio, ser responsável pela sensibilidade decrescida à apoptose induzida por anti-CD3, todos os clones foram corados com mAb anti-CD3 e analisados por citometria de fluxo.

Não se detectaram diferenças da expressão de CD3 entre clones transfectados e não transfectados (resultados não mostrados).

Foi mostrado que a apoptose de células T pode ser induzida por vários estímulos diferentes do desencadeamento do complexo TCR/CD3, incluindo corticosteróides, irradiação de UV e privação de nutrientes (Zacharchuk *et al.*, 1990; Bansal *et al.*, 1991; Lowe *et al.*, 1993).

Realizaram-se experiências para testar se a expressão de GILR poderia inibir a apoptose de células T induzida por

outros estímulos. Os resultados obtidos com os mesmos clones (os resultados com GILR/1,5,7 e pcDNA3/4,7,8 estão apresentados na Fig. 7) indicam que a super-expressão de GILR não contraria a apoptose induzida por DEX, várias doses de irradiação de UV, privação de nutrientes ou desencadeamento por anticorpo monoclonal anti-Fas com ligações cruzadas.

Estes resultados sugerem que a GILR pode modular a apoptose de células T desencadeada pelo complexo TCR/CD3 mas não por outros estímulos.

É interessante notar que o efeito inibidor específico da GILR na via de sinalização apoptótica dependente de CD3/TCR é peculiarmente diferente do efeito exercido pela TSC-22, a proteína zíper de leucina mais homóloga. A literatura científica demonstra que a TSC-22 pode induzir apoptose numa linha de células de carcinoma humano (Ohta *et al.*, 1997), é induzida por um fármaco anti-cancerígeno, Vesnarinona (Kawamata *et al.*, 1998), numa linha de células de cancro das glândulas salivares humana e a sua regulação negativa intensifica acentuadamente o crescimento da linha de células (Nakashiro *et al.*, 1998).

e) Expressão de Fas e Fas-L em células T transfectadas com GILR

Foi sugerido que a AICD de células T também depende da interacção Fas/Fas-L (Alderson *et al.*, 1995; Dhein *et al.*, 1995; Ju *et al.*, 1995). Em particular, os presentes inventores mostraram previamente que a apoptose induzida por anti-CD3 em células 3D0 é bloqueada por mAb anti-Fas solúvel, ao passo que mAb anti-Fas com ligações cruzadas induz directamente morte celular (Ayroldi *et al.*, 1997). Realizaram-se experiências para testar se o bloqueio do Fas (utilizando mAb anti-Fas solúvel sem ligações cruzadas, 1 µg/mL) poderia inibir a apoptose induzida por anti-CD3

neste sistema experimental onde se testaram clones de 3D0. Os resultados indicam que o bloqueio do Fas inibe significativamente a morte celular induzida por CD3 (apoptose, a média de resultados obtidos com 3 clones normais num ensaio de 20 horas foi: 4 ± 1 em controlos não tratados, 63 ± 5 em clones tratados com anti-CD3, 29 ± 6 em clones tratados com anti-CD3 mais anti-Fas solúvel; $P < 0,01$ comparando tratados com anti-CD3 com tratados com anti-CD3 mais anti-Fas).

Também se realizaram experiências para avaliar se a inibição da apoptose em células transfectadas com GILR poderia ser mediada por um efeito na expressão do sistema Fas/Fas-L.

Os resultados mostram que 20 horas de tratamento com mAbs anti-CD3 induziram a expressão de Fas e Fas-L na linha de células 3D0 e em clones transfectados com o controlo de vector vazio (pcDNA3/4,7) mas não aumentaram a expressão do Fas e Fas-L em clones que super-expressam GILR (clones GILR/1,2,3,5,7) (Figura 8).

Experiências cinéticas também indicam que, não obstante a expressão de Fas-L não ser evidente às 3 horas após tratamento com anti-CD3, quando não há apoptose detectável, se detecta indução da expressão de Fas-L às 10 horas, quando a apoptose é mensurável. Apresentam-se na Tabela I resultados de uma experiência representativa com um vector vazio e um clone transfectado com GILR. Também se obtiveram resultados semelhantes quando se avaliou a expressão de mRNA de Fas por ensaios de coloração "Northern" e protecção de RNase (Fig. 9).

Estes resultados indicam que a expressão de GILR inibe a apoptose activada por TCR/CD3 e expressão de Fas/Fas-L.

f) GILR na activação de células T

Tendo demonstrado que a super-expressão de GILR salvou de apoptose induzida por anti-CD3 ao diminuir a expressão de Fas/Fas-L, seguidamente avaliou-se o papel da GILR na activação de células T. Para essa finalidade, clones transfectados com GILR foram activados e analisados quanto à apoptose e expressão de marcadores da activação, como o receptor da interleuquina-2 (IL-2R). Em particular, após estimulação com anticorpos monoclonais anti-CD3 com ligações cruzadas (1 µg/mL), clones transfectados com GILR e de vector vazio (utilizados como controlo) foram corados com um anticorpo monoclonal anti-IL-2R (CD25) ou tratados para etiquetagem com iodeto de propídio para avaliar a apoptose. Utilizaram-se os sobrenadantes de clones de controlo e tratados com anti-CD3 para a detecção da IL-2 num ensaio ELISA.

Os resultados mostraram que clones transfectados com o vector vazio expressam, por estimulação com anti-CD3, níveis elevados de IL-2R e produzem IL-2, como avaliado por análise de citometria de fluxo e ensaio ELISA, respectivamente. Em contraste, clones transfectados com GILR expressam níveis baixos ou indetectáveis de IL-2 (Tabela II). Estes dados indicam que a super-expressão de GILR inibe a activação induzida por anti-CD3 e sugerem que a GILR poderá desempenhar um papel no controlo da activação de células T.

Para investigar suplementarmente o papel de GILR na activação de células T examinámos em seguida a sua expressão por estimulação com anti-CD3 e/ou anti-CD2 e os efeitos da ciclosporina A.

Foi mostrado que o desencadeamento de CD2 salva células T de apoptose induzida por anti-CD3, ao modular negativamente o sistema Fas/Fas-L (Ayroldi et al., 1997).

Este efeito é mediado pelo decréscimo da produção de IL-2 endógena e, em consequência, de activação de células T. Depois estudou-se a expressão de GILR, utilizando coloração "Northern", em células 3DO tratadas com anticorpos monoclonais anti-CD3 e/ou anti-CD2. A Figura 10A mostra que mRNA de GILR é regulado negativamente por activação de anti-CD3, ao passo que é modulado positivamente por tratamento com anti-CD2. A co-estimulação com o tratamento anti-CD2 e anti-CD3 restabelece o mRNA de GILR para o nível de controlo.

Foi previamente relatado que a ciclosporina inibe especificamente a transcrição mediada por TCR do gene IL-2 por bloqueio da via de transdução do sinal dependente de cálcio (Liu *et al.*, 1993). Como mostrado na Figura 10B, a ciclosporina A inverte a modulação negativa de GILR induzida por anti-CD3.

Estes resultados também sugerem o envolvimento de GILR no controlo da activação de células T.

g) Isolamento do cDNA de GILR humano

O homólogo humano do GILR murino foi isolado num rastreio de uma biblioteca de cDNA humano λ gt11 criada a partir de linfócitos T estimulados com PHA, utilizando como sonda o cDNA de GILR de ratinho previamente isolado. De entre os clones positivos, quatro exibiram a mesma sequência, altamente homóloga à sequência de cDNA de GILR de ratinho, e o mesmo comprimento (1946 pares de bases, Fig. 2).

Apresenta-se na Fig. 13 a sequência de cDNA do GILR humano (h-GILR). O cDNA contém uma fase de leitura com um único par de bases, começando na posição de nucleótido 241 e estendendo-se até um codão de terminação na posição 643. O GILR humano tem 86% de identidade ao nível do DNA (Fig. 14) e 94% de identidade e 97% de semelhança com o GILR de

ratinho (Fig. 15) ao nível proteico. A GILR humana é uma proteína zíper de leucina que é altamente homóloga à GILR murina e que exhibe semelhança com as proteínas TSC-22 e hDIP previamente descritas, especialmente no terminal C, onde está localizado o motivo zíper de leucina.

TABELA I

Evolução temporal da expressão de Fas/L relacionada com apoptose induzida por anti-CD3 num clone de vector vazio ou transfectado com GILR

	3h		6h		10h	
	Fas/L	Apoptose	Fas/L	Apoptose	Fas/L	Apoptose
pcDNA3(4)	0,7*	1,3	1,0	2,5	5,7	2,9
pcDNA4(4)+anti-CD3	1,2	1,7	1,1	3,7	81,1	72,0
GILR(7)	1,0	0,3	1,7	1,8	0,1	2,8
GILR(7)+anti-CD3	0,6	0,9	1,2	1,4	1,4	2,7

= Números representam a percentagem de células positivas para Fas/L em análise de Citometria de fluxo e de células que foram apoptóticas em análise de iodeto de propídio.

TABELA II

Marcadores da activação em clones transfectados com
GILR

CLONES	APOPTOSE (%)		IL-2R (%)		IL-2 (pg/ml)	
vector vazio	controlo anti-CD3		controlo anti-CD3		controlo anti-CD3	
PV5	1.7	55.7	3.3	85.2	neg.	
PV6	5.8	62.8	5.8	62.8	1200	
PVT1	5.5	59.3	1.3	87.7	neg.	
					601	
					neg.	
					555	
vector GILR	controlo anti-CD3		controlo anti-CD3		controlo anti-CD3	
ST7	6.4	39.3	6.9	32	neg.	448
SG11	2.4		6.5	13	neg.	
SG5	4.6		7.1	33.6	neg.	
ST5	6.5	41.6	4.4	28.1	neg.	339
GILR19	2.4	32.8	2.6		neg.	25
	2.6		6.4		neg.	6
	6.4					

REFERÊNCIAS

- Alderson, M.R. *et al.* (1995). *J. Exp. Med.*, 181, 71-77.
- Ausubel, F.M. *et al.* (1987-1995). Eds. *Current Protocols in Molecular Biology*.
- Ayroldi, E. *et al.* (1995). *Blood*, 86: 2672-2678.
- Ayroldi, E. *et al.*, (1997). *Blood*, 89: 3717-3726.
- Bansal, N., (1991). *FASEB J.*, 5: 211-216.
- Barinaga, M. (1993). *Science*, 262:1512-1514.
- Beg, A.A. e Baltimore, D. (1996). *Science*, 274:782-784.
- Beidler, J. *et al.*, (1995). *J. Biol. Chem.*, 270:16526-16528.
- Beutler, B. e Cerami, C. (1987). *NEJM*, 316:379-385.
- Boldin, M.P. *et al.* (1995a). *J. Biol. Chem.*, 270:337-341.
- Boldin, M.P. *et al.* (1995b). *J. Biol. Chem.*, 270:7795-7798.
- Boldin, M.P. *et al.* (1996). *Cell*, 85:803-815.
- Brakebusch, C. *et al.* (1992). *EMBO J.*, 11:943-950.
- Bursch, W. *et al.* (1992). *Trends Pharmacol. Sci.*, 13, 245-251.
- Cantor, G.H. *et al.* (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:10932-10936.
- Chen, C.J. *et al.* (1992). *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 660:271-273.
- Chinnaiyan *et al.* (1995). *Cell*, 81:505-512.
- Chirgwin, J.M. *et al.* (1979). *Biochemistry*, 18: 5294-5299.
- Cohen, J.J. (1993). *Immunol. Today*, 14: 126-130.
- Cohen, J.J. e Duke, R.C. (1984). *J. Immunol.*, 132, 38-42.
- Crisell, P. *et al.* (1993). *Nucleic Acids Res.*, 21, 5251-5255.
- D'Adamio, F. *et al.* (1997). *Immunity*, 7, 803-808.
- Dent, A.L. *et al.* (1990). *Nature*, 343: 714-719.
- Dhein, J. *et al.* (1995). *Nature*, 373: 438-441.
- Enari, M. *et al.* (1995). *Nature*, 375: 78-81.
- Fernandes-Alnemri, T. *et al.* (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 7464-7469.
- Galle, P.R. *et al.* (1995). *J. Exp. Med.*, 182: 1223-1230.
- Geysen, H.M. (1985). *Immunol. Today*, 6: 364-369.
- Geysen, H.M. *et al.* (1987). *J. Immunol. Meth.*, 102: 259-274.
- Goldstone, S.D. e Lavin, M.F. (1994). *Oncogene*, 9: 2305-2311.

- Gubler, U. & Hoffman, B.J. (1983). *Gene*, 25: 263-269.
- Henkart, P.A. (1996) *Immunity*, 4:195-201.
- Hope, I.A. & Struhl, K. (1987). *EMBO J.*, 6: 2781-2784.
- Howard, A.D. *et al.* (1991). *J. Immunol.*, 147:2964-2969.
- Hsu, H. *et al.* (1995). *Cell*, 81: 495-504.
- Hsu, H. *et al.* (1996). *Cell*, 84: 299-308.
- Itoh, N. & Nagata, S. (1993). *J. Biol. Chem.*, 268: 10932-10937.
- Itoh, N. *et al.* (1991). *Cell*, 66: 233-243.
- Jay, P. *et al.* (1996). *Biochem. Biophys. Acta*, 222: 821-826
- Jenkinson, E.J. *et al.* (1989). *Eur. J. Immunol.*, 19: 2175-2177.
- Joseph, S. & Burke, J.M. (1993) *J. Biol. Chem.*, 268: 24515-24518.
- Ju-S.T. *et al.* (1995). *Nature*, 373: 444-448.
- Kabelitz, D. *et al.* (1993). *Immunol. Today*, 14, 338-339.
- Kaufmann, S.H. (1989). *Cancer Res.* 49: 5870-5878.
- Kaufmann, S.H. (1993). *Cancer Res.* 53: 3976-3985.
- Kawamata, H., *et al.* (1998). *Br. J. Cancer*, 77: 71-78
- Kerr, J.F.R. *et al.* (1972). *Br. J. Cancer*, 26: 239-257.
- Kischkel, F.C. *et al.* (1995). *EMBO J.*, 14: 5579-5588.
- Koizumi, M. *et al.* (1993). *Biol. Pharm. Bull (Japan)* 16: 879-883.
- Kozak, M. (1989). *J. Cell. Biol.*, 108: 229-241.
- Kumar, S. (1995). *Trends Biochem Sci.*, 20: 198-202.
- Lamph, W.W. *et al.* (1988). *Nature*, 334: 629-631.
- Lazebnik, Y.A. *et al.* (1994). *Nature*, 371: 346-347.
- Los, M. *et al.* (1995). *Nature*, 375: 81-83.
- Lowe, S.W. *et al.* (1993). *Nature*, 362: 847-849.
- Malinin, N.L. *et al.* (1997). *Nature*, 385: 540-544.
- Maniatis, T. *et al.* (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York Cold Spring Harbor Laboratory.
- MacDonald, H.R. and Lees, R.K. (1990). *Nature*, 343: 642-644.
- Mashima, T. *et al.* (1995). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209: 907-915.
- Migliorati, G. *et al.* (1993). *Blood*, 81: 1352-1358.

- Milligan, C.E. *et al.* (1995). *Neuron*, 15: 385-393.
- Muranishi, S. *et al.* (1991). *Pharm. Research*, 8: 649.
- Nagata, S. e Golstein, P. (1995). *Science*, 267: 1449-1456.
- Nakashiro, K. *et al.* (1998). *Cancer Res.*, 58: 549-555.
- Nicholas, S.F. *et al.* (1991). *Cell*, 64: 739-749.
- Nicoletti, I. *et al.* (1991). *J. Immunol. Methods*, 139: 271-279.
- Nieto, M.A. *et al.* (1990). *J. Immunol.*, 145: 1364-1368.
- Nieto, M.A. e Lopez-Rivas, A. (1989). *J. Immunol.*, 143: 4166-4170.
- Ohta, S. *et al.* (1997). *Biochem. J.*, 324: 777-782.
- Osborne, B.A. e Schwartz, L.M. (1994). *Trends Cell. Biol.*, 4: 394-399.
- Piquet, P.F. *et al.* (1987). *J. Exp. Med.*, 166: 1280-1289.
- Shibanuma, M. *et al.* (1992). *J. Biol. Chem.*, 267: 10219-10224.
- Shi, Y. *et al.* (1992). *Science*, 257: 212-214.
- Shimayama, T. *et al.* (1993). *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 29: 177-178.
- Shore, S.K. *et al.* (1993). *Oncogene*, 8: 3183-3188.
- Sleath, P.R. *et al.* (1990). *J. Biol. Chem.*, 265: 14526-14528.
- Smeyne, R.J. *et al.* (1993). *Nature*, 363: 166-169.
- Smith, C.A. *et al.* (1989). *Nature*, 337: 181-184.
- Song, H.Y. *et al.* (1994). *J. Biol. Chem.*, 269: 22492-22495.
- Srinivasula, S.M. *et al.* (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 14486-14491.
- Stanger, B.Z. *et al.* (1995). *Cell*, 81: 513-523.
- Tan, Y. *et al.* (1994). *Mol. Cell. Biol.*, 14: 7546-7556.
- Tartaglia, L. A. *et al.* (1993). *Cell*, 74: 845-853.
- Tewari, M. *et al.* (1995). *J. Biol. Chem.*, 270: 3255-3260.
- Thornberry, N.A. *et al.* (1992). *Nature* 356: 768-774.
- Thornberry, N.A. *et al.* (1994). *Biochemistry* 33: 3934-3940.
- Tracey, J.T. *et al.* (1987). *Nature*, 330: 662-664.
- Van Antwerp, D.J. *et al.* (1996). *Science*, 274: 787-789.
- Vandenabeele, P. *et al.* (1995). *Trends Cell Biol.*, 5: 392-400.
- Vito, P. *et al.* (1996). *Science*, 271: 521-525.
- Vogel, P. *et al.* (1996). *Biochem. Biophys. Acta.*, 1309: 200-204.

- Wallach, D. (1986) *Em: Interferon 7* (Jon Gresser, ed.), pp. 83-122, Academic Press, Londres.
- Wallach, D. *et al.* (1994) *Cytokine*, 6: 556.
- Wang, C.-Y *et al.* (1996) *Science*, 274: 784-787.
- Watanabe, F.R. *et al.* (1992). *J. Immunol.*, 148: 1274-1279.
- Webb, S. *et al.* (1990). *Cell*, 63: 1249-1256.
- Wilks, A.F. *et al.* (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 1603-1607.
- Wyllie, A.H. (1980). *Nature*, 284: 555-556.
- Wyllie, A.H. *et al.* (1980). *Int. Rev. Cytol.*, 68: 251-306.
- Xue, D. *et al.* (1995) *Nature* 377: 248-251.
- Yamamoto, K.K. *et al.* (1988). *Nature*, 334: 494-498.
- Yang, Y. *et al.* (1995). *J. Exp. Med.*, 181: 1673-1682.
- Yonehara, S. *et al.* (1989). *J. Exp. Med.*, 169: 1747-1756.
- Zacharchuk, C.M. *et al.* (1990). *J. Immunol.*, 145: 4037-4045.
- Zaccharia, S. *et al.* (1991). *Eur. J. Pharmacol.*, 203: 353-357.
- Zhao, J.J. e Pick, L. (1993). *Nature*, 365: 448-451.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÕES GERAIS:

(i) CANDIDATO:

- (A) NOME: APPLIED RESEARCH SYSTEMS ARS HOLDING
N.V.
- (B) RUA: 14 JOHN B. GROSIRAWEG
- (C) CIDADE: CURAÇAO
- (E) PAÍS: ANTILHAS HOLANDESAS
- (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): NENHUM
- (G) TELEFONE: 639300
- (H) TELEFAX: 614129

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: MODULADORES INTRACELULARES DE VIAS DA MORTE CELULAR APOPTÓTICA

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 6

(iv) FORMA DE LEITURA EM COMPUTADOR:

- (A) TIPO DE MEIO: Disquete
- (B) COMPUTADOR: PC compatível com IBM
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) "SOFTWARE": PatentIn Tiragem #1.0, Versão #1.30 (EPO)

(2) INFORMAÇÕES PARA ID SEQ NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 1972 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) FILAMENTAÇÃO: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOME/CHAVE: CDS
- (B) LOCALIZAÇÃO: 206..616

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: ID SEQ NO: 1:

CTGGCTGCTG TGGAGTTTGT GACATACTAG GTGACACCCT TGGAGTCACT TCTCTTCAAC
60

TCCAGCTIAG AAGTGCTGC CTGGCTCAGG GTCTGCACTG CAGCCTACTC CTTGCTTCAG
120

GGCCTGACTG CAACGCCAAA GCCTATCCTA TAGCGGCAGC GCCAGCAGCC ACTCAAACCA
180

GGAGAAAGTA GTTTTGAGAT GTGATGCCAG TGTGCTCCAG AAAGTGTAAG GGGTCTGTTT
976

TTCATTTCCA TGGACATCTT CCACAGCTTC ACCTGACAAT GACTGTTCCCT ATGAAGAAGC
1036

CACTTGTGTT CTAAGCAGAA GCAACCTCTC TCTTCTTCCT CTGTCTTTTC CAGGCAGGGG
1096

CAGAGATGGG AGACATTGAG CCAAATGAGC CTTCTGTTGG TTAATACTGT ATAATGCATG
1156

GCTTTGTGCA CAGCCCAGTG TGGGGTTACA GCTTTGGGAT GACTGCTTAT AAAGTTCTGT
1216

TTGGTTAGTA TTGGCATCGT TTTTCTATAT AGCCATAATG CGTATATATA CCCATAGGGC
1276

TAGATCTATA TCTTAGGGTA GTGATGTATA CATATACACA TACACCTACA TGTGAAGGG
1336

CCTAACCAGC TTTGGGAGTA CTGACTGGTC TCTTATCTCT TAAAGCTAAG TTTTGGACTG
1396

TGCTAATTTA CCAAATTGAT CCAGTTTGTG CTTTAGATTA AATAAGACTC GATATGAGGG
1456

AGGGAGGGGA AGACCAGCCT CACAATGCGG CCACAGATGC CTFGCTGCTG CAGTCCCTCC
1516

TGATCTGTCC ACTGAAGACA TGAAGTCCTC TTTTGAATGC CAAACCCACC ATTCATTGCT
1576

GCTGACTACA TAGAATGGGG TTGACAGAAG ATCAGTTTGG ACTTCACATT TTTGTTTTAA
1636

GTTTTAGGTT GTTTTTTTTT GGTITTTGTTT GTTTGTTCGT TTGTTTGTTT TTGTTTTTTG
1696

TTTTTCTTTT TTAAGTTCTT GTGGGGAAC TTTGGGGTTA ATCAAAGCAT GTAGTCCCTGT
1756

GGTAGACCAG AGGAGTAACT AGTTTTGATC CTTTGGGGTC TGGAAAATGT ACCCAGGAAG
1816

CTTGTGTAAG GAGGTTCTGT GACAGTGAAC ACTTTCACCT TTCTGACACC TCATCCTGCT
1876

GTACGACTCC AGGATTTGGA TTTGCATTTT TCAAATGTAG CTTCAARTTT CAATAAACTT
1936

TGCTCCTTTT TCTAAAAATA AAAAAAAAAA AAAAAA
1972

(2) INFORMAÇÕES PARA ID SEQ NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 137 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: ID SEQ NO: 2:

```

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

```

(2) INFORMAÇÕES PARA ID SEQ NO: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 20 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) FILAMENTAÇÃO: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: característica_diversa

(B) LOCALIZAÇÃO: 1..20

(D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /nota = ""primer" directo
de PCR"

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: ID SEQ NO: 3:

CCATCTGGGT CCACTCCAGT
20

(2) INFORMAÇÕES PARA ID SEQ NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) FILAMENTAÇÃO: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: característica_diversa

(B) LOCALIZAÇÃO: 1..20

(D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /nota = ""primer" reverso
de PCR"

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: ID SEQ NO: 4:

AGGACAGTGG GAGTGGCACC
20

(2) INFORMAÇÕES PARA ID SEQ NO: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 1946 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) FILAMENTAÇÃO: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOME/CHAVE: CDS
- (B) LOCALIZAÇÃO: 241..642

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: ID SEQ NO: 5:

AATCCGGGG CCGTGGAGTT TGTGACATAC GAGGTGACAC CCCTCGAGTC ACTTCCCTTC
60

AACTCCAGCT GGAGCGCCTG CTGGGCTTTG GGTTCGTTCT GCAGCCTTG CCCCCTCCT
120

AGCCTCAGGG CCGGACTCCA GCGCAGAGCC CAGCCCAGCG CAGCCTGCCA GCAGCCACCC
180

AGCGGCCAG CCGCCAGCC CCGCACGAA CCCGGCCAGA GCTTCTAGC AGCCCGAGCC
240

ATG AAC ACC GAA ATG TAT CAG ACC CCC ATG GAG GTG GCG GTC TAC CAG
 288
 Met Asn Thr Glu Met Tyr Gln Thr Pro Met Glu Val Ala Val Tyr Gln
 5 10 15

CTG CAC AAT TTC TCC ATC TCC TTC TTC TCT TCT CTG CTT GGA GGG GAT
 336
 Leu His Asn Phe Ser Ile Ser Phe Phe Ser Ser Leu Leu Gly Gly Asp
 20 25 30

GTG GTT TCC GTT AAG CTG GAC AAC AGT GCC TCC GGA GCC AGC GTG GTG
 384
 Val Val Ser Val Lys Leu Asp Asn Ser Ala Ser Gly Ala Ser Val Val
 35 40 45

GCC ATA GAC AAC AAG ATC GAA CAG GCC ATG GAT CTG GTG AAG AAT CAT
 432
 Ala Ile Asp Asn Lys Ile Glu Gln Ala Met Asp Leu Val Lys Asn His
 50 55 60

CTG ATG TAT GCT GTG AGA GAG GAG GTG GAG ATC CTG AAG GAG CAG ATC
 480
 Leu Met Tyr Ala Val Arg Glu Glu Val Glu Ile Leu Lys Glu Gln Ile
 65 70 75 80

CGA GAG CTG GTG GAG AAG AAC TCC CAG CTA GAG CGT GAG AAC ACC CTG
 528
 Arg Glu Leu Val Glu Lys Asn Ser Gln Leu Glu Arg Glu Asn Thr Leu
 85 90 95

TTG AAG ACC CTG GCA AGC CCA GAG CAG CTG GAG AAG TTC CAG TCC TGT
 576
 Leu Lys Thr Leu Ala Ser Pro Glu Gln Leu Glu Lys Phe Gln Ser Cys
 100 105 110

CTG AGC CCT GAA GAG CCA GCT CCC GAA TCC CCA CAA GTG CCC GAG GCC
 624
 Leu Ser Pro Glu Glu Pro Ala Pro Glu Ser Pro Gln Val Pro Glu Ala
 115 120 125

CCT GGT GGT TCT GCG GTG TAAGTGGCTC TGTCTCAGG GTGGGCAGAG
 672
 Pro Gly Gly Ser Ala Val
 130

CCACTAAACT TGTTTTACCT AGTTCCTTCC AGTTTGTTTT TGGCTCCCCA AGCATCATCT
 732

CACGAGGAGA ACTTTACACC TAGCACAGCT GGTGCCAAGA GATGTCTTAA GGACATGGCC
 792

ACCTGGGTCC ACTCCAGCGA CAGACCCCTG ACAAGAGCAG GTCTCTGGAG GCTGAGTTGC
 852

ATGGGGCCTA GTAACACCAA GCCAGTGAGC CTCTAATGCT ACTGCCCCCT GGGGGCTCCC
 912

AGGGCCTGGG CAACTTAGCT GCAACTGGCA AAGGAGAAGG GTAGTTTGAG GTGTGACACC
 972

AGTTTGCTCC AGAAAGTTA AGGGGTCTGT TTCTCATCTC CATGGACATC TTCAACAGCT
1032

TCACCTGACA ACGACTGTTC CTATGAAGAA GCCACTTGTG TTTAAGCAG AGGCAACCTC
1092

TCTCTTCTCC TCTGTTTCGT GAAGGCAGGG GACACAGATG GGAGAGATTG AGCCAAGTCA
1152

GCCTTCTGTT GGTAAATATG GTATAATGCA TGGCTTTGTG CACAGCCCAG TGTGGGATTA
1212

CAGCTTTGGG ATGACCGCTT ACRAAGTCT GTTTGGTTAG TATTGGCATA GTTTTCTAT
1272

ATAGCCATAA ATGCGFATAT ATACCCATAG GGCTAGATCT GTATCTTAGT GTAGCGATGT
1332

ATACATATAC ACATCCACCT ACATGTTGAA GGGCCTAACC ACCCTTGGGA GTATTGACTG
1392

GTCCCTTACC TCTTATGGCT AAGTCTTTGA CTGTGTTTAT TTACCAAGTT GACCCAGTTT
1452

GTCTTTTAGG TTAAGTAAGA ACTCGAGAGT AAAGGCAAGG AGGGGGGCCA GCCTCTGAAT
1512

GGGGCCACGG ATGCCTTGCT GCTGCAACCC TTTCCCAGC TGTCCACTGA AACGTGAAGT
1572

CCTGTTTTGA ATGCCAAACC CACCATTAC TGGTGTGAC TACATAGAAT GGGTTGAGAG
1632

AAGATCAGTT TGGGCTTAC AGTGTCAATT GAAAAGCGT TTTTGTTTG TTTTGAATTA
1692

TTGTGAAAA CTTTCAAGTG AACAGAAGGA TGGTGTCTTA CTGTGGATGA GGCATGAACA
1752

AGGGCATGGC TTTGATCCAA TGGAGCCTGG GAGGTGTGCC CAGAAAGCTT GTCTGTAGCG
1812

GGTTTTGTGA GAGTGAACAC TTTCCACTT TGCACACCTT ATCCTGATGT ATGGTTCCAG
1872

GATTTGGATT TTGATTTCC AATGTAGCT TGAAATTTCA ATAAACTTTG CTCTGTTTTT
1932

CTAAAAATA AAAA
1946

(2) INFORMAÇÕES PARA ID SEQ NO: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 134 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: ID SEQ NO: 6:

```

Met Asn Thr Glu Met Tyr Gln Thr Pro Met Glu Val Ala Val Tyr Gln
 1           5           10           15

Leu His Asn Phe Ser Ile Ser Phe Phe Ser Ser Leu Leu Gly Gly Asp
           20           25           30

Val Val Ser Val Lys Leu Asp Asn Ser Ala Ser Gly Ala Ser Val Val
           35           40           45

Ala Ile Asp Asn Lys Ile Glu Gln Ala Met Asp Leu Val Lys Asn His
 50           55           60

Leu Met Tyr Ala Val Arg Glu Glu Val Glu Ile Leu Lys Glu Gln Ile
 65           70           75           80

Arg Glu Leu Val Glu Lys Asn Ser Gln Leu Glu Arg Glu Asn Thr Leu
           85           90           95

Leu Lys Thr Leu Ala Ser Pro Glu Gln Leu Glu Lys Phe Gln Ser Cys
           100           105           110

Leu Ser Pro Glu Glu Pro Ala Pro Glu Ser Pro Gln Val Pro Glu Ala
 115           120           125

Pro Gly Gly Ser Ala Val
 130
  
```

Lisboa, 29 de Fevereiro de 2008

REIVINDICAÇÕES

1. Sequência de DNA isolada que codifica uma proteína relacionada com a família de zíperes de leucina induzidos por glucocorticóides (GILR), respectivas isoformas, fragmentos ou análogos, em que a referida GILR, respectivas isoformas, fragmentos ou análogos são capazes de inibir a apoptose induzida por TCR/CD3 e/ou Fas/Fas-L e de estimular a actividade de linfócitos, e que incluem não mais do que dez alterações de aminoácidos em comparação com a ID SEQ NO: 2 ou ID SEQ NO: 6.
2. Sequência de DNA isolada de acordo com a Reivindicação 1 seleccionada do grupo que consiste em:
 - (a) uma sequência de cDNA derivada da região codificadora de uma proteína GILR nativa;
 - (b) sequências de DNA capazes de hibridizar para uma sequência de (a) em condições moderadamente restritas, e
 - (c) sequências de DNA que são degeneradas, em resultado do código genético, com as sequências de DNA definidas em (a) e (b).
3. Sequência de DNA isolada de acordo com a Reivindicação 1 ou Reivindicação 2 que compreende pelo menos parte da sequência de DNA ID SEQ NO: 1.
4. Sequência de DNA isolada de acordo com a Reivindicação 3 que codifica uma proteína GILR, isoforma, análogo ou fragmento que tem pelo menos parte da sequência de aminoácidos ID SEQ NO: 2.

5. Sequência de DNA isolada de acordo com a Reivindicação 1 ou Reivindicação 2 que compreende pelo menos parte da sequência de DNA ID SEQ NO: 5.
6. Sequência de DNA isolada de acordo com a Reivindicação 5 que codifica uma proteína GILR humana, isoforma, análogo ou fragmento que tem pelo menos parte da sequência de aminoácidos ID SEQ NO: 6.
7. Vector que compreende uma sequência de DNA de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 - 6.
8. Vector de acordo com a Reivindicação 7 apto a ser expresso numa célula-hospedeiro eucariótica.
9. Vector de acordo com a Reivindicação 7 apto a ser expresso numa célula-hospedeiro procariótica.
10. Células-hospedeiro eucarióticas ou procarióticas transformadas isoladas que contêm um vector de acordo com qualquer uma das Reivindicações 7 - 9.
11. Proteína GILR isolada, respectiva isoforma, fragmento, análogos ou derivados, em que a referida proteína, respectiva isoforma, fragmento, análogos e derivados são capazes de inibir a apoptose induzida por TCR/CD3 e/ou Fas/Fas-L e de estimular a actividade de linfócitos, e que incluem não mais do que dez alterações de aminoácidos em comparação com a ID SEQ NO: 2 ou ID SEQ NO: 6.
12. Proteína GILR isolada com a sequência de aminoácidos da ID SEQ NO: 2 ou ID SEQ NO: 6.

13. Processo para a preparação da proteína GILR, respectiva isoforma, fragmento, análogos ou derivados de acordo com a Reivindicação 11 ou 12, que compreende fazer crescer as células-hospedeiro transformadas de acordo com a Reivindicação 10 em condições adequadas para a expressão das referidas proteínas, análogos ou derivados, efectuar modificações pós-tradução consoante o necessário para obter a referida proteína, fragmentos, análogos ou derivados e isolar a referida proteína, fragmentos, análogos ou derivados expressos.
14. Anticorpos ou respectivos fragmentos activos ou derivados, específicos para a proteína GILR, isoforma, fragmento, análogos ou derivados de acordo com a Reivindicação 11 ou 12.
15. Método para conferir a células T em cultura de células resistência a apoptose induzida por TCR/CD3 e/ou Fas/Fas-L utilizando uma ou mais proteínas GILR, isoformas, fragmentos, análogos ou derivados de acordo com a Reivindicação 11 ou 12, que compreende introduzir nas referidas células as referidas uma ou mais proteínas, isoformas, análogos, fragmentos ou derivados numa forma adequada para a sua introdução intracelular, ou introduzir nas referidas células uma sequência de DNA que codifica as referidas uma ou mais proteínas, isoformas, análogos, fragmentos ou derivados na forma de um vector adequado que contém a referida sequência, em que o referido vector é capaz de proceder à inserção da referida sequência nas referidas células de modo que a referida sequência seja expressa nas referidas células.

16. Método de acordo com a Reivindicação 15 em que as referidas células são transfectadas com um vector de vírus animal recombinante, que compreende os passos seguintes:

(a) construir um vector de vírus animal recombinante contendo uma sequência que codifica uma proteína da superfície viral (ligando) que é capaz de se ligar a um receptor específico da superfície celular na superfície das referidas células, e uma segunda sequência que codifica uma proteína seleccionada de entre a proteína GILR, isoformas, análogos, fragmentos e derivados de acordo com a Reivindicação 11 ou 12, que, quando expressa nas referidas células, é capaz de inibir a apoptose induzida por TCR/CD3 e/ou Fas/Fas-L, e

(b) infectar as referidas células com o referido vector de (a).

17. Método para intensificar a apoptose induzida por TCR/CD3 e/ou Fas/Fas-L em células T em cultura de células utilizando os anticorpos ou fragmentos activos ou derivados de acordo com a Reivindicação 14, que compreende introduzir nas referidas células os referidos anticorpos, fragmentos activos ou derivados numa forma adequada para introdução intracelular.

18. Método para intensificar a apoptose induzida por TCR/CD3 e/ou induzida por Fas/Fas-L em células T em cultura de células utilizando uma sequência oligonucleotídica que é anti-sentido para pelo menos parte da sequência de DNA que codifica uma proteína GILR de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 - 6, em que a referida sequência oligonucleotídica é

capaz de bloquear a expressão da referida proteína GILR, que compreende introduzir o referido oligonucleótido nas referidas células numa forma adequada para introdução intracelular.

19. Método de acordo com a Reivindicação 18, em que a referida sequência oligonucleotídica é introduzida nas referidas células via um vírus da Reivindicação 16, em que a referida segunda sequência do referido vírus codifica a referida sequência oligonucleotídica.
20. Método de acordo com as Reivindicações 17 - 19, em que as referidas células T são células tumorais ou infectadas com o HIV.
21. Processo para isolar e identificar proteínas, de acordo com a Reivindicação 11 ou 12, que são proteínas do tipo GILR pertencentes à família de zíperes de leucina ou que são proteínas capazes de se ligar directamente à GILR, que compreende aplicar o procedimento de dois híbridos de levedura no qual uma sequência que codifica a referida GILR está contida num vector híbrido e uma sequência de uma biblioteca de cDNA ou DNA genómico está contida no segundo vector híbrido, em que os vectores são depois utilizados para transformar células-hospedeiro de levedura e as células transformadas positivas são isoladas, seguido de extracção do referido segundo vector híbrido para obter uma sequência que codifica uma proteína que se liga à referida GILR.
22. Composição farmacêutica para a inibição de apoptose induzida por TCR/CD3 e/ou induzida por Fas/Fas-L em

células ou para estimular a activação de linfócitos, que compreende, como ingrediente activo, pelo menos uma proteína GILR, isoforma, fragmentos, análogos, derivados de acordo com a Reivindicação 11 ou 12 ou respectivas misturas.

23. Composição farmacêutica para a inibição de apoptose induzida por TCR/CD3 e/ou induzida por Fas/Fas-L em células ou para estimular a activação de linfócitos, que compreende, como ingrediente activo, um vector de vírus animal recombinante que codifica uma proteína capaz de se ligar a um receptor da superfície celular e que codifica pelo menos uma proteína GILR, isoforma, fragmentos activos ou análogos de acordo com a Reivindicação 11 ou 12.
24. Composição farmacêutica para intensificar a apoptose induzida por TCR/CD3 e/ou induzida por Fas/Fas-L em células T que compreende, como ingrediente activo, um anticorpo, fragmento activo ou derivado de acordo com a Reivindicação 14.
25. Composição farmacêutica para intensificar a apoptose induzida por TCR/CD3 e/ou induzida por Fas/Fas-L em células T que compreende, como ingrediente activo, uma sequência oligonucleotídica que é anti-sentido para pelo menos parte da sequência de DNA que codifica uma proteína GILR de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 - 6.

26. Proteína GILR de acordo com qualquer uma das Reivindicações 11 ou 12 para utilização como medicamento.

Lisboa, 29 de Fevereiro de 2008

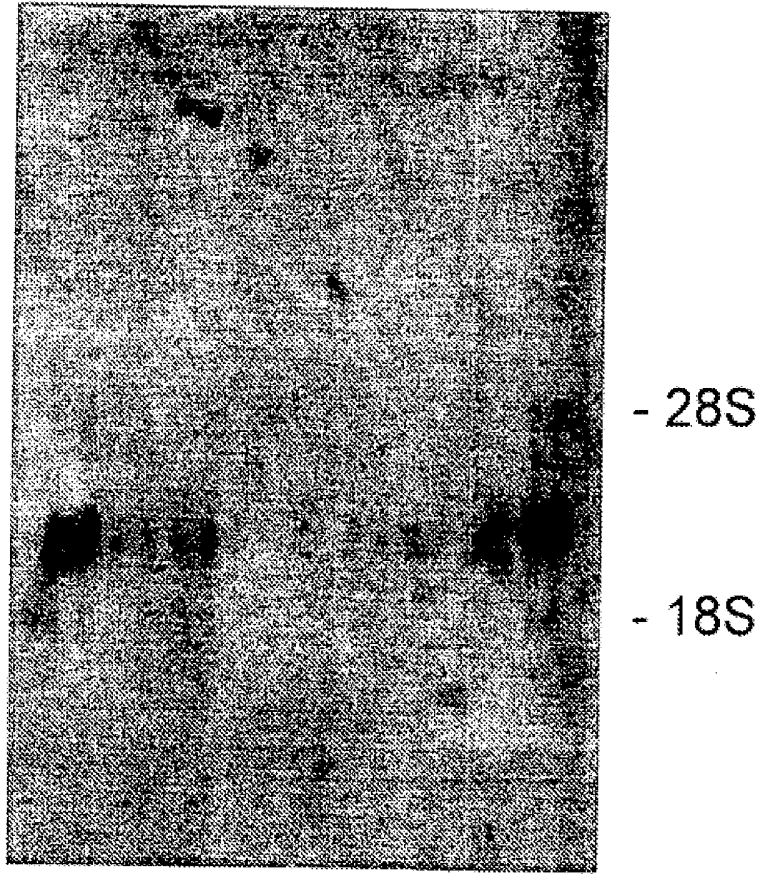


Fig. 1A

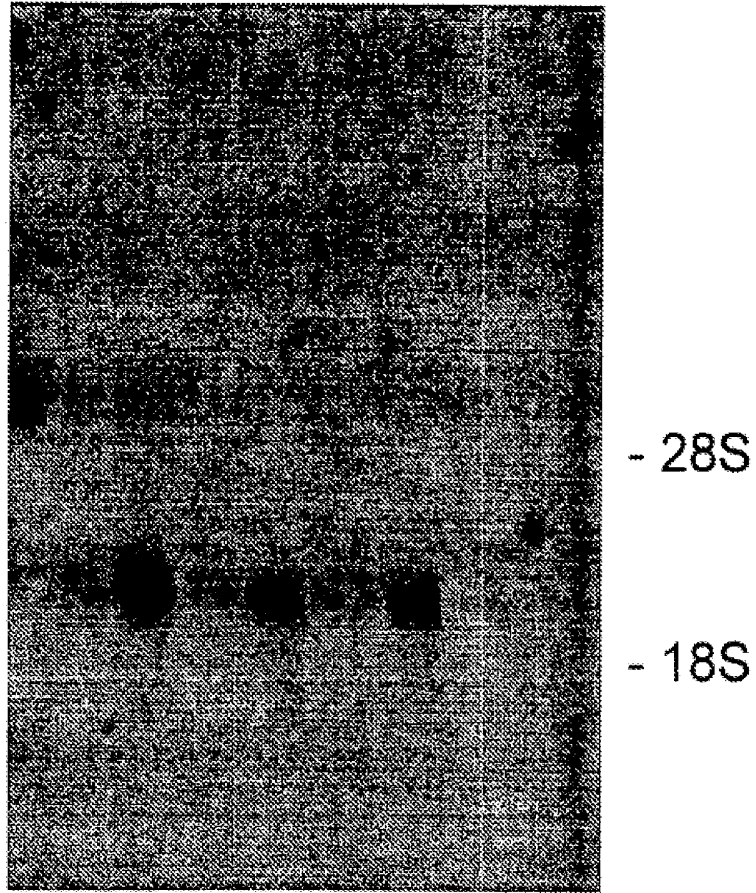


Fig. 1B

1 CTGGCTGCTGTGGAGTTTGTGACATACTAGGTGACACCCTTGGAGTCACTTC
53 TCTTCAACTCCAGCTTAGAAGTGCCTGCCTGGCTCAGGGTCTGCACTGCAGCCTACTCCT
113 TGCTTCAGGGCCTGACTGCAACGCCAAAGCCTATCCTATAGCGGCAGCGCCAGCAGCCAC
173 TCAAACCAGCCACROCTCCCGGCAACCCGACCCATGAACACCCGAAATGTATCAGACCCCC
MetAsnThrGluMetTyrGlnThrPro
233 ATGGAGSTGGCGGTCTATCAGCTGCACAATTTCTCCACCTCCTTCTTTCTCTCTGCTT
MetGluValAlaValTyrGlnLeuHisAsnPheSerThrSerPhePheSerSerLeuLeu
293 GGAGGGATGTGTTTCCGTTAACTGGATAACAGTGCCTCCGGAGCCAGTGTGGTGGCC
GlyGlyAspValValSerValLysLeuAspAsnSerAlaSerGlyAlaSerValValAla
353 CTAGACAACAAGATTGAGCAGGCCATGCACCTCGTGAAGAACCACCTGATGTACCGTGTG
LeuAspAsnLysIleGluGlnAlaMetAspLeuValLysAsnHisLeuMetTyrAlaVal
413 AGACAGSAGGTGGAGTCCCTAABGGAGCAGATTCCGTGAGCTGCTTGAGAAGAACTCCAG
ArgGluGluValGluValLeuLysGluGlnIleArgGluLeuLeuGluLysAsnSerGln
473 CTGGAGCGGAGAACACCCTCCTEAAGACGCTGCCAAGCCCGAGCAACTGGAAAAGTTC
LeuGluArgGluLeuThrLeuLeuLysThrLeuAlaSerProGluGlnLeuGluLysPhe
533 CAGTCCCGGCTGAGCCCTGAAGAGCCAGCACCTGARGCCCCAGAAACCCCGAAAACCCCG
GlnSerArgLeuSerProGluGluProAlaProGluAlaProGluThrProGluThrPro
593 GAAGCCCCCTGGTGGTCTGCGGTGTAAGTGGCTCTGTCTTAGGGTGGGCAGAGCCACAT
GluAlaProGlyGlySerAlaVal *
653 CTGTTCTACCTACTTCTTTCCAGTTTGTTTTTGGCTCCCCAAGGGTCACTCTCATGTGGA
713 GAACTTTACACCTAACATAGCTGCTGCCAAGAGATGTCCCAAGGACATGCCCATCTGGGT
773 CCACTCCAGTGACAGACCCCTGACAAAGAGCAGGTCTCTGGAGACTAAGTTGCATGGGGC
833 CTAGTAACACCAAGCCAGTGACCCTGTGCTGCACCGGCCCTGGGGCTCCAGGGCTG
893 GGCAACTTAGTTACAGCTGACCAAGGAGAAAGTAGTTTTGAGATGTGATGCCAGTGTGCT
953 CCAGAAAGTGTAAGGGGTCTGTTTTTCATTTCCATEGACATCTTCCACAGCTTCACTGA
1013 CAATGACTGTTCCCTATGAAGRAGCCACTGTGTTCTAAGCAGAAGCAACCTCTCTTCT
1073 TCCTCTGCTTTTCCAGGCAGGGGCAGAGATGGGAGGATTGAGCCAAATGAGCCTTCTG
1113 TTGGTTAATACTGTATAATGCATGGCTTTGTGCACAGCCAGTGTGGGGTTACAGCTTTG
1193 GGATGACTGCTTATAAAGTCTGTTTGGTTAGTATTGGCATCGTTTTTCTATATAGCCAT
1253 AATGCGTATATATACCATAGGGCTAGATCTATATCTTAGGCTAGTGATGTATACATATA
1313 CACATACACCTACATGTTGAAGGGCCTAACCCAGCTTTGGGAGTACTGACTGGTCTCTTAT
1373 CTCTAAAGCTAAGTTTTTGACTGTGCTAATTTACCAAATGATCCAGTTTGTCTTTAG
1433 ATTAATAAGACTCGATATGAGGGAGGGAGGGGAAGCCAGCCCTCACAAATGGGGCCACAG
1493 ATGECCTTGCTGCTGCAGTCTCCCTGATCTGTCCACTGAAGACATGAAGTCTCTTTGA
1553 ATGCCAAACCCACCATTTCATTTGCTGCTGACTACATAGAAATGGGGTTGAGAGAAGATCAGT
1613 TTGGACTTCACATTTTGTFTTAAAGTTTTAGGTTGTTTTTTTTGGTTTTGTTTGT
1673 TTGTTTGTTTGTTTTGTTTTGTTTTTCTTTTTTAAGTTCTTGTGGGGAACCTTGGG
1733 GTTAATCAAAGGATGTAGTCTCTGTGGTAGACCAGAGGTAAGTACTTTTTGATCCTTTGG
1793 GGTGTGGAAAATGTACCCAGGAAGCTTGTGTAAGGAGTTCTGTGACAGTGAACACTTTC
1853 CACTTTCTGACACCTCATCTGCTGTACGACTCCAGGATTTGGATTTGGATTTTCAAAT
1913 GTAGCTTGAATTTCAATAAAGCTTTGCTCTTTTTCTAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Fig. 2

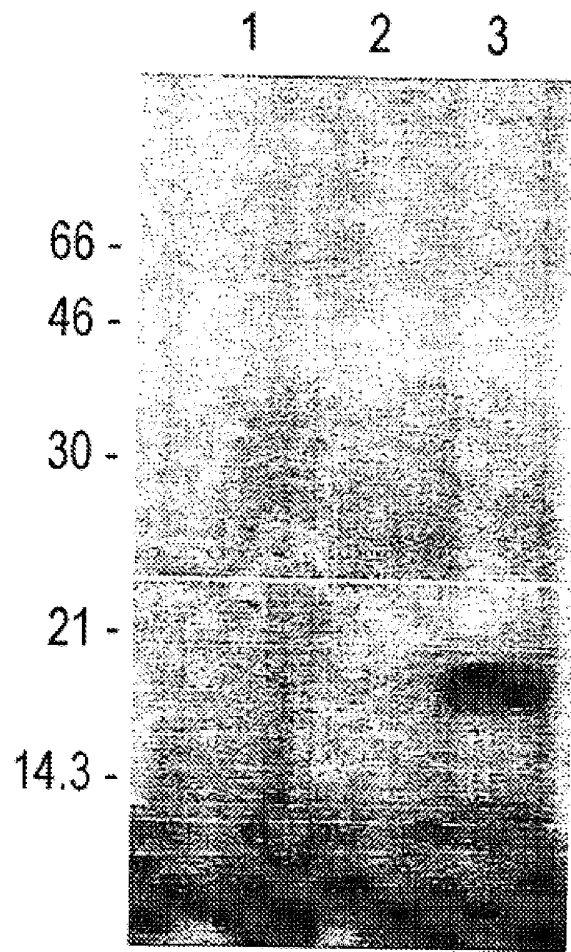


Fig. 3A

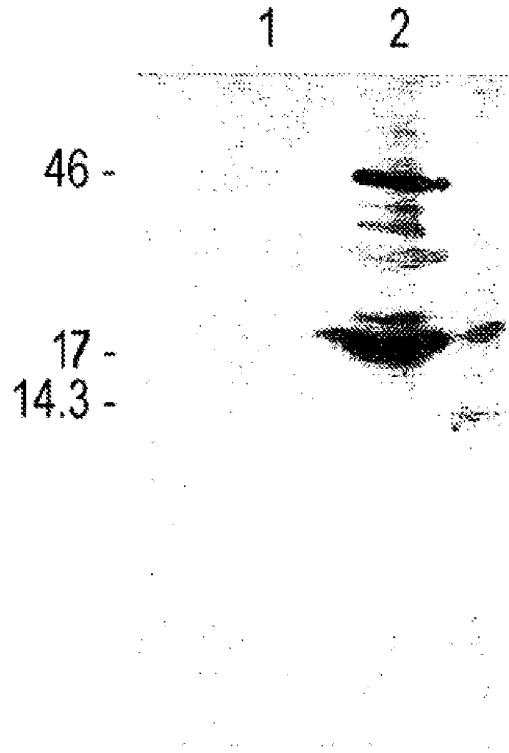


Fig. 3B

6/20

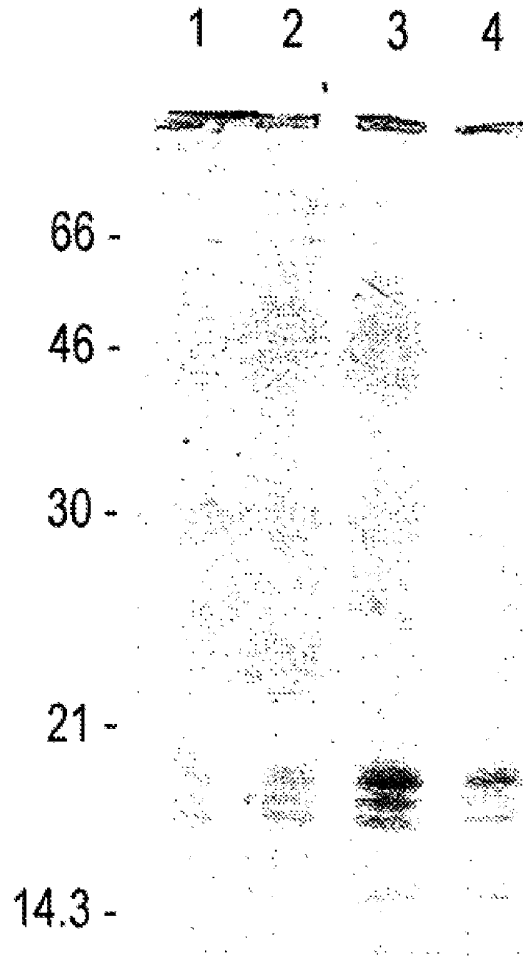


Fig. 3C

GILR	L	K	E	Q	I	R	E	L	L	E	K	N	S	Q	L	E	R	E	N	T	L	L	K	T	L	A
TSC-22	L	K	E	Q	I	K	E	L	I	E	K	N	S	Q	L	E	Q	E	N	D	L	L	K	T	L	A
GCN4	L	E	D	K	V	E	E	L	L	S	K	N	Y	H	L	E	N	E	V	A	R	L	K	K	L	V
CREB	L	E	N	R	V	A	V	L	E	N	Q	N	K	T	L	I	E	E	L	K	A	L	K	D	L	Y
CREM	L	E	N	R	V	A	V	L	E	N	Q	N	K	T	L	I	E	E	L	K	A	L	K	D	L	Y
c-jun	L	E	E	K	V	K	T	L	K	A	Q	N	S	E	L	A	S	T	A	N	M	L	R	E	Q	V

Fig. 4

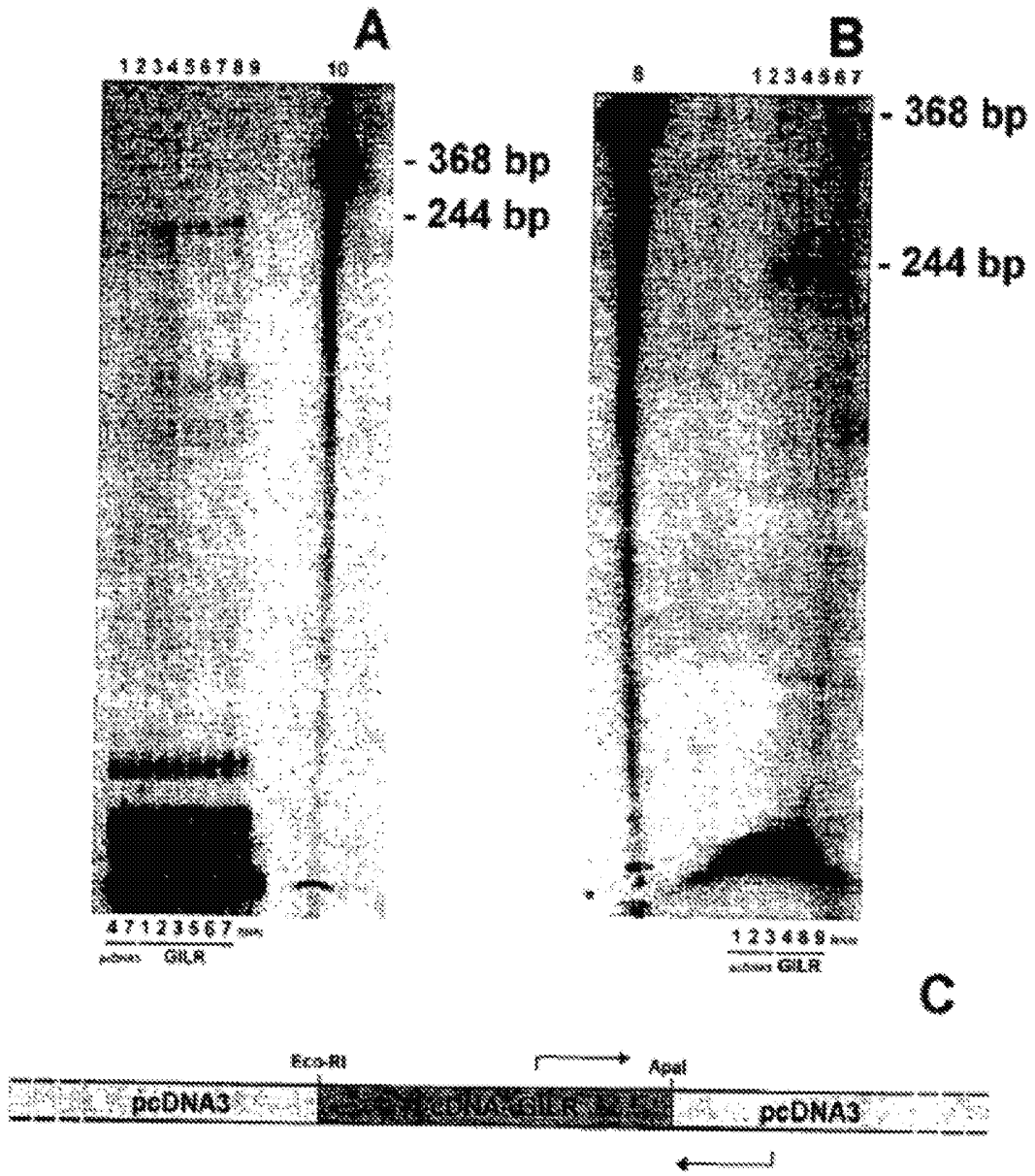


Fig. 5

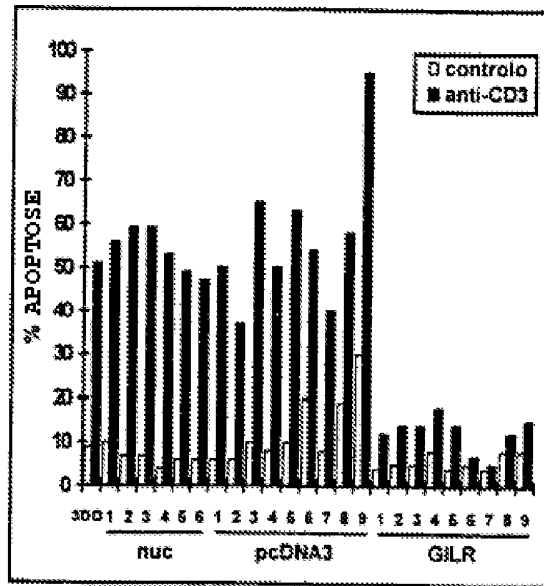


Fig. 6

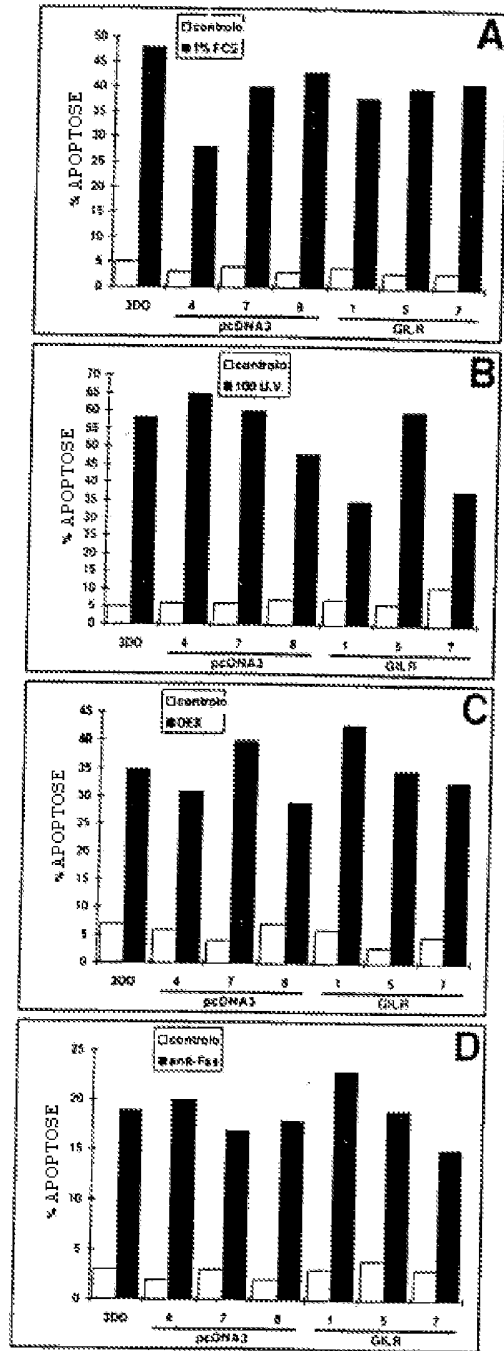


Fig. 7

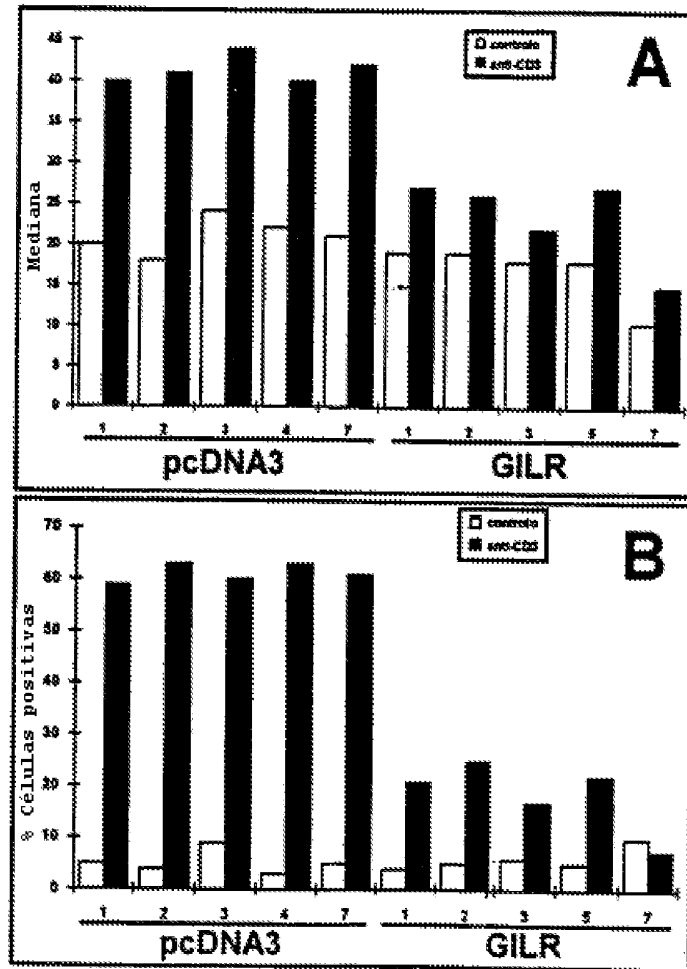


Fig. 8

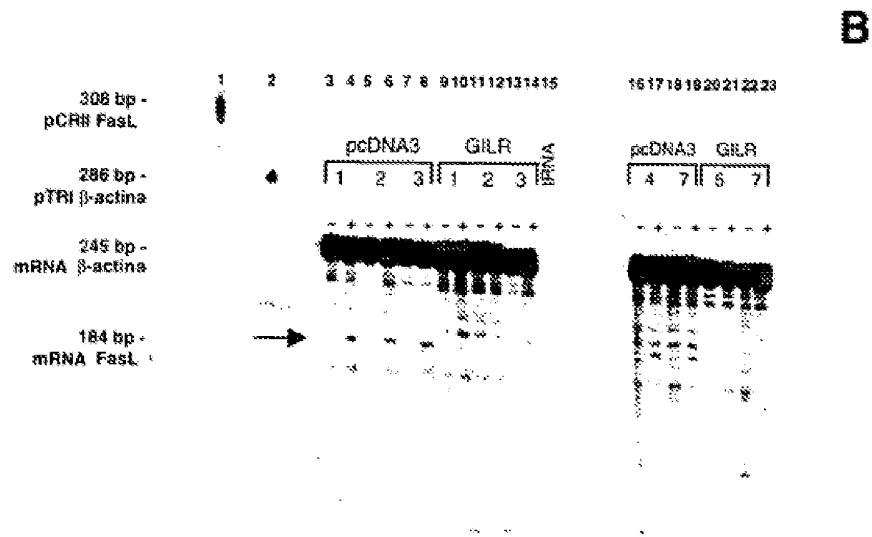
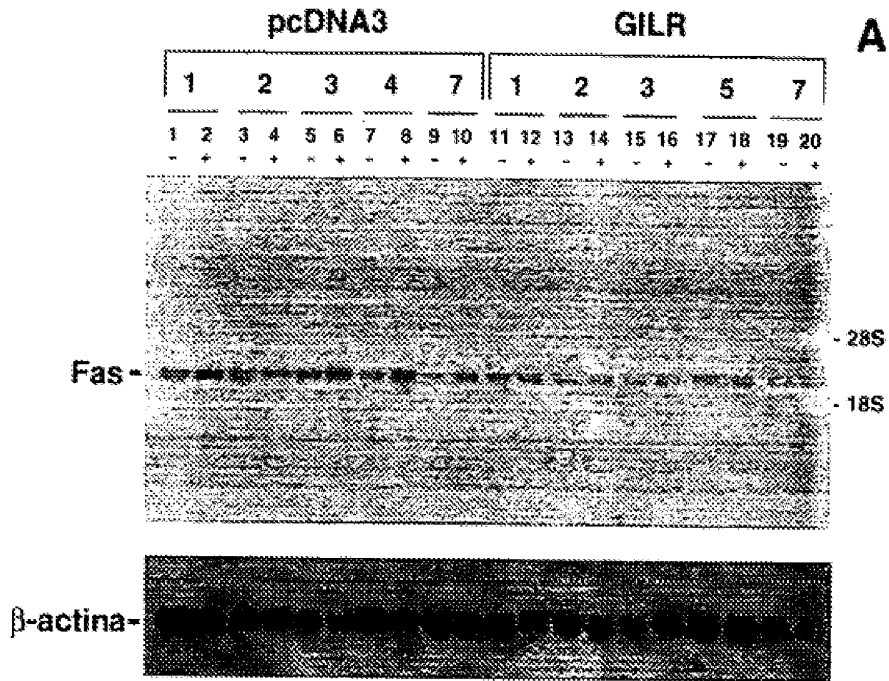
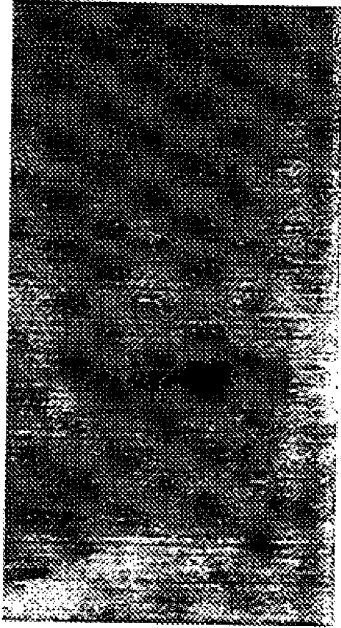
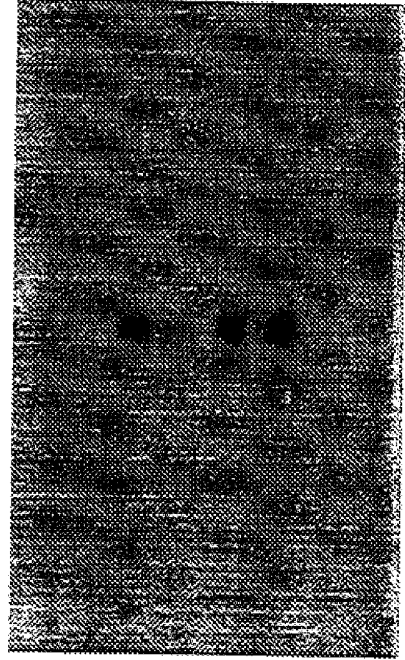


Fig 9



A



B

Fig. 10

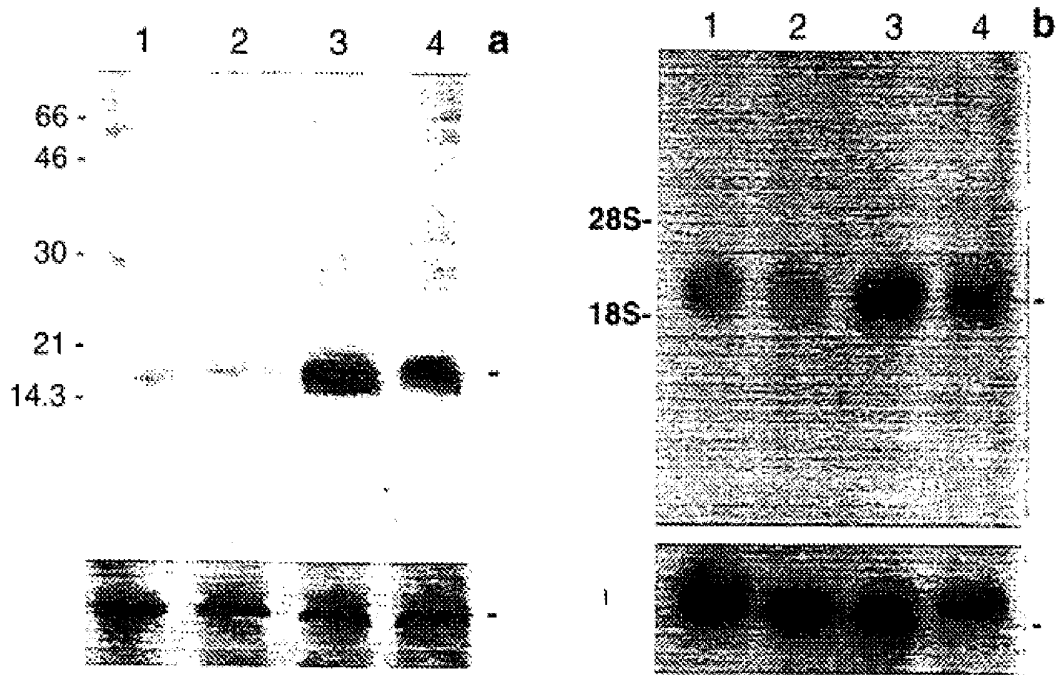


Fig. 11

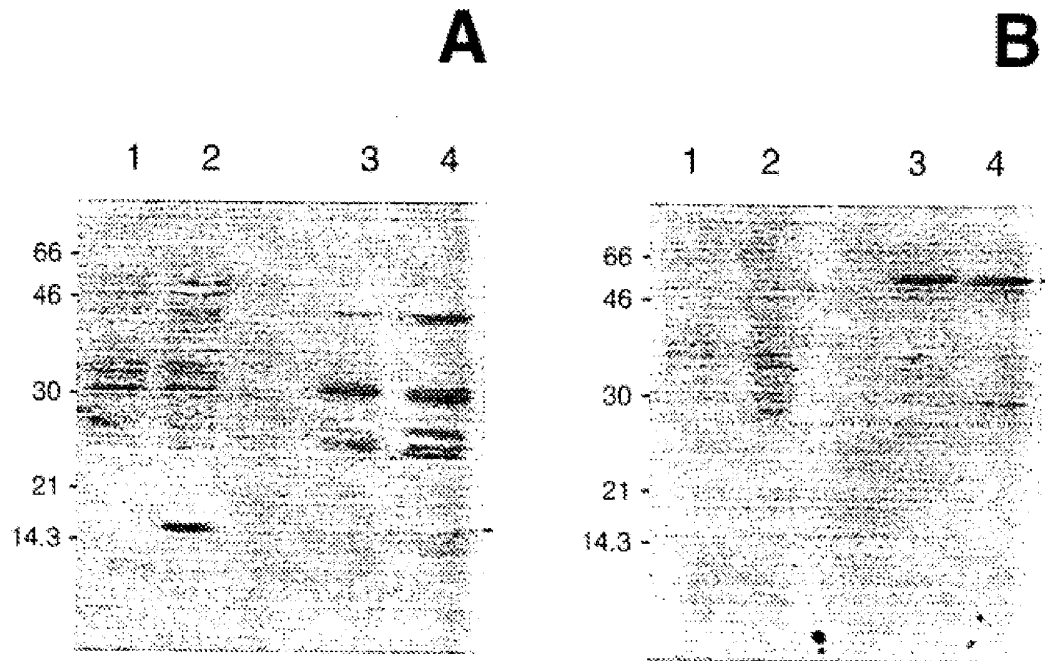


Fig. 12

1 AATTCGGGGCCCGTGGAGTTTGTGACATACGAGGTGACACCCCTCGAGTCACTTCCCTTC
 61 AACTCCAGCTGGAGCCCTGCTTGGCTTTGGTTTCGTTCTGCAGCCTTGGCCCCGCTCCT
 121 AGCCTCAGGGCCGACTCCAGCGCAGAGCCCAGCCAGCGCAGCCTGCCAGCAGCCACCC
 181 AGCCGCCAGCCGCCAGCCCCSCACGAAACCCGGCCAGAGCTTCTAGCAGCCCGAGCC
 241 ATGAACACCGAAATGTATCAGACCCCATGGAGGTGGCGGTCTACCAGCTGCACAATTC
 MetAsnThrGluMetTyrGlnThrProMetGluValAlaValTyrGlnLeuHisAsnPhe

 301 TCCATCTCCTTCTTCTTCTGCTTGGAGGGATGTGGTTTCCGTTAAGCTGGACAAC
 SerIleSerPhePheSerSerLeuLeuGlyGlyAspValValSerValLysLeuAspAsn

 361 AGTGCCTCCGGAGCCAGCGTGGTGGCCATAGACAACAAGATCGAACAGGCCATGGATCTG
 SerAlaSerGlyAlaSerValValAlaIleAspAsnLysIleAspGlnAlaMetAspLeu

 421 GTGAAGAATCATCTGATGTATGCTGTGAGAGAGGAGGTGGAGATCCTGAAGGAGCAGATC
 ValLysAsnHisLeuMetTyrAlaValArgGluGluValGluIleLeuLysGluGlnIle

 481 CGAGAGCTGGTGGAGAAGAACTCCAGCTAGAGCGTGAAGAACCCCTGTGAAGACCCCTG
 ArgGluLeuValGluLysAsnSerGlnLeuGluArgGluAsnThrLeuLeuLysThrLeu

 541 GCAAGCCAGAGCAGCTGGAGAAGTTCCAGTCTCTGCTGAGCCCTGAAGAGCCAGCTCCC
 AlaSerProGluGlnLeuGluLysPheGlnSerCysLeuSerProGluGluProAlaPro

 601 GAATCCCCACAAGTGCCCGAGGCCCTCGTGGTTCTGCGGTGTAAGTGGCTCTGTCTCA
 GluSerProGlnValProGluAlaProGlyGlySerAlaVal *

 661 GGGTGGCCAGAGCCACTAAACTTGTTTTACCTAGTTCCTTTCCAGTTTGTFTTTGGCTCCC
 721 CAAGCATCATCTCAGGAGGAGACTTTACACCTAGCACAGCTGGTGCCAAGAGATGTCTCT
 781 AAGGACATGGCCACCTGGGTCCACTCCAGCGACAGACCCCTGACAAGAGCAGGTCTCTGG
 841 AGGCTGAGTTGCATGGGGCCTAGTAACACCAAGCCAGTGAGCCTCTAATGCTACTGGCC
 901 CTGGGGGCTFCCCAGGGCCTGGGCAACTTAGCTGCAACGGCAAGGAGAGGGTAGTTTG
 961 AGGTGTGACACCAGTTTGTCCAGAAAGTTTAAGGGGTCTGTTTCTCATCTCCATGGACA
 1021 TCTTCAACAGCTTCACCTGACAACCGACTGTTCCATGAAGAAGCCACTTGTGTTTTAAGC
 1081 AGAGGCAACCTCTCTCTTCTCTCTGTTTCCTGAAGGCAGGGGACACAGATGGGAGAGAT
 1141 TGAGCCAAAGTCAGCCTTCTGTTGGTTAATAAGGTATAATGCATGGCTTTGTGCACAGCCC
 1201 AGTGTGGGATTACAGCTTTGGGATGACCCCTTACAAAGTTCTGTTTGGTTAGTATTGGCA
 1261 TAGTTTTTCTATATAGCCATAAATGCGTATATATACCCATAGGGCTAGATCTGTATCTTA
 1321 GTGTAGCGATGTATACATATACATCCACTACATGTTGAAGGGCCCTAACAGCCTTGG
 1381 GAGTATGACTGGTCCCTTACCTCTTATGGCTAAGTCTTTGACTGTGTTCATTTACCAAG
 1441 TTGACCCAGTTTGTCTTTTAGGTTAAGTAAGAAGTCCGAGAGTAAAGCCAGGAGGGGGCC
 1501 CAGCCTCTGAATGCGGCCACGGATGCCTTGTCTGCTGCAACCCCTTECCCAGCTGTCCACT
 1561 GAAACGTGAAGTCCTSTTTTGAATGCCAAACCCACCATTCACTGGTGTGACTACATAGA
 1621 ATGGGTTGAGAGAAGATCAGTTTGGCCTTCACAGTGCATTTGAAAAGCGTTTTTGT
 1681 TCTTTTGAATTATTGTGAAAACPTTCAAGTGAACAGAAGGATGGTGTCTACTGTGGAT
 1741 GAGGGATGAACAAGGGGATGGCTTTGATCCAATGGAGCCTGGGAGGTGTGCCCGAAAAGC
 1801 TTGTCTGTAGCGGTTTTGTGAGAGTGAACACTTTCACCTTTTTGACACCTTATCTGTAT
 1861 GTATGTTCCAGGATTTGGATTTGATTTTCCAAATGTAGCTTGAATTTCAATAAACTT
 1921 TCCTCTGTTTTTCTAAAAATAAAAA

Fig. 13


```

mG 1 MNTEHYQTPMEVAVYQLHNFSTSEFFSSLLGGDVVSVKLDNSASGASVVAL 50
hG 1 MNTEHYQTPMEVAVYQLHNFSTSEFFSSLLGGDVVSVKLDNSASGASVVAI 50
*****
hT 2 KSQWCRPVAMDVGQVYQLRHFSISFLSSLLCTENASVRLDNSSSGASVVAI 51
----- ** ** ***** - *****
*****

mG 51 DNKIEQAMDVLVKNHLMYAVREEVEVLKEQIRELLEKNSQLERENTLLKTL 100
hG 51 DNKIEQAMDVLVKNHLMYAVREEVEILKEQIRELVEKNSQLERENTLLKTL 100
*****
hT 52 DNKIEQAMDVLVKSHLMYAVREEVEVLKEQIKELIEKNSQLBQENLLKTL 101
*****
hD 1 MDLVKNHLMYAVREEVEILKEQIRELVEKNSQLERENTLLKTL 41
*****

mG 101 ASPEQLEKFAQSRLSPPEPAPETPETPEAPGGSAA* 138
hG 101 ASPEQLEKFAQSCLSPPEPAPES...PQVPEAPGGSAA* 135
*****
hT 102 ASPEQLAQFAQLQTCSPFATTQPQCTTQPPAQFASQGSQPTA* 145
*****
hD 42 ASPEQLEKFAQSCLSPPEPAPES...PQVPEAPGGSAA*
*****

```

Fig. 15