



(19) INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) Número de Publicação: PT 600970 E

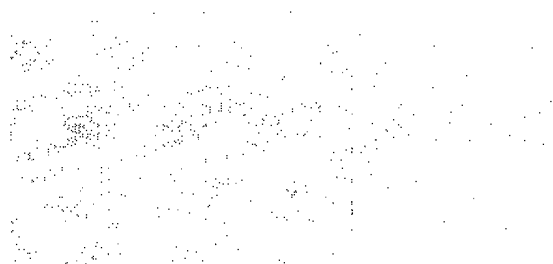
(51) Classificação Internacional: (Ed. 6)
A61K038/00 A A61K039/395 B

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de depósito: 1992.08.06	(73) Titular(es): SCHERING CORPORATION 2000 GALLOPING HILL ROAD KENILWORTH, NEW JERSEY 07033 US
(30) Prioridade: 1991.08.06 US 742129	
(43) Data de publicação do pedido: 1993.05.12	(72) Inventor(es): HITOSHI ISHIDA JP DI-HWEI HSU US RENE DE WAAL MALEFYT US HERGEN SPITS NL ANNE O'GARRA US
(45) Data e BPI da concessão: 1999.12.09	(74) Mandatário(s): JORGE BARBOSA PEREIRA DA CRUZ RUA DE VÍTOR CORDON 10-A 3/AND. 1200 LISBOA PT

(54) Epígrafe: UTILIZAÇÃO DE ANÁLOGOS OU ANTAGONISTAS DA INTERLEUCINA-10 PARA TRATAR TOXICIDADE INDUZIDA POR ENDOTOXINAS OU SUPERANTIGÉNIOS

(57) Resumo:



FOLHA DO RESUMO

PAT. INV. ☐	MOD. UTI. ☐	MOD. IND. ☐	DES. IND. ☐	TOP. SEMIC. ☐	CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL (51)
N.º (11) DATA DO PEDIDO ____ / ____ / ____ (22)					
REQUERENTE (71) SCHERING CORPORATION , norte-americana, com sede em 2000 Galloping Hill Road, Kenilworth New Jersey 07033, Estados Unidos da América do Norte (NOME E MORADA)					
CÓDIGO POSTAL					
INVENTOR(ES) / AUTOR(ES) (72) RENE DE WAAL MALEFYT; MAUREEN HOWARD; DI-HWEI HSU; ANNE O'GARRA; HERGEN SPITS; ALBERT ZLOTNIK , residentes nos Estados Unidos da América do Norte e HIROSHI ISHIDA , residente no Japão					
REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE(S) (30)					
DATA DO PEDIDO		PAÍS DE ORIGEM		N.º DO PEDIDO	
06.08.91		E.U.A.		742129	
EPIGRAFE (54) "UTILIZAÇÃO DE ANALOGOS OU ANTAGONISTAS DA INTERLEUCINA-10 PARA TRATAR TOXICIDADE INDUZIDA POR ENDOTOXINAS OU SUPERANTIGÉNIOS"					
FIGURA (para interpretação do resumo)					
RESUMO (max. 150 palavras) (57)					
Proporciona-se um método para o tratamento de choque séptico ou choque tóxico					

NÃO ESCREVER NAS ZONAS SOMBREADAS

Campo das Cebolas - 1149 - 035 LISBOA
Telefs.: 01 888 51 51 / 2 / 3
Linha azul: 01 888 10 78 • Fax: 01 887 53 08 - 886 00 66
E-mail: inpi @ mail. telepac. pt



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA

FOLHA DO RESUMO (Continuação)

PAT. INV. ☐	MOD. UTI. ☐	MOD. IND. ☐	DES. IND. ☐	TOP. SEMIC. ☐	CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL (51)
N.º		N.º Objectos N.º Desenhos			
N.º (11)		DATA DO PEDIDO / / (22)			

RESUMO (continuação) (57)

que se caracteriza pela administração de uma quantidade eficaz de interleucina-10.

NÃO ESCREVER NAS ZONAS SOMBREADAS

DESCRIÇÃO

"UTILIZAÇÃO DE ANÁLOGOS OU ANTAGONISTAS DA INTER- LEUCINA-10 PARA TRATAR TOXICIDADE INDUZIDA POR ENDOTOXINAS OU SUPERANTIGÉNIOS"

Campo do invento

O presente invento está relacionado com um método de modulação das respostas imunes, incluindo tratamento de sintomas do tipo choque séptico ou tóxico, *e.g.*, toxicidade induzida por endotoxinas ou por superantigénios, e estados auto-imunes pela administração de uma quantidade eficaz de interleucina-10 (IL-10) ou de um seu análogo ou antagonista, nos casos em que a inflamação ou a função imune mediada por células T é acompanhada de um nível anormal de factor de necrose tumoral alfa.

Fundamento

Várias infecções podem resultar em alterações fisiológicas e metabólicas profundas. Os sintomas podem variar, mas incluem febre, hipotensão, acidose metabólica, necrose dos tecidos, disfunção generalizada dos órgãos e finalmente, quando não tratadas correctamente, morte. Ver, *e.g.* Berkow (ed) The Merck Manual, Rahway, New Jersey; Weatherall *et al.*, (eds) Oxford Textbook of Medicine, Oxford University Press, New York; Braunwald *et al.*, (eds) Harrison's Textbook of Internal Medicine, Mcgrw-Hill, New York; ou Wyngaarden *et al.*, (eds) Cecil's Textbook of Medicine, Saunders Co., Philadelphia; cada um deles sendo aqui incluído como referência.



O choque séptico é um modelo de respostas induzidas por endotoxinas. O choque séptico é causado pela apresentação de uma endotoxina, tipicamente um componente do tipo lipopolissacárido (LPS) das paredes celulares das bactérias Gram-negativas, ao sistema imunitário. O choque tóxico é um modelo de respostas induzidas por superantígenos e é causado pela libertação de um componente proteico da parede celular das bactérias Gram-positivas, *e.g.* enterotoxina B de estafilococos (SEB). Se bem que ambas as respostas sejam inicialmente causadas pela infecção microbiana, o sistema imune responde diferencialmente ao produto microbiano causando a respectiva resposta.

Na resposta do tipo choque induzida pelas endotoxinas, *e.g.*, LPS, demonstrou-se recentemente que uma proteína do hospedeiro, factor de necrose tumoral (TNF), induz muitos dos efeitos prejudiciais da septicémia por bactérias Gram-negativas. A imunização passiva com anti-soros contra NF pode evitar muitos dos efeitos letais da bacteriémia por Gram-negativas ou endotoxémia. Ver, *e.g.*, Tracey *et al.* (1986) Science, 234:470-474; Beutler *et al.* (1986) Nature 320:584-588; e Tracey *et al.* (1987) Nature 330:662-664. Níveis elevados de TNF no soro também foram observados noutras infecções, incluindo meningite meningocócica, malária e leishmaniose. Muitos doentes com níveis de TNF circulantes elevados possuem um aumento da disfunção dos órgãos juntamente com uma mortalidade mais elevada. Ver, *e.g.*, Waage *et al.*, (1987) Lancet 355-357; Girardin *et al.*, (1988) New Engl. J. Med., 319:397-400; Scuderi *et al.*, (1988) Lancet 1364-1365; e Kern *et al.* (1989) Am. J. Med., 87:139-

Foi descrito que a administração de TNF a animais ou ao homem resulta em níveis detectáveis de interleucina-6 (IL-6), no soro, 2-6 horas mais tarde. McIntosh *et al.* (1989) J. Immunol. 143: 162-167; e Brouckaert *et al.*, J. Exp. Med., Vol. 169, pg. 2257 (1989). IL-6, também conhecida como factor



estimulador de células B-2, interferão $\beta 2$, ou factor estimulador de hepatócitos, foi identificada como uma glicoproteína derivada de células T que provoca maturação de células B. Ver, *e.g.*, Kishimoto, Blood 74:1-10. Mais recentemente, demonstrou-se que IL-6 possui actividades biológicas pleiotrópicas, incluindo indução de proteínas da fase aguda em hepatócitos e acções em células progenitoras hematopoiéticas e células T. Ver, *e.g.*, Geiger *et al.*, Eur. J. Immunol., Vol 18, pg. 717 (1988); Marínjovic *et al.*, J. Immunol., Vol. 142, pg. 808 (1989); Morrone *et al.*, J. Biol. Chem., Vol. 263, pg 12554 (1988); e Perlmutter *et al.*, J. Clin. Invest., Vol. 84, pg. 138 (1989). Starnes *et al.*, J. Immunol., Vol. 145, pgs. 4185-4191 (1990), demonstraram que um anticorpo antagonista de IL-6 prolonga a sobrevivência em modelos de choque séptico de ratinho.

A enterotoxina B de estafilococos (SEB) é um superantigénio e pode induzir uma reacção de choque tóxico. Estas reacções resultam da activação de uma subsérie substancial de células T, conduzindo a reacções imunes sistémicas graves mediadas pelas células T. Esta resposta é característica das respostas mediadas pelas células T, para as quais a IL-10, ou seus análogos ou antagonistas, serão úteis para o tratamento terapêutico. Mecanicamente os superantigénios parecem interactuar directamente com o elemento $V\beta$ do receptor das células T e activar as células T com uma especificidade relativamente baixa de MHC classe II. Ver Herman *et al.*, (1991) em An. Rev. Immunol. 9:745-772.

Actualmente, as condições sépticas, tais como septicémia, bacterémia e similares, são tipicamente tratadas com compostos antimicrobianos. A septicémia é comum nas instalações hospitalares, onde a infecção bacteriana muitas vezes ocorre a partir das inserções de catéteres ou de intervenções cirúrgicas. No entanto, quando tais condições estão associadas a choque não



existem medidas terapêuticas adicionais eficazes para melhorar o síndrome de choque que é causado, em parte, pelas citocinas induzidas na resposta à infecção. Ver, e.g., Young (1985) " " pgs. 468-470, em Mandell *et al.*, (eds) Principles and Practice of Infectious Diseases (2nd Ed.). John Wiley & Sons, New York. Em particular, o tratamento com antibióticos conduz à morte microbiana e libertação de produtos bacterianos que causam a resposta de choque.

A sepsis bacteriana e o choque séptico relacionado são frequentemente condições letais causadas por infecções que resultam de certos tipos de cirurgia, trauma abdominal e supressão imune da terapia do cancro ou de transplantes, ou de outros estados clínicos. Nos Estados Unidos, cerca de 700 000 doentes por ano sofrem de choque séptico provocado por infecções bacterianas. Destas, cerca de 160 000 desenvolvem sintomas de choque séptico e cerca de 50 000 morrem como resultado disso. O choque tóxico atinge menos pessoas por ano, mas a gravidade da resposta é tipicamente mais ameaçadora da vida.

Face às consequências graves destas respostas imunológicas à infecção, são extremamente necessárias técnicas eficazes para o tratamento profilático ou terapêutico de choque induzido por microorganismos. O presente invento proporciona composições e métodos para o tratamento destas e de outras reacções imunológicas graves.

De acordo com o presente invento, é proporcionada a utilização de interleucina-10 ou um seu análogo, agonista ou antagonista, na produção de uma composição farmacêutica para administração a um hospedeiro, de forma a modular a inflamação ou função imune mediada por células T num hospedeiro, em que a referida inflamação ou imunidade mediada pelas células T é acompanhada de um nível anormal de factor de necrose tumoral alfa.



Preferencialmente, a interleucina-10 é seleccionada do grupo consistindo em polipeptídeos maduros das grelhas de leitura definidas pelas sequências de aminoácidos que se seguem:

Met His Ser Ser Ala Leu Leu Cis Cis Leu Val Leu Leu Tre Gli
Val Arg Ala Ser Pro Gli Gln Gli Tre Gln Ser Glu Asn Ser Cis
Tre His Fen Pro Gli Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg
Asp Ala Fen Ser Arg Val Lis Tre Fen Fen Gln Met Lis Asp Gln
Leu Asp Asn Leu Leu Leu Lis Glu Ser Leu Leu Glu Asp Fen Lis
Gli Tir Leu Gli Cis Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Fen Tir
Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile
Lis Ala His Val Asn Ser Leu Gli Glu Asn Leu Lis Tre Leu Arg
Leu Arg Leu Arg Arg Cis His Arg Fen Leu Pro Cis Glu Asn Lis
Ser Lis Ala Val Glu Gln Val Lis Asn Ala Fen Asn Lis Leu Gln
Glu Lis Gli Ile Tir Lis Ala Met Ser Glu Fen Asp Ile Fen Ile
Asn Tir Ile Glu Ala Tir Met Tre Met Lis Ile Arg Asn

e

Met Glu Arg Arg Leu Val Val Tre Leu Gln Cis Leu Val Leu Leu
Tir Leu Ala Pro Glu Cis Gli Gli Tre Asp Gln Cis Asp Asn Fen
Pro Gln Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Fen Ser Arg Val Lis
Tre Fen Fen Gln Tre Lis Asp Glu Val Asp Asn Leu Leu Leu Lis
Glu Ser Leu Leu Glu Asp Fen Lis Gli Tir Leu Gli Cis Gln Ala
Leu Ser Glu Met Ile Gln Fen Tir Leu Glu Glu Val Met Pro Gln
Ala Glu Asn Gln Asp Pro Glu Ala Lis Asp His Val Asn Ser Leu
Gli Glu Asn Leu Lis Tre Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cis His
Arg Fen Leu Pro Cis Glu Asn Lis Ser Lis Ala Val Glu Gln Ile
Lis Asn Ala Fen Asn Lis Leu Gln Glu Lis Gli Ile Tir Lis Ala
Met Ser Glu Fen Asp Ile Fen Ile Asn Tir Ile Glu Ala Tir Met
Tre Ile Lis Ala Arg,



em que é usada a abreviatura de três letras para indicar os L-aminoácidos, começando a partir do extremo N. Estas duas formas de IL-10 são por vezes referidas como IL-10 humana (ou factor inibidor da síntese de citocinas humano) e IL-10 viral (ou BCRF1), respectivamente. Ver, Moore *et al.*, (1990) Science 248:1230-1234; Vieira *et al.*, (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 1172-1176; Fiorentino *et al.* (1989) J. Exp. Med. 170:2081-2095; e Hsu *et al.* (1990) Science 250: 830-832. Os mutantes da sequência proteica natural, *e.g.*, variantes alélicas e muteínas, incluindo variantes de deleção e inserção, são composições alternativas cujas utilizações são aqui incluídas.

Mais preferencialmente, a IL-10 madura usada no método do invento é seleccionada do grupo constituído por:

Ser Pro Gli Gln Gli Tre Gln Ser Glu Asn Ser Cis Tre His Fen
Pro Gli Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Fen
Ser Arg Val Lis Tre Fen Fen Gln Met Lis Asp Gln Leu Asp Asn
Leu Leu Leu Lis Glu Ser Leu Leu Glu Asp Fen Lis Gli Tir Leu
Gli Cis Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Fen Tir Leu Glu Glu
Val Met Pro Gln Ala Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lis Ala His
Val Asn Ser Leu Gli Glu Asn Leu Lis Tre Leu Arg Leu Arg Leu
Arg Arg Cis His Arg Fen Leu Pro Cis Glu Asn Lis Ser Lis Ala
Val Glu Gln Val Lis Asn Ala Fen Asn Lis Leu Gln Glu Lis Gli
Ile Tir Lis Ala Met Ser Glu Fen Asp Ile Fen Ile Asn Tir Ile
Glu Ala Tir Met Tre Met Lis Ile Arg Asn

e



Tre Asp Gln Cis Asp Asn Fen Pro Gln Met Leu Arg Asp Leu Arg
Asp Ala Fen Ser Arg Val Lis Tre Fen Fen Gln Tre Lis Asp Glu
Val Asp Asn Leu Leu Leu Lis Glu Ser Leu Leu Glu Asp Fen Lis
Gli Tir Leu Gli Cis Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Fen Tir
Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala Glu Asn Gln Asp Pro Glu Ala
Lis Asp His Val Asn Ser Leu Gli Glu Asn Leu Lis Tre Leu Arg
Leu Arg Leu Arg Arg Cis His Arg Fen Leu Pro Cis Glu Asn Lis
Ser Lis Ala Val Glu Gln Ile Lis Asn Ala Fen Asn Lis Leu Gln
Glu Lis Gli Ile Tir Lis Ala Met Ser Glu Fen Asp Ile Fen Ile
Asn Tir Ile Glu Ala Tir Met Tre Ile Lis Ala Arg.

O presente invento baseia-se, em parte, na descoberta de que IL-10 inibe a síntese de várias citocinas que medeiam reacções inflamatórias indesejáveis (*e.g.* choque séptico) e a activação de células T por superantígenos, um acontecimento que conduz aos síndromes do tipo choque tóxico. Pelo contrário, os antagonistas de IL-10 aumentarão estas mesmas respostas imunes e tal aumento é, de facto, desejável noutras situações clínicas, *e.g.*, em certos modelos de tumores e auto-imunidade.

Breve descrição das figuras

Figura 1. Ilustração do plasmídeo TRPC11. [ver exemplo 3].

Figura 2. IL-4, hIL-10 e vIL-10 inibem a síntese de (A) IFN γ e (B) TNF α por células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) activadas por IL-2. ND, não determinado. As barras de erro mostram a gama de amostras em duplicado numa experiência. PBMC de dadores diferentes variaram na sua capacidade para produzir IFN γ e TNF α quando estimulados por IL-2. Os efeitos inibidores de IL-4 e de IL-10 são revertidos por anticorpos neutralizantes (c) anti-



IL-4 e (d) anti-IL-10, respectivamente. PBMC foram cultivados como descrito na secção experimental com 200 U/ml de IL-2 recombinante (rIL-2) e quantidades variáveis de rIL-4 ou IL-10 produzida por células COS (COS-hIL-10), na presença de 10 µg/ml de imunoglobulinas neutralizantes anti-citocinas ou controlo de isotipo. O anticorpo e citocina foram incubados durante 30 minutos antes da adição aos PBMC.

Figura 3. (A) IL-4, mas não IL-10 humana (hIL-10) ou viral (vIL-10), inibe a actividade assassina de linfócitos activados (LAK) induzida por IL-2 em PBMC. PBMC de uma experiência semelhante à da Figura 2 foram colhidos juntamente com os sobrenadantes e testados quanto à citotoxicidade contra células COLO (carcinoma do cólon, Fig. 3A1) e Daudi (linfoma de Burkitt Fig. 3A2) marcadas com ^{51}Cr . (B) A actividade LAK é expressa pelas células CD56+ em PBMC em cultura com IL-2 e IL-10. PBMC foram corados com anticorpo anti-CD56 conjugado com FITC, e separados num FacStar Plus (Becton-Dickinson, San Jose, CA). Testou-se a actividade citotóxica nas fracções CD56+ e CD56- (pureza 99,7%). Obtiveram-se resultados semelhantes com células derivadas das culturas de PBMC com IL-2 sózinha.

Figura 4. (A) A síntese de IFN γ induzida por IL-2 por células NK purificadas é directamente inibida por IL-4 mas não por hIL-10 ou vIL-10. As células NK purificadas por FACS (pureza >99,5%) foram cultivadas a 10^6 células/ml com 200 unidades/ml de rIL-2 com 500 unidades/ml de rIL-4 ou COS-hIL-10, COS-vIL-10 ou sobrenadantes testemunha de COS (10%) em meio de Yssel durante 4-5 dias, depois os sobrenadantes de culturas em duplicado foram colhidos e misturados para medição de IFN γ por ELISA. (B) A proliferação de células purificadas NK e PBMC induzida por IL-2 é inibida por IL-4 mas não por hIL-10/vIL-10 (Figura 4B1: NK separadas; Figura 4 B2: PBL).



Figura 5. (A) Adição de células aderentes, mas não células T, restaurou a inibição, mediada por IL-10, da síntese de IFN γ induzida por IL-2 em células NK purificadas. (B) Adição de monócitos purificados restaurou a inibição, mediada por IL-10, da síntese de IFN γ induzida por IL-2 em células NK purificadas. Os monócitos sózinhos produziram quantidades inferiores às detectáveis de IFN γ . As barras de erro mostram a gama de amostras em duplicado de uma experiência. A produção de IFN γ na ausência de IL-2 foi abaixo dos limites de detecção (Figura 2). As células NK de diferentes dadores variaram na sua capacidade para produzir IFN γ . (C) Efeitos de IL-10 na síntese de TNF α pelas células NK, células CD14 $^{+}$ e ambos os tipos em conjunto. As células NK (10^6 células/ml) e/ou células CD14 $^{+}$ (3×10^5 células/ml) foram cultivadas durante cinco dias na presença ou ausência de 400 U/ml de rIL-2 e 10% de sobrenadante de COS-hIL-10.

Figura 6. As cinéticas de produção de IL-10, IL-6, TNF α e GM-CSF por monócitos humanos, activados por LPS. Monócitos humanos, isolados por elutriação com centrifugação, foram cultivados em sacos de Teflon (4×10^6 células/ml) na ausência ou presença de LPS (1 μ g/ml) e determinada a produção de (A) IL-10, (B) IL-6, (C) TNF α ou (D) GM-CSF nos sobrenadantes de cultura colhidos nos tempos indicados pelas ELISAS específicas de citocinas.

Figura 7. Produção de IL-10 por monócitos humanos como resposta a concentrações crescentes de LPS. Monócitos humanos (4×10^6 células/ml) foram cultivados em sacos de Teflon com concentrações crescentes de LPS durante 24 horas e a produção de IL-10 foi determinada por ELISA.

Figura 8. Efeitos de IL-10 na produção de citocinas por monócitos activados por IFN γ , LPS ou LPS e IFN γ . Monócitos humanos (4×10^6 células/ml) foram cultivados com IFN γ (100 U/ml), 1, 10, 10 ou 1000 ng/ml de LPS e



combinações de LPS (1, 10, 100 ou 1000 ng/ml) e IFN γ (100 U/ml) na ausência ($\square$) ou na presença ($\boxtimes$) de IL-10 (100 U/ml) durante 24 horas e determinou-se a produção de (A) IL-1 α , (B) IL-1 β , (C) IL-6, (D) TNF α ou (E) GM-CSF por ELISA específico para as citocinas nos sobrenadantes.

Figura 9. Efeitos de IL-10 humano ou IL-10 viral na produção de TNF α e GM-CSF por monócitos activados por LPS. Monócitos humanos (4×10^6 células/ml) foram activadas por LPS (1 μ g/ml) e cultivadas com IL-10 humana (100 U/ml) ou IL-10 viral na ausência ou na presença de mAb 19F1 neutralizante anti-IL-10 (10 μ g/ml) durante 24 horas e a produção de (A) TNF α ou (B) GM-CSF foi determinada por ELISA específica para as citocinas.

Figura 10. Efeitos de IL-10 exógeno, IL-10 produzida endogenamente e IL-4 nos níveis de expressão de mRNA específico de citocinas em monócitos humanos activados por LPS. Monócito humanos (4×10^6 células/ml) foram cultivados em meio a 4°C e 37°C ou activados por LPS (1 μ g/ml) na ausência ou presença de IL-4 (100 U/ml), IL-10 (100 U/ml) e mAb 19F1 neutralizante anti-IL10 (10 μ g/ml) e isolou-se mRNA após 24 horas. A expressão de β -actina, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , GM-CSF e G-CSF foi determinada por transcrição inversa de mRNA e análise por PCR, com escorvas específicas de citocinas, seguido de transferência Southern dos produtos de reacção e hibridação com sondas internas. O cDNA obtido a partir de um clone de células T CD4+ foi incluído como testemunha para a expressão de TNF α e GM-CSF.

Figura 11. Efeitos de IL-10 nos níveis de expressão de mRNAs específicos de citocinas em monócitos activados por LPS. mRNA isolado a partir de monócitos humanos (4×10^6 células/ml), activados por LPS (1 μ g/ml) na ausência ou presença de IL-10 (100 U/ml) durante 7 horas e expressão de IL-6,



IL-8, IL-10, TGF β e β -actina foram determinados por análise de Northern.

Figura 12. Efeitos de IL-10 exógena, IL-10 produzida endogenamente e IL-4 nos níveis de expressão de mRNA específico de IL-10 e TGF β em monócitos humanos activados por LPS. Monócito humanos (4×10^6 células/ml) foram cultivados em meio a 4°C e 37°C ou activados por LPS (1 μ g/ml) na ausência ou presença de IL-4 (100 U/ml), IL-10 (100 U/ml) e mAb 19F1 neutralizante anti-IL10 (10 μ g/ml). Isolou-se mRNA após 24 horas. A expressão de (A) IL-10, TGF β e β -actina foi determinada por análise Northern e (B) a expressão de IL-10 foi determinada por transcrição inversa de mRNA e análise por PCR, com escorvas específicas de citocinas, seguido de transferência Southern dos produtos de reacção e hibridação com sondas internas.

Figura 13. Efeitos de IL-10 produzida endogenamente na expressão de MHC classe II em monócitos humanos activados com LPS. Os monócitos humanos foram cultivados com (A) 0 ng/ml de LPS, (B) 0,1 ng/ml de LPS, (C) 10 ng/ml de LPS ou (D) 1000 ng/ml de LPS na ausência ou presença de mAb 19F1 neutralizante anti-IL-10 (10 μ g/ml) durante 40 horas. A expressão de HLA-DR/DP (Q5/13) foi determinada por imunofluorescência indirecta.

Figura 14. Efeito de IL-10 na função APC das linhas celulares de macrófagos. Topo (Fig. 14A). Linhas celulares de macrófagos 1G18.LA ou PU5.1 (10^6 células/ml) foram activadas com IFN γ (2 ng/ml). Estas APCs foram então lavadas e incubadas (10^5 células/alvéolo) com células Th1 HDK.1 (5×10^4 células/alvéolo) e antígeno (TNP-KLH, 10 μ g/ml), na presença (▨) ou ausência (■) de IL-10 purificada (200 unidades/ml). Os sobrenadantes foram colhidos após 48 horas e testados relativamente a IFN γ . Fundo (Fig. 14B). Macrófagos 1G18.LA foram activados, como atrás, e depois incubados (10^5 células/alvéolo) com células Th1 HDK.1 (5×10^4 células/alvéolo) mais TPN-KLH (10 μ g/ml); ou



o hibridoma de células T DO11.0 (5×10^4 células/alvéolo) mais ovalbumina (2,5 mg/ml), na presença (▨) ou ausência (■) de IL-10 purificada (em baixo) (200 unidades/ml). Os sobrenadantes foram colhidos após 20 h e testados relativamente a IL-2. Em todos os painéis estão apresentadas as médias e desvios padrão de culturas em triplicado.

Figura 15. IL-10 induz uma alteração morfológica em macrófagos peritoneais purificados. Os macrófagos peritoneais (Mac-1⁺, brilhante, B220⁻) foram purificados por FACS e depois incubados durante 72 h, na presença de IFN γ (2 ng/ml) (em cima, Fig. 15A) ou IFN γ (2 ng/ml) mais IL-10 (200 unidades/ml) (em baixo, Fig. 15B). Os sobrenadantes foram removidos, as células secas ao ar, fixadas e coradas com Wright's-Giemsa, secas e depois fotografadas.

Figura 16. IL-10 inibe a produção das proteínas IL-1, TNF- α e IL-6 induzida por LPS em linhas celulares de macrófagos. As linhas celulares de macrófagos 1G18.LA (Figs. 16A, B e C) e PU5.1 (Figs. 16D, E e F) foram incubadas (10^6 células/ml) com LPS (10 μ g/ml); ou LPS (10 μ g/ml) mais IFN γ (2 ng/ml); na presença ou ausência de IL-10 ou IL-4 (nalguns casos) ambos a 200 unidades/ml, conforme indicado. Os sobrenadantes foram colhidos e testados relativamente aos seus níveis de IL-1, IL-6 ou TNF- α .

Figura 17 (partes A, B1, B2 e C). IL-10 inibe a expressão de RNA de TNF α induzida por LPS numa linha celular de macrófago. A linha celular de macrófago 1G18.LA foi estimulada como na Figura 16. Os sobrenadantes foram removidos após 6 h e adicionou-se solução de isotiocianato de guanidina quando da colheita das células para a preparação do RNA. 10 μ g de RNA total das amostras da linha celular 1G18.LA estimuladas do mesmo modo foi aplicado num gel, transferido para membrana e hibridado com uma sonda específica de TNF α e actina.



Figura 18. Estimulação de macrófagos peritoneais. IL-10 inibe a síntese da proteína IL-6 induzida por LPS em macrófagos peritoneais. Macrófagos peritoneais (Mac-1⁺, brilhante, B220⁻) foram purificados no FACS e depois novamente incubados sózinhos ou com LPS (10 µg/ml) na presença ou ausência de IL-10 (200 unidades/ml), anti-IL-10 (10 µg/ml) ou IFN γ (2 ng/ml), a 7×10^5 células/ml. Os sobrenadantes foram colhidos e testados quanto aos seus níveis de IL-6, relativamente a um padrão conhecido usando um imuno-ensaio específico (ELISA).

Figura 19. IL-10 não regula negativamente um co-estimulador solúvel ou induz um inibidor solúvel em macrófagos. (A) Os sobrenadantes foram obtidos a partir da linha celular de macrófagos 1G18.LA (10^6 células/ml) após estimulação com IFN γ durante 24 horas e depois ainda estimulados com células Th1 (HDK-1, 2×10^5 células/ml) e antígeno (KLH, 500 µg/ml) durante 24 horas. Os sobrenadantes foram concentrados e eliminado IFN γ e IL-2, e depois usados num ensaio CSIF. Estes sobrenadantes sózinhos não contêm níveis detectáveis de IFN γ . APC macrófagos 1G18.LA activados com IFN γ (10^5 células/alvéolo) foram incubados com células HDK-1 (5×10^4 células/alvéolo) e antígeno (TNP-KLH, 10 µg/ml) sózinho (Δ) ou na presença de doses variáveis de IL-10 mais ($\square$) ou menos ($\blacktriangle$) os sobrenadantes atrás referidos (concentração final 25%). Os sobrenadantes do ensaio CSIF foram colhidos após 48 horas e testados quanto aos níveis de IFN γ . Estão apresentadas as médias e desvios padrões de culturas em triplicado de uma experiência. (B) Doses graduais de macrófagos do baço purificados, na ausência ($\blacksquare$) ou presença ($\square$) de IL-10 (200 unidades/ml); ou uma mistura de doses graduais de macrófagos purificados juntamente com células B ($2,5 \times 10^3$ células/alvéolo) na ausência ($\bullet$) ou presença ($\circ$) de IL-10 (200 unidades/ml); ou células B sózinhas na ausência ($\oplus$) ou presença ($\odot$) de IL-10 (200 unidades/ml); foram usados como APC



para o clone Th1 HDK-1 (10^4 células/alvéolo) com TNP-KLH ($10 \mu\text{g/ml}$). Após 48 horas os sobrenadantes foram colhidos e testados relativamente a IFN γ . Estão apresentadas as médias e desvios padrões de culturas em triplicado.

Figura 20. IL-10 protege ratinhos BALB/c de toxicidade induzida por SEB; Figura 20A: $20 \mu\text{g}$ SEB/ 30 mg d-Gal; Figura 20B: IL-10/ $20 \mu\text{g}$ SEB/ 30 mg d-Gal; Figura 20C: $10 \mu\text{g}$ SEB/ 30 mg d-Gal; Figura 20D: IL-10/ $10 \mu\text{g}$ SEB/ 30 mg d-Gal; Figura 20E: 30 mg galactosamina; Figura 20F: $10 \mu\text{g}$ IL-10.

Figura 21. IL-10 protege ratinhos de endotoxemia letal. Grupos de 20 ratinhos BALB/c foram injectados intraperitonealmente (i.p.) com $350 \mu\text{g}$ de LPS ou $350 \mu\text{g}$ de LPS juntamente com doses variáveis de IL-10 recombinante purificada de murgancho. A morte ocorreu ao longo dos seis dias que se seguiram.

Figura 22. Anticorpos anti-IL-10 neutralizam a capacidade de IL-10 para proteger ratinhos de endotoxemia letal. Grupos de 20 ratinhos BALB/c receberam 1 mg de anticorpo 2A5 anti-IL-10 (Figura 22A) ou 1 mg do anticorpo testemunha de isotipo GL113 (Figura 22B) intraperitonealmente uma hora antes da administração de LPS. Os ratinhos foram injectados com $350 \mu\text{g}$ de LPS i.p. sózinho ou juntamente com doses variáveis de IL-10, como descrito na Figura 21 legenda.

Figura 23. IL-10 protege ratinhos da endotoxemia letal quando administrada 30 minutos após a injeção de LPS. Grupos de 20 ratinhos BALB/c receberam $350 \mu\text{g}$ de LPS i.p. no tempo 0 e $1,0 \mu\text{g}$ de IL-10 recombinante i.p. no tempo 0, 0,5 hr, 1 hr, 2 hr ou 5 hr após injeção de LPS. Os ratinhos testemunha que receberam $350 \mu\text{g}$ de LPS i.p. na ausência de IL-10 morreram todos nesta experiência.



Figura 24. Análise por imunofluorescência da expressão de IgM e IgD de superfície em células totais de lavados peritoneais obtidas a partir de ratinhos tratados com anti-IL-10 e ratinhos testemunha. Ratinhos BALB/c foram injectados desde o nascimento até às 8 semanas com anticorpo anti-IL-10 SXC-1 (Fig. 24D), anticorpo testemunha do isotipo J5/D (Figura 24B), tampão de fosfatos salino (PBS) (Fig. 24C) ou nada (Fig. 24A, como descrito na secção experimental. Os resultados mostram as intensidades de fluorescência de 5000 células vivas contadas em cada grupo experimental.

Figura 25. Níveis de IgM no soro de ratinhos tratados com anti-IL-10 e testemunhas testados após 8 semanas de tratamento. Os resultados mostram a média geométrica $\pm$ desvio padrão de cinco soros individuais em cada grupo e incluem dados de duas experiências diferentes. Três experiências adicionais deram os mesmos resultados.

Figura 26. Respostas *in vivo* de anticorpos em ratinhos tratados com anti-IL-10 e ratinhos testemunha a α 1,3-dextrano (fig. 26B) ou fosforilcolina (Fig. 26A). Ratinhos BALB/c foram injectados desde o nascimento até às 9 semanas com anticorpo SXC.1 anti-IL-10, anticorpo J5/D testemunha de isotipo, PBS ou não receberam tratamento. Às 8 semanas, os ratinhos foram injectados com α 1,3-dextrano ou com *Streptococcus pneumoniae* mortos pelo calor como fonte de fosforilcolina, como descrito na secção experimental. Os resultados mostram a média geométrica $\pm$ desvio padrão dos níveis de anticorpos específicos detectados em cinco soros individuais.

Figura 27. Análise por imunofluorescência da expressão de B220 e CD3 de superfície de células linfóides do baço vivas obtidas a partir de ratinhos tratados com SXC.1 anti-IL-10 e ratinhos testemunhas. Para mais detalhes, ver Figura 24 legenda - partes A-D da Figura 27 correspondem às partes A-D respectivamente da Figura 24.



Figura 28. Resposta *in vivo* a TNP-KLH de ratinhos tratados com anti-IL-10 ou de ratinhos testemunha. Os ratinhos foram injectados desde o nascimento até às 10 semanas de idade com anticorpo anti-IL-10 (●), ou com um controlo do isotipo (○). À 8 semana, os animais foram injectados intraperitonealmente com 10 µg de TNP-KLH. Os níveis séricos de IgM específica de TNP (Fig. 28A) e de IgG (Fig. 28B) foram determinados 7 e 14 dias após imunização, respectivamente. Os resultados mostram três experiências separadas, cada círculo representando um ratinho individual.

Figura 29. Os anticorpos anti-IL-10 não são directamente citotóxicos para as células B de lavados peritoneais. Ratinhos BALB/c de 8 semanas de idade não sensibilizados foram injectados intraperitonealmente com 1 mg de anticorpo anti-IL-10 (SXC.1 - Fig. 29 partes A, B e C), ou 1 mg de cada um isotipo testemunha (J5/D - Fig. 29 partes D, E e F). As células da lavagem peritoneal foram colhidas de diferentes animais 1, 2 ou 3 dias mais tarde e analisadas relativamente à co-expressão de IgD e IgM de superfície. Os resultados mostram as intensidades de fluorescência de 5000 células vivas contadas de cada grupo experimental.

Figura 30. Níveis séricos de IFN γ em ratinhos tratados com anti-IL-10 e em ratinhos testemunha. Os ratinhos BALB/c foram injectados desde o nascimento até às 8 semanas de idade com anticorpo anti-IL-10 (●) ou com um controlo do isotipo (○). Os soros colhidos às 8 semanas foram analisados relativamente a IFN γ por imuno-ensaio. Os resultados mostram cinco experiências separadas, cada um dos círculos representa um ratinho individual.

Figura 31. Co-administração de anticorpos anti-IFN γ reduz a capacidade de um tratamento anti-IL-10 para eliminar as células B peritoneais de



ratinho. Ratinhos BALB/c foram tratados desde o nascimento até às 8 semanas com anticorpos anti-IL-10 (Fig. 31C); com anti-IL-10 mais anticorpos anti-IFN γ (Fig. 31B); ou não foram tratados (Fig. 31A). As células do lavado peritoneal foram então analisadas relativamente à expressão de B220 e de IgM. Os resultados mostram as intensidades de fluorescência de 5000 células vivas contadas em cada um dos grupos experimentais.

Figura 32. Níveis séricos de TNF α em ratinhos tratados com anti-IL-10 às 8 semanas. Os ratinhos foram tratados desde o nascimento até às 8 semanas de idade com anticorpo SXC.1 anti-IL-10 (●) ou com um controlo do isotipo correspondente (○) como descrito na secção experimental. Os soros colhidos às 8 semanas foram analisados quanto ao teor em TNF α por ELISA. Os resultados mostram cinco experiências separadas, cada um dos círculos representa um ratinho individual.

Figura 33. Níveis séricos de IL-6 em ratinhos tratados com anti-IL-10. Soros colhidos de ratinhos tratados desde o nascimento até às 8 semanas de idade com o anticorpo SXC.1 anti-IL-10 (●) ou com um controlo do isotipo correspondente (○) foram analisados quanto ao teor em IL-6 por ELISA. Os resultados mostram cinco experiências separadas, cada um dos círculos representa um ratinho individual.

Figura 34. Ratinhos tratados com anti-IL-10 mostram um aumento da susceptibilidade à morte resultante do choque induzido por LPS (500 μ g de LPS na Fig. 34A, 400 μ g de LPS na Fig. 34B, 100 μ g de LPS na Fig. 34C, 50 μ g de LPS na Fig. 34D, 50 μ g de LPS na Fig. 34E e 1 μ g de LPS na Fig. 34F). Os ratinhos foram tratados desde o nascimento até às 8 semanas de idade com anticorpo IgM de rato SXC.1 anti-IL-10 (●), anticorpo IgG $_1$ de rato 2A5 anti-IL10 (▲) ou anticorpos testemunha do isotipo adequado (○) (△). Às 8 semanas,



os ratinhos (5 ratinhos/grupo) foram injectados intraoperitonealmente com diferentes doses de LPS. A morte foi controlada durante os 14 dias seguintes.

Figura 35. Níveis séricos de isotipos de imunoglobulina em ratinhos tratados com anti-IL-10. Os ratinhos foram tratados desde o nascimento até às 8 semanas de idade com o anticorpo de rato anti-IL-10 SXC.1 ou 2A5, anticorpos testemunha adequados para os diferentes isotipos ou PBS. Os soros colhidos às 8 semanas foram analisados relativamente ao teor de IgG1 (Fig. 35A), IgG2a (Fig. 35C), IgG2b (Fig. 35E), IgG3 (Fig. 35B), IgE (Fig. 35D) ou IgA (Fig. 35F) tais de ratinho usando ELISAs com imunoglobulinas específicas de isotipo. Os resultados mostram quatro experiências independentes para cada análise do isotipo de imunoglobulina. entro de cada experiência, os resultados estão apresentados como a média geométrica $\pm$ desvio padrão dos níveis de imunoglobulina detectados em 5 soros individuais.

Figura 36. A depleção de células B Ly1 em ratinhos tratados com IL-10 é transitória. Os ratinhos foram tratados desde o nascimento até às 8 semanas de idade com o anticorpo SXC.1 anti-IL-10 e depois o tratamento foi interrompido. As células dos lavados peritoneais foram colhidas de diferentes grupos desses ratinhos (3 ratinhos/grupo) às 8 semanas (Fig. 36 A e D), 12 semanas (fig. 36B e E) e 16 semanas (Fig. 36 C e F). os resultados mostram a análise por imunofluorescência da expressão de IgM de superficie e B220 de superficie em células totais de lavado peritoneal vivas, contando 5000 células vivas em cada grupo experimental.

Figura 37. Análise por imunofluorescência sa expressão de Ly1 de superficie e de IgM de superficie em células linfóides de lavado peritoneal obtidas a partir de ratinhos tratados com SXc.1 anti-IL-10 (Fig. 37D) ou de ratinhos testemunha (tratados com o anticorpo para controlo do isotipo J5/D na



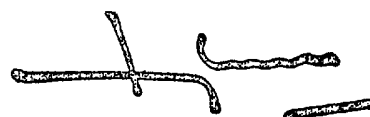
Fig. 37C, tampão de fosfatos salino (PBS) na Fig. 37B ou sem tratamento na Fig. 37A). Os resultados mostram as intensidades de fluorescência de 5000 células vivas contadas em cada grupo experimental.

Figura 38. Análise por imunofluorescência da expressão de Ly1 de superfície e de OgM de superfície em células totais vivas de lavado peritoneal obtidas a partir de ratinhos tratados com SXC.1 anti-IL-10 ou de ratinhos testemunha (paralelo à Fig. 37). Os resultados mostram as intensidades de fluorescência de 5000 células vivas contadas em cada grupo experimental.

Figura 39. Resposta anticorpos *in vivo* de ratinhos tratados com anti-IL-10 ou ratinhos testemunha a TNP-Ficoll. Os ratinhos foram injectados desde o nascimento até às 9 semanas de idade com anticorpo SXC.1 anti-IL-10 (○) ou com um anticorpo para controlo do isotipo (●). Às 8 semanas, os animais foram injectados intraperitonealmente com 10 µg de TNP-Ficoll. Os níveis séricos de IgM ou IgG específicas de TNP foram determinados 5 ou 10 dias mais tarde respectivamente por ELISA. Cada um dos círculos representa um ratinho individual.

Figura 40. Tratamento com anticorpo anti-IL-10 retarda o estabelecimento de auto-imunidade em ratinhos NZB/W. Grupos de 20 ratinhos fêmea NZB/W foram injectados três vezes por semana desde o nascimento e ao longo de todo o estudo com anticorpo IgM de rato SXC-1 anti-IL-10 de ratinho (●) ou um anticorpo para controlo do isotipo designado J5/D (○). A sobrevivência dos animais foi controlada durante as 42 semanas que se seguiram.

Figura 41. Desenvolvimento de proteinúria (> 3+) em ratinhos fêmea NZB/W tratados com anticorpos anti-IL-10. Grupos de 22 ratinhos fêmea NZB/W F1 foram injectados três vezes por semana desde o nascimento e ao



longo de todo o estudo com anticorpo SXC-1 anti-IL-10 (●) ou com um anticorpo para controlo do isotipo (○). O desenvolvimento de doença renal foi avaliado através da medição de proteinúria usando estiletos Albustix desde a semana 12 até à semana 42. Os resultados mostram a proporção de ratinhos com mais de 300 mg de proteína/dl na sua urina.

Figura 42. Exame histológico de rins de ratinhos NZB/W tratados com anti-IL-10. Fig. 42A mostra um rim de NZB/WF1 testemunha (coloração PAS): observa-se uma grave glomerulonefrite com deposição homogênea de complexos imunes e moldes de proteínas nos túbulos, indicando perda de proteína para os túbulos. A Fig. 42B mostra um rim NZB/WF1 tratado com anti-IL-10 (coloração de PAS).

Figura 43. Produção de auto-anticorpos em ratinhos NZB/W tratados com anti-IL-10. Ratinhos fêmea NZB/W foram injectados com o anticorpo anti-IL-10 SXC-1 (●) ou com um controlo do isotipo (○) de três em três dias desde o nascimento e ao longo de todo o estudo. Os soros colhidos aos 5 meses ou aos 6 meses foram avaliados relativamente ao teor em anticorpos IgG que se ligam a DNA de cadeia dupla usando um ELISA. Cada um dos círculos representa um ratinho individual.

Figura 44. Níveis séricos de $\text{TNF}\alpha$ em ratinhos NZB/WF1 tratados com anti-IL-10. Ratinhos fêmea NZB/W foram injectados com anticorpo SXC-1 anti-IL-10 (●) ou com um controlo do isotipo (○) de três em três dias desde o nascimento e ao longo de todo o estudo. Os soros colhidos aos 5 meses, 7 meses ou 8 meses foram avaliados relativamente ao teor em $\text{TNF}\alpha$ usando um ELISA específico para citocinas. cada um dos círculos representa um ratinho individual.

Figura 45. Anticorpos anti- $\text{TNF}\alpha$ revertem a protecção induzida



por anti-IL-10 em ratinhos NZB/WF1. Grupos de 36 e 18 ratinhos fêmea NZB/W foram injectados duas vezes por semana com anticorpo 2A5 ANTI-IL-10 (■) (▲) ou com um anticorpo para controlo de isotipo designado GL113 (□) respectivamente desde o nascimento e ao longo de toda a experiência. Metade dos animais injectados com o anticorpo anti-IL-10 receberam anticorpo XT22 anti-TNF α duas vezes por semana começando às 30 semanas após o nascimento (▲). A sobrevivência dos animais foi controlada durante um período de 34 semanas.

Descrição detalhada do invento

Conforme indicado, o presente invento proporciona a utilização de interleucina-10 ou um seu análogo, agonista ou antagonista, na produção de uma composição farmacêutica para administração a um hospedeiro de forma a modular a inflamação ou função imune mediada por células T num hospedeiro, em que a referida inflamação ou imunidade mediada por células T é acompanhada de um nível anormal de factor de necrose tumoral alfa, particularmente para prevenir e/ou reduzir os efeitos prejudiciais de choque induzido por microrganismos ou controlar a diferenciação ou desenvolvimento de células B.

A IL-10 para usar no invento é preferencialmente seleccionada do grupo de polipeptídeos maduros codificados pelas grelhas de leitura abertas definidas pelos insertos de cDNA de pH5C, pH15C e pBCRF1(SRa), os quais estão depositados na American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland, com o números de acesso 68191, 68192 e 68193, respectivamente.

IL-10 inibe a síntese de TNF α e INF γ em monócitos ou monócitos mais células assassinas naturais (NK), mas não em células NK por si sós. IL-4



inibe a secreção de citocinas directamente a partir de células NK activadas com IL-2. Isto sugere que IL-4 e IL-10 actuam sobre as células NK através de vias distintas, *e.g.*, a acção de IL-10 requiere a participação de monócitos. IL-10 inibe a secreção de citocinas em células NK activadas com IL-2 mas não a actividade LAK, sugerindo que a síntese de citocinas induzida por IL-2 e a actividade de assassina de linfócitos activados são reguladas por mecanismos diferentes.

Está demonstrado que IL-10 possui uma actividade anti-inflamatória, aparentemente por um mecanismo da sua capacidade para inibir a produção de citocinas pro-inflamatórias em monócitos e/ou macrófagos activados ou células NK. Esta inibição da produção de citocinas ocorre ao nível da transcrição.

Foi também aqui demonstrado que IL-10 modela as respostas induzidas por superantígenos, *e.g.*, respostas mediadas por células T, em animais. A enterotoxina B estafilocócica (SEB) pode induzir uma reposta de choque tóxico grave e estudos em ratinhos demonstraram eficácia *in vivo*. A administração de IL-10 simultaneamente com, ou mesmo após, exposição ao superantígeno é eficaz na prevenção da letalidade derivada da exposição a um nível elevado de SEB,

O lipopolissacárido das bactérias Gram-negativas (LPS) induz uma resposta de choque séptico em mamíferos. Esta resposta de choque séptico induzida por endotoxinas resulta da libertação de $\text{TNF}\alpha$, IL-1 e/ou IL-6 por macrófagos/monócitos estimulados, como descrito atrás. No entanto, a administração de IL-10 suprime a expressão induzida de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e GM-CSF. Os resultados apresentados estabelecem que IL-10 é capaz de proteger ratinhos do choque induzido por endotoxinas, mesmo se administrado após a apresença do LPS. Inversamente, os anticorpos anti-IL-10 podem bloquear o efeito protector. Outros estudos indicam que ratinhos tratados com anti-IL-10



também apresentam níveis substancialmente elevados de factor de necrose tumoral alfa (TNF α) circulante e IL-6 circulante e uma grande susceptibilidade ao choque induzido por endotoxinas (*e.g.*, induzido por LPS).

Os anticorpos anti-IL-10 também são úteis para tratar outros estados imunológicos. São apresentados dados indicando que a administração a longo termo de anticorpo anti-IL-10 a um ratinho jovem, pode eliminar a subclasse de células B Ly-1. Isto implica que IL-10 é um regulador do desenvolvimento de células B Ly-1 e proporciona um meio para eliminar as células B Ly-1. Esta observação lança alguma luz sobre o tratamento de estados de auto-imunidade.

O desenvolvimento de uma resposta auto-imune requiere uma complexa interacção de células T. A estirpe NZB/W de ratinhos está predisposta ao lupus (lupus sistémico eritematoso, SLE) e proporciona um modelo para testar reagentes terapêuticos no tratamento de estados de auto-imunidade. Ainda, estes ratinhos apresentam uma proporção invulgar de células B Ly-1 comparado com outros tipos de células B. São descritas experiências *in vivo* com ratinhos usando a estirpe NZB/W.

O tratamento anti-IL-10 destes ratinhos retarda substancialmente o estabelecimento da resposta de auto-imunidade conforme avaliado pela sobrevivência global ou pelo desenvolvimento de proteinémia, nefrite ou títulos de autoanticorpos. Este resultado indica que o tratamento anti-IL-10 deverá ser útil no tratamento de outros mamíferos, *e.g.*, humanos.

Uma larga gama de sistemas de expressão de células isoladas e multicelulares (*i.e.*, combinações hospedeiro-vector de expressão) podem ser usados para produzir os polipeptídeos para usar nos métodos do presente invento.



Os tipos celulares de hospedeiro incluem, mas não estão limitados a bactérias, leveduras, células de insecto, de mamífero e similares. Existem muitas revisões que proporcionam um guia para fazer escolhas e/ou modificações de sistemas de expressão específicos. Ver, *e.g.*, de Boer e Shepard "Strategies for Optimizing Foreign Gene Expression in *Escherichia coli*," pgs 205-247, em Kroon (ed.) *Genes: Structure and Expression* (John Wiley & Sons, New York, 1983), os quais fazem a revisão de vários sistemas de expressão para *E. coli*; Kucherlapati *et al.*, *Critical Reviews in Biochemistry*, Vol.16, Issue 4, pgs. 349-379 (1984) e Banerji *et al.*, *Genetic Engineering*, Vol. 5, pgs. 19-31 (1983), os quais fazem a revisão de métodos para a transfecção e transformação de células de mamífero; Reznikoff e Gold, eds., *Maximizing Gene Expression* (Butterworths, Boston, 1986) os quais descrevem tópicos seleccionados na expressão de genes em *E. coli*, levedura e células de mamífero; e Thilly, *Mammalian Cell Technology* (Butterworths, Boston, 1986) que revê os sistemas de expressão de mamíferos. Cada um destes é aqui incluído como referência. Igualmente, estão disponíveis muitas revisões que descrevem técnicas e condições para ligar e/ou manipular cDNAs específicos e sequências de controlo da expressão para criar e/ou modificar vectores de expressão adequados para usar no presente invento, *e.g.*, Maniatis *et al.*, (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York; Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory manual (2nd Ed; Vols 1-3), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York; e Ausubel *et al.*, (1987e suplementos periódicos) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley and Sons, New York, os quais são aqui incluídos como referência.

Um sistema de expressão em *E. coli* está descrito por Riggs na Patente U.S. 4,431,739 que aqui é incluído como referência. Um promotor procariótico particularmente útil para uma expressão elevada em *E. coli* é o promotor tac, descrito por de Boer na Patente U.S. 4,551,433, o qual é aqui



incluído como referência. Existem também vetores de expressão e secreção para hospedeiros *E. coli*. São particularmente úteis os vetores pIN-III-ompA, descritos por Ghayeb *et al.*, em EMBO J., Vol. 3, pgs 2437-2442 (1984), em que o cDNA a ser transcrito é fundido com uma parte do gene OmpA de *E. coli* codificador do peptídeo sinal da proteína ompA que, por sua vez, provoca a secreção da proteína madura para o espaço periplásmico da bactéria. As Patentes U.S. 4,336,336 e 4,338,397 também descrevem vetores de expressão e secreção para procariotas. Assim, estas referências são aqui incluídas como referência.

Numerosas estirpes de bactérias são hospedeiros adequados para vetores de expressão procarióticos incluindo estirpes de *E. coli*, tais como W3110 (ATCC nº 27325), JA221, C6000, ED767, DH1, LE392, HB101, X1776 (ATCC Nº 31244), X2282, RR1 (ATCC Nº 31343) MRCI; estirpes de *Bacillus subtilis*; e outras enterobactereáceas tais como *Salmonella typhimurium* ou *Serratia marcescens* e várias espécies de pseudomonas. Métodos gerais para a obtenção de estirpes bacterianas, tais como *E. coli* K12 X1776, úteis na expressão de proteínas eucarióticas está descrito por Curtis III na Patente U.S. 4,190,495. Assim, esta patente é aqui incluída como referência.

Para além de microrganismos procarióticos e eucarióticos, podem ser igualmente usados para produzir as proteínas do invento sistemas de expressão compreendendo células derivadas de organismos multicelulares. São de interesse particular, os sistemas de expressão de mamíferos uma vez que a sua maquinaria de processamento pós-tradução tem maior probabilidade de produzir proteínas de mamífero biologicamente activas. Têm sido usados vários vírus de DNA indutores de tumores como vetores para hospedeiros mamíferos. São particularmente importantes os numerosos vetores que compreendem as sequências de controlo da replicação, transcrição e/ou tradução do SV40 acoplados a sequências de controlo da replicação bacteriana, *e.g.*, os vetores



pcD desenvolvidos por Okayama e Berg, descritos em Mol. Cell. Biol. Vol. 2, pgs. 161-170 (1982) e Mol. Cell. Biol., Vol. 3, pgs. 280-289 (1983) e melhorados por Takebe *et al.*, Mol. Cell. Biol., Vol. 8, pgs. 466-472 (1988). Assim, estas referências são aqui incluídas como referência. Outros vectores de expressão de mamífero baseados em SV40 incluem os descritos por Kaufman e Sharp, em Mol. Cell. Biol., Vol. 2, pgs 1304-1319 (1982) e Clark *et al.*, na Patente U.S. 4,675,285, ambos aqui incluídos como referência. As células de macaco são geralmente os hospedeiros preferidos para os vectores atrás referidos. tais vectores contendo as sequências ori de SV40 e um gene A intacto podem replicar-se autonomamente em células de macaco (para dar um número de cópias superior e/ou um número de cópias estáveis superior do que os plasmídeos de replicação não autónoma). Ainda, os vectores contendo as sequências ori de SV40 sem um gene A intacto podem replicar-se autonomamente dando origem a elevado número de cópias (mas não estáveis) em células de macaco COS7, descrito por Gluzman, Cell, Vol. 23, pgs 175-182 (1981) e disponível na ATCC (Nº de acesso CRL 1651). Os vectores baseados em SV40 atrás referidos podem igualmente transformar outras células de mamífero, tais como células de ratinho, por integração no DNA da célula hospedeira.

Os organismos multicelulares podem também servir como hospedeiros para a produção dos polipeptídeos do invento, *e.g.*, larvas de insectos, Maeda *et al.*, Nature, Vol. 315, pgs 592-594 (1985) e Ann. Rev. Entomol., pgs. 351-372 (1989); e animais transgênicos, Jaenisch, Science, Vol. 240, pgs 1468-1474 (1988). Estas referências, tal como as outras são também aqui incluídas como referência.

I. Ensaio para a interleucina-10 e análogos

Proteínas e peptídeos relacionados com interleucina-10, referidos



colectivamente como IL-10s, apresentam várias actividades biológicas que poderão constituir a base de ensaios e unidades. Em particular, IL-10s possuem a propriedade de inibirem a síntese de pelo menos uma citocina do grupo constituído por IFN γ , linfotoxina, IL-2, IL-3 e GM-CSF numa população de células T auxiliares induzidas para sintetizarem uma ou mais destas citocinas através de exposição a células apresentadoras de antígeno singeneicas (APCs) e antígeno. Nesta actividade, as APCs são tratadas de forma a serem incapazes de se replicarem, mas a sua maquinaria de processamento de antígenos permanece funcional. Isto é adequadamente conseguido através da irradiação das APCs, *e.g.*, com cerca de 1500-3000 R (radiação gama ou raios X) antes de serem misturadas com as células T. Ver também a Tabela 2 para o ensaio da IL-10 de ratinho.

Tabela 2

Ensaio de IL-10 (CSIF) - Modificado para ensaio de proliferação Células apresentadoras de antígenos (APC)

- 1) Colocar baços de BALB/c (cerca de 10^8 células/baço) num tubo com cRPMI.
- 2) Produzir uma suspensão de células isoladas usando uma seringa de 10 ml (esterilmente na câmara de fluxo laminar), centrifugar a 1200 rp.
- 3) Ressuspender o sedimento em 5 ml de NH $_4$ Cl (0,83% em H $_2$ O) frio. Centrifugar novamente a 1200 rpm.
- 4) Ressuspender o sedimento em 5 ml de cRPMI (sem IL-2 para ensaio) e centrifugar para lavar.
- 5) Ressuspender em 5 ml de cRPMI e contar.
- 6) Irradiar com 3000 rad. (geralmente 20 min).
- 7) Ajustar a concentração de células a 8×10^6 /ml. (coloca-se 50 μ l



por alvéolo no ensaio para dar um total de 4×10^5 /alvéolo).

Titular IL-10 em 100 μ l de volume final em placa de microtitulação (ou em 50 μ l de volume final se se pretender adicionar anticorpo anti-IL-10).

Células Th1

1) Três dias antes do ensaio descongelar uma ampola de células HDK1 directamente em 2 x 25 ml de cRPMI contendo IL-2.

2) Observar as células no dia seguinte e se necessário dividir 1 em 2 ou 1 em 3.

3) No dia do ensaio centrifugar as células a 1200 rpm imediatamente antes de semear as células e ressuspender em 5 ml de cRPMI e contar (diluir a 1 para 2 em azul tripano).

4) Ajustar a concentração para 2×10^5 por ml e adicionar 50 μ l por alvéolo (final 10^4 células por alvéolo). Antes de semear adicionar KLH para dar uma concentração de 400 mg/ml. (Isto dará uma concentração final de 100 mg/ml).

Testemunhas

50 ml de células Th1 sem KLH.

50 ml de células Th1 + KLH.

50 ml de APC de baço.

mais e menos IL-10 (provavelmente a concentração mais alta está bem).

prefazer um volume final de 200 μ l.



Ordem do ensaio.

- 1) Preparar APC
- 2) Distribuir IL-10
- 3) Preparar células Th1 e distribuir.
- 4) Distribuir APC.

Após 48 horas remover 100 µl de sobrenadante para ELISA de IFNγ; adicionar então ³H-timidina (1 mCi por alvéolo) e colher na manhã seguinte.

Como alternativa, a inibição de citocinas pode ser ensaiada em reacções de linfócitos mistos (MLR) primários ou, preferencialmente secundários, neste caso não é necessário usar APCs singeneicas. MLRs são bem conhecidas neste campo, ver *e.g.*, Bradley, pgs 162-166, em Mischell *et al.*, eds. Selected Methods in Cellular Immunology (Freeman, San Francisco, 1980); e Battisti *et al.*, Meth. in Enzymol., Vol. 150, pgs. 83-91 (1987), os quais são aqui incluídos como referência. Resumidamente, duas populações de células linfóides alogénicas são misturadas, uma das populações tendo sido previamente tratada antes da mistura para evitar a proliferação, *e.g.*, por irradiação. preferencialmente, as populações celulares são preparadas numa concentração de cerca de 2×10^6 células/ml em meio suplementado, *e.g.*, RPMI 1640 com 10% de soro fetal de vitela. Para as testemunhas e culturas a testar, misturar 0,5 ml de cada uma das populações para o ensaio. Para um MLR secundário, as células que ficam após 7 dias no MLR primário são re-estimuladas com células estimuladoras irradiadas preparadas de fresco. A amostra suspeita de conter IL-10 pode ser adicionada às culturas a testar na altura da mistura e e testemunhas e culturas a testar podem ser analisadas quanto à produção de citocinas entre 1 e 3 dias após mistura.

A obtenção de populações de células T e/ou populações de APC para ensaios de IL-10 utiliza técnicas bem conhecidas que estão detalhadamente



descritas, *e.g.*, em DiSabato *et al.*, eds., Meth. in Enzymol., Vol. 108 (1984), a qual é aqui incluído como referência. As APCs para o ensaio de IL-10 preferido são monócitos do sangue periférico ou macrófagos dos tecidos. Estas são obtidos usando técnicas convencionais, *e.g.*, como descrito por Boyum, Meth. in Enzymol., Vol. 108, pgs. 88-102 (1984); Mage, Meth. in Enzymol., Vol. 108, pgs. 118-132 (1984); Livin *et al.*, Meth. in Enzymol., Vol. 108, pgs. 298-302 (1984); Stevenson, Meth. in Enzymol., Vol. 108, pgs. 242-249 (1984); e Romain *et al.*, Meth. in Enzymol., Vol. 108, pgs. 148-153 (1984), referências estas que aqui são incluídas como referência. Preferencialmente, as células T auxiliares são usadas nos ensaios de IL-10, as quais são obtidas separando primeiro os linfócitos do sangue periférico, baço ou nódulos linfáticos, depois seleccionando, *e.g.*, por adsorção ou citometria de fluxo, as células auxiliares usando um anticorpo anti-CD4, *e.g.*, OKT4 descrito na Patente U.S. 4,381,295 e adquirida à Ortho Pharmaceutical orp. Anti-CD4 de ratinho é adquirido à Becton-Dickson ou Pharmigen. As técnicas usadas estão bem descritas em Boyum, Scand. J. Clin. Lab. Invest., Vol. 21 (Suppl. 97), pg. 77 (1968); Meth. in Enzymol., Vol. 108 (referido atrás) e em Bram *et al.*, Meth. in Enzymol., Vol. 121, pgs. 737-748 (1986), cada um deles aqui incluído como referência. De um modo geral, os PBLs são obtidos a partir de sangue fresco por centrifugação em gradiente de densidade de Ficoll-Hypaque.

Pode ser empregue no ensaio uma variedade de antígenos, *e.g.*, hemocianina de lapa (KLH), γ -globina de galinha ou similares. Mais preferencialmente, em vez do antígeno, as células T auxiliares são estimuladas com anticorpo monoclonal anti-CD3, *e.g.*, OKT3 descrito na Patente U.S. 4,361,549, no ensaio.

As concentrações de citocinas nas amostras testemunha e a testar são medidas por ensaios biológicos e/ou imunoquímicos convencionais. A



construção de ensaios imunoquímicos para citocinas específicas é bem conhecida quando se dispõe da citocina purificada. Ver, *e.g.* Campbell, Monoclonal Antibody Technology (Elsevier, Amsterdam, 1984); Tijssen, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays (Elsevier, Amsterdam, 1985); e Patente U.S. 4,486,530, cada um deles aqui incluído como referência, são exemplos da numerosa literatura sobre o tema. Estojos de ELISA para IL-2 humana, IL-3 humana e GM-CSF humano podem ser adquiridos à Genzyme Corp. (Boston, MA); e um estojo de ELISA para IFN γ pode ser adquirido comercialmente à Endogen, Inc. (Boston, MA). Anticorpos policlonais específicos para linfotóxina humana podem ser adquiridos à Genzyme Corp. os quais podem ser usados num radioimuno-ensaio para linfotóxina humana, *e.g.*, Chard, An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques (Elsevier, Amsterdam, 1982).

Os ensaios biológicos para as citocinas referidas atrás podem ser igualmente usados para determinar a actividade de IL-10. Um ensaio biológico para a linfotóxina humana está descrito em Aggarwal, Meth. in Enzymol., Vol. 116, pgs. 441-447 (1985) e Matthews *et al.*, pgs. 221-225, em Clemens *et al.*, eds., Lymphokines and Interferons: A Practical Approach (IRL Press, Washington, D.C., 1987), cada um deles aqui incluído como referência. A IL-2 e GM-CSF podem ser testados com linhas celulares dependentes de factores CTLL-2 e KG-1, disponíveis na ATCC com os números de acesso TIB 214 e CCL 246, respectivamente. A IL-3 humana pode ser testada quanto à sua capacidade para estimular a formação de uma larga gama de colónias de células hematopoiéticas em culturas em agar mole, *e.g.*, como descrito por Metcalf, The Hemopoietic Colony Stimulating Factors (Elsevier, Amsterdam, 1984). IFN γ pode ser quantificado com ensaios anti-virais, *e.g.*, Meager, pgs. 129-147, em Clemens *et al.*, eds. (referido atrás). Os equivalentes de ratinho podem ser igualmente testados com as linhas celulares adequadas.



A produção de citocinas pode ser também determinada por análise de mRNAs. Os mRNAs de citocinas podem ser medidos por hibridação citoplasmática como descrito por White *et al.*, J. Biol. Chem., Vol. 257, pgs. 8569-8572 (1982) e Gillespie *et al.*, Patente U.S. 4,483,920. Assim, estas referências são aqui incluídas como referência. Outras abordagens incluem transferência para membranas usando RNA purificado, *e.g.*, capítulo 6, em Hames *et al.*, eds. Nucleic Acid Hybridization A Practical Approach (IRL Press, Washington, D.C., 1985). Podem ser igualmente usadas as técnicas de reação em cadeia com polimerase (PCR), ver Innis *et al.* (ed.) (1990) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc., New York, que aqui é incluído como referência.

Nalguns casos, as amostras a serem testadas quanto à actividade de IL-10 serão previamente tratadas para remover certas citocinas que possam interferir com o ensaio. Por exemplo, IL-2 aumenta a produção de IFN γ nalgumas células. Assim, dependendo das células T auxiliares usadas no ensaio, IL-2 poderá ter de ser removida da amostra a ser testada. Tais remoções são convenientemente conseguidas passando a amostra numa coluna de afinidade anti-citocinas convencional.

Por conveniência, as unidades de actividade de IL-10 são definidas em termos de capacidade de IL-10 para aumentar a proliferação de células MC/9 induzida por IL-4, o que está descrito na Patente U.S. 4,559,310 e disponível na ATCC com o número de acesso CRL 8306. Uma unidade/ml é definido como a concentração de IL-10 que dá 50% de estimulação máxima da proliferação de MC/9 acima do nível de IL-4 no ensaio que se segue. Diluições em duplicado ou em triplicado de IL-4 e IL-10 são preparadas em 50 μ l de meio por alvéolo numa placa de microtitulação convencional. O meio consiste em RPMI 1640, 10% de soro fetal de vitela, 2-mercaptoetanol 50 μ M, glutamina 2 mM, penicilina (100



U/l) e estreptomicina (100 mg/l). Adicionar IL-4, 25 μ l/alvéolo de 1600 U/ml (400 U/ml final) diluído em meio e incubado durante a noite, *e.g.*, 20-24 horas. Adiciona-se ^{3} H-timidina (*e.g.*, 50 mCi/ml em meio) a 0,5-1,0 mCi/alvéolo e as células são novamente incubadas durante a noite, após o que as células são colhidas e medida a radioactividade incorporada.

Para as descrições gerais da preparação das citocinas IL-4 e IL-10, ver Patente U.S. Nº 5,017,691 e U.S.S.N. 07/453,951, cada uma delas aqui incluída como referência.

II. Agonistas e antagonistas

Os agonistas de IL-10 podem ser moléculas que simulam a interacção de IL-10 com os seus receptores. Podem ser análogos ou fragmentos de IL-10 ou anticorpos contra os epitopos dos sítios de ligação do ligando dos receptores de IL-10 ou anticorpos anti-idiotípicos contra anticorpos particulares que se ligam aos fragmentos de IL-10 que interactivam com os receptores.

Os antagonistas podem ter a forma de proteínas que competem para a ligação a receptores, *e.g.*, os quais não possuem capacidade para activar o receptor enquanto bloqueiam a ligação de IL-10, ou moléculas que se ligam a IL-10, *e.g.*, anticorpos.

Podem ser induzidos anticorpos contra a citocina IL-10, seus fragmentos e análogos, ambos nas suas formas naturais e nas suas formas recombinantes. Ainda, podem ser induzidos anticorpos contra IL-10 nas suas formas activas ou nas suas formas inactivas, a diferença sendo que os anticorpos contra a citocina activa reconhecerão com maior probabilidade os epítopos que estão presentes apenas na conformação activa. Os anticorpos anti-idiotípicos são



também considerados nestes métodos e podem ser agonistas potenciais de IL-10.

Os anticorpos, incluindo fragmentos de ligação e versões de cadeia simples, contra fragmentos pré-determinados dos antígenos pretendidos, *e.g.*, citocinas, podem ser induzidos por imunização de animais com conjugados dos fragmentos com proteínas imunogénicas. Os anticorpos monoclonais são preparados a partir de células que secretam o anticorpo pretendido. Estes anticorpos podem ser despistados relativamente à ligação a análogos normais ou inactivos, ou despistados relativamente a actividade agonista ou antagonista. Estes anticorpos monoclonais de um modo geral ligar-se-ão com pelo menos um K_D de cerca de 1 mM, mais geralmente a pelo menos cerca de 300 μ M, tipicamente pelo menos cerca de 10 μ M, mais tipicamente pelo menos cerca de 30 μ M, preferencialmente a pelo menos cerca de 10 μ M e mais preferencialmente a pelo menos cerca de 3 μ M ou melhor. Se bem que nos tenhamos referido a IL-10, anticorpos semelhantes podem ser induzidos contra outros análogos, seus receptores e antagonistas.

Os anticorpos, incluindo fragmentos de ligação a antígenos, deste invento podem ter importância significativa em diagnóstico ou terapia. Podem ser potentes antagonistas que se ligam aos receptores de IL-10 e inibem a ligação de ligandos aos receptores ou que inibem a capacidade de IL-10 para induzir uma resposta biológica.

IL-10 ou fragmentos podem ser ligados a outros materiais, particularmente polipeptídeos, como polipeptídeos fundidos ou ligados covalentemente, para serem usados como imunogénios. A citocina e seus fragmentos podem ser fundidos ou ligados covalentemente a uma variedade de imunogénios, tais como hemocianina de lapa, albumina sérica bovina, toxóide do tétano, etc. Ver Microbiology, Hoeber Medical Division, Harper and Row, 1969;



Landsteiner (1962) Specificity of Serological Reactions, Dover Publications, New York and Williams *et al.* (1967) Methods in Immunology and Immunochemistry, Vol. 1, Academic Press, New York, cada um deles sendo aqui incluído como referência, para descrições dos métodos de preparação de anti-soros policlonais. Um método típico envolve a hiperimunização de um animal com um antígeno. O sangue do animal é então colhido pouco tempo após as imunizações repetidas e isolada a gamaglobulina. Nalguns casos, é desejável preparar anticorpos monoclonais a partir de vários hospedeiros mamíferos, tais como ratinhos, roedores, primatas, humanos, etc. A descrição de técnicas para a preparação de tais anticorpos monoclonais pode ser encontrada em, *e.g.*, Sites *et al.*, (eds) Basic and Clinical Immunology (4ª ed.), Lange Medical Publications, Los Altos, CA, e referência ali citadas; Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press; Goding (1986) Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2nd ed.) Academic Press, New York; Coligan *et al.*, (eds; 1991 e suplementos periódicos) Current Protocols in Immunology, Wiley and Sons, New York; e particularmente em Kohler e Milstein (1975) em Nature 256:495-497, os quais descrevem um método para a produção de anticorpos monoclonais. Cada uma das referências é aqui incluída como referência. Resumidamente, este método envolve a injeção de um animal com um imunogénio. O animal é então morto e retiradas as células do seu baço, as quais são fundidas com células de mieloma. O resultado é uma célula híbrida ou "hibridoma" que é capaz de se multiplicar *in vitro* em condições selectivas, ao contrário das células de mieloma parentais. A população de hibridomas é então despistada para isolar clones individuais, cada um dos quais secreta uma única espécie de anticorpo contra o imunogénio. Desta forma, a espécie de anticorpo individual obtida são produtos de células B isoladas imortalizadas e clonadas a partir do animal imunizado geradas como resposta a um sítio específico reconhecido na substância imunogénica.



Outras técnicas adequadas envolvem exposição de linfócitos *in vitro* a polipeptídeos antigénicos ou, como alternativa, selecção de bibliotecas de anticorpos em fagos ou vectores semelhantes. Ver, Huse *et al.*, (1989) "Generation of a Large Combinatorial Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda," Science 246:1275-1281; e Ward *et al.* (1989) Nature 341:544-546, cada um deles é aqui incluído como referência. os polipeptídeos e anticorpo do presente invento podem ser usados com ou sem modificação, incluindo anticorpos quiméricos ou humanizados. Igualmente, podem ser produzidas imunoglobulinas recombinantes, ver Cabilly, Patente U.S. Nº 4,816,567. Estas patentes são aqui incluídas como referência.

Os anticorpos induzidos contra a citocina ou seu receptor também serão úteis para induzir anticorpos anti-idiotípicos, os quais podem apresentar propriedades agonistas ou antagonistas. Estes serão úteis na modulação de várias respostas imunológicas conforme discutido atrás.

III. Purificação e composições farmacêuticas

Quando os polipeptídeos do presente invento são expressos na forma solúvel, *e.g.*, como um produto secretado de leveduras ou células de mamífero transformadas, eles podem ser purificados de acordo com processos convencionais, incluindo passos de precipitação com sulfato de amónio, cromatografia de permuta iónica, filtração em gel, electroforese, cromatografia de afinidade, e/ou similares, ver, *e.g.*, "Enzyme Purification and Related Techniques," *Methods in Enzymology*, 22:233-577 (1977), e Scopes, R., *Protein Purification: Principles and Practice* (Springer-Verlag, New York, 1982), os quais são aqui incluídos como referência, proporcionam instruções para tais purificações. Igualmente, quando os polipeptídeos do invento são expressos na forma insolúvel, por exemplo como agregados, corpos de inclusão, ou similares, podem ser puri-



ficados por processos convencionais, incluindo separação por centrifugação dos corpos de inclusão das células hospedeiras rebentadas, solubilização dos corpos de inclusão com agentes caotrópicos e redutores, diluição da mistura solubilizada e redução da concentração do agente caotrópico e do agente redutor de forma a que o polipeptídeo adquira a conformação biologicamente activa. Estes últimos processos estão descritos nas referências que se seguem, as quais são aqui incluídas como referência: Winkler *et al.*, *Biochemistry*, 25: 4041-4045 (1986); Winkler *et al.*, *Biotechnology*, 3: 992-998 (1985); Koths *et al.*, Patente U.S. 4,569,790; e Pedidos de patente europeia 86306917.5 e 86306353.3.

Conforme aqui é usado "quantidade eficaz" significa uma quantidade suficiente para melhorar ou prevenir um estado de choque, conforme determinado, por exemplo, por sintomas reconhecidos, tais como calafrios, vasoconstrição, confusão mental, hipoperfusão, hiperpirexia e similares. A quantidade eficaz para um doente particular pode variar dependendo de factores tais como o estado e tipo de sépsia a ser tratada, estado de saúde geral do doente, método de administração, gravidade dos efeitos secundários e similares. De um modo geral, um reagente de IL-10 é administrado como uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade eficaz do reagente e um veículo farmacêutico. Ver, *e.g.*, Kaplan and Pasce (1984) *Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation*, Mosby and Co., St. Louis, MO; e Gilman *et al.*, (1990) *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics* (8^a ed), Pergamon Press; os quais são aqui incluídos como referência. Em certas aplicações, o reagente terapêutico IL-10 pode ser combinado com um outro ingrediente farmacêuticamente activo, incluindo uma composição antibiótica.

Um veículo farmacêutico pode ser qualquer substância não tóxica compatível adequada para a administração das composições do invento a um doente. Muitas composições úteis para administração parenteral de tais drogas



são conhecidas, *e.g.*, Remington's Pharmaceutical Science, 15^a Ed. (Mack Publishing Company, Easton, PA 1980). Como alternativa, as composições do invento podem ser introduzidas num doente através de um sistema de libertação de droga implantável ou injectável. Ver, *e.g.*, Urquhart *et al.*, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., Vol. 24, pgs. 199-236 (1984); Lewis, ed. Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals (Plenum Press, New York, 1981); Patente U.S. 3,773,919; Patente U.S.3,270,960; cada um deles sendo aqui incluído como referência, e similares.

Quando administrado parenteralmente, a IL-10 é formulada numa forma de dosagem unitária injectável (solução, suspensão, emulsão) em associação com um veículo farmacêutico. Exemplos de tais veículos são soro fisiológico normal, solução de Ringer, solução de dextrose e solução de Hank. Veículos não aquosos, tais como óleos fixados e oleato de etilo, podem ser igualmente empregues. Um veículo preferido é 5% de dextrose/soro fisiológico. O veículo pode conter pequenas quantidades de aditivos tais como substâncias que aumentam a isotonicidade e estabilidade química, *e.g.*, tampões e conservantes. O reagente de IL-10 é preferencialmente formulado na forma purificada substancialmente livre de agregados e outras proteínas numa concentração de cerca de 5 a 20 mg/ml. Preferencialmente, IL-10 é administrado por infusão contínua de forma a que uma quantidade na gama de aproximadamente 50-800 mg seja libertado por dia (*i.e.*, cerca de 1-16 mg/Kg/dia). A taxa de infusão diária pode variar com base no controlo dos efeitos secundários e contagens das células do sangue.

Considerações semelhantes são aplicáveis na determinação de uma quantidade eficaz de um agonista ou antagonista de IL-10, se bem que certos antagonistas possam requerer gamas de dosagem mais largas, *e.g.* nas gamas superiores.



IV. Observações e mecanismos biológicos

Ainda que não vinculada aos mecanismos propostos que se seguem, a discussão a seguir proporciona algumas perspectivas sobre as utilizações e aplicações de análogos, agonistas e antagonistas de IL-10. Conhecimentos básicos úteis sobre o funcionamento, desenvolvimento e diferenciação do sistema imunitário podem ser adquiridos, *e.g.*, em Paul (ed) (1989) Fundamental Immunology (2ª ed) Raven Press, New York, que aqui é incluído como referência. Os capítulos 26 sobre inflamação, 28 sobre sobre hipersensibilidade do tipo retardado e sobre auto-imunidade são particularmente relevantes para as utilizações aqui descritas.

Os efeitos de IL-4 e IL-10 na síntese de citocinas e actividade LAK induzida por IL-2 em PBMC humanos e células NK purificadas foram estudados, *e.g.*, em Study A.. Enquanto que IL-4 e IL-10 inibem ambos a síntese de IFN γ e TNF α em PBMC, apenas IL-4 inibe a síntese de IFN γ induzida por IL-2 em células NK purificadas. Assim, IL-4 e IL-10 inibem a síntese de citocinas em células NK por mecanismos diferentes.

Os resultados de experiências para o estudo da produção de TNF α sugerem uma conclusão semelhante. No entanto, neste caso os monócitos também produzem esta citocina. IL-10 não tem um efeito directo na síntese de TNF α induzida por IL-2 em células NK, mas é capaz de bloquear a produção de TNF α em monócitos. A estimulação de culturas, contendo células NK e células CD14+, por IL-2 resultou num grande aumento da produção de TNF α e IL-10 bloqueou totalmente este aumento. Uma vez que IL-2 não activa as células CD14+ para produzirem TNF α adicional, o aumento sinérgico provavelmente representa o aumento da síntese de TNF α em células NK. Assim, parece que IL-



IL-10 inibe a produção de $\text{TNF}\alpha$ em monócitos assim como os seus efeitos co-estimuladores na síntese de $\text{TNF}\alpha$ em células NK.

Se bem que IL-4 e hIL-10/vIL-10 suprimam a síntese de $\text{IFN}\gamma$ e $\text{TNF}\alpha$ em PBMC estimulados com IL-2, apenas IL-4 inibe a actividade LAK induzida por IL-2. Estas observações indicam que a produção de citocinas e a citotoxicidade de PBMC, induzidas por IL-2, são reguladas através de vias diferentes. Estes resultados são importantes na aplicação clínica de IL-2 e LAK. Problemas associados à terapia com IL-2 têm incluído efeitos cardiovasculares e um síndrome de derrame capilar. A causa destes efeitos secundários são desconhecidas, mas poderão envolver libertação de citocinas tais como $\text{TNF}\alpha$ induzida por IL-2 em doentes com cancro. O facto de IL-10 inibir a síntese de citocinas induzida por IL-2 mas não a actividade LAK sugere que esta citocina possa ser útil, em combinação com IL-2, para o tratamento de tais doentes. Ainda, face aos dados que sugerem que $\text{TNF}\alpha$ pode induzir expressão do vírus da imunodeficiência humana em células T infectadas, a capacidade de IL-10 para inibir a síntese de $\text{TNF}\alpha$ é de possível interesse neste contexto.

Estes estudos também demonstram que IL-10 humana é produzida em quantidades relativamente grandes em monócitos após activação. Estudos cinéticos mostraram que níveis baixos de IL-10 foram detectados 7 horas após a activação dos monócitos e a produção máxima de IL-10 ocorreu 24-48 horas após activação. Esta foi relativamente tardia comparado com a produção de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e $\text{TNF}\alpha$, os quais foram secretados em níveis elevados entre 4 e 8 horas após activação. Também foi demonstrado que IL-10 humana possui fortes efeitos inibidores na produção de citocinas por monócitos após activação com $\text{IFN}\gamma$, LPS ou combinações de $\text{IFN}\gamma$ e LPS. Estes efeitos inibidores são específicos de IL-10 uma vez que puderam ser totalmente neutralizados pelo mAb 19F1 que inibe tanto a actividade de IL-10 como de v-IL-10. IL-10



adicionada em concentrações de 100 U/ml reduziu a síntese de IL-1 α , TNF α , GM-CSF em mais de 90% após activação óptima dos monócitos por combinações de IFN γ (100 U/ml) e LPS (1 μ g/ml). Os efeitos inibidores na produção de IL-1 β , IL-6 e IL-8 foram menos pronunciados, particularmente quando os monócitos foram optimamente activados por combinações de IFN γ e LPS. O mecanismo pelo qual IL-10 inibe a produção de citocinas por monócitos não é clara, *e.g.*, ou seja desconhece-se se estes efeitos da IL-10 são directos ou mediados indirectamente através de outros factores. Uma vez que IL-1 pode induzir a produção de IL-6 em fibroblastos, timócitos e monócitos, é, por exemplo, possível que a inibição parcial de IL-6 seja o resultado da produção reduzida de IL-1.

IL-10 viral, que se demonstrou possuir actividades biológicas em células humanas, semelhante a IL-10, foi menos extensivamente testada. No entanto, v-IL-10 inibiu a produção de TNF α e de GM-CSF em monócitos activados com LPS no mesmo grau que IL-10 humana. Estes efeitos inibidores de v-IL-10 na produção de TNF α e de GM-CSF foram neutralizados pelo mAb 19F1, ilustrando a especificidade dos efeitos de v-IL-10.

A inibição da secreção de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , GM-CSF e G-CSF ocorreu a nível da transcrição. IL-10 inibiu fortemente a síntese de mRNA específico de citocinas induzida por LPS, conforme determinado por análise de Northern e PCR. A análise por PCR foi realizada em condições que permitiram uma comparação dos produtos de reacção de amostras individuais de forma semi-quantitativa. Isto foi validado pelo facto da amplificação de cDNAs com escorvas específicas para β -actina ter resultado em quantidades equivalentes de produtos de reacção entre as amostras e resultados quantitativamente comparáveis foram obtidos quando a expressão do mRNA de IL-10 foi determinada nas mesmas amostras por análise Northern e PCR. Ainda, os níveis



de expressão de mRNAs de citocinas são proporcionais aos níveis de proteína presente nos sobrenadantes destas culturas. IL-10 não afectou a expressão de TGF β em monócitos activados. No entanto, deverá notar-se que TGF β foi constitutivamente expresso em monócitos não activados e que a activação dos monócitos por LPS não afectou os níveis de mRNA de TGF β . Assoian *et al.* (1987) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 84:6020-6024, demonstraram que os monócitos expressam constituivamente mRNA de TGF β e que a secreção de TGF β requiere a activação de monócitos. No entanto, desconhece-se se IL-10 tem efeito na conversão de TGF β de uma forma latente para uma forma activa.

Demonstrou-se que a produção de IL-10 é inibida por IL-4 ao nível da transcrição. Se bem que os efeitos inibidores de IL-4 sobre a produção de IL-10 fossem consideráveis, IL-4 não foi capaz de bloquear a produção de IL-10 totalmente. IL-4 inibiu a produção de IL-10 apenas até 70%, mesmo quando foram usadas concentrações elevadas de IL-4 (400 U/ml), as quais eram suficientes para inibir totalmente a produção de IL-1, IL-6 e TNF α . Também já foi demonstrado que IL-4 é capaz de inibir a produção de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF α em monócitos humanos. Estes resultados foram confirmados e demonstrou-se ainda que IL-4 também inibiu a produção de IL-8, GM-CSF e G-CSF em monócitos humanos activados com LPS. Esta inibição ocorreu ao nível da transcrição. Os resultados ilustram ainda que IL-4 e IL-10 têm efeitos semelhantes sobre a expressão de citocinas em monócitos humanos, o que sublinha os efeitos pleiotrópicos das citocinas e a redundância do sistema imunitário.

É de salientar que IL-10 é uma citocina auto-reguladora, uma vez que inibe fortemente a síntese do mRNA de IL-10 em monócitos activados durante 24 horas. Ainda, a activação de monócitos por LPS na presença de mAbs neutralizantes anti-IL-10 resultou num aumento da expressão de mRNA de IL-10



às 24 horas, indicando que a IL-10 produzida endogenamente também inibiu a síntese de mRNA de IL-10. O facto de IL-10 ser capaz de regular negativamente a sua própria produção por monócitos humanos torna-a a primeira citocina que é regulada por um mecanismo de retroacção negativa. Os efeitos auto-reguladores da IL-10 produzida endogenamente foram também observados na produção de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , GM-CSF e G-CSF em monócitos activados por LPS com LPS na presença de anticorpos anti-IL-10. No entanto, os efeitos inibidores da IL-10 endógena na produção destas citocinas foram menos pronunciados do que os da IL-10 exógena adicionada quando do estabelecimento da cultura. Isto está relacionado com o facto de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , e G-CSF serem já produzidos em níveis elevados às 4-8 horas após activação, enquanto que a produção máxima de IL-10 endógena ocorre muito mais tarde às 24-48 horas após activação. Esta noção é suportada pela observação de que os efeitos inibidores mais fortes da IL-10 produzida endogenamente foram encontrados para a secreção de GM-CSF, que se observou ser produzida tardiamente após a activação dos monócitos. Assumindo que a síntese de mRNA de IL-10 reflete e precede a secreção da proteína IL-10 e que IL-10 pode interagir apenas com o seu receptor na superfície celular, estes resultados sugerem que os efeitos inibidores de IL-10 produzida endogenamente ocorrem relativamente tarde e podem portanto ser de particular importância nas fases tardias de uma resposta imune.

IL-10 foi inicialmente descrita no ratinho como um factor inibidor da síntese de citocinas (CSIF) produzido pelas células Th2, o qual inibia a produção de citocinas (predominantemente IFN γ) pelas células Th1. Este efeito inibidor de m-IL-10 na produção de citocinas pelas células Th1 necessitava da presença de macrófagos, ver *e.g.*, Fiorentino *et al.*, (1991) J. Immunol. 146:3444-3451; Trowbridge *et al.*, (1981) J. Ept'l Med. 154:1517-1524; Lambert *et al.* (1989) Cell. Immunol. 120:401-418; e Hirsch *et al.* (1981) J. Ept'l Med. 154:713-



725, os quais são aqui incluídos como referência. Aqui IL-10 e v-IL-10 inibem fortemente a proliferação de células T específica de antígeno quando os monócitos são usados como APCs. Ainda, a redução nas respostas proliferativas de células T específicas de antígeno é largamente devida à reduzida capacidade de apresentação de antígeno dos monócitos provocada pelos fortes efeitos reguladores negativos de IL-10 sobre a expressão do antígeno MHC classe II nestas células. Estes resultados juntamente com o facto de se ter encontrado que IL-10 é produzida na fase tardia em monócitos e que possui efeitos auto-reguladores sobre a secreção de IL-10 nestas células, indica que IL-10 possui fortes efeitos reguladores negativos nas referidas respostas de células T específicas de antígeno. Assim IL-10 pode desempenhar um papel essencial no refreamento de respostas proliferativas de células T induzidas por antígenos. A noção de que UL-10 produzida pelos monócitos pode também ter uma forte actividade de retroacção auto-reguladora sobre a activação das células T, é apoiada pela observação de que IL-10 produzida pelos monócitos após activação por LPS é responsável pela regulação negativa dos antígenos MHC classe II nestas células, uma vez que a expressão de MHC classe II não foi reduzida e sendo mesmo fortemente aumentada quando se realizaram estimulações com LPS na presença do mAb neutralizante anti-IL-10.

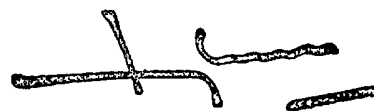
As citocinas pro-inflamatórias, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF α , estão envolvidas em processos inflamatórios agudos e crónicos e em muitas doenças auto-imunes, incluindo artrite reumatóide. Estas citocinas modulam a activação e função de células do sistema imunitário, mas também as das células endoteliais, queratinócitos e hepatócitos. O facto de IL-10 ter fortes efeitos reguladores negativos na secreção destas citocinas sugere que IL-10 seja um inibidor potente da inflamação. Com base nestas propriedades descritas, as quais incluem inibição da proliferação de células T específica de antígeno através da redução da capacidade APC dos monócitos através da regulação negativa dos



antígenos MHC classe II nestas células e os efeitos inibidores sobre a secreção de citocinas pro-inflamatória em monócitos, parece que IL-10 desempenha um papel importante como supressor das respostas imune e inflamatória. Este papel é ainda confirmado por estudos em modelos *in vitro* e *in vivo* das respostas a superantígenos de endotoxina e enterotoxina.

O presente estudo demonstra que IL-10 possui efeito inibidor sobre a produção de citocinas induzida por LPS em linhas celulares de macrófagos e macrófagos peritoneais. Assim, IL-10 não só tem um papel importante na regulação da resposta de células T, como também nas respostas inflamatórias induzidas durante a infecção ou ferimento.

O efeito de IL-10 nas linhas celulares de macrófagos é mais pronunciado do que o induzido por quantidades semelhantes de IL-4, que se demonstrou previamente inibir a produção de citocinas em macrófagos e monócitos de ratinho e humanos. Estes resultados mostram uma inibição significativa, por IL-4, da produção de proteína $\text{TNF}\alpha$ induzida por LPS, mas uma inibição menos marcada da síntese de IL-6, nestas linhas celulares. No entanto, a inibição de $\text{TNF}\alpha$ por IL-4 não é tão grande quanto anteriormente descrito para monócitos humanos. Esta diferença pode ser explicada pela diferença das espécies, utilização de linhas celulares de macrófagos diferenciados em vez de monócitos ou porque estes estudos usaram 10 $\mu\text{g/ml}$ de LPS em oposição à dose de 100 ng/ml usada num dos sistemas de monócitos humanos. Ao contrário de IL-4, IL-10 inibiu significativamente a produção de proteína IL-6, $\text{TNF}\alpha$ e IL-1 nesta concentração elevada de LPS. A estimulação das linhas celulares de macrófagos com LPS e $\text{IFN}\gamma$ induziu um nível muito superior de $\text{TNF}\alpha$ e IL-6 e, nalguns casos, este foi resistente à acção de IL-4, sugerindo que IL-4 e $\text{IFN}\gamma$ possuem efeitos opostos e que se contrariam em certos aspectos da activação de macrófagos. Novamente isto está em contradição



com os estudos em monócitos humanos, os quais foram realizados com quantidades mais baixas de LPS. Mais uma vez, a inibição mediada por IL-10 da produção de IL-6 e $\text{TNF}\alpha$, induzida por $\text{IFN}\gamma$ mais LPS, foi mais significativa do que o observado com IL-4. A inibição da expressão de RNA codificadora de IL-6 e $\text{TNF}\alpha$ induzida por LPS ou $\text{IFN}\gamma$ mais LPS foi também observada usando um método semi-quantitativo de amplificação por PCR para o RNA sujeito a transcrição inversa. Nalguns casos, IL-4 inibiu a expressão num nível semelhante a IL-10, sugerindo que IL-10 possui um efeito semelhante na secreção ou estabilidade das proteínas traduzidas. Apesar de IL-10 ter os seus efeitos, parece que o seu papel inibidor final na produção de citocinas por macrófagos é mais potente do que o observado com IL-4. Os efeitos de IL-10 na produção de monocinas sugere que este forte poder inibidor possa ter potencial como agente anti-inflamatório talvez numa larga variedade de manifestações clínicas.

Uma vez que também se demonstrou que os macrófagos peritoneais foram inibidos por IL-10 de células T estimuladoras, testou-se se IL-10 inibiu a secreção de citocinas por esta população celular purificada. Macrófagos peritoneais purificados por FACS obtidos a partir de ratinhos BALB/c ou CBA/J, estimulados com LPS produziram níveis significativos de proteína IL-6 que foi apenas ligeiramente reduzida na presença de IL-10. Uma vez que dos preliminares de PCR sugeriram que os macrófagos purificados produziam IL-10, nalgumas das estimulações com LPS foi incluído um anticorpo anti-IL-10. A adição deste anticorpo às estimulações com LPS em ambas as estirpes de ratinho elevou a produção da proteína IL-6 para um nível muito superior (30-35 ng/ml por 7×10^5 células/ml, em 20 horas). Isto foi consistente com a produção de citocinas por macrófagos sob estreito controlo autócrino ou que exista mais de uma população de macrófagos nos macrófagos peritoneais Mac-1^+ , brilhante, uma das quais tem controlo sobre as outras através da sua produção de IL-10. Os resultados obtidos paralelamente no sistema de monócitos humanos mostra que



IL-10 inibe a produção de citocinas induzida por LPS, incluindo a produção da própria IL-10, em monócitos humanos purificados por elutriação. De acordo com descrições anteriores de efeitos contrários de citocinas derivadas de células T auxiliares, tais como IL-4 e IL-10, com citocinas de células T auxiliares Th1, tais como IFN γ , são proporcionados mais dados apoiando o facto destas citocinas poderem ter efeitos contrários umas sobre as outras. IFN γ aumentou o nível de IL-6 produzida como resposta a LPS, até um nível quase tão alto quanto o conseguido por anti-IL-10, ao inibir ostensivamente a produção de IL-10 pelos mesmos macrófagos. Estes resultados sugerem que a produção de citocinas tais como IL-6 e TNF α seja regulada por IL-10, a qual por sua vez está sob o controlo de de IFN γ produzido pelas células T activadas e células NK. Esta acção de de IFN γ poderá explicar as observações anteriores mostrando que a incubação de macrófagos peritoneais com de IFN γ , durante 24 horas, aumentou a sua capacidade para estimular as células Th1.

Desconhece-se o mecanismo de como IL-10 inibe a síntese de citocinas em macrófagos na presença de células estimuladoras. Face ao decréscimo significativo na síntese de citocinas observado quando os macrófagos são estimulados na presença de IL-10, IL-10 pode regular negativamente uma actividade co-estimuladora necessária a uma produção de citocinas óptima como resposta a macrófagos e antígenios. Usando sobrenadantes obtidos a partir de macrófagos 1G18.LA, foi possível ultrapassar o efeito inibidor de IL-10 em macrófagos e na estimulação de células Th1 dependente de antígeno. Isto é consistente com um mecanismo em que IL-10 não medeia os seus efeitos na síntese de citocinas através da regulação negativa de um co-estimulador solúvel. É possível, apesar de improvável, que IL-10 interfira com a acção e não com a produção de tal factor, ou que tal co-estimulador seja altamente sensível ou absorvido e não esteja presente nas preparações de sobrenadante. Como alternativa, IL-10 pode inibir a expressão de um co-estimulador ligado a



membranas, o qual poderá também explicar descrições anteriores sugerindo que a estimulação das células requiera uma APC/célula acessória que não possa ser substituída por um co-estimulador solúvel. Uma explicação alternativa para o mecanismo da inibição da síntese de citocinas por IL-10 poderá ser que IL-10 induza a produção de um ou mais factores inibidores pelo macrófago, os quais actuarão então sobre as células T para inibir a secreção de citocinas. A mistura de macrófagos e células B APC num sistema específico de antígeno para a estimulação de células Th1 conduz a uma estimulação aditiva das células T, comparado com a estimulação por cada uma das APC individuais. A presença de IL-10 inibe a síntese de citocinas pela célula até ao nível que a célula B APC atinge sózinha. Isto sugere que o macrófago não induz a produção de um inibidor que actue directamente sobre a célula T ou célula B APC. Se bem que improvável, é possível que tal inibidor possa ser específico para interacções macrófagos-células T, ou que a célula B APC de alguma forma ultrapasse ou escape ao efeito de tal actividade. Os resultados obtidos no sistema humano sugerem que IL-10 não atinge a sua inibição de proliferação das células T auxiliares via um inibidor solúvel ou factor co-estimulador produzido pelo monócito. No entanto, os seus efeitos podem ser explicados pela regulação negativa dos antígenos MHC classe II pela IL-10 em monócitos humanos, o que ainda não foi observado no sistema de ratinho.

Para além da regulação da função efectora, IL-10 poderá também desempenhar um papel na iniciação de uma resposta imune no sentido da produção de anticorpos ou de hipersensibilidade do tipo retardado (DTH), por activação de diferentes sub-séries de células T auxiliares CD4 produtoras de diferentes padrões de citocinas. O facto de tanto as células B como os macrófagos produzirem IL-10 e também funcionarem como APC, sendo simultaneamente sensíveis a diferentes moduladores do tipo citocina (IFN γ inibe muitas das funções das células B; IL-10 inibe a função APC dos macrófagos mas não das



células B), dá apoio a esta teoria. Estes estudos mostram ainda que IL-10 tem um efeito inibidor sinificativo na síntese de citocinas em macrófagos, assim como provoca uma alteração morfológica marcada nos macrófagos peritoneais. Consideradas na sua globalidade estas observações sugerem um papel importante para IL-10, não só na regulação das respostas das células T como também como modulador importante das respostas inflamatórias agudas induzidas pela infecção ou ferimento.

No estudo D foi testada a capacidade de IL-10 para inibir *in vivo* a toxicidade mediada por superantigénios. IL-10 é capaz de inibir a produção de citocinas pelas células T, em parte através da inibição da capacidade dos macrófagos para activarem as células T. Os superantigénios têm sido definidos como moléculas que activam as células T formando uma "ponte" entre a cadeia V β do TCR e as moléculas MHC classe II presentes nas APCs. Estes resultados sugeriram que IL-10 poderá inibir a produção de citocinas pelas células T activadas por superantigénios apresentados pelos macrófagos. Os superantigénios podem ser endógenos, *e.g.*, codificadas por vírus ou exógenos, *e.g.*, enterotoxinas microbianas. Os superantigénios mais estudados do último grupo incluem as enterotoxinas de estafilococos. Sabe-se agora que a toxicidade apresentada por estas toxinas depende da sua capacidade para activar células T *in vivo*. Estas observações sugerem que os agentes que inibem a activação das células T prevenirão a toxicidade dos superantigénios. Isto é consistente com a observação de que a ciclosporina evita a toxicidade mediada por SEB. De acordo com este modelo, TNF α é o principal mediador da toxicidade. Os resultados aqui apresentados indicam que IL-10 é capaz de prevenir a toxicidade de SEB, provavelmente através da sua capacidade para inibir a produção de TNF pelas células T.

Estas observações têm implicações interessantes para o mecanismo



de acção de IL-10 *in vivo*. Demonstrou-se que IL-10 inibe funções dos macrófagos, *e.g.*, produção de citocinas, capacidade para activar células T e induzir a expressão de antigénio Ia nas células B. Mas uma vez que a toxicidade de SEB depende da expressão dos antigénios Ia por APC, o resultado destas experiências *in vivo* foi incerto. O facto de IL-10 prevenir a toxicidade induzida por SEB sugere que a principal APC *in vivo* é o macrófago, não a célula B.

Estes resultados têm implicações importantes para a utilização terapêutica de IL-10. Para além da contaminação de alimentos provocada por enterotoxinas de estafilococos, foi descrita uma série de doenças como sendo induzidas por superantigénios, *e.g.*, síndrome do choque tóxico, doença de Kawasaki, doenças causadas por toxinas de estreptococos e doenças auto-imunes como sejam a artrite reumatóide.

IL-10 é altamente eficaz na protecção de ratinhos da endotoxémia letal, um resultado que sugere que IL-10 pode ser útil no tratamento de sepsis bacteriana. Se bem que muitos outros reagentes, *e.g.*, anticorpos contra TNF α ou contra endotoxinas, e a IL-1Ra, sejam correntemente usados em ensaios clínicos para o tratamento de sepsis bacteriana, a maior parte necessita de ser dada antes da indução da sepsis nas experiências com modelos animais para uma protecção óptima. Uma excepção a isto, a IL-1Ra, é eficaz quando administrada na altura da indução da sepsis em experiências com modelos animais, mas deve ser administrada em quantidades suficientemente grandes para bloquear todos os receptores de IL-1 endógenos. As doses farmacológicas de IL-10 também produzem uma série de efeitos na função do macrófago/monócito que deverão contribuir para a protecção da endotoxémia letal, muito possivelmente em quantidades inferiores às saturantes dos receptores.

Se bem que as discussões anteriores sejam dirigidas para os efeitos



da administração de IL-10 na regulação e diferenciação de vários aspectos dos sistema imunitário, é possível ir mais longe através do bloqueio dos efeitos da citocina IL-10 usando anticorpos anti-IL-10.

Os resultados aqui apresentados indicam que o tratamento contínuo de ratinhos desde o nascimento até à idade adulta com anticorpos anti-IL-10 reduz drasticamente o número total e função das células B Ly-1, sem alteração do número, fenótipo ou imunocompetência das células B convencionais situadas nos baços destes mesmos animais. Várias observações apoiam a depleção proposta de células B Ly-1 em ratinhos tratados com anti-IL-10: (a) ratinhos tratados com anti-IL-10 contêm menos ou nenhuma células B nas suas cavidades peritoneais, um sítio de enriquecimento em células B Ly-1 nos ratinhos normais. (Células das lavagens peritoneais de ratinhos BALB/c de 8 semanas de idade no sistema de tratamento de animais DNAX contêm menos de 5% das células B convencionais por análise de fenótipo); (b) ratinhos tratados com anti-IL-10 contêm 0-10% dos níveis séricos normais de IgM, o que é consistente com experiências de reconstituição anteriores que identificaram as células B Ly-1 como a fonte predominante de IgM circulante; e (c) ratinhos tratados com anti-IL-10 produziram pouco ou nenhum anticorpo como resposta à injeção com fosforilcolina e α 1,3-dextrano, antígenos para os quais existem células B específicas na subserie de células B Ly-1. Os dados sugerindo um compartimento de células B convencionais inalterado em ratinhos tratados com anti-IL-10 são igualmente convincentes, com números inalterados de células B do baço apresentando fenótipos de marcadores de superfície celular normais e respondendo normalmente a antígeno dependente do timo e a mitógenos das células B. A depleção selectiva de células B Ly-1 em ratinhos tratados com anti-IL-10 verificou-se ser transitória, uma vez que as células B Ly-1 reapareceram nas cavidades peritoneais destes animais várias semanas após paragem do tratamento com IL-10.



Foram considerados vários mecanismos possíveis para a explicação da depleção selectiva de células B Ly-1 em ratinhos tratados com anti-IL-10. Os resultados apresentados indicam que esta é, pelo menos em parte, a consequência do aumento de IFN γ após o tratamento anti-IL-10, uma vez que a coadministração de anticorpos neutralizantes anti-IL-10 e anti-IFN γ evitam substancialmente a depleção de células B peritoneais nestes estudos. A implicação de que IFN γ directa ou indirectamente inibe o desenvolvimento de células B Ly-1 deriva de observações anteriores de que IFN γ provoca supressão ligeira da proliferação induzida *in vitro* por IL-5 do linfoma B Ly-1⁺ BCL1. Ao prolongar-se estes estudos, observou-se supressão mediada por IFN γ da proliferação de células peritoneais induzida por LPS, mas não células do baço de ratinhos BALB/c normais. Não está totalmente compreendido se o aumento de IFN γ nos ratinhos tratados com anti-IL-10 é totalmente devido à depleção de células B Ly-1 e se isto reflete uma acção directa do IFN γ das células B Ly-1 ou algum efeito indirecto mediado por IFN γ . Possivelmente, outras alterações nos ratinhos tratados com anti-IL-10 contribuem ainda para a depleção de células B Ly-1. O tratamento anti-IL-10 conduzirá provavelmente ao aumento dos níveis de monocinas endógenas. Os ratinhos tratados com anti-IL-10 são cerca de 50 vezes mais susceptíveis à morte pelo choque induzido por LPS, um caso conhecido como sendo mediado por citocinas, e 5 dos 32 ratinhos tratados com anti-IL-10 possuem níveis séricos substanciais de IL-6, uma monocina que não é geralmente encontrada em circulação nos animais normais e que não foi detectada nos soros de qualquer um dos 10 animais testemunha destas experiências. No entanto, ratinhos transgénicos IL-6, ou animais que possuem níveis muito elevados de monocinas séricas, quando da administração *in vivo* de LPS parecem possuir níveis séricos de IgM normais, sugerindo números inalterados de células B Ly-1. Resultados anteriores em que células B Ly-1, mas não células B convencionais produzem IL-10 constitutiva e induzível levou à sugestão de que IL-10 actua



como um factor de crescimento autócrino. Isto agora parece improvável face aos números substanciais de células B Ly-1 peritoneais recuperados de ratinhos tratados com anticorpos anti-IL-10 e anti-IFN γ .

O ratinho sem células B Ly-1 criado por tratamento contínuo com anti-IL-10 é consideravelmente semelhante ao ratinho imunodeficiente xid, uma estirpe mutante espontânea derivada de ratinhos CBA/CaH que não possui células B Ly-1 e que não responde a uma subsérie de antígenos independentes do timo. Apesar destas semelhanças, os nossos estudos preliminares revelaram que ratinhos xid produzem IL-10 normalmente e contêm receptores de IL-10 funcionais, distinguindo assim mecanisticamente ratinhos xid e ratinhos tratados com anti-IL-10. Ainda, uma propriedade que distinguiu ratinhos tratados com anti-IL-10 de ratinhos xid é a resposta *in vitro* de células do baço à estimulação anti-IgM, apresentada pelos primeiros mas não por estes últimos animais.

O papel fisiológico de IL-10 foi estudado injectando ratinhos desde o nascimento até à idade adulta com anticorpos monoclonais que neutralizam especificamente IL-10. Tal tratamento conduz a numerosas alterações distintas no estado imune destes animais. Os animais são caracterizados por aumentos na circulação de TNF α , IFN γ e em muitos casos IL-6. Estes efeitos são consistentes com as propriedades *in vitro* anteriormente descritas para IL-10, um supressor forte de IFN γ e da produção de monocinas em experiências de culturas celulares. O aumento de IFN γ endógeno parece ser responsável por outras consequências resultantes do tratamento anti-IL-10. Por exemplo, conduz à depleção de células B Ly-1 e isto por sua vez é responsável pela redução de anticorpos IgM e IgA circulantes e respostas de anticorpos específicas contra a fosforilcolina e α 1,3-dextrano. Os níveis elevados de IFN γ são provavelmente também responsáveis pelos aumentos de IgG_{2a} circulantes pois este isotipo é regulado positivamente por IFN γ . As restantes alterações de aumentos nas células T peritoneais,



granulócitos e IgG_{2b} circulante não estão compreendidos mecanisticamente, mas podem ser consequência de perturbações de citocinas secundárias. Se bem que de um modo geral saudáveis, os ratinhos tratados com anti-IL-10 são altamente susceptíveis à morte resultante de choque induzido por endotoxinas. Esta reacção inflamatória letal é uma situação mediada por monocinas, que pode ser evitada pela transferência passiva de anticorpos específicos de TNF- α , IL-1, IL-6 ou endotoxina. Portanto, não é surpreendente que os ratinhos tratados com anti-IL-10, que apresentam regulação positiva de monocinas endógenas e que não possuem a população de células B muito provavelmente produzem anticorpos anti-endotoxina (*i.e.* células B Ly-1), sejam mais susceptíveis a esta reacção inflamatória. Estes dados sugerem um papel clínico para IL-10 como reagente anti-inflamatório. Consistente com esta noção, as experiências indicam que doses farmacológicas de IL-10 protegem os ratinhos da morte devido ao choque induzido por endotoxinas.

Ainda que, o fenótipo descrito para os ratinhos tratados com anti-IL-10 seja claramente consistente com as propriedades *in vitro* conhecidas para IL-10, está no entanto em oposição a descrições preliminares acerca de ratinhos deficientes em IL-10 por mutagenização de genes. Estes mutantes possuem níveis indetectáveis de IFN γ , TNF α e IL-6 circulantes, números normais de células B Ly-1 na cavidade peritoneal e, numa primeira aproximação, níveis séricos de IgG normais. A explicação para esta discrepância não é clara, se bem que uma situação discrepante semelhante exista entre ratinhos não produtores de IL-2 e nalgumas descrições de ratinhos tratados desde o nascimento até à idade adulta com anticorpos contra os receptores de IL-2. Uma explicação envolve a redundância bem conhecida que existe dentro do sistema das citocinas. É possível que um embrião de ratinho em desenvolvimento compense a perda de um gene de citocina crítico através da amplificação da expressão de um gene codificador de uma citocina de função estreitamente relacionada. Por exemplo, uma vez que IL-



4 partilha muitas propriedades com IL-10, esta citocina será um excelente candidato para compensar a perda total de IL-10 e assim a sua expressão pode ser regulada positivamente em ratinhos que não expressam IL-10. Pelo contrário, a neutralização de IL-10 endógena via tratamento com anticorpos de ratinhos desde o nascimento representará uma eliminação "falível" da citocina e portanto os vestígios de IL-10 endógena podem ser suficientes para evitar uma imunodeficiência profunda e uma activação reguladora de uma via compensatória das citocinas. Uma explicação alternativa é que os animais tratados com anticorpos montem respostas imunes artificial aos anticorpos xenogeneicos administrados e/ou que os complexos imunes resultantes não possam ser totalmente eliminados. No entanto, esta alternativa parece improvável uma vez que os anticorpos de controlo dos isotipos e os anticorpos contra outras citocinas, que também gerariam complexos imunes *in vivo*, não produzem as imunomodulações atribuídas a ratinhos tratados com anti-IL-10.

Se bem que o padrão de imunomodulação observado em ratinhos tratados com anti-IL-10 não esteja correlacionado totalmente com qualquer uma das doenças de imunodeficiência humana conhecidas, existem certas semelhanças com doentes Wiskott-Aldrich e doentes com síndrome de deficiência de IgA. Estas imunodeficiências humanas são caracterizadas por uma ausência de IgM ou IgA circulantes respectivamente, capacidades reduzidas para gerar respostas de anticorpos anti-bacterianos e frequentemente um aumento na circulação de IgG1, o principal isotipo de anticorpos humanos fixadores do complemento que provavelmente corresponde com IgG2a de ratinho. Aguarda confirmação se tais doentes apresentam produção reduzida de IL-10 ou falta de resposta a IL-10, e, caso assim seja, se esta por sua vez contribui para a sua imunodeficiência. O potencial papel de IL-10 no síndrome de deficiência de IgA é particularmente intrigante face a um estudo recente implicando a IL-10 como um importante cofactor necessário às células B humanas naíves para se diferenciarem em células



secretoras de IgA após a sua activação com anticorpo anti-CD40 interligados e TGF β . A incapacidade dos ratinhos tratados com anti-IL-10 para gerar resposta de anticorpos específicos a dois antígenos bacterianos apoia ainda a proposição de que IL-10 será um adjuvante eficaz na imunidade antibacteriana, como descrito atrás.

Para além de proporcionar informação acerca do papel fisiológico e potencial clínico de IL-10, os ratinhos tratados com anti-IL-10 proporcionam uma nova oportunidade para avaliar a contribuição das células B Ly-1 para o sistema imunitário. Conforme referido atrás, as consequências secundárias resultantes da depleção de células B Ly-1 em ratinhos tratados com anti-IL-10 confirmam muitas das propriedades previamente atribuídas a esta subpopulação pequena de células B. No entanto estes dados proporcionam ainda novas perspectivas relativamente à contribuição das células B Ly-1 para o sistema imunitário. Em particular, é razoável concluir que as células B Ly-1 não são necessárias para o desenvolvimento de respostas IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 ou IgE, uma vez que os níveis séricos destes isotipos não baixam nos ratinhos tratados com anti-IL-10 e sem células B Ly-1. De modo semelhante, se bem que as células B Ly-1 sejam essenciais para a resposta a alguns antígenos tipo II independentes do timo, *e.g.*, fosforilcolina e α 1,3-dextrano, elas não são aparentemente necessárias para outros, *e.g.*, TNP-Ficoll e anti-IgM. De facto, os níveis inalterados ou ligeiramente elevados de IgG3 circulante, um isotipo unicamente associado à resposta de células B a antígenos do tipo polissacárido, sugere que os ratinhos deficientes em células B Ly-1 sejam provavelmente capazes de responder à maior parte dos antígenos tipo II independentes do timo. Este aspecto dos ratinhos tratados com anti-IL-10 facilmente os distingue do ratinho xid, uma estirpe de ratinho com imunodeficiência espontânea que também não possui células B Ly-1, mas que não responde a todos os antígenos tipo II independentes do timo.



Para além de proporcionar informação acerca da contribuição das células B Ly-1 para o sistema imunitário, os ratinhos tratados com anti-IL-10 permitem-nos avaliar as consequências do aumento de $\text{TNF}\alpha$ *in vivo*. Os nossos dados ilustram claramente que o antagonismo *in vivo* de IL-10 conduz a um aumento substancial dos níveis séricos de $\text{TNF}\alpha$. Se bem que as consequências desfavoráveis do aumento de $\text{TNF}\alpha$ tenham sido consideradas detalhadamente atrás (e.g., choque séptico, malária cerebral, etc.), também devem ser consideradas numerosas consequências favoráveis do aumento de $\text{TNF}\alpha$. Estas incluem a demonstração em modelos animais de efeitos anti-tumorais directos, expansão de linhagens hematopoiéticas de granulócito-monócito, radioprotecção e protecção contra algumas doenças auto-imunes e infecciosas. Estas considerações implicam pois que os antagonistas de IL-10 sejam candidatos à intervenção terapêutica no tratamento destes tipos de doenças. De facto, confirmámos esta hipótese tendo demonstrado que os anticorpos anti-IL-10 podem retardar substancialmente o desenvolvimento de auto-imunidade em ratinhos NZB/W com predisposição para o lupus.

Resumindo, o presente invento está relacionado com a utilização de IL-10 ou antagonistas de IL-10 para regular a produção de monocinas que sejam mediadores importantes de muitas doenças. IL-10 e os seus agonistas provocarão uma supressão marcada de monocinas tais como $\text{TNF}\alpha$ e desta forma proporcionarão protecção contra reacções inflamatórias indesejáveis tais como sépsia bacteriana, choque tóxico, artrite reumatóide e psoríase. De modo semelhante, os antagonistas de IL-10 aumentarão o nível de monocinas tais como $\text{TNF}\alpha$, as quais por sua vez podem actuar como agente anti-tumorais e proporcionar radioprotecção e protecção contra certas doenças auto-imunes e infecciosas.



Exemplos

Os exemplos que se seguem servem para ilustrar o presente invento. A selecção de vectores e hospedeiros, assim como a concentração de reagentes, temperaturas e valores de outros parâmetros variáveis são para exemplificar a aplicação do presente invento e não devem ser considerados como limitantes.

Exemplo 1. Expressão de IL-10 humana num hospedeiro bacteriano

Um gene sintético para IL-10 humana foi montado a partir de uma pluralidade de fragmentos de DNA de cadeia dupla, obtidos por síntese química, para formar um vector de expressão designado TAC-RBS-hIL-10. As clonagem e expressão foram realizadas num sistema bacteriano convencional, por exemplo *E. coli* K-12 estirpe JM101, JM103 ou similares, descritos por Vieira e Messing, em Gene, Vol. 19, pgs 259-268 (1982). As digestões com endonucleases de restrição e reacções com ligase foram tipicamente realizadas usando protocolos convencionais, e.g., Maniatis *et al.*, (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York; Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory manual (2nd Ed; Vols 1-3), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York; e Ausubel *et al.*, (1987e suplementos periódicos) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley and Sons, New York, os quais são aqui incluídos como referência.

O método de lise alcalina foi usado para as preparações de plasmídeo em pequena escala. Para as preparações em larga escala usou-se uma modificação do método de lise alcalina em que se usou um volume igual de isopropanol para precipitar os ácidos nucleicos a partir do lisado clarificado. A precipitação com acetato de amónio frio 2,5M foi usada para remover o RNA



antes da centrifugação de equilíbrio em gradientes de densidade de cloreto de cézio e detecção com brometo de etídio.

Para as hibridações em filtro usaram-se círculos de filtro Whatman 540 para transferir as colónias, que foram então lisadas e fixadas por tratamentos sucessivos com NaOH 0,5M, NaCl 1,5M; Tris-HCl 1M pH 8,0, NaCl 1,5M (2 min. cada); e aquecimento a 80°C (30 min). As hibridações foram em 6x SSPE, 20% formamida, 0,1% dodecilsulfato de sódio (SDS), 100 µg/ml de tRNA de *E. coli* e 100 µg/ml de Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad) a 42°C durante 6 horas usando DNAs sintéticos marcados com ³²P (fosforilados). (20XSSPE foi preparado dissolvendo 174g de NaCl, 27,6 g de NaH₂PO₄·9H₂O, e 7,4 g de EDTA em 800 ml de H₂O. O pH foi ajustado a 7,4 com NaOH. O volume foi ajustado a 1 litro e esterilizado por autoclavagem). Os filtros foram lavados duas vezes (15 min, temperatura ambiente) com 1xSSPE, 0,1% SDS. Após auto-radiografia (filme Fuji RX), as colónias positivas foram localizadas alinhando as colónias que voltaram a crescer com as colónias coradas de azul nos filtros. O DNA foi sequenciado de acordo com o método didesoxi, Sanger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 74, pg. 5463 (1977). Os moldes para as reacções didesoxi foram DNAs de cadeia simples de regiões importantes reclonadas em vectores M13mp, *e.g.*, Messing *et al.*, Nucleic Acids Res., Vol. 9, pg. 309 (1981) ou DNA de cadeia dupla preparado pelo método minialcalino e desnaturado com NaOH 0,2M (5 min, temperatura ambiente) e precipitado do NaOH 0,2M, acetato de amónio 1,43M pela adição de 2 volumes de etanol. O DNA foi sintetizado através de química de fosforamidetos usando sintetizadores Applied Biosystems 380A. A síntese, desprotecção, clivagem e purificação (PAGE em ureia 7M, eluição, cromatografia em DEAE-celulose) foram realizados como descrito no manual do sintetizador 380A.

As cadeias complementares de DNAs sintéticos a serem clonados



(400 ng de cada) foram misturadas e fosforiladas com cinase de polinucleótidos num volume de reacção de 50 µl. Este DNA foi ligado com 1 mg de DNA vector, digerido com as enzimas de restrição adequadas, e as ligações foram realizadas num volume de 50 µl à temperatura ambiente durante 4 a 12 horas. As condições de fosforilação, digestões com enzimas de restrição, reacções com polimerases e ligação foram já descritas (Maniatis *et al.*, referido atrás). Contaram-se as colónias lacZ⁺ (quando necessário) semeando em agar L suplementado com ampicilina, isopropil-1-tio-beta-D-galactósido (IPTG) (0,4 mM) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosido (X-gal) (40 µg/ml).

O vector TAC-RBS foi construído preenchendo com DNA polimerase o sítio BamHI do plasmídeo pDR540 portador de tacP (Pharmacia). Este foi então ligado a oligonucleótidos sintéticos não fosforilados (Pharmacia) que formam um fragmento de cadeia dupla codificador de um sítio de consenso de ligação aos ribossomas (RBS, GTAAGGAGGTTTAAC). Após ligação, a mistura foi fosforilada e religada com o adaptador SstI ATGAGCTCAT. Este complexo foi então clivado com SstI e EcoRI e o fragmento de 173 pb isolado por electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e clonado em pUC19 digerido com EcoRI-SstI (Pharmacia) (como descrito abaixo). A sequência das regiões RBS-ATG-poliadaptador da construção final (designada TAC-RBS) está descrita na Patente U.S. 5,017,691, a qual está aqui incluída como referência.

O gene sintético de IL-10 foi montado num plasmídeo pUC19 em oito passos. Em cada um dos passos, fragmentos sem deleções e/ou fragmentos foram detectados após clonagem mantendo o gene lacZ(a) de pUC19 na grelha de leitura correcta relativamente ao codão de iniciação ATG inserido no passo 1. Os clones contendo alterações do tipo deleção e/ou inserção foram excluídos visualizando as colónias azuis em placas de L-ampicilina contendo X-gal e IPTG. Como alternativa, em cada um dos passos, as sequências dos fragmentos



inseridos podem ser facilmente confirmadas usando uma escorva de sequenciação universal com minipreparações de DNA plasmídico.

No passo 1 o vector TAC-RBS foi digerido com SstI, tratado com DNA-polimerase de T4 (cuja actividade de exonuclease 3' digere as cadeias salientes 3' dos cortes com SstI para formar fragmentos com extremos cegos) e após desactivação da DNA-polimerase de T4, tratados com EcoRI para formar um fragmento de 173 pares de bases (pb). Este fragmento contem a região TAC-RBS e possui um extremo cerse no codão de iniciação ATG e um extremo EcoRI no extremo oposto. Finalmente, isolou-se o fragmento TAC-RBS de 173 pb.

No passo 2 o fragmento TAC-RBS isolado do passo 1 foi misturado com o plasmídeo pUC19 digerido com EcoRI/KpnI e com o fragmento sintético 1A/B que, como se mostra abaixo, possui um extremo cerse no extremo a montante e um extremo coesivo correspondendo ao corte com KpnI a jusante. Este extremo KpnI é adjacente e a jusante do sítio BstEII. Os fragmentos foram ligados para formar pUC19 do passo 2.

No passo 3, os fragmentos sintéticos 2A/B e 3A/B (apresentado abaixo) foram misturados com pUC19 do passo 2 digerido com BstEII/SmaI (após amplificação e purificação) e ligados para formar pUC19 do passo 3. Note-se que o extremo a jusante do fragmento 3A/B contem bases extra que formam o extremo cerse SmaI. Estas bases extra foram clivadas no passo 4. Também os fragmentos 2A/B e 3A/B possuem extremos de cadeia simples complementares de 9 resíduos que emparelham quando misturados, deixando o corte BstEII a montante de 2A/B e o extremo cerse a jusante de 3A/B para ligar ao pUC19.

No passo 4 pUC19 do passo 3 (após amplificação e purificação) digerido com AflII/XbaI foi repurificado, misturado com o fragmento sintético



4A/B (apresentado abaixo) e ligado para formar pUC19 do passo 4.

No passo 5, pUC19 do passo 4 (após amplificação e purificação) digerido com XbaI/SalI foi misturado com o fragmento sintético 5A/B (apresentado abaixo) e ligado à forma do pUC19 do passo 5. Note-se que o extremo coesivo SalI fragmento 5A/B é eliminado por digestão com HpaI no passo 6.

No passo 6, pUC19 do passo 5 (após amplificação e purificação) digerido com HpaI/PstI foi misturado com o fragmento sintético 6A/B (apresentado abaixo) e ligado para formar o pUC19 do passo 6.

No passo 7, pUC19 do passo 6 (após amplificação e purificação) digerido com ClaI/SphI foi misturado com o fragmento sintético 7A/B (apresentado abaixo) e ligado para formar o pUC19 do passo 7.

No passo 8, pUC19 do passo 7 (após amplificação e purificação) digerido com MluI/HindIII foi misturado com os fragmentos sintéticos 8A/B e 9A/B e ligado para formar a construção final. A construção final foi inserida em *E. coli* K-12 estirpe JM101, *e.g.*, disponível na ATCC como número de acesso 33876, através de técnicas convencionais. Após cultura, a proteína foi extraída das células JM101 e diluições dos extractos foram testadas quanto à sua actividade biológica. As sequências dos fragmentos referidos estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. As letras mnúsculas indicam que uma base difere da sequência nativa nesse sítio

AGCCCAGGCC AGGGCACCCA GTCTGAGAAC AGCTGCACCC ACTTC-



TCGGGTCCGG TCCCGTGGGT CAGACTCTTG TCGACGTGGG TGAAG-

CCAGGtAACC ggtac

AGGGTCCaTTGG c

Fragmento 1A/B

GtAACCTGCC TAACATGCTT CGAGATCTCC GAGATGCCTT CAG-
GACGG ATTGTACGAA GCTCTAGAGG CTCTACGGAA GTC-

CAGAGTGAAGACTTTCTTT

GTCTCACTTC

Fragmento 2A/B

CAAATGAAGG ATCAGCTGGA CAACTTGTTc TtAAG
TGAAAGAAA GTTTACTTCC TAGTCGACCT GTTGAACAAG AaTTC

Fragmento 3A/B

GAGTCCTTGC TGGAGGACTT TAAGGGTTAC CTGGGTTGCC AAGCC-
CTCAGGAACG ACCTCCTGAA ATTCCCAATG GACCCAACGG TTCGG-

TTGTCTGAGA TGATCCAGTT TTAt

AACAGACTCT ACTAGGTCAA AATaGAtC

Fragmento 4A/B

CTaGAGGAGG TGATGCCCCA AGCTGAGAAC CAAGACCCAG ACATC-
GAtCTCCTCC ACTACGGGGT TCGACTCTTG GTTCTGGGTC TGTAAG-



AAGGCGCATG TtAACg
TTCCGCCTAC AaTTGcagct

Fragmento 5A/B

AACTCCCTGG GGGAGAACCT GAAGACCCTC AGGCTGAGGC TACGG-
TTGAGGGACC CCCTCTTGGA CTTCTGGGAG TCCGACTCCG ATGCC-

CGCTGTCATC GATctgca
GCGACAGTAG CTAg

Fragmento 6A/B

CGATTTCTTC CCTGTCAAAA CAAGAGCAAG GCCGTGGAGC AGGTG-
TAAAGAAG GGACAGTTTT GTTCTCGTTC CGGCACCTCG TCCAC-

AAGAAcGCgT gcatg
TTCTTgCGcA c

Fragmento 7A/B

CGCGTTTAAT AATAAGCTCC AAGACAAAGG CATCTACAAA GCCAT-
AAATTA TTATTCGAGG TTCTGTTTCC GTAGATGTTT CGGTA-

GAGTGAGTTT GAC
CTCA

Fragmento 8A/B



ATCTTCATCA ACTACATAGA AGCCTACATG ACAAT-
CTCAAAGT TAGAAGTAGT TGATGTATCT TCGGATGTAC TGTTA-

GAAGATACGA AACTGA
CTTCTATGCT TTGACTtcga

Fragmento 9A/B

Exemplo 2. Expressão de vIL-10 em células de macaco COS7

Um gene codificador da grelha de leitura aberta para vIL-10 foi amplificado por reacção em cadeia com polimerase, usando escorvas que permitiram inserir mais tarde o fragmento amplificado num vector pcD(SRa) digerido com EcoRI, descrito em Tabeke *et al.* (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472. A cadeia codificadora do fragmento inserido está apresentada abaixo (à grelha de leitura aberta sendo atribuídas letras maiúsculas).

aattcATGGA GCGAAGGTTA GTGGTCACTC TGCAGTGCCT GGTGCTGCTT
TACCTGGCAC CTGAGTGTGG AGGTACAGAC CAATGTGACA ATTTTCCCCA
GACCTAAGAG ATGCCTTCAG TCGTGTTAAA ACCTTTTTTCC AGACAAAGGA
CGAGGTAGAT AACCTTTTGC TCAAGGAGTC TCTGCTAGAG GACTTTAAGG
ATGCCAGGCC CTGTCAGAAA TGATCCAATT CTACCTGGAG GAAGTCATGC
CACAGGCTGA AACCAGGAC CCTGAAGCCA AAGACCATGT CAATTCTTTG
GGTGAAAATC TAAAGACCCT ACGGCTCCGC CTGCGCAGGT GCCACAGGTT
CCTGCCGTGT GAGAACAAGA GTAAAGCTGT GGAACAGATA AAAAATGCCT
TTAACAAGCT GCAGGAAAAA GGAATTTACA AAGCCATGAG TGAATTTGAC
ATTTTTATTA ACTACATAGA AGCATAACATG ACAATTAAAG CCAGGTGA



Os clones portadores do fragmento inserido na orientação correcta foram identificados por expressão de vIL-10 e/ou padrão electroforético dos produtos de digestão. Um desses vectores portadores do gene vIL-10 foi designado pBCRF1(SRa) e foi depositado na ATCC com o número de acesso 68193. pBCRF1 (SRa) foi amplificado em *E. coli* MC1061, isolado por técnicas convencionais e usado para transfectar células de macaco COS7 como se segue: um dia antes da transfecção, aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células de macaco COS 7 foram semeadas em placas individuais de 100 mm em meio de Eagle modificação de Dulbecco (DME) contendo 5% de soro fetal de vitela (FCS) e glutamina 2mM. Para realizar a transfecção, as células COS 7 foram removidas das placas incubando-as com tripsina, lavadas duas vezes em DME sem soro e ressuspensas a 10^7 células/ml em DME sem soro. Uma amostra de 0,75 ml foi misturado com 20 μ g de DNA e transferido para uma cuvete de electroporação estéril de 0,4 cm. Após 10 minutos, as células foram sujeitas a um pulso de 200 volts, 960 mF numa unidade BioRad Gene Pulser. Após mais 10 minutos, as células foram removidas da cuvete e adicionadas a 20 ml de DME contendo 5% FCS, glutamina 2 mM, penicilina, estreptomicina e gentamicina. A mistura foi distribuída por quatro placas de cultura de tecidos de 100 mm. Após 12-24 horas a 37°C, 5% CO₂, o meio foi substituído com meio semelhante contendo apenas 1% FCS e a incubação continuou durante mais 72 horas a 37°C, 5% CO₂, após o que o meio foi colhido e testado quanto à sua capacidade para inibir a síntese de IFN γ .

Quantidades de dez ml de leucócitos do sangue periférico (PBLs) isolados de fresco (cerca de 2×10^6 células/ml) foram incubadas a 37°C com fito-hemaglutinina (PHA) (100 ng/ml) em meio consistindo em (i) 90% DMEM suplementado com 5% FCS e glutamina 2 mM e (II) 10% de sobrenadante das células COS 7 previamente transfectadas com pBCRF1 (SRa). Após 24 horas as células e os sobrenadantes foram colhidos para testar a presença de mRNA de



IFN γ ou proteína IFN γ , respectivamente. As testemunhas foram tratadas identicamente, excepto os 10% do sobrenadante serem de culturas de COS7 previamente transfectadas com plasmídeo portador de um fragmento de cDNA não relacionado. As amostras tratadas com vIL-10 apresentaram uma inibição de cerca de 50% da síntese de IFN γ relativamente às testemunhas.

Exemplo 3. Expressão de vIL-10 em *Escherichia coli*

Um gene codificador da vIL-10 madura que se segue pode ser expresso em *E. coli*.

Tre Asp Gln Cis Asp Asn Fen Pro Gln Met Leu Arg Asp Leu Arg
Asp Ala Fen Ser Arg Val Lis Tre Fen Fen Gln Tre Lis Asp Glu
Val Asp Asn Leu Leu Leu Lis Glu Ser Leu Leu Glu Asp Fen Lis
Gli Tir Leu Gli Cis Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Fen Tir
Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala Glu Asn Gln Asp Pro Glu Ala
Lis Asp His Val Asn Ser Leu Gli Glu Asn Leu Lis Tre Leu Arg
Leu Arg Leu Arg Arg Cis His Arg Fen Leu Pro Cis Glu Asn Lis
Ser Lis Ala Val Glu Gln Ile Lis Asn Ala Fen Asn Lis Leu Gln
Glu Lis Gli Ile Tir Lis Ala Met Ser Glu Fen Asp Ile Fen Ile
Asn Tir Ile Glu Ala Tir Met Tre Ile Lis Ala Arg.

O fragmento de cDNA inserido em pBCRF1(SRa) foi reclonado num plasmídeo M13 onde foi alterado duas vezes por mutagénese dirigida: primeiro para formar um sítio ClaI no extremo 5' da região codificadora do polipeptídeo vIL-10 maduro e segundo para formar um sítio BamHI no extremo 3' da região codificadora do polipeptídeo vIL-10 maduro. A sequência mutagenizada foi então facilmente inserida no vector de expressão TRPC11 descrito abaixo.



O vector TRPC11 foi construído ligando um fragmento sintético do consenso RBS a adaptadores ClaI /ATGCAT) e clonando os fragmentos resultantes em pMT11hc cortado com ClaI (o qual foi previamente modificado para conter o sítio ClaI). pMT11hc é um derivado pequeno do pBR322 (2,3 quilobases) de alto número de cópias, AMP^R, TET^S, portador da região poliadaptadora EcoRI-HindIII do pVX. (pVX está descrito por Maniatis *et al.* (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor. Este foi modificado de forma a conter o sítio ClaI cortando pMT11hc com EcoRI e BamHI, enchendo os extremos coesivos 5' e ligando ao adaptador ClaI (CATCGATG), restaurando assim os sítios EcoRI e BamHI e substituindo o sítio SmaI por um sítio ClaI. Um transformante da construção TRPC11 possui uma sequência RBS em tandem flanqueada por sítios ClaI. Um dos sítios ClaI e parte da segunda cópia da sequência RBS foram removidos por digestão deste plasmídeo com PstI, tratamento com a nuclease Bal31, corte com EcoRI e tratamento com DNA polimerase de T4 na presença dos quatro trifosfatos de desoxinucleótidos. Os fragmentos resultantes de 30-40 pb foram recuperados via PAGE e clonados em pUC12 cortado com SmaI. Um fragmento EcoRI portador de trpP de *E. coli* de 248 pb derivado de pKC101 (descrito por Nichols *et al.* (1983) *Methods in Enzymology* 101:155-164, Academic Press, N.Y.) foi então clonado no sítio EcoRI para completar a construção TRPC11. Isto está ilustrado na Figura 1. TRPC11 foi empregue como vector para vIL-10, digerindo-o primeiro com ClaI e BamHI, purificando-o e depois misturando-o numa mistura de ligação convencional com o fragmento ClaI-BamHI de M13 contendo a sequência de nucleótidos codificadora de BCRF1 madura. TRPC11 contendo o fragmento inserido, referido com TRPC11-BCRF1, foi propagado em *E. coli* K12 estirpe JM101, e.g., disponível na ATCC com o número de acesso 33876.



ESTUDO A. Efeitos diferenciais da interleucina-4 e -10 na síntese de interferão γ , induzida por interleucina-2, e na actividade assassina activada por linfocinas

Os resultados apresentados nesta secção foram publicados após a data de prioridade em Hsu *et al.* (1992) *Int'l Immunology* 4:563-569, sendo aqui incluídos na sua totalidade como referência.

Sumário

A cultura de células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) humanas com interleucina-2 (IL-2), estimula a síntese de citocinas e a geração de actividade assassina activada por linfocinas (LAK). Tanto a interleucina-4 (IL-4) como a interleucina-10 (IL-10; factor inibidor da síntese de citocinas, CSIF) inibem a síntese de IFN γ e de TNF α induzida por IL-2 em PBMC humanos. No entanto, ao contrário de IL-4, IL-10 não inibe a proliferação de PBMC e de células assassinas naturais (NK) induzida por IL-2, nem a actividade LAK induzida por IL-2. Ainda, IL-4 inibe a síntese de IFN γ induzida por IL-2 em células NK frescas purificadas enquanto, pelo contrário, o efeito inibidor de IL-10 é mediado pelas células CD14 $^{+}$ (monócitos/macrófagos). IL-10 inibe a síntese de TNF α em monócitos ou monócitos mais células NK, mas não em células NK sózinhas. Estes resultados mostram que IL-4 e IL-10 actuam sobre as células NK por vias distintas, e que a síntese de citocinas induzida por IL-2 e a actividade LAK são reguladas por mecanismos diferentes.

A interleucina-10 (factor inibidor da síntese de citocinas, CSIF) inibe a síntese de citocinas, tais como IFN γ , em linfócitos T e monócitos/macrófagos de ratinho e humanos. O efeito inibidor sobre a síntese de citocinas em células T é indirecto, mediado por monócitos/macrófagos na sua capacidade



como células apresentadoras de antígeno. Tanto IL-10 de ratinho como humana (mIL-10; hIL-10) são homólogas da grelha de leitura aberta BCRF1 do vírus de Epstein-Barr (IL-10 viral; v-IL-10), a qual apresenta também actividade de IL-10 em células de ratinho e humanas. Observou-se anteriormente que vIL-10 inibe a síntese de IFN γ induzida por IL-2 em PBMC humanos. Devido às células NK terem sido descritas como a principal fonte de IFN γ em PBMC estimulado com IL-2, os efeitos de hIL-10 e de v-IL-10 na síntese de citocinas induzida por IL-2 e actividade LAK foram estudados juntamente com a comparação destas citocinas com IL-4, um conhecido inibidor da actividade LAK. Os resultados mostram que IL-4, hIL-10 e vIL-10 inibem a síntese de IFN γ e TNF α em PBMC estimulados com IL-2, mas apenas IL-4 inibe a síntese de IFN γ em células NK purificadas. Ainda, ao contrário de IL-4, IL-10 não inibe a actividade LAK induzida por IL-2. Estes resultados apoiam um modelo de que IL-4 e IL-10 actuam sobre as células NK através de diferentes mecanismos e que a síntese de citocinas e a actividade LAK induzidas por IL-2 são reguladas por vias distintas.

Exemplo A1. Efeitos de IL-4 e IL-10 na síntese de citocinas e actividade LAK induzidas por IL-2

Citocinas. IL-2 humana recombinante (rIL-2) foi gentilmente preparada, usando processos convencionais, por S. Zurawski (DNAX) ou adquirida (Cetus, Emeryville, CA). rIL-4 humana foi adquirida à Biosource International (Camarillo, CA). hIL-10 recombinante e vIL-10 foram usadas como sobrenadantes para transfecção de células COS7; usaram-se como testemunas os sobrenadantes das transfecções com um cDNA irrelevante ou sem cDNA. Ver Vieira *et al.* (1991) Proc. Nat'l Acad. Sci., USA 88:1172-1176 e Hsu *et al.* (1990) Science 250:830-832, os quais são aqui incluídos como referência e outros já referidos. IFN γ e TNF α (Endogen, Boston, MA) foram medidos por ELISA. A produção de citocinas na ausência de IL-2 foi abaixo dos limites de sensibilidade



dos ensaios para IFN γ e TNF α , os quais foram 0,3 ng/ml e 12 pg/ml, respectivamente.

Linhas celulares. Células de Daudi (linfoma de Burkitt) foram fornecidas pela Schering-Plough (Lyon, France). Células COLO (carcinoma do colon), cedidas pelo Dr. Lewis Lanier, foram cultivadas em RPMI 1640 mais 5% de soro fetal de vitela.

Anticorpos. Os anticorpos monoclonais contra antígenos de superfície celular de leucócitos (CD3, CD4, CD5, CD14, CD16, CD19, CD56) foram adquiridos à Becton-Dickinson (San Jose, CA). Os anticorpos para as experiências de depleção com esferas magnéticas (CD3, CD4, CD5, CD14, CD19) foram preparados a partir de fluidos ascíticos de ratinhos SCID injectados com a linha celular adequada. Os anticorpos neutralizantes anti-IL-4 e anti-IL-10 estão descritos, *e.g.*, em Chretien *et al.*, (1989) J. Immunol. Methods 117:67-81; e Yssel *et al.* J. Immunol. Methods 72:219-227, que aqui são incluídos como referência.

Preparação e cultura de PBMC. PBMC humanos foram isolados a partir do anel de PBMCs de doadores saudáveis por centrifugação sobre Ficoll-Hypaque e cultivados a 10^6 /ml ub de rIL-2 (200 unidades/ml) com ou sem outras citocinas em meio de Yssel com 1% de soro humano Ab+. As culturas foram realizadas durante cinco dias em placas de 24 (ou 96) alvéolos e os sobrenadantes foram colhidos. PBMC de diferentes doadores variaram na sua capacidade para produzir IFN γ e TNF α quando estimulados por IL-2.

Purificações celulares

PBMC foram lavados e incubados em placas de cultura de tecidos



durante 40 min a 37°C. As células aderentes foram colhidas raspando com um raspador de borracha. As células não aderentes foram removidas, sedimentadas e aplicadas numa coluna de lã de nylon e incubadas durante 40 min a 37°C. Após eluição da coluna, as células foram sedimentadas e ressuspensas em 30% de Percoll com 10% de FCS/PBS e colocadas sobre 10%FCS/PBS e colocadas sobre uma camada de 40% Percoll. Após centrifugação durante 30 min à temperatura ambiente, os linfócitos granulares grandes na interface foram recuperados e lavados duas vezes. Estas células foram incubadas com anticorpo anti-CD56 (Becton-Dickinson, San Jose, CA) durante 30 min a 4°C, lavadas e depois coradas com anticorpos de cabra anti-ratinho marcados com FITC (Jackson Immunoresearch, Avondale, PA) antes da separação por FACS. As células CD56+ compreendem cerca de 35-50% das células sujeitas a separação. As células separadas constituíam mais de 99,5% CD56+ quando de nova análise. 9×10^4 células NK purificadas foram misturadas com 3×10^4 células aderentes ou células T num volume final de 100 ml e cultivadas com IL-2 com ou sem outras citocinas.

As células NK purificadas e os monócitos do mesmo dador foram obtidos como se segue: PBMC foram incubados com eritrócitos de carneiro durante a noite; As células que deram rosetas "E+" (CD2+) e as células que não deram rosetas "E-" foram separadas por centrifugação sobre um gradiente de Ficoll-hypaque. As células E+ foram sujeitas ao mesmo processo de purificação como descrito para PBMC (ver atrás) para se obter células NK purificadas. As células E- foram incubadas subsequentemente com mAb anti-CD14 (LeuM3) e anticorpo de cabra anti-IgG de ratinho marcado com FITC e as células CD14+ foram separadas num FACStar plus. A pureza destas células foi superior a 98%. 10^5 células NK purificadas foram misturadas com 10^4 monócitos puros em 100 ml e cultivados sózinhos ou com IL-2 e outras adições como descrito atrás.



Como alternativa, células NK e monócitos foram enriquecidos por selecção com esferas magnéticas, depois separados como se segue: PBMC foram primeiro incubados com anticorpos monoclonais anti-CD3, -CD4, -CD5 e anti-CD19 para corar as células T e as células B. Após lavagem duas vezes com PBS, adicionou-se esferas magnéticas revestidas anticorpos de cabra anti-IgG de ratinho (Dynabeades M-450, Dynal Inc., Great Neck, NY) para remover as células T e as células B revestidas com anticorpo através de selecção magnética. As células resultantes enriquecidas em células NK e os monócitos foram corados com anti-CD56-PE e anti-CD14-FITC e isolaram-se as células CD56+ e CD14+ no separador de células. A pureza das duas populações de células separadas foi superior a 98,5%.

Ensaio de citotoxicidade. PBMCs foram incubados com 200 U/ml de IL-2 a 10^6 células/ml durante 3 dias em meio de Yssel's contendo 1% de soro humano AB+. As culturas foram realizadas em alvéolos de 1 ml de uma placa de 24 alvéolos Linbro (Flow Laboratories, McLean, VA). Após o período de cultura, as células foram colhidas, lavadas duas vezes e usadas como células efectoras num ensaio de libertação de ^{51}Cr . Ver Spits *et al.* (1988) J. Immunol. 141:29- , que aqui é incluído como referência. 1000 células alvo marcadas com ^{51}Cr (COLO ou Daudi) foram misturadas com números variáveis de células efectoras em meio de Iscove contendo 0,25% BSA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) em placas de 96 alvéolos em forma de U. As placas foram centrifugadas durante 5 min a 50 xg antes da incubação durante 4 horas a 37°C numa atmosfera húmida de 5% de CO_2 . As amostras foram colhidas e contadas num contador gama (LAB, Bromma, Sweden).

hIL-10, vIL-10 e hIL-4 recombinantes foram testadas quanto aos seus efeitos na síntese de $\text{IFN}\gamma$ e $\text{TNF}\alpha$ e na actividade LAK induzida por IL-2 em células mononucleadas do sangue periférico (PBMC). PBMC foram



cultivados em 200 U/ml de rIL-2 com rIL-4 (200 U/ml) ou sobrenadantes de COS7 contendo hIL-10, vIL-10 ou sem citocinas (testemunha) durante 5 dias, após o que a síntese de citocinas foi medida. A síntese de IFN γ e TNF α induzida por IL-2 nas culturas contendo hIL-10, vIL-10 ou IL-4 foi substancialmente inibida (Figura 2A, 2B).

O resultado obtido com IL-4 confirma as observações de que IL-4 inibe a expressão de mRNA e proteína de IFN γ induzida por IL-2. A inibição da síntese de citocinas é dependente da dose de IL-4 e IL-10 e é revertida bloqueando com anticorpos monoclonais anti-hIL-4 e anti-hIL-10, respectivamente, mas não por imunoglobulinas do controlo do isotipo (Figura 2C, 2D).

A actividade LAK foi também avaliada contra a linha celular Daudi de linfoma de Burkitt e contra a linha COLO de carcinoma do colon, as quais são eficazmente mortas pelas células LAK, mas não por células NK frescas. A actividade LAK induzida por IL-2 contra células Daudi e COLO foi inibida apenas em culturas contendo IL-4 e ficou inalterada, ou mesmo ligeiramente aumentada, nas culturas com hIL10 e vIL-10 (Figura 3A). A actividade LAK induzida por IL-2 é mediada principalmente pelas células NK CD56(Leu19)+. A actividade LAK contra células COLO não foi inibida por IL-10 indicando que a citotoxicidade mediada por células NK activadas não foi afectada por esta citocina. No entanto, uma vez que as células T CD3+ gd+ podem matar as células Daudi, é possível que a citotoxicidade de células T gd+ induzida por IL-2 e estimulada por IL-10 contra as células Daudi bloqueie simultaneamente a actividade NK induzida por IL-2 contra estas células alvo.

Para determinar o fenótipo das células LAK anti-Daudi induzidas em PBMC cultivados com IL-2 e hIL-10, as populações CD56+ e CD56- foram separadas por FACS e testadas relativamente à citotoxicidade contra células



Daudi. A Figura 3B mostra que, como acontece com IL-2, observou-se actividade LAK significativa na população CD56+. Assim, enquanto IL-4 e IL-10 inibem a síntese IFN γ e TNF α induzida por IL-2, apenas IL-4 inibe a citotoxicidade induzida por IL-2 em células NK activadas presentes em PBMCs.

Exemplo A2. IL-10 não inibe a síntese de IFN γ ou a proliferação de células NK purificadas estimuladas por IL-2

Ensaio de proliferação. As células foram distribuídas a 10^5 células/alvéolo em placas de fundo redondo de 96 alvéolos e incubadas na presença ou ausência de citocinas durante quatro dias num volume final de 200 μ l /alvéolo. Em seguida, adicionou-se a cada alvéolo 1 mCi de ^{3} H-timidina em 10 μ l. Após seis horas as culturas foram colhidas e analisada a radioactividade incorporada por contagem de cintilação.

A maioria da síntese de IFN γ induzida por IL-2 em PBMC está descrita como derivada das células NK em vez das células T. Assim, o efeito de hIL-10, vIL-10 e IL-4 na síntese de IFN γ induzida por IL-2 foi testada em células NK purificadas por FACS (pureza >99,5%). IL-4 inibiu a síntese de IFN γ induzida por IL-2 nestas células; pelo contrário, nem hIL-10 nem vIL-10 suprimem a síntese de IFN γ em células NK recentemente purificadas (Figura 4A). Ainda, IL-4 inibiu significativamente a proliferação induzida por IL-2 em PBMC ou células NK purificadas, enquanto IL-10 não tem efeito na proliferação mediada por IL-2 (Figura 4B).

Ao contrário de IL-4, IL-10 não afecta a célula NK directamente, mas inibe a capacidade dos monócitos para proporcionarem um sinal co-estimulador. Esta conclusão é apoiada mais claramente pelos efeitos de IL-10 na produção de IFN γ induzida por IL-2. Conforme referido atrás, preparações de



células acessórias não produzem IFN γ (Figura 4A, 5A & 5B), a adição de células aderentes a plástico e de células CD14 $^{+}$ purificadas a células NK purificadas resultou num grande aumento da síntese de IFN γ . A ausência de um efeito directo de IL-10 nas células NK (Figura 4A & 4B), sugere que IL-10 iniba a produção de IFN γ induzida por IL-2 ao actuar sobre os monócitos. De forma semelhante, a inibição da síntese de citocinas em células T por IL-10 é mediada por células acessórias monócito /macrófago.

Exemplo A3. Os monócitos medeiam a inibição por IL-10 da síntese de IFN γ e TNF α estimulada por IL-2 em células NK.

O facto da síntese de IFN γ ser inibida por IL-10 em culturas de PBMC mas não em células NK puras sugeriu que este efeito de IL-10 fosse mediado por células acessórias. Para estudar a natureza destas células acessórias, células NK foram purificadas separando as células CD56 $^{+}$ da fracção celular de baixa densidade obtida por centrifugação em gradiente de Percoll, ou a partir de PBMCs livres de células T, células B e monócitos, e foram misturadas com células aderentes a plástico ou com a população de células de alta densidade (98% células T) do gradiente de Percoll. A adição de células aderentes às células NK aumentou fortemente a produção de IFN γ induzida por IL-2 em células NK; este efeito estimulador das células aderentes foi bloqueado por IL-10 (Figura 5A). A própria população de células aderentes não produziu níveis detectáveis de IFN γ como resposta a IL-2. Pelo contrário, a fracção contendo células T não teve efeito na produção de IFN γ induzida por IL-2 em células NK e não mediou a inibição da produção de IFN γ por IL-10 (Figura 5A).

As células aderentes ao plástico estão enriquecidas em monócitos, mas podem conter outras populações celulares. Para confirmar que os monócitos aumentam a produção de IFN γ induzida por IL-2 e medeiam a sua inibição por



IL-10, as células NK e os monócitos CD14⁺ foram purificados por separação e foram cultivados na presença de IL-2 e IL-10. A Figura 5B mostra que a adição de monócitos purificados às células NK aumentou a produção de IFN γ induzida por IL-2 e que IL-10 inibiu este aumento.

Observaram-se resultados qualitativamente semelhantes para a síntese de TNF α . A Figura 5C mostra que, conforme esperado, as células NK produzem níveis detectáveis de TNF α como resposta a IL-2. As células CD14⁺ produzem TNF α independentemente de IL-2. IL-10 inibe a produção de TNF α por monócitos na presença (Figura 5C) e na ausência de IL-2. Pelo contrário, a síntese de TNF α em células NK não foi inibida por IL-10. A estimulação de células NK e CD14⁺ em conjunto resultou num nível de produção de TNF α substancialmente superior ao observado para qualquer uma das células sózinha e este aumento foi bloqueado por IL-10.

Observou-se que os monócitos e os seus produtos aumentam substancialmente a produção de IFN γ nas células NK não activadas (Figura 5B). Várias monocinas, tais como IL-1 e TNF α , têm sido implicadas na co-estimulação da síntese de IFN γ em células NK humanas e de ratinho em várias condições. O facto de IL-10 inibir a síntese de monocinas, tais como IL-1, IL-6 e TNF α por monócitos/macrófagos estimulados por LPS ou por IFN γ sugere que os efeitos de IL-10 aqui descritos fossem devidos à inibição da produção de moléculas co-estimuladoras por IL-10 em células acessórias. Observou-se que os sobrenadantes das células aderentes (contendo principalmente monócitos) aumentam a produção de IFN γ em células NK purificadas estimuladas com IL-2, enquanto os sobrenadantes das células aderentes cultivadas na presença de IL-10 não possuem esta capacidade, mesmo quando sem IL-10. Não é claro se esta actividade do sobrenadante é responsável por todo o efeito co-estimulador das células acessórias. Observou-se que IL-1 α e IL-1 β , mas não IL-6 ou TNF α , co-



estimulam a produção de IFN γ induzida por IL-2 em células NK; no entanto, a adição de até 1000 U/ml de IL-1 não reverte o efeito inibidor de IL-10 na síntese de IFN γ em PBMC não fraccionados. Assim, existe a possibilidade de uma ou mais actividades adicionais funcionarem neste sistema, ou que IL-10 induza a síntese de um factor secundário que inibe a síntese de citocinas em células NK.

Estudo B. IL-10 inibe a síntese de citocinas em monócitos humanos: um papel auto-regulador de IL-10 produzida por monócitos.

Os resultados apresentados nesta secção foram publicados após a sua data de prioridade em de Waal Malefy *et al.* (1990) J. Exptl. Med. 174:1209-1220, que é aqui incluído na sua totalidade como referência.

Sumário

Esta secção demonstra que os monócitos humanos activados por LPS são capazes de produzir níveis elevados de interleucina-10 (IL-10), anteriormente designado Factor Inibidor da Síntese de Citocinas (CSIF), de forma dependente da dose. IL-10 foi detectável 7 hrs após activação dos monócitos e níveis máximos de produção de IL-10 foram observados após 24 - 48 horas. Estas cinéticas indicaram que a produção de IL-10 em monócitos humanos foi relativamente tardia comparado com a produção de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α e G-CSF, os quais foram todos secretados em níveis elevados 4- 8- horas após activação. A produção de IL-10 em monócitos activados por LPS foi, à semelhança de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , GM-CSF e G-CSF, inibida por IL-4. Ainda, IL-10 adicionada a monócitos, activados por IFN γ , LPS ou combinações de inibiu fortemente a produção de LPS e IFN γ quando do estabelecimento da cultura, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , GM-CSF e G-CSF



a nível da transcrição. IL-10 viral, que possui actividades biológicas em células humanas, também inibiu a produção de $\text{TNF}\alpha$ e de GM-CSF em monócitos após activação com LPS. A activação de monócitos por LPS na presença de MAbs neutralizantes anti-IL-10 resultou na produção de quantidades superiores de citocinas relativamente ao tratamento com LPS sózinho, indicando que IL-10 produzida endogenamente inibiu a produção de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, $\text{TNF}\alpha$, GM-CSF e G-CSF. Ainda, IL-10 tinha efeitos auto-reguladores uma vez que inibiu fortemente a síntese de mRNA de IL-10 em monócitos activados com LPS. Ainda, IL-10 produzida endogenamente é responsável pela redução da expressão de MHC classe II após activação dos monócitos com LPS. Considerados em conjunto estes resultados indicam que IL-10 possui importantes efeitos reguladores nas resposta imunológicas e inflamatórias devido à sua capacidade para regular negativamente a expressão de MHC classe II e para inibir a produção de citocinas pro-inflamatórias em monócitos. Interleucina-10 de ratinho foi recentemente identificada e o seu gene clonado com base na sua actividade Inibidora da Síntese de Citocinas (CSIF). Nos sistemas de ratinho, IL-10 foi produzido pela subsérie CD4⁺ Th2 e inibe a produção de citocinas, particularmente IFN γ , em clones Th1. A inibição da produção de citocinas por IL-10 foi observada apenas quando os macrófagos, mas não as células B, foram usadas como células apresentadoras de antígeno (APC). Para além desta actividade de CSIF, IL-10 é pleiotrópica e actua em diferentes tipos celulares, incluindo timócitos, células T citotóxicas, mastócitos, células B e macrófagos.

IL-10 humana também apresenta actividade CSIF. A produção de IFN γ e de GM-CSF em PBMC activados por PHA ou por mAbs anti-CD3 foi fortemente inibida por IL-10 e esta inibição ocorreu ao nível da transcrição. Tanto IL-10 humana como de ratinho possuem uma extensa homologia de



sequências com uma grelha de leitura aberta anteriormente não caracterizada do genoma do vírus de Epstein Barr, BCRF-1. A expressão desta grelha de leitura aberta deu uma proteína activa, designada IL-10 viral (v-IL-10), que partilha a maior parte das suas características com a IL-10 humana e de ratinho, incluindo a actividade de CSIF em células T de ratinho e humanas.

IL-10 humana e v-IL-10 são capazes de inibir as respostas proliferativas de células específicas de antígeno ao reduzirem a capacidade apresentadora de antígeno de monócitos humanos através da regulação negativa das moléculas MHC classe II. Os resultados aqui apresentados mostram que os monócitos humanos são capazes de produzir níveis elevados de IL-10 após activação com LPS e que esta produção é relativamente tardia comparado com a de outras monocinas. Ainda, é aqui descrito que IL-10 inibe fortemente a produção das citocinas pró-inflamatórias, *e.g.*, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α e os factores de crescimento hematopoiéticos, GM-CSF e G-CSF, em monócitos activados por LPS, IFN γ ou LPS e IFN γ . IL-10 produzida endogenamente não só tem efeitos auto-reguladores sobre a produção de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , GM-CSF e G-CSF pelos monócitos, como também regula negativamente a sua própria produção e a expressão de MHC classe II em monócitos de forma auto-reguladora. Estes resultados indicam que IL-10 possui importantes efeitos auto-reguladores nas respostas imunológica e inflamatória.

Exemplo B1. IL-10 é produzido em monócitos humanos.

Isolamento e cultura de monócitos humanos. Monócitos do sangue periférico humano foram isolados a partir de 500 ml de sangue de dadores normais. As células mononucleadas foram isoladas por centrifugação em



gradiente de densidade num separador de componentes do sangue, seguido de fraccionamento em linfócitos e monócitos por elutriação por centrifugação. a preparação de monócitos era >95% pura, conforme avaliado por coloração não específica com estearase e continha mais de 98% de células viáveis. Os monócitos foram cultivados em meio de Yssel contendo albumina sérica humana (HSA) suplementada com 1% de soro humano AB+ obtido de um conjunto de soros inactivados pelo calor. Este meio de cultura não tinha endotoxinas conforme determinado pelo ensaio de lisado de amebócitos de *Limulus* (<0,2 ng/ml de endotoxina). Os monócitos foram cultivados numa concentração de 4×10^6 células/ml em sacos de teflon (Jansen MNL, St Niklaas, Belgium), o que evitou a adesão destas células. Após cultura durante o tempo indicado, os monócitos foram colhidos e analisados relativamente à expressão na superfície celular por imunofluorescência indirecta ou analisados relativamente à expressão dos genes das linfocinas por análise Northern e PCR. Ainda, os sobrenadantes das culturas de monócitos foram colhidos para determinação da produção de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , GM-CSF e G-CSF após activação destas células. A viabilidade das células após cultura excedeu sempre 95% conforme determinado por exclusão com azul tripano.

Reagentes. IL-10 humana recombinante e v-IL-10 foram expressos em *E.coli* como proteínas de fusão com a glutathione-S-transferase e digeridas com trombina para remover a parte N-terminal da fusão, resultando em IL-10 activa humana e viral. rIL-4 humana purificada e r-IFN γ foram fornecidos pela Schering-Plough Research (Bloomfield, NJ). LPS (*E. coli* 0127:B8) foi adquirida aos laboratórios Difco (Detroit, MI). O mAb neutralizante anti-IL10 foi induzido contra v-IL-10 e neutralizou eficazmente IL-10 humana e viral.



Determinações de linfocinas. A produção de IL-1 α e TNF α em monócitos foi medida por ELISA específica de linfocinas adquirida à Endogen (Bosto, MA). O limite de detecção inferior destes ELISAs foi de 50 pg/ml e 10 pg/ml respectivamente. A produção de IL-1 β foi determinada por ELISA específica de linfocinas adquirida à Cistron (Pine Brook, NJ). A sensibilidade deste ELISA foi de 20 pg/ml. Os níveis de IL-6 foram determinados por ELISA específica de linfocinas adquirida à Genzyme (Boston, mA). A sensibilidade deste ensaio foi de 0,313 ng/ml. ELISAs específicas para IL-8 e G-CSF foram adquiridas à R&D Systems (Minneapolis, MN) e usadas para quantificar a produção de IL-8 e G-CSF. A sensibilidade destes ELISAs foi de 4,7 pg/ml e 7,2 pg/ml, respectivamente. A produção de GM-CSF foi determinada por ELISA específico de citocinas. A sensibilidade deste ELISA foi de 50 pg/ml. A produção de IL-10 foi determinada por um ELISA específico em que um mAb anti-IL-10 (JES 9D7) foi usado como anticorpo de revestimento e um outro mAb anti-IL-10 (JES3-12G8) foi usado como anticorpo de detecção. A sensibilidade deste ELISA foi de 50 pg/ml.

A IL-10 é produzida por clones de células T humanas activadas, células T e B activadas do sangue periférico, linhas celulares de células B transformadas por EBV e monócitos. Monócitos altamente purificados, isolados por eluição por centrifugação, produziram IL-10 após activação por LPS. Ainda, demonstrou-se que estes monócitos humanos foram capazes de produzir níveis elevados de IL-6, TNF α e GM-CSF (Figura 6). As cinéticas de produção de citocinas em monócitos activados por LPS indicou que a produção de IL-10 por monócitos activados por LPS foi relativamente tardia. Foi inicialmente detectada em sobrenadantes colhidos às 7,5 horas, mas a produção máxima foi observada 20-48 horas após activação. Pelo contrário, TNF α e IL-6 foram produzidos rapidamente quando da activação e atingiram níveis máximos de



produção às 3,5 e 7,5 horas após activação respectivamente (Figura 6). No entanto, a produção de GM-CSF foi também inicialmente detectada às 7,5 horas após activação dos monócitos por LPS, mas neste caso os níveis de produção máximos foram atingidos às 20 horas. Os estudos de dose-resposta indicaram que a activação dos monócitos por LPS a 10 ng/ml já tinha resultado em níveis significativos de produção de IL-10, enquanto que a síntese máxima de IL-10 foi observada em concentrações de LPS de 1 µg/ml. (Figura 7).

Exemplo B2. IL-10 inibe a produção de citocinas em monócitos humanos

Demonstrou-se que IL-10 inibe a produção de IFN γ e GM-CSF em PBMCs activados. Para determinar os efeitos de IL-10 na produção de citocinas por monócitos, monócitos altamente purificados foram activados durante 24 horas por LPS na ausência ou presença de iL-10. Ainda, os monócitos foram activados com LPS durante 24 horas na presença de IL-4 (100 U/ml) ou mAb neutralizante 19F1 anti-IL-10, o qual foi induzido contra v-IL-10 mas neutraliza eficazmente IL-10 humana e v-IL-10. A produção de citocinas foi determinada nos sobrenadantes destas culturas, colhidas 24 horas após activação, por ELISAs específicos das citocinas. Como se mostra na Tabela B1, os monócitos que foram incubados em meio sózinho a 37°C não produziram IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF α , GM-CSF e G-CSF. Nestas condições, foram sintetizados apenas níveis significativos de IL-8. A activação de monócitos com LPS (1 µg/ml) resultou na produção de níveis elevados de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF α , GM-CSF e G-CSF. É interessante que IL-10 inibiu a produção de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , GM-CSF e G-CSF em vários graus (Tabela B1). Os efeitos inibidores mais fortes de IL-10 foram observados na produção de IL-1 α , TNF α , GM-CSF e G-CSF os quais foram bloqueados em 80-100%. A inibição de IL-1 β e IL-6 foi menos pronunciada, enquanto a síntese de IL-8 foi apenas ligeiramente afectada por IL-10.

Tabela B1.

Efeitos de IL-10 exógena, IL-10 endógena e IL-4 na produção de citocinas em monócitos humanos

	IL-1 α	IL-1 β	IL-6	IL-8	IL-10	TNF α	GM-CSF	G-CSF
	<i>ng/ml</i>							
Meio 37°C	0	0	0	150	0	0	0	0
LPS	1,2	44,8	261,7	479	30,6	21,2	0,6	90
LPS+IL-4	0	9,7	135,7	418	11,9	5,1	0	17,5
LPS+IL-10	0	13,6	78	434	ND	2,6	0	21,1
LPS+ α IL-10	2,7	50,6	323	672	ND	47,6	5,5	110

Monócitos humanos, isolados por elutriação por centrifugação foram cultivados em sacos de teflon numa concentração de 4 x 10⁶ células/ml e activados por LPS (1 mg/ml) na ausência e presença de IL-10 (100 U/ ml), IL-4 (100 U/ml) ou mAb 19F1 anti-IL-10 (10 μ g/ml) durante 24 h e a produção de citocinas foi determinada nos sobrenadantes por ELISAs específicos das citocinas. ND: não determinado.

11



Exemplo B3. IL-10 também inibe a produção de citocinas em monócitos activados por IFN γ

IL-10 também inibiu a produção de citocinas em monócitos activados por IFN γ , ou combinações de IFN γ e LPS. A Figura 8 mostra que IFN γ em concentração óptima de 100 U/ml de um modo geral foi um indutor menos potente da secreção de citocinas do que LPS nas concentração óptima de 1 μ g/ml. Ainda, demonstrou-se que os efeitos de combinações de IFN γ e LPS na produção de citocinas em monócitos geralmente são aditivos. Os efeitos inibidores mais fortes de IL-10 foram observados sobre a produção de IL-1 α , TNF α e GM-CSF. A secreção de TNF α e GM-CSF foi suprimida em mais de 90%, mesmo após activação dos monócitos por concentrações óptimas de LPS e IFN γ . Se bem que tenham sido observados efeitos inibidores consideráveis na secreção de IL-1 β e IL-6 em condições óptimas de estimulação, a sua inibição foi mais pronunciada quando os monócitos foram estimulados por concentrações subóptimas de LPS, quer na ausência quer na presença de concentrações óptimas de IFN γ .

Exemplo B4. IL-10 viral inibe a produção de citocinas em monócitos.

IL-10 viral e IL-10 humana têm efeitos semelhantes nas células humanas. A Figura 9 mostra que tanto IL-10 como v-IL-10 inibiram de forma semelhante a produção de TNF α e GM-CSF em monócitos. IL-10 e v-IL-10, adicionadas em concentrações de 100 U/ml, têm efeitos inibidores significativos na produção de TNF α e GM-CSF em monócitos após activação por LPS (1 μ g/ml). Estes efeitos inibidores de IL-10 e v-IL-10 sobre a secreção de TNF α e GM-CSF foram revertidos quando as incubações foram realizadas na presença de mAb 19F1 (Figura 9), demonstrando a especificidade dos efeitos inibidores de v-IL-10. De facto, a activação de monócitos por LPS na presença de IL-10 ou v-



IL-10 e o mAb neutralizante anti-IL-10 resultaram mesmo num aumento da produção de $\text{TNF}\alpha$ e GM-CSF, indicando que IL-10 produzida endogenamente suprime a produção destas citocinas.

Os efeitos inibidores de IL-10 produzida endogenamente na produção de citocinas em monócitos foram ainda avaliados quantificando os níveis de citocinas produzidos por monócitos activados por LPS na presença de mAb neutralizante anti-IL-10. Na Tabela B1 mostra-se que o tratamento de monócitos com LPS mais anti-IL-10 resultou em níveis de produção de citocinas superiores comparado com a activação por LPS sózinho, indicando que IL-10 produzida endogenamente para além dos seus efeitos inibidores na produção de $\text{TNF}\alpha$ e GM-CSF, bloqueou a produção de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e G-CSF. Os efeitos inibidores mais significativos foram encontrados na produção de IL-1 α , GM-CSF e $\text{TNF}\alpha$, enquanto que os efeitos inibidores sobre a expressão de IL-1 β , IL-6, IL-8 e G-CSF foram consideráveis mas menos pronunciados. Considerados em conjunto estes resultados indicam que IL-10 exógena e endógena inibem a produção de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, $\text{TNF}\alpha$, GM-CSF e G-CSF em monócitos activados com LPS.

Exemplo B5. IL-4 inibe a produção de IL-10 em monócitos activados.

IL-4 inibe a produção de IL-1 β , IL-6 e $\text{TNF}\alpha$ em monócitos activados com LPS. Para determinar se IL-4 inibe também a produção de IL-10, os monócitos foram activados com LPS durante 24 horas e medida a secreção de IL-10. A Tabela B1 mostra que IL-4 inibiu fortemente a produção de IL-10 em monócitos activados com LPS. Ainda, IL-4, para além dos seus efeitos inibidores sobre a secreção de IL-1 β , IL-6 e $\text{TNF}\alpha$, bloqueia eficazmente a produção de GM-CSF e G-CSF. No entanto, conforme observado para IL-10, a produção de



IL-8 foi apenas ligeiramente afectada por IL-4. Colectivamente estes resultados indicam que IL-4 e IL-10 possuem efeitos inibidores comparáveis na produção de citocinas em monócitos activados.

Exemplo B6. A inibição da produção de monocinas ocorre ao nível da transcrição.

Sondas. As sondas que se seguem foram usadas para análise Northern: fragmento SmaI de 600 pb (nt 1299-1899) de pCD-hTGF β , ver Yokota *et al.* (1987) em Lymphokines vol. 13, Goeddel e Webb (eds.) Academic Press, New York; fragmento PstI de 1200 pb de pAL (β -actina), ver Vieira *et al.*, (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1172-1176; fragmento BamHI-XbaI de 567 pb (nt 1-567) de pCD-hIL-6, ver Yokota *et al.* (1987); fragmento HindIII de 268pb (nt 29-297) de SP64-3-10c (IL-8), ver Schmidt *et al.* (1987) J. Immunol. 139:250 - ; fragmento BglII- HindIII de 760 pb (nt 159-919) de pCD-SRa-hIL-10, ver Vieira *et al.* (1991). Os oligonucleótidos que se seguem foram usados na análise Southern dos produtos de PCR: IL-1 α : 5'-CATGGGTGCTTATAAGTCATC-3' (nt 500-521), ver March *et al.* (1985) Nature 315: 641- ; IL-1 β : 5'-CGATCACTGAACTGCACGCTCCGGG-3' (nt 444-469), ver March *et al.* (1985) Nature; IL-6: 5'-GAGGTATACCTAGAGTACCTC-3' (nt 510-531), ver Hirano *et al.* (1986) Nature 324:73- ; IL-8: 5'-TAAAGACATACTCCAAACCTT-3' (nt 200-221), ver Schmid *et al.* (1987) J. Immunol.; IL-10: 5'-CAGGTGAAGAATGCCTTTAATAAGCTCCAAGAGAAAGGCATCTACAAAGCCATGAGTGAGTTTGACATC-3' (nt 429-498), Vieira *et al.* (1991) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA; TNF α : 5'-GGCGTGGAGCTGAGAGATAAC-3' (nt 500-521), ver Pennica *et al.*, (1984) Nature 312:724- ; GM-CSF: 5'-CCGGCGTCTCCTGAACCT-3' (nt 150-168), ver Lee *et al.* (1985) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82: 4360-4364; actina: 5'-CTGAACCCTAAGGCCAACCGTG-3' (nt 250-272), ver Alonso *et al.* (1986) J. Mol. Evol. 23: 11- ; e G-CSF: 5'-



GCCCTGG-AAGGGATCTCCCCC-3' (nt 400-421), ver Nagata *et al.* (1986) Nature 319:415- . As sequências nucleotídicas estão também disponíveis no GENBANK, c/o Intelligenetics, Inc., Menlo Park, CA, e a base de dados BCCG e Universidade de Wisconsin Biotechnology Centre, Madison, Wisconsin. A biosíntese de nucleótidos sintéticos está descrita em Gait (1984) Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach IRL Press, Oxford, que aqui é incluído como referência.

Isolamento de mRNA e análise Northern. Isolou-se RNA total a partir de 20×10^6 monócitos seguindo o processo do tiocianato de guanidina-CsCl. Para a análise Northern, 10 μ g de RNA total por amostra foi separado de acordo com o tamanho em géis de 1% de agarose contendo 6,6% de formaldeído, transferido para membranas de nylon Nytran (Schleicher & Schuell, Keene, NH) e hibridadas com sondas, marcadas com elevada actividade específica ($>10^8$ cpm/mg). Os filtros foram hibridados, lavados em condições restritivas e revelados.

Análise por PCR. Um micrograma de RNA total foi sujeito a transcrição inversa usando oligo (dT) como escorva (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) e transcriptase inversa de AMV (Boehringer Mannheim) em 20 μ l de reacção. Dois microlitros do produto da transcrição inversa (equivalente a 100 ng de RNA total) foi usado directamente para cada reacção de amplificação. As condições para PCR foram as seguintes: numa reacção de 50 μ l, 25 nmoles de cada escorva, 125 μ M para cada dGTP, dATP, dCTP e dTTP (Pharmacia, Uppsala, Sweden), KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, MgCl₂ 1,5 mM, 1 mg/ml de gelatina, 100 μ g/ml de BSA não acetilada e 1 unidade de DNA-polimerase Vent (New England Biolabs, Beverly, MA). As escorvas usadas foram as seguintes: IL-1 α escorva directa 5'-CATCGCCAATGACTCAGAGGAAG-3' (nt 302-325); IL-1 α escorva inversa 5'-TGCCAAFCACACCCAGTAGTCTTGCTT-3' (nt 770-



743); IL-1 β escorva directa 5'-CCAGCTACGAATCTCGGACCACC-3' (nt 230-253); IL-1 β escorva inversa 5'-TTAGGAAGACACAAATTGCATGGTGAA-GTCAGT-3' (nt 896-863); IL-6 escorva directa 5'-ATGAACTCCTTCTCCA-CAAGC-3' (nt 1-21); IL-6 escorva inversa 5'-CTACATTTGCCGAAGAGC-CCTCAGGCTGGACTG-3' (nt 810-777); IL-8 escorva directa 5'-ATGACTT-CCAAGCTGGCCGTG-3' (nt 1-21); IL-8 escorva inversa 5'-TTATGAATTCTC-AGCCCTCTTCAAAAA-CTTCTC-3' (nt 302-269); IL-10 escorva directa 5'-ATGCCCCAAGCTGAGAACCAAGACCCA-3' (nt 323-349); IL-10 escorva inversa 5'-TCTCAAGGGGCTGGGTCAGCTATCCCA-3' (nt 674-648); TNF α escorva directa 5'-AGAGGGAAGAGTTCCCCAGGGAC-3' (nt 310-333); TNF α escorva inversa 5'-TGAGTCGGTCACCCTTCTCCAG-3' (nt 782-760); GM-CSF escorva directa 5'-GCATCTCTGCACCCGCCC-GCTCGCC-3' (nt 76-100); GM-CSF escorva inversa 5'-CCTGCTTGACAGCTCCAGGCGGGT-3' (nt 276-250); G-CSF escorva directa 5'-GAGTGTGCCACCTACAAGCTGTGCC-3' (nt 233-258); G-CSF escorva inversa 5'-CCTGGGTGGGCTGCAGGGCAGGGGC-3' (nt 533-508) β -actina escorva directa 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3' (nt 1-20); β -actina escorva inversa 5'-GTCCTTAA-TGTCACGCACGATTTC-3' (nt 548-530). As reacções foram incubadas num termociclador de DNA Perkin-Elmer/Cetus durante 20 ciclos (desnaturação 30 s 94°C, emparelhamento 30 s 55°C, extensão 60s 72°C). As reacções foram extraídas com CHCl₃ e 40 μ l por amostra foi aplicado em géis de 1% de agarose em tampão TAE. Os produtos foram visualizados por coloração com brometo de etídio. Subsequentemente, os géis foram desnaturados em NaOH 0,5M, NaCl 1,5M, neutralizados em acetato de amónio 10M e transferidos para membranas de nylon Nytran. As membranas foram pré-hibridadas em SSC 6x, 1% SDS, solução de Denhardt 10X (0,2% Ficoll, 0,2% polivinilpirrolidona, 0,2% BSA, fracção pentax V) e 200 μ g/ml de tRNA de *E. coli* (Boehringer, Mannheim, FRG) durante 4 horas a 55°C. Os oligonucleótidos sonda (200 ng), específicos para uma sequência interna relativamente às escorvas usadas na amplificação, foram marcados no extremo 5'



com cinase de oligonucleótidos de T4 (New England Biolabs) e γ - ^{32}P -ATP (Amersham, Arlington Heights, IL). As sondas foram separadas dos nucleótidos não incorporados por passagem através de uma coluna Nick (Pharmacia, Uppsala, Sweden) e adicionados à mistura de hibridação. Após hibridação durante 12 horas a 55°C, os filtros foram lavados em SSC 0,1X (1X SSC: NaCl 150 mM, Na-citrato 15 mM pH = 7,0) e 1% SDS à temperatura e exposto a filmes Kodak XAR-5 durante 1-2 horas.

Para determinar a que nível IL-10 inibiu a produção de citocinas em monócitos, análises comparativas de PCR foram realizadas em RNA isolado a partir de monócitos, activados por LPS na ausência ou presença de IL-10, IL-4, ou mAb neutralizante anti-IL-10 durante 24 horas. As medições de citocinas desta experiência estão apresentadas na Tabela B1. O mRNA isolado a partir destas amostras foi sujeito a transcrição inversa para se obter cDNA e subsequentemente amplificado com escorvas específicas das citocinas. Usou-se um número relativamente pequeno de ciclos na amplificação para assegurar que a quantidade do DNA amplificado foi proporcional ao número de ciclos e está correlacionado com a quantidade de mRNA específico na amostra original. A Figura 10 mostra que nestas condições foram amplificadas quantidades equivalentes de cDNA específico de β -actina. Os monócitos incubados a 4°C em meio sózinho durante 24 horas expressaram níveis muito baixos de mRNA de IL-8. A incubação destas células a 37°C resultou num aumento da expressão do mRNA de IL-8, mas não induziu a expressão do mRNA de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF α , GM-CSF ou G-CSF. A activação por LPS resultou numa expressão forte de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e G-CSF, enquanto que o mRNA de TNF α e GM-CSF foram moderadamente induzidos. Ainda, a Figura 10 mostra que a expressão de IL-1 α , IL-6, TNF α , GM-CSF e G-CSF foram fortemente inibidos por IL-10 e IL-4 ao nível do mRNA, enquanto que IL-1 β e IL-8 foram apenas ligeiramente afectados por IL-10. A activação de monócitos por LPS na presença do mAb anti-



IL-10 resultou num aumento moderado na expressão do mRNA de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e G-CSF e um forte aumento na síntese do mRNA de TNF α e GM-CSF. Os níveis de expressão de mRNA específico de citocinas e a sua modulação por IL-10 ou IL-4 exógena e endógena estão correlacionados com a secreção das proteínas correspondentes como se mostra na Tabela B1 indicando que IL-10 e IL-4 inibiram a expressão de citocinas em monócitos activados com LPS ao nível da transcrição.

Exemplo B7. IL-10 regula a expressão de mRNA de IL-10 mas não a de mRNA de TGF β em monócitos activados.

Tendo demonstrado que monócitos humanos produziram IL-10 relativamente tarde após activação com LPS, determinou-se se IL-10 poderá afectar a síntese de mRNA de IL-10 endógena. Os monócitos humanos foram activados por LPS na presença ou ausência de IL-10 durante 7 horas e a expressão de mRNA foi analisada por Northern. A Figura 11 mostra que o mRNA de IL-10 foi detectado 7 horas após activação por LPS e que IL-10 não tem efeito inibidor sobre IL-10 ou tem um efeito inibidor mínimo na expressão de mRNA de IL-10 nesta altura. Pelo contrário, a expressão de mRNA de IL-6 e de IL-8 foi fortemente inibida por IL-10. No entanto, numa outra série de experiências em que os monócitos foram activados durante 24 horas por LPS, IL-10 reduziu fortemente a expressão de mRNA de IL-10 como se mostra por análise Northern na Figura 12. Ainda, a Figura 12 mostra que a activação de monócitos com LPS na presença de um mAb neutralizante anti-v-IL-10 resultou numa regulação positiva da expressão do mRNA de IL-10 às 24 horas. Estes resultados foram confirmados por análise por PCR com escorvas específicas de IL-10 uma vez que o RNA usado nesta última experiência foi também usado para as análises por PCR apresentadas na Figura 10. Mostra-se na Figura 12B que as diferenças quantitativas observadas na expressão de mRNA de IL-10 por análise Northern está correlacionado com a dose observada por análise comparativa por



PCR. Ainda, uma análise mais sensível por PCR permitiu detectar níveis baixos de mRNA de IL-10 que foram induzidos 24 horas após a cultura de monócitos em meio sózinho a 37°C. Estes resultados indicam que IL-10 tem efeitos auto-reguladores na síntese de mRNA de IL-10 e, se os níveis de mRNA refletem com precisão a produção de proteína IL-10, provavelmente também na produção de IL-10 em monócitos humanos. No entanto, a regulação negativa de IL-10 ocorreu muito tarde no processo de activação. mRNA de TGFβ, que é expresso constitutivamente em monócitos não activados isolados de fresco, não foi aumentado pela activação por LPS durante 7 ou 24 horas (Figuras 11 e 12). Ainda, as Figuras 11 e 12 mostram que os níveis de mRNA de TGFβ não foram afectados quando as activaões foram realizadas na presença de IL-4, IL-10 ou mAbs neutralizantes anti-IL-10.

Exemplo B8. IL-10 tem efeitos auto-reguladores na expressão de MHC classe II em monócitos.

Análise por imunofluorescência. As células (10^5) foram incubadas em placas de microtitulação com fundo em V (Flow Laboratories, McLean, VA) com 10 µl de mAb purificado (1 mg/ml) durante 30 minutos a 4°C. Após duas lavagens com PBS contendo azida de sódio 0,02mM e 1% BSA (Sigma, St Louis, MO), as células foram incubadas com uma diluição a 1/40 de fragmentos F(ab')₂ de anticorpos de cabra anti-ratinho marcados com FITC (TAGO, Inc. Burlingame, CA) durante 30 min a 4°C. Após três lavagens adicionais, as amostras de células marcadas foram analisadas por microfluorometria de fluxo num FCSan (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA). Os mAbs PdV5.2 (HLA-DR/DP/DQ), Q5/13 HLA-DR/DP e L243 (HLA-DR) anti-MHC ClasseII foram anteriormente descrito, ver Koning *et al.*, (1984) Hum. Immunol. 9:221-; Quaranta *et al.* (1980) J. Immunol. 125:1421-1425; e Lampson *et al.* (1980) J. Immunol. 125:293- .



IL-10 regula negativamente a expressão de moléculas MHC Classe II na superfície celular de monócitos humanos. Mostrou-se que IL-10 regula negativamente a expressão constitutiva de MHC classe II induzida por IL-4 ou IFN γ . Uma vez que os monócitos produzem níveis elevados de IL-10 após activação por LPS, estudou-se se IL-10 endógeno inibe a expressão de MHC classe II em monócitos activados por LPS. Os monócitos foram activados por várias concentrações de LPS na presença ou na ausência de mAb neutralizante anti-IL-10. A Figura 13 mostra que a activação de monócitos com LPS reduziu a expressão constitutiva de HLA-DR/DP nestas células numa forma dependente da dose. No entanto, na presença do mAb neutralizante anti-IL-10 19F1 observou-se uma indução forte da expressão de HLA-DR/DP. Resultados idênticos foram obtidos com vários anticorpos específicos para HLA-DR ou HLA-DR/DP. Estes resultados indicam que a IL-10 produzida endogenamente, de forma auto-reguladora, é responsável pela regulação negativa da expressão de MHC classe II nos monócitos humanos após activação por LPS.

Estudo C. IL-10 inibe a produção de citocinas em macrófagos activados.

Os resultados apresentados nesta secção foram publicados após a sua data de prioridade em Fiorentino *et al.* (1991) J. Immunology 147:3815-3822, que aqui é incluído na sua totalidade como referência.

Sumário

IL-10 inibe a capacidade dos macrófagos mas não das células B apresentadoras de antígeno (APC) para estimular a síntese de citocinas por clones de células T Th1. Estudaram-se os efeitos directos de IL-10 nas linhas celulares de macrófagos e em macrófagos peritoneais normais. A produção das



proteínas IL-1, IL-6 e $\text{TNF}\alpha$ induzida por LPS (ou LPS e $\text{IFN}\gamma$) foi significativamente inibida por IL-10 em duas linhas celulares de macrófagos. Ainda, IL-10 parece ser um inibidor mais potente da síntese de monocinas do que IL-4 quando adicionada em concentrações semelhantes. A expressão de mRNA de IL-1, IL-6 e $\text{TNF}\alpha$ induzida por LPS ou LPS e $\text{IFN}\gamma$ foi também inibida por IL-10, como se mostra pela análise de PCR semi-quantitativo ou por Northern. A inibição por IL-10 da secreção de IL-6 induzida por LPS foi menos marcada em macrófagos peritoneais purificados por FACS do que em linhas celulares de macrófagos. No entanto, a produção de IL-6 em macrófagos peritoneais foi aumentada pela adição de anticorpos anti-IL-10, implicando que a presença nestas culturas de IL-10 endógena, a qual resulta numa redução intrínseca da síntese de monocinas após activação com LPS. Ainda, mostrou-se que os macrófagos peritoneais estimulados com LPS produzem directamente IL-10 detectável por ELISA. Encontrou-se que $\text{IFN}\gamma$ aumenta a produção de IL-6 em macrófagos peritoneais estimulados com LPS, e isto provavelmente resulta da supressão da produção de IL-10 por esta mesma população de células. Para além dos seus efeitos na síntese de monocinas, IL-10 também induz uma alteração significativa na morfologia dos macrófagos peritoneais estimulados com $\text{IFN}\gamma$. A forte acção de IL-10 no macrófago, particularmente ao nível da produção de monocinas, indica um papel importante desta citocina não apenas na regulação das respostas de células T como também em resposta inflamatórias agudas.

IL-10 foi inicialmente descrita como uma citocina produzida por clones de células T auxiliares Th2 que inibe a síntese de citocinas em macrófagos dependente de APC, e apresenta efeitos pleiotrópicos em várias outras células e é produzida por outras células. As células Th1 secretam IL-2 e $\text{IFN}\gamma$ e preferencialmente induzem activação de macrófagos e hipersensibilidade do tipo retardado (DTH), enquanto que as células Th2 produzem IL-4 e IL-5 e proporcionam ajuda às respostas das células B. Uma vez activados, cada um dos tipos de células Th pode ser capaz de regular a proliferação e/ou função dos



outros. Tal regulação cruzada é mediada por várias citocinas e oferece uma explicação para a observação de que algumas respostas de anticorpos e DTH podem ser mutuamente exclusivas. IL-10 actua nos macrófagos, mas não nas células B, para inibir a síntese de citocinas em clones de Th1 e IL-10 exerce um efeito directo nos macrófagos.

Os produtos de macrófagos, tais como IL-1, IL-6 e $\text{TNF}\alpha$ têm sido implicados em muitas respostas inflamatórias e imunológicas induzidas durante a infecção ou destruição de tecidos. $\text{TNF}\alpha$ e IL-1 são pirogénios endógenos que, causam ainda uma série de alterações metabólicas numa variedade de tipos celulares. Ainda, IL-1 e IL-6 são os principais indutores da síntese de proteínas hepáticas da fase aguda. Os exemplos que se seguem mostram que IL-10 inibe a produção de citocinas tais como IL-1, $\text{TNF}\alpha$ e IL-6 em macrófagos activados por LPS. Assim, IL-10 desempenha um papel importante nas respostas inflamatórias regulando a função de macrófagos para além do seu papel na activação das células T.

Exemplo C1. IL-10 inibe a função de APC de diferentes linhas de macrófagos.

Citocinas. mIL-1 α recombinante purificada foi generosamente oferecida por P. Lomedico, Hoffman-La Roche, Nutley, NJ. mIL-2 recombinante e mIFN γ foram adquiridos à Schering Research, Bloomfield, NJ. IL-6 recombinante de ratinho purificada, cedida generosamente por M. Pearce, DNAX, foi expressa em células Cos/ e purificada por imunoafinidade. $\text{TNF}\alpha$ de ratinho foi adquirido à Genzyme Corporation (Boston, MA). IL-10 recombinante de ratinho (CSIF), obtida por transfecção de células Cos7 com o clone de cDNA F115 como descrito atrás e sobrenadantes testemunha de células sujeitas simulação de transfecção, foram usados numa concentração final de 2% a menos que de outra forma indicado. Como alternativa, IL-10 recombinante de ratinho,



generosamente fornecida por Warren Dang foi expressa em *E. coli* e purificada por afinidade usando o anticorpo SXC2 anti-IL-10.

Anticorpos. Usaram-se anticorpos monoclonais (mAbs) neutralizantes contra IFN γ (XMG1.2) e IL-10 (SXC1), ver Cherwinski *et al.*, (1987) *J. Expt'l Med.* 166:1229-1244; e Mosmann *et al.* (1990) *J. Immunol.* 145:2938-2945. J5, um controlo de isotipo para SXC-1, foi generosamente cedido por Robert Coffman (DNAX). Os anticorpos monoclonais contra IL-6 (20F3 e 32C11), ver Starnes *et al.* (1990) *J. Immunol.* 145:4185-4191 e contra TNF α (MP6.XT3.11 e XT22.11) foram purificados e cedidos generosamente por John Abrams (DNAX). Os anticorpos usados para separação por FACS incluíram o anticorpo de rato B220 anti-ratinho (RA3-6B2), ver Coffman *et al.* (1988) *Nature* 289:681-683 e anticorpo de rato anti-ratinho Mac-1 (M1/70), ver Springer *et al.*, (1978) *Eur. J. Immunol.* 8: 539-542. O anticorpo monoclonal de rato anti-ratinho contra Fc-gR foi 2.4G2, ver Unkeless (1979) *J. Expt'l Med.* 150:580-596.

Meios. O meio de ensaio (cRPMI) consistiu em RPMI 1640 (J. R. Scientific Inc. Woodland, CA) com 10% de soro fetal de vitela (FCS) inativado pelo calor (J.R. Scientific Inc.), 2-ME 0,05 mM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) e tampão Hepes 10 mM (Gibco Laboratories, Grand Island, NY). Para o crescimento de células T, mIL-2 recombinante (330 U/ml) foi adicionado a cRPMI.

Antigénios. Hemocianina de lapa (KLH) adquirida à Pacific Bio-Marine Laboratories, Inc. (Venice, CA) ou Calbiochemicals Labs (La Jolla, CA) foi usada numa concentração final de 100-500 μ g/ml e ovalbumina da Sigma foi usada numa concentração final de 1 mg/ml.



Linhas celulares. O clone Th1, HDK1, (específico para IA^d/KLH), ver Cherwinski *et al.* (1987) J. Expt'l Med., e o hibridoma de células T DO11.10, (específico para IA^d/ovalbumina), ver Kapples *et al.*, (1981) J. Expt'l Med. 153:1198- , foram usados no ensaio de inibição da síntese de citocinas (CSIF). O clone Th2, D10.G4.1 (D10), AKR/J anti-conalbumina, obtido de C. Janeway (Yale University, New Haven, CT), ver Kaye *et al.* (1983) J. Expt'l Med. 153:836-856, foi usado para um ensaio de IL-1, ver Suda *et al.*, (1989) J. Immunol. Methods 120:173-178. Todos os clones foram mantidos por estimulação periódica com antígeno (Ag) e APC irradiadas, seguido de crescimento em meio com IL-2, ver Cherwinski *et al.* (1987) J. Expt'l Med. A linha celular de macrófagos clonada IG.18.LA (H-2^d) foi obtida a partir de culturas de células do estroma de timo e mantidas em 20% de sobrenadante de células L. A linha celular de macrófagos PU.5.1 (H-2^d), ver Ralph *et al.* (1977) J. Immunol. 119:950-954, foi mantida em cRPMI co 10% FCS. Para usar como APC, as linhas celulares IG.18. LA e PU5.1 foram activadas durante 20-24 horas com IFN γ (0,5-2 ng/ml). A linha celular WEHI.164.13, que responde a TNF α e a TNF β , ver Espevik *et al.* (1986) J. Immunol. Methods 65:55-63, foi mantida em cRPMI/5% FCS.

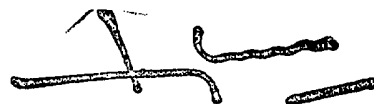
Ensaio imunométrico para citocinas. Os níveis de citocinas (IL-6, IFN γ e CSIF/IL-10) foram medidos num formato de ELISA em sanduíche.

Bioensaios. Usou-se um ensaio de proliferação celular colorimétrico com MTT para os bioensaios com TNF α (células WEHI 164.13), IL-2 (células HT-2) e IL-1 (células D10) (10⁴ células/alvéolo para todos os ensaios). A actividade é expressa como Unidades/ml relativamente a um padrão conhecido ou em pg ou ng/ml. Em cada um dos casos, uma unidade por ml representa a quantidade de uma citocina particular que produz 50% da resposta máxima desse bioensaio.



Indução e medição da síntese de citocinas Th1. $1-5 \times 10^4$ células HDK.1, Th1, ou células de hibridoma de células T DO-11.10 foram combinadas com números variáveis de APCs vivas na presença ou ausência de antígeno em placas de microtitulação de fundo plano com 96 alvéolos num volume total de 200 μ l/alvéolo. Os níveis de citocinas foram medidos em sobrenadantes de 20 ou de 48 horas.

Estimulação de linhas celulares de macrófagos. As linhas celulares de macrófagos 1G.18.LA e PU 5.1 foram colhidas por raspagem suave, lavadas e ressuspensas em cRPMI/5% FCS a 10^6 células/ml em placas de cultura de tecidos de 9,5 cm (Becton Dickinson, NJ) a 37°C em 5%CO₂/95% de ar, durante 6 horas para a expressão de RNA, ou 24 horas para a detecção de citocinas nos sobrenadantes. A estimulação com LPS foi a 10 μ g/ml ou nalguns casos LPS e IFN γ a 100 unidades/ml, na presença ou ausência de IL-10 (200 unidades/ml) ou de IL-4 (200 unidades/ml). Os sobrenadantes foram colhidos, centrifugados (800 xg) e guardados a -80°C, e depois usados para testar os níveis de IL-1, IL-6 ou TNF α . Ainda, as linhas celulares de macrófagos foram estimuladas com IFN γ , durante 24 horas como atrás e nalguns casos ainda estimuladas durante 24 horas na presença do clone Th1 HDK.1 e do seu antígeno específico KLH. Neste caso os sobrenadantes foram inda concentrados usando um filtro AMICON com uma membrana de 10000 de peso molecular de exclusão e removidos IL-2 e IFN γ usando colunas de imunoafinidade. Estes sobrenadantes e os volumes de exclusão do passo de concentração foram então testados quanto à sua capacidade para co-estimular a síntese de citocinas Th1 dependente de APC e específica de antígeno. Ainda, para usar como APC, as linhas celulares de macrófagos 1G18.LA e PU5.1 foram primeiro activadas durante 20-24 horas com IFN γ (0,5-2 ng/ml).



IL-10 inibirá a capacidade de APC para estimular a produção de IFN γ pelas células Th1 quando são usadas como APCs macrófagos normais peritoneais ou de baço ou a linha celular de macrófagos 1G18.LA. IL-10 é também eficaz sobre a linha celular de macrófagos PU5.1 que tem uma origem diferente de 1G18.LA (Figura 14), se bem que a estimulação conseguida usando a linha celular PU5.1, como APC para as células Th1, não seja maior do que a observada com a linha celular de macrófagos 1G18.LA. A Figura 14B mostra que a linha celular 1G18.LA pode também mediar a indução, específica de antígeno, da produção de IL-2 pelo clone Th1 e pelo hiridoma de células T específico de ovalbumina DO11.10. Ambas as estimulações foram significativamente inibidas por IL-10.

Exemplo C2. IL-10 induz uma alteração morfológica em macrófagos peritoneais estimulados por IFN γ .

Purificação e estimulação de macrófagos peritoneais. Células peritoneais foram obtidas por injeção e remoção de 7 ml de cRPMI/10% FCS e os macrófagos foram, separados com base em Mac-1 e B220 (os macrófagos são Mac-1+brilhante; B220-). As células foram estimuladas com 10 μ g/ml de LPS na presença ou ausência de IL-10, anticorpos monoclonais anti-IL-10 ou IFN γ . Os sobrenadantes foram colhidos após incubação durante 20 horas, a 8×10^5 células/ml, numa atmosfera de 5% de CO $_2$ a 37°C. Os sobrenadantes foram testados relativamente a TNF α e IL-6 usando um imuno-ensaio ligado a enzima.

Os macrófagos peritoneais purificados por FACS foram incubados com IFN γ na presença ou ausência de IL-10 durante vários períodos de tempo. Os sobrenadantes foram então removidos, as células secas ao ar, fixadas e coradas com Wright's-Giemsa. Como se mostra na Figura 15, IL-10 induz o arredondamento das células e o descolamento, o qual pode ser significativo relativamente à inibição da função APC dos macrófagos.



Exemplo C3. IL-10 regula negativamente a produção de citocinas biologicamente activas ou secretadas por linhas celulares de macrófagos activadas.

Dados anteriores sugerem que IL-10 tenha um efeito directo na capacidade dos macrófagos para funcionarem como APC e activarem a síntese de citocinas Th1. Testou-se o efeito directo de IL-10 na produção de monocinas por estas linhas celulares de macrófagos. Os sobrenadantes colhidos das linhas celulares de macrófagos estimulados com IFN γ , LPS ou IFN γ mais LPS, na presença ou ausência de IL-10, foram testados relativamente aos seus níveis de citocina(s). Sempre que possível IL-4 foi usada como testemunha, uma vez que se demonstrou que este factor inibe a produção de citocinas nos macrófagos activados. A estimulação das linhas celulares de macrófagos com IFN γ sózinho não induziu níveis detectáveis das monocinas IL-1, IL-6 ou TNF α nos sobrenadantes. Pelo contrário, LPS ou LPS mais IFN γ induziram níveis significativos destas citocinas (Figura 16). O ensaio de D10.G4.1 usado para detectar IL-1, realizado na ausência de Concanavalina A (ConA), não detecta outras citocinas expressas por macrófagos. As linhas celulares de macrófagos 1G18.LA e PU5.1 foram ambas significativamente inibidas na sua capacidade pra produzir bioactividade de IL-1 após indução com LPS (Figura 16). IL-10 também possui um efeito inibidor significativo na produção de TNF α induzida por LPS ou IFN γ mais LPS, nos sobrenadantes de ambas as linhas celulares de macrófagos, conforme demonstrado no bioensaio WEHI.164.13 (encontrou-se que toda a actividade nestes sobrenadantes de macrófagos era atribuível a TNF α usando um anticorpo bloqueador específico). De modo semelhante, IL-10 inibe a produção da proteína IL-6 nas linhas celulares de macrófagos, estimuladas por IFN γ mais LPS e/ou induzidas por LPS conforme medido num imuno-ensaio ligado a enzima para IL-6. Em todas as experiências a IL-10 testada tem um



efeito inibidor muito mais significativo do que IL-4 na produção de monocinas induzida por LPS ou IFN γ mais LPS (ao nível da proteína).

Exemplo C4. IL-10 regula negativamente a expressão de mRNA de citocinas em macrófagos activados.

Extracção de RNA e análise do RNA. Extraíu-se RNA celular total das linhas celulares de macrófagos usando um processo com isotiocianato de guanidina. A concentração de RNA foi medida por absorção a 260 nm. A análise da transferência de RNA foi como descrito em Moore *et al.* (1990) Science 248:1230-1234 ou no caso de PCR de RNA sujeito a transcrição inversa como descrito por O'Garra *et al.* (1990) Int'l Immunol 2:821-832. Uma quantidade específica de cada amostra de cDNA (diluições de um vigésimo do cDNA) foi amplificada com 2,5 unidades de Thermalase (DNA-polimerase de *Thermus aquaticus*) (IBI) num termociclador Cetus/Perkin-Elmer nas seguintes condições: 94°C desnaturação, 30s; 55°C emparelhamento, 30s; e 72°C extensão, 1 min., usando escorvas específicas para HPRT (enzima de limpeza), TNF α e IL-6 como apresentado: HPRT directa: 5'-GTA ATG ATC AGT CAA CGG GGG AC-3' (nt 422-444); HPRT inversa: 5'-CCA GCA AGC TTG CAA CCT TAA CCA-3' (nt 543-570); TNF α directa: 5'-GCG ACG TGG AAC TGG CAG AAG-3' (nt 4499-4519); TNF α inversa: 5'-GGT ACA ACC CAT CGG CTG GCA-3' (nt 58655845); sonda TNF α : 5'CAG TTC TAT GGC CCA GAC CCT C-3' (nt 5801-5821); IL-6 directa: 5'-CCA GTT GCC TTC TTG GGA CTG-3' (nt 1520-1540); IL-6 inversa; 5'-GGT AGC TAT GGT ACT CCA-3' (nt 6093-6075); sonda IL-6: 5'-GTG ACA ACC ACG GCC TTC CCT ACT-3' (nt 1547-1570).

Todas as escorvas abrangeram sequências de intrões no gene. A sensibilidade e especificidade foram ainda aumentadas fazendo o despiste de transferências para membrana dos produtos amplificados com oligonucleótidos



internos, relativamente ao produto amplificado, marcados radioactivamente (^{32}P , γ -ATP). As transferências radioactivas foram quantificadas usando Ambis Image Scanner e visualizadas por exposição a filme de raios X. Nos diferentes casos incluiu-se uma curva padrão de RNA de P388D1 para assegurar a reprodutibilidade do ensaio e unidades arbitrárias relativas a pg de RNA introduzido numa transferência final foram obtidas a partir dele. Ainda, usou-se um padrão interno de enzima de limpeza HPRT para assegurar que se usou exactamente a mesma quantidade de RNA e que todas as amostras foram transcritas inversamente e amplificadas por PCR com a mesma eficiência.

O RNA foi extraído das linhas celulares de macrófagos, 1G18.L e PU5.1, 6 hr após estimulação com LPS ou LPS mais $\text{IFN}\gamma$, na presença ou ausência de IL-10 ou IL-4. A análise das transferências de RNA de 10 μg de RNA total revelaram que IL-10 regula negativamente a expressão de $\text{TNF}\alpha$ induzida por LPS ou LPS mais $\text{IFN}\gamma$, em ambas as linhas celulares (Figura 17), apesar de num grau muito menor no último caso. Isto foi confirmado usando um PCR semi-quantitativo para análise do RNA sujeito a transcrição inversa a partir de ambas as linhas celulares. Ao incluir-se uma curva padrão para cada uma das citocinas descritas na Tabela C1, foi possível obter unidades arbitrárias relativas a pg de RNA total padrão representado em cada ponto e portanto apresentar os resultados numericamente. A Tabela C1 mostra que IL-10 e IL-4 inibe a expressão de $\text{TNF}\alpha$ induzida por LPS e $\text{IFN}\gamma$ mais LPS na linha celular de macrófagos 1G18.LA. Isto é melhor ilustrado com valores obtidos a partir da parte linear da curva padrão e a legenda da tabela C1 explica o método usado para derivar os dados numéricos. A análise da expressão de RNS pela linha celular de macrófagos PU5.1 em resposta a LPS e $\text{IFN}\gamma$ mais LPS, usando o mesmo método, também mostrou que a expressão de IL-6 e de $\text{TNF}\alpha$ foram igualmente inibidas por IL-10 (Tabela C2).

TABELA C1

Tabela I

Inibição, por IL-10 e IL-4, da expressão de TNF α induzida por LPS na linha celular de macrófagos IG18.LA ^a

Estímulo	Factor de diluição		0		IL-4		IL-10	
	do cDNA	cpm	*pg RNA	cpm	*cpm	*pgRNA	cpm	*cpm
LPS+IFN γ	1:9	1260	300	1987	2682	patamar	1232	1034
	1:27	984	160	601	769	110	713	589
	1:81	722	110	110	332	57	411	312
LPS	1:9	1114	210	210	1587	330	1387	1068
	1:27	896	120	120	403	60	460	271
	1:81	472	72	72	403	60	310	220

^a A linha celular de macrófagos IG18.LA foi estimulada como na Figura 3. Os sobrenadantes foram removidos após 6 h e adicionada a solução de isotiocianato de guanidina para colher os extractos celulares para preparação de RNA. Um micrograma de RNA total da linha celular de macrófagos IG18.LA foi sujeito a transcrição inversa num total de 20 μ l. Fizeram-se diluições do cDNA (apresentado na Figura) e 1 μ l de cada diluição foi amplificado por PCR com escorvas específicas para HPRT (padrão interno) ou TNF α . Dez microlitros do produto de cDNA amplificado foi depositado em membranas e despistado com as respectivas sondas marcadas radioactivamente (internas relativamente às escorvas). O sinal mostrado foi medido com a utilização de um Ambis Image Scanner. Para cada diluição, os cpm do TNF α foram padronizados (*cpm) de acordo com um factor de correcção (*) obtido a partir dos cpm de HPRT relativos à amostra "0" (*i.e.*, sem IL-10 ou IL-4). Foram então atribuídas unidades arbitrárias, relativas a uma titulação do controlo positivo e corrigidas relativamente ao seu teor (*pg RNA/ponto) usando uma curva padrão (não apresentada).

11

Tabela C2
MECANISMO DE ACÇÃO DE IL-10

Tabela II
IL-10 inibe a expressão, induzida por LPS, do RNA codificador de IL-6 e TNF α na linha celular de macrófagos PU5.1^a

RNA de citocina testado	Estímulo					
	LPS + IFN γ			LPS		
	+0	+IL-10	+0	+0	+IL-10	+IL-10
	cpm	*pgRNA	cpm	*pgRNA	cpm	*pgRNA
TNF α	1031	370	587	80	1864	730
IL-6	589	1000	207	700	108	90
					469	23
					27	44

^a Amostras de PU5.1 foram tratadas essencialmente como descrito na Tabela I e analisadas relativamente aos níveis de HPRT, TNF α e IL-6. Os cpm apresentado acima foram primeiro corrigidos de acordo com os níveis de HPRT por amostra como descrito na Tabela I. Ao usar-se curvas padrão de quantidades conhecidas de controlos positivos para TNF- α ou IL-6, foi atribuída uma unidade arbitrária *pg RNA por material na membrana como descrito na Tabela I. Os valores para TNF α foram obtidos a partir de uma diluição de 1 em 27 e para IL-6 a partir de uma diluição de 1 em 9 de 1 μ l de cDNA (1 μ g de RNA foi sujeito a transcrição inversa num volume total de 20 μ l).



Exemplo C5. IL-10 regula negativamente a produção da proteína IL-6 em macrófagos peritoneais activados com LPS

Macrófagos peritoneais (separados com base em Mac-1 e B220) (os macrófagos são Mac-1+ (brilhante); B220-) que já se demonstrou serem inibidos por IL-10 no que concerne à sua função de APC relativamente a células Th1, foram ainda testados quanto à sua produção de TNF α e IL-6 como resposta a LPS. TNF α não foi detectável nos sobrenadantes de macrófagos separados por FACS e estimulados com LPS (densidade celular, 7×10^5 células/ml). Pelo contrário, níveis significativos de IL-6 foram detectáveis nos sobrenadantes obtidos a partir de macrófagos peritoneais de ratinhos BALB/c ou CBA/J, estimulados com LPS como atrás (Figura 18). Os níveis de IL-6 eram reduzidos se as células fossem estimuladas por LPS na presença de IL-10, mas surpreendentemente, o nível de inibição foi menos marcado (Figura 18) do que o observado com as linhas celulares de macrófagos (Figura 16). No entanto, o nível de produção de IL-6 induzida por LPS puderam ser aumentados pela inclusão de um anticorpo monoclonal dirigido contra IL-10, na estimulação com LPS (Figura 18). A produção de IL-10 pelos macrófagos como resposta a LPS foi confirmada num ELISA específico para IL-10 (macrófagos peritoneais de ratinhos CBA/J ou BALB/c estimulados com LPS como atrás produziram 2 unidades/ml ou 4,5 unidades/ml de IL-10, respectivamente).

A Figura 18 também mostra que macrófagos peritoneais de BALB/c produzem níveis mais elevados de IL-6 quando estimulados com LPS na presença de IFN γ em oposição a quando são estimulados apenas com LPS. Isto pode ser explicado pelos resultados de uma outra experiência sobre produção de IL-10 em macrófagos peritoneais de ratinhos BALB/c. Neste caso, os macrófagos estimulados com LPS produziram 12 unidades/ml de IL-10 e esta foi reduzida para menos de 3 unidade/ml se as células foram estimuladas com LPS na



presença de IFN γ .

Exemplo C6. Teste para um mecanismo co-estimulador solúvel para a inibição por IL-10 da função APC dos macrófagos.

IL-10 apenas inibirá a síntese de citocinas Th1 na presença de células apresentadoras de antígeno (APC) (macrófagos) vivas. Um mecanismo possível de acção de IL-10 é a supressão da produção de um cofactor solúvel necessário à libertação óptima de citocinas pelas células Th1. Os sobrenadantes foram obtidos a partir de macrófagos estimulados com IFN γ , na presença ou ausência de células Th1 e antígeno específico. Tais sobrenadantes (Figura 19A), ou o volume de exclusão gerado durante a sua concentração foram incapazes de reverter a inibição mediada por IL-10 da função APC de macrófagos relativamente às células Th1. Estes dados não proporcionam evidência de que IL-10 regula negativamente um co-estimulador solúvel necessário à síntese de citocinas. Experiências semelhantes não proporcionam evidência de que IL-10 induza os macrófagos a produzirem um factor inibidor solúvel que actue directamente nas células T, se bem que tal inibidor possa ser sensível ou esteja ligado a membranas. Para testar isto, realizou-se uma experiência de mistura de células como se segue. Células B e macrófagos do baço foram separados por FACS (com base em B220 e Mac-1). Doses graduais de macrófagos, na presença ou ausência de células B e também na presença ou ausência de IL-10, foram usados como APCs para a estimulação, específica de antígeno, de células HDK.1. A síntese de citocinas Th1 estimulada por macrófagos, mas não por células B, foi inibida por IL-10 (Figura 19B). A mistura de doses graduais de macrófagos com um número constante de células B, deu uma estimulação aditiva da síntese de citocinas Th1 (Figura 19B). No entanto, a adição de IL-10 a esta mistura de APCs levou o nível da síntese de citocinas Th1 apenas até ao nível conseguido com APC de apenas células B, uma observação que argumenta contra



a presença de um inibidor de gama curta ou sensível que actue directamente na célula Th1, ou na célula B APC.

Estudo D. IL-10 protege os ratinhos contra o choque letal induzido por superantigénios.

Sumário

Estudou-se o papel de IL-10 na protecção contra o choque letal induzido pela enterotoxina B de estafilococos (SEB) num modelo de ratinho. O pré-tratamento do ratinho com IL-10 evitou a morte do ratinho posteriormente injectado com SEB e D-galactosamina (esta última foi necessária para ultrapassar a resistência natural dos ratinhos a SEB). Este efeito indica que IL-10 é capaz de inibir a activação de células T *in vivo*, provavelmente através da sua capacidade para inibir a capacidade dos macrófagos para activarem as células T.

Os superantigénios são mitogénios das células T que activam as células T de forma específica de VB do receptor das células T (TCR) ao ligar-se às cadeias VB de TcR e à cadeia B das moléculas de MHC classe II. Os superantigénios incluem moléculas endógenas produzidas por vírus dos tumores mamários de ratinho e superantigénios exógenos que incluem enterotoxinas como as produzidas por *Staphylococcus aureus*. O efeito tóxico dos superantigénios depende da presença de células apresentadoras de antígeno (APC). Nos últimos anos foi reconhecido que o efeito tóxico destas toxinas é devido à sua actividade mitogénica relativamente às células T, uma conclusão que foi demonstrada *in vivo*.

IL-10 é uma citocina que apresenta actividades pleiotrópicas numa variedade de linhagens celulares. Estas incluem: cofactor de crescimento para as



células T e mastócitos de ratinho, indução de Ia em células B e a capacidade para inibir a activação das células T. Este último efeito foi demonstrado como sendo indirecto, ao inibir a capacidade dos macrófagos para actuarem como APCs. Este efeito parece ser parte de um efeito inibidor geral da IL-10 sobre a função dos macrófagos, incluindo a sua capacidade para produzir citocinas tais como IL-1, TNF α e IL-6.

O presente estudo usou o choque induzido por enterotoxina B de estafilococos (SEB) em ratinhos como modelo *in vivo* de choque letal mediado por células T. Neste modelo, os ratinhos são tornados sensíveis aos efeitos tóxicos de SEB através de pré-tratamento com D-galactosamina. Este tratamento baixa a resistência natural que os ratinhos possuem contra as enterotoxinas, provavelmente ao afectar os mecanismos de eliminação hepáticos. A administração subsequente de pequenas doses de SEB resulta na morte dentro de 2 dias. Neste modelo, demonstrou-se que a toxicidade é devida à activação massiva de células T em que a produção de TNF α pela célula T desempenha um papel crítico. O tratamento dos ratinhos com IL-10 inibe a toxicidade mediada por SEB, provavelmente devido à sua capacidade para inibir a activação de células T dependente de macrófagos.

Exemplo D1. IL-10 evita a toxicidade mediada por SEB *in vivo*

Ratinhos. Ratinhos BALB/c H-2^d, de quatro a cinco semanas de idade, foram adquiridos à Simonson Laboratories, Gilroy, California.

Reagentes. Os materiais usados foram: interleucina-10 de ratinho (mIL-10) preparada segundo processos convencionais por Satish Menon do DNAX Research Institute (Palo Alto, CA). D(+)-Galactosamina (G-0500) foi adquirida à Sigma, St.Louis, MO. A enterotoxina B de estafilococos (SEB) usada



na experiência inicial foi também adquirida à Sigma. A SEB usada em experiências subsequentes foi da Toxin Technology, Madison, WIS. graciosamente fornecida por P. Hugo (National Jewish Center for Immunology, Denver, Co.). Todos os materiais foram diluídos em solução de sais equilibrada.

Tratamento. Ratinhos macho de quatro a cinco semanas de idade foram injectados (i.p.) com várias concentrações de mIL-10. Três a quatro horas mais tarde os mesmos ratinhos foram injectados (i.p.) com D-galactosamina. Uma hora depois da segunda injeção, os ratinhos foram injectados com SEB em diferentes concentrações. Os ratinhos foram observados às 24, 36 e 48 horas após a injeção.

As experiências iniciais estabeleceram que IL-10 altera a toxicidade de SEB num modelo *in vivo* de ratinho. Projectaram-se experiências preliminares para determinar a dose mínima de SEB necessária para observar uma mortalidade elevada neste modelo. Esta dose variou dependendo da origem (fornecedor) e lote de SEB. Uma vez determinada esta dose para um determinado lote de SEB, testou-se o pré-tratamento com IL-10 (10 µg/ratinho). A Figura 20 mostra que o pré-tratamento com IL-10 resultou na sobrevivência de todos os ratinhos injectados com 10 µg de SEB/ratinho. Se bem que o pré-tratamento com IL-10 não tenha evitado a morte eventual dos animais injectados com 20 µg de SEB/ratinho, ela prolongou a sua sobrevivência.

Estudo E. Interleucina 10 protege os ratinhos de endotoxémia letal

Sumário

IL-10 decresce a produção de IL-1, IL-6 e TNFα *in vitro* e a neutralização de IL-10 em ratinhos conduz a um aumento das mesmas



monocinas. O presente estudo testa se esta propriedade supressora de monocinas da IL-10 confere a capacidade para proteger os ratinhos de choque induzido por LPS, uma reacção inflamatória mediada por monocinas. Uma única injeção de 0,5-1 µg de IL-10 recombinante de ratinho protegeu de forma reprodutível ratinhos BALB/c de uma injeção intraperitoneal letal de endotoxina. Este resultado foi obtido quer a IL-10 fosse administrada simultaneamente com a injeção de endotoxina ou 30 minutos após a mesma. O efeito protector de IL-10 foi revertido com uma injeção prévia de anticorpos neutralizantes anti-IL-10 e está correlacionado com um decréscimo substancial da libertação de TNF α induzido pela endotoxina. Estes dados implicam que IL-10 seja um candidato para o tratamento de sépsia bacteriana e de um modo mais geral como um reagente anti-inflamatório eficaz.

As infecções bacterianas graves podem resultar em alterações fisiológicas profundas incluindo hipotensão, febre, necrose dos tecidos, disfunção generalizada dos órgãos e finalmente a morte. No caso das bactérias Gram-negativas, esta toxicidade é devida à endotoxina, um componente lipopolissácrido (LPS) da parede celular bacteriana. De facto, a injeção de doses adequadas de LPS em coelhos, ratinhos e outros animais produz alterações que são típicas do síndrome do choque séptico, resultando assim num modelo animal simples desta reacção inflamatória. A toxicidade induzida por endotoxinas parece ser devida à libertação de TNF α , IL-1 e/ou IL-6 pelos macrófagos/monócitos estimulados com endotoxina uma vez que os animais podem ser protegidos do choque induzido por bactérias e endotoxina através da neutralização destas monocinas, usando anticorpos monoclonais ou um antagonista fisiológico de IL-1 designado IL-1Ra.

A interleucina-10 (IL-10) tem numerosas propriedades *in vitro* incluindo a supressão da produção de IFN γ pelas células T auxiliares e células



NK; co-estimulação do crescimento de timócitos, mastócitos e células B; e supressão da produção de monocinas. Relativamente a esta última propriedade, IL-10 suprime profundamente a produção induzida de $\text{TNF}\alpha$, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e GM-CSF em monócitos humanos e macrófagos peritoneais de ratinho. Pelo contrário, IL-10 não tem efeito na expressão constitutiva de $\text{TGF}\beta$ em monócitos e de facto regula positivamente a produção de IL-1Ra em monócitos. Estes resultados *in vitro* são apoiados por experiências *in vivo* mostrando que a neutralização de IL-10 usando anticorpos monoclonais específicos conduz a níveis elevados de $\text{TNF}\alpha$ e IL-6 circulantes em ratinhos. Testou-se se a capacidade de IL-10 para suprimir a produção de $\text{TNF}\alpha$, IL-1 e IL-6, combinado com a sua capacidade para aumentar IL-1Ra, tornará esta citocina capaz de proteger os ratinhos contra o choque induzido por endotoxinas.

Exemplo E1. Efeito de IL-10 na endotoxémia letal em ratinhos.

Ratinhos. Ratinhos fêmea BALB/c de 8 semanas de idade foram adquiridos à Simonsen Laboratories (Gilroy, CA).

Reagentes. O lipopolissacárido (LPS) de *Escherichia coli* serotipo 0111:B4 foi adquirido à Sigma Chemical Co. IL-10 recombinante de ratinho foi expressa em *E. coli* e purificada até uma actividade específica elevada por purificação por afinidade e cromatografia de permuta iónica. Este material continha um mínimo de endotoxina e permaneceu estável a 4°C durante pelo menos 4 meses. A actividade específica da IL-10 de ratinho foi avaliada pelo ensaio de inibição da síntese de citocinas, ver Fiorentino *et al.*, (1989) J. Expt'l Med. 170:2081-2095 e pelo ensaio de co-estimulação de mastócitos MC/9, ver Thompson-Snipes *et al.* (1991) J. Exp. Med. 173:507-510. As experiências com anticorpos neutralizantes utilizaram o anticorpo monoclonal IgG1 de rato anti-IL-10 de ratinho, 2A5, ou um anticorpo para controlo de isotipo designado GL113.



Ensaio de TNF α . Os níveis séricos de TNF α foram avaliados usando um ELISA específico da citocina.

Grupos de 20 ratinhos BALB/c foram injectados intraperitonealmente com uma dose letal de LPS sózinho ou com a mesma quantidade de LPS juntamente com quantidades variáveis de IL-10 recombinante de ratinho. Em várias experiências deste tipo, os ratinhos foram totalmente protegidos da morte resultante do choque induzido por LPS quando foi administrado ao animal 0,5 μ g, 1,0 μ g ou 10 μ g de IL-10 juntamente com a LPS (Figura 21). Nalgumas destas experiências, também foi observada protecção parcial nos ratinhos que receberam 0,1 μ g ou 0,05 μ g de IL-10 na altura da administração do LPS (Figura 21).

Exemplo E2. Neutralização da protecção por anticorpos anti-IL-10.

A protecção mediada por IL-10 relativamente à endotoxémia letal poderá ser bloqueada pela administração prévia de anticorpos neutralizantes anti-IL-10, mas não pelo anticorpo de controlo do isotipo (Figura 22), confirmando a especificidade deste efeito.

Exemplo E3. A administração retardada de IL-10 permanece eficaz na protecção

Um estudo cinético revelou que a protecção mediada por IL-10 relativamente à endotoxémia letal foi conseguida mesmo quando a IL-10 foi administrada 30 minutos após a injeção de LPS (Figura 23). No entanto, outros atrasos na administração de IL-10 reduzem substancialmente a protecção e não se observou protecção quando IL-10 foi administrada 5 horas após a injeção de LPS (Figura 23).



Exemplo E4. Efeito de IL-10 sobre TNF α

A endotoxémia letal é uma reacção inflamatória indesejável mediada por monocinas. Demonstrou-se que IL-10 suprime a produção de monocinas *in vitro* em macrófagos e monócitos activados, sugerindo que a protecção mediada por IL-10 atrás referida reflectiu uma supressão da produção de monocinas na resposta induzida pela endotoxina. De facto, os soros colhidos às 1, 2 e 3 horas após a injeção de LPS $\pm$ IL-10 indicou uma profunda redução nos níveis de TNF α circulantes em animais protegidos por IL-10. Uma vez que os anticorpos anti-TNF protegem de forma semelhante os ratinhos da endotoxémia letal, é provável que a supressão de TNF α induzida por IL-10 pelo menos contribua para a protecção que esta citocina proporciona contra a endotoxémia letal. Outros efeitos de IL-10 na função dos macrófagos/monócitos poderão também contribuir para a sua capacidade em proteger contra endotoxémia letal. Estudos *in vitro* indicaram que IL-10 não só suprime IL-1 e IL-6, como também regula positivamente IL-1Ra, consequências que também protegerão contra a endotoxémia letal, conforme sugerido por descrições usando anticorpos neutralizantes anti-citocina ou administração de IL-1Ra.

Estudo F. A administração contínua de anticorpo anti-interleucina-10 a ratinhos elimina as células B Ly-1 mas não as células B convencionais

Sumário

As células B Ly-1 têm a característica única de auto-renovação contínua e, podem ainda distinguir-se das células B convencionais com base na produção constitutiva e induzível muito elevada da citocina, recentemente descrita, interleucina-10 (IL-10). Testou-se se IL-10 actua como factor de



crescimento autócrino ou parócrino para as células B Ly-1 tratando ratinhos continuamente desde o nascimento até às 8 semanas de idade com um anticorpo monoclonal IgM de rato que neutraliza especificamente IL-10 de ratinho. Os ratinhos tratados desta forma não possuíam células B Ly-1 peritoneais residentes, continham níveis séricos extremamente reduzidos de imunoglobulina M e foram incapazes de gerar respostas de anticorpos significativas *in vivo* a injecções peritoneais de α 1,3-dextrano ou fosforilcolina, os antígenos para os quais residem células B específicas na sub-série de células B Ly-1. Pelo contrário, as células B convencionais do baço de ratinhos tratados com anti-IL-10 eram normais relativamente aos números totais, fenótipo e respostas *in vitro* a mitógenos de células B e ao antígeno dependente do timo trinitrofenil-hemocianina de lapa (TNP-KLH). O mecanismo de eliminação de células B Ly-1 parece estar relacionado com o aumento dos níveis de interferão γ (IFN γ) endógeno em ratinhos tratados com anti-IL-10, uma vez que a co-administração de anticorpos anti-IFN γ substancialmente restaurou o número de células B Ly-1 residentes na cavidade peritoneal nestes ratinhos. Estes resultados implicam que IL-10 seja um regulador do desenvolvimento de células B Ly-1 e identificam um processo para eliminar especificamente as células B Ly-1, permitindo assim uma avaliação do papel destas células no sistema imune.

As células B Ly-1 compreendem cerca de 2% das células B totais de um ratinho adulto e apresentam várias propriedades intrigantes que as distinguem das células b convencionais: (a) ainda que dificilmente detectáveis na maior parte dos tecidos linfóides primários e secundários, elas estão grandemente enriquecidas nas cavidades peritoneal e pleural, assim como a sua progénie no tecido linfóide associado ao tubo digestivo; (b) desenvolvem-se e predominam na ontogenia precoce e são auto-renováveis durante a vida do animal; (c) produzem um repertório restricto de anticorpos de baixa afinidade que dão uma reactividade cruzada elevada com auto-determinantes e não parecem fazer a maturação por



mutação somática; e (d) produzem a maior parte das IgM encontrada no soro e produzem toda a resposta de anticorpos induzida por vários determinantes bacterianos, tais como fosforilcolina e α 1,3-dextrano. Se bem que os seus papéis precisos na função do sistema imune sejam pouco claros, os vários modelos que têm sido avançados, baseados nas especificidades dos anticorpo produzidos pelas células B Ly-1, incluem papéis na imunidade anti-bacteriana; eliminação de detritos celulares do hospedeiro tais como eritrócitos senescentes; e na modulação do repertório de anticorpos durante o desenvolvimento. Um resultado recente de que as células B Ly-1 são produtores potentes de IL-10, uma citocina imuno-supressora que regula negativamente a produção de várias monocinas e citocinas derivadas das células, levanta a possibilidade de um papel imuno-regulador mais vasto para as células B Ly-1. Muitas destas características únicas são difíceis de avaliar em humanos, mas foi identificada uma população de linfócitos B humanos portadores de Ly-1 com propriedades relacionadas.

Exemplo F1. A neutralização contínua de IL-10 em ratinhos elimina as células B Ly-1.

Ratinhos. Ratinhos BALB/c prenhes a meio do tempo e ratinhos C3H/HeJ foram adquiridos à Simonsen Laboratory (Gilroy, CA).

Tratamento anti-IL-10. 5-10 ratinhos BALB/c com a mesma idade foram injectados intraperitonealmente três vezes por semana desde o nascimento até às 8 semanas de idade com o anticorpo neutralizante IgM de rato anti-IL-10 de ratinho, designado SXC.1 (0,2 mg/injecção para a semana um, 0,5 mg/injecção para a semana dois, 1,0 mg/injecção para as semanas três a oito), quantidades equivalentes de um controlo do isotipo designado J5/D, ou volumes equivalentes (100 ou 200 μ l), de tampão de fosfatos salino (PBS). ratinhos BALB/c da mesma idade não tratados foram incluídos em todas as experiências



para comparação. Os anticorpos SXC.1 e J5/D foram obtidos a partir de sobrenadantes de hibridoma sem soro e purificados através de dois passos sequenciais de precipitação com 35% de sulfato de amônio. Nalgumas experiências, os ratinhos receberam quantidades semelhantes de um anticorpo IgG1 de rato anti-IL-10 de ratinho designado 2A5 ou o seu controlo de isotipo GL113. Estes últimos anticorpos foram administrados intraperitonealmente a 0,5 mg/injecção durante a semana um, 1 mg/injecção durante a semana dois, 2 mg/injecção durante as semanas três a oito.

Imunofluorescência. As células lavadas foram coradas com combinações dos seguintes reagentes: anticorpo anti-IgM de ratinho marcado com fluoresceína (DS-1; Pharmingen, San Diego, CA); anticorpo de rato anti-IgD de ratinho (11-26c) produzido por J. Kearney); anticorpo anti-CD3 de ratinho marcado com fluoresceína (145-2C11, Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN; Caltag Labs., South San Francisco, CA). Os reagentes biotinilados foram usados em conjunto com estreptavidina conjugada com ficoeritrina (Becton-Dickinson & Co., Mountais View, CA). As várias células foram analisadas usando um FACScan e as células mortas foram excluídas com base do ângulo directo e desvio lateral. Os resultados mostram as intensidades de fluorescência de 5000 células vivas contadas em cada grupo experimental.

ELISAs para anticorpos. Amostras de soro colhidas após 8 semanas de tratamento, foram testadas quanto à presença de IgM de ratinho usando uma ELISA em sanduiche onde anticorpos de rato anti-IgM de ratinho (R8-103, Pharmingen) foram usados para revestir, a 5 µg/ml, placas de microtitulação em PVC, sendo adicionadas diluições das amostras de soro ou uma mistura de várias proteínas IgM purificadas de mieloma de ratinho como padrão e os complexos imunes foram subsequentemente detectados usando anticorpos de rato anti-IgM de ratinho biotinilados (R19-15, Pharmingen) e peroxidase de rábano silvestre



conjugado com avidina (CalBiochem Corp., La Jolla, CA), mais 1 mg/ml de substrato (ácido 2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolin]sulfórico; Sigma Chemical Corp.).

As respostas de anticorpos específicos contra fosforilcolina e α 1,3-dextrano foram determinados após injeção intraperitoneal dos ratinhos anti-IL-10 ou controlo com 0,5 ml de soro fisiológico, 50 μ g de α 1,3-dextrano derivado de *Leuconostoc mesenteroides* fornecido por Dr. Slodki (U.S. Department of Agriculture Research Service) ou 2×10^8 *Streptococcus pneumoniae* mortos pelo calor como fonte de fosforilcolina. Os soros foram colhidos de todos os ratinhos 7 dias mais tarde e analisados quanto à presença de anticorpos específicos contra α 1,3-dextrano ou fosforilcolina usando ELISAs. As respostas de anticorpos específicas contra TNP-KLH foram determinadas após injeção intraperitoneal dos ratinhos com 10 μ g de TNP-KLH e colheita dos soros 7 dias mais tarde para análise de IgM e 10 e 14 dias mais tarde para análise de IgG. Os anticorpos específicos de TNP foram quantificados usando um ELISA. Em todos os casos, o tratamento anti-IL-10 foi continuado entre a exposição ao antígeno e a colheita dos soros.

ELISA para IFN γ . As amostras de soro colhidas dos ratinhos tratados com anti-IL-10 e controlo foram testadas relativamente a IFN γ de ratinho usando um ELISA específico da citocina.

Ratinhos BALB/c machos e fêmeas foram injectados três vezes por semana desde o nascimento até às 8 semanas de idade com doses graduais de um mAb IgM de rato anti-IL-10 de ratinho designado SXC.1 e subsequentemente analisado relativamente ao número e função das células B Ly-1. Os grupos testemunha de ratinhos BALB/c com a mesma idade não receberam tratamento ou receberam injeções equivalentes de PBS ou de um controlo do isotipo da IgM



de rato (designado J5/D) foram incluídos para comparação. Os anticorpos foram administrados intraperitonealmente ou subcutaneamente sem alteração significativa do desfecho. O regime de injeções do anticorpo usado deu um nível médio de IgM sérica de rato às 8 semanas de 50 mg/ml conforme medido por um ELISA específico de IgM de rato no caso dos anticorpos SXC.1 e J5/D. Após 8 semanas de tratamento, os ratinhos tratados com anti-IL-10 não se distinguiram dos três grupos testemunha em termos dos seguintes critérios: Peso total do corpo, avaliação histológica grosseira do fígado, baço, timo, nódulos linfáticos, intestinos e pulmões; hematócrito; número total de células brancas do baço, timo, nódulos linfáticos e peritônio; e proporções de células B, células T e células não B/não T no baço, nódulos linfáticos e timo. Pelo contrário, a fenotipagem por imunofluorescência das células obtidas nas lavagens peritoneais reunidas colhidas de 5-10 ratinhos compreendendo cada um dos quatro grupos experimentais descritos revelaram uma eliminação drástica de células IgM⁺ e IgD⁺ nos ratinhos tratados com anti-IL-10 (SXC.1), mas não em qualquer um dos animais testemunha (Figura 24). Resultados idênticos foram obtidos em 24 experiências independentes incluindo duas usando ratinhos C3H/HeJ e várias usando um anticorpo neutralizante IgG1 de rato anti-IL-10. Nos animais tratados com anti-IL-10 foram também eliminadas as células peritoneais portadoras de B220, conforme avaliado por imunofluorescência, e as células peritoneais que respondem a LPS, conforme avaliado pela capacidade destas células para incorporar [³H]-timidina após 3 dias de cocultura com 50 µg/ml de LPS. Estes resultados sugerem que os ratinhos BALB/c tratados com anti-IL-10 não continham células B nas suas cavidades peritoneais, ao contrário das $1-5 \times 10^6$ células B que podem ser normalmente recuperadas deste local. É significativo que pela imunofluorescência de três cores as cavidades peritoneais de ratinhos BALB/c com 8 semanas de idade no nosso biotério possuíam muito poucas células B convencionais (<5%). Os resultados mostrados na Figura 24 representam portanto predominantemente uma depleção de células B Ly-1.



Apesar desta eliminação drástica das células B peritoneais, o número total de células das cavidades peritoneais dos ratinhos tratados com anti-IL-10 não difere significativamente dos dos grupos testemunha. Posterior análise por imunofluorescência, juntamente com contagens de células hematopoiéticas diferenciais, mostrou que a perda das células B foi compensada com um aumento das células T CD4⁺ e granulócitos peritoneais nos animais tratados com anti-IL-10. Duas outras observações indicaram que a depleção de células B Ly-1 em ratinhos tratados com anti-IL-10 ocorreu em todo o sistema imunitário e não foi restringida à cavidade peritoneal. Primeiro, ratinhos tratados com anti-IL-10 apresentaram uma redução drástica de 90-100% nos níveis séricos de IgM comparado com os três grupos testemunha, conforme avaliado por um ELISA específica para IgM de ratinho (Figura 25). Segundo, os ratinhos tratados com anti-IL-10 eram profundamente deficientes nas suas capacidades para gerar respostas de anticorpos *in vivo* contra α 1,3-dextrano ou fosforilcolina (Figura 26), dois antígenos dependentes do timo para os quais as células B que respondem funcionalmente residem totalmente na subsérie de células B Ly-1.

Exemplo F2. Ratinhos tratados com anti-IL-10 contêm células B convencionais fenotípica e funcionalmente normais.

Face ao efeito drástico do tratamento anti-IL-10 sobre as células B Ly-1, foi importante avaliar cuidadosamente a situação das células B convencionais nestes animais. Conforme estabelecido atrás, o número total de células brancas nos baços de animais tratados com anti-IL-10 ou animais testemunha não diferiram significativamente em 24 experiências independentes. A Figura 24 mostra que as proporções de células B220⁺, células T CD3⁺ e células nãoB/nãoT (B220-CD3-) não diferem em qualquer um dos quatro grupos experimentais de ratinhos. Dados equivalentes fora, obtidos quando células B Ig⁺ ou células T CD4⁺ foram comparadas. Estes dados indicam que o número total



de células B do baço em ratinhos tratados com anti-IL-10 são iguais aos dos outros grupos testemunha. A imunocompetência das células B convencionais em ratinhos tratados com anti-IL-10 foi testada em dois dias. Primeiro, os ratinhos tratados com anti-IL-10 desenvolveram anticorpos IgM e IgG normais como resposta à injeção de antígenos dependentes do timo TNP-KLH (Figura 28). Respostas secundárias a TNP-KLH foram também normais nos ratinhos tratados com anti-IL-10. Segundo, as células B do baço de ratinhos tratados com anti-IL-10 desenvolveram respostas proliferativas normais *in vitro* a 50 µg/ml de LPS ou anticorpos anti-IgM (Tabela F1). As respostas proliferativas de fundo das células do baço para os ratinhos tratados com anti-IL-10 foram frequentemente três a cinco vezes superiores às dos controles (Tabela F1). Colectivamente, estes dados sugerem que as células B convencionais nos ratinhos tratados com anti-IL-10 são quantitativamente e funcionalmente indistintas das dos ratinhos testemunha.

Tabela F1. Resposta proliferativa *in vitro* das células do baço de ratinhos tratados com anti-IL-10 e ratinhos testemunha a estimulação com LPS, anti-IgM e anti-CD3.

Grupo de animais*	[³ H] timidina			
	+0	+LPS	+anti-IgM	+anti-CD3
	<i>cpm</i>			
Não tratados	224	22570	3346	90093
PBS	320	42298	3821	115692
J5/D	547	46748	2897	135172
SXC.1	2779	61609	7218	96389

Os animais foram tratados desde o nascimento até às 8 semanas de idade como descrito na Figura 1. O conjunto de células do baço a 2×10^6 /ml



obtidas a partir de três ratinhos em cada grupo foram cultivados durante 3 dias em meio sem aditivos ou em meio suplementado com LPS (50 mg/ml), anticorpos de cabra anti-IgM de ratinho (50 mg/ml) ou anticorpos de hamster anti-CD3 de ratinho (5 mg/ml). Para a estimulação anti-CD3, o anticorpo foi usado para revestir a placa de microtitulação antes da adição das células do baço. A proliferação foi avaliada através da incorporação de [³H]timidina, após um pulso de 16h com 1 mCi/alvéolo de [³H]timidina (NET 027; New England Nuclear, Boston, MA).

Exemplo F3. Mecanismo de eliminação de células B Ly-1

Ensaio de proliferação. As células do baço reunidas a 2×10^6 células/ml obtidas a partir de três ratinhos de cada grupo foram cultivadas durante 3 dias em meio sózinho ou meio suplementado com LPS (50 µg/ml), anticorpos de cabra anti-IgM de ratinho (0611-0201; Cappel Laboratories, Chranville, PA) (50 µg/ml) ou anticorpos de hamster anti-CD3 de ratinho (cedido por D. J. Bluestone, University of Chicago, Chicago, IL) (5 µg/ml). Para a estimulação anti-CD3, o anticorpo foi usado para revestir a placa de microtitulação antes da adição das células do baço. A proliferação foi avaliada através da incorporação de [³H]timidina, após um pulso de 16 horas com 1 mCi/alvéolo de [³H]timidina (NET 027; New England Nuclear, Boston, MA).

Foram considerados vários mecanismos possíveis como explicação para a eliminação de células B Ly-1 em ratinhos tratados com anti-IL-10. Este efeito não pareceu envolver citotoxicidade selectiva das células B Ly-1 devida aos anticorpos anti-IL-10, uma vez que a injeção dos mesmos anticorpos em ratinhos adultos não teve efeito nas recuperações subsequentes de células de lavado peritoneal ou células B peritoneais totais (Figura 29) 1, 2 ou 3 dias mais tarde. Como explicação alternativa, considerámos a possibilidade da eliminação



de células B reflectir uma consequência secundária da perturbação de uma outra citocina endógena. De facto, encontrou-se que de um modo geral os ratinhos tratados com anti-IL-10 possuíam níveis séricos elevados de IFN γ (Figura 30) uma observação que foi consistente com a capacidade anteriormente descrita de IL-10 para suprimir a produção de IFN γ em células Th1 e NK *in vitro*. Para testar a possibilidade deste aumento de IFN γ induzido por anti-IL-10 ser directa ou indirectamente responsável pela eliminação de células B Ly-1, os ratinhos foram injectados desde o nascimento até à idade adulta com uma combinação de anti-IL-10 anticorpos neutralizantes anti-IFN γ ou anti-IL-10 e um anticorpo de controlo de isotipo adequado. Os resultados mostraram que os anticorpos anti-IFN γ (Figura 31), mas não o controlo do isotipo, reduziu substancialmente a capacidade de tratamento anti-IL-10 para eliminar as células B Ly-1 peritoneais dos ratinhos. É importante notar que a administração continuada de anticorpos anti-IFN γ sózinhos ou a combinação de anticorpos anti-IL-10 mais anti-IFN γ , não altera a recuperação de células totais de lavagem peritoneal de ratinhos tratados com anti-IL-10 ou com o controlo do isotipo. Estes dados apoiam o conceito de que a eliminação de células B Ly-1 é pelo menos em parte uma consequência do aumento de IFN γ em ratinhos tratados com anti-IL-10.

Estudo G. Situação imunológica modificada dos ratinhos tratados com IL-10

Sumário

Demonstrou-se atrás que o tratamento contínuo de ratinhos desde o nascimento até à idade adulta com anticorpos neutralizantes anti-IL-10 conduz a uma eliminação específica de células Ly-1, enquanto que as células B convencionais permanecem normais em termos de número, fenótipo e função, ver Study F. Prolongando a caracterização destes animais, estes resultados mostram



que os ratinhos tratados com anti-IL-10 podem ser distinguidos dos ratinhos não tratados ou tratados com o controlo do isotipo de acordo com outros critérios. Os ratinhos tratados com anti-IL-10 continham níveis substancialmente elevados de TNF α circulante e em muitos casos IL-6 circulante e eram profundamente susceptíveis à morte por choque induzido com LPS, uma reacção inflamatória mediada por monocinas. A análise dos níveis de imunoglobulinas séricas revelou um decréscimo dos níveis séricos de IgA para acompanhar a redução anteriormente descrita da IgM sérica, mais um aumento drástico dos níveis de IgG2a e IgG2b. Outros estudos sobre a eliminação de células B Ly-1 de ratinhos tratados com IL-10 revelou que este efeito foi transitório conforme evidenciado pelo retorno das células B Ly-1 aos números normais 8 semanas após paragem do tratamento anti-IL-10. Encontrou-se que a eliminação de células B Ly-1 que ocorreu durante o tratamento com anti-IL-10 foi compensada por um aumento das células T peritoneais e granulócitos. Finalmente, se bem que os ratinhos tratados com IL-10 tenham sido incapazes de produzir anticorpos contra fosforilcolina e α 1,3-dextrano, eles desenvolveram respostas de anticorpos normais após injeções intraperitoneais de TNP-Ficoll. Este resultado sugere a existência de subcategorias dentro da família dos antígenos polissacáridos independentes do timo tipo II. Estes dados são discutidos dentro do contexto das suas implicações para os papéis de IL-10 e das células B Ly-1 no sistema imunitário.

O sistema imunitário é regulado por uma família das glicoproteínas solúveis designadas citocinas que são produzidas por uma variedade de células hemopoiéticas e não hemopoiéticas. A caracterização exaustiva *in vitro* destes imuno-reguladores ao longo dos últimos cinco anos conduziu ao conceito de pleiotropia funcional extensa e redundância dentro do sistema de citocinas. Os imunologistas têm pela frente o desafio de avaliar se este conceito reflete com precisão os papéis fisiológicos das citocinas *in vivo*. O papel fisiológico da



citocina recentemente descoberta IL-10 foi estudado. Uma extensa lista de propriedades *in vitro* caracteriza IL-10 como um imuno-supressor forte capaz de regular negativamente a produção de várias monocinas e citocinas e de inibir a apresentação de antigénio por algumas, mas não todas as células apresentadoras de antigénio. Uma lista igualmente longa de propriedades estimuladores indicam a mesma citocina como um co-estimulador de crescimento de timócitos, células T periféricas, células B e mastócitos; um amplificador do desenvolvimento e função de células T citotóxicas; e um indutor da viabilidade e diferenciação de células T; e um indutor da viabilidade e diferenciação das células. Para avaliar o papel fisiológico de IL-10 *in vivo*, os ratinhos foram injectados duas a três vezes por semana desde o nascimento até à idade adulta com anticorpos monoclonais neutralizantes anti-IL-10. Uma análise inicial revelou que este tratamento conduz a uma eliminação drástica de uma subsérie pouco abundante de linfócitos B, designados células B Ly-1 ou B-1, implicando assim IL-10 como um regulador do desenvolvimento de células Ly-1/B-1.

As células B Ly-1 são uma subpopulação de linfócitos B que são altamente prevalentes nos tecidos linfóides fetais e neonatais do homem e ratinho, mas que são encontradas em pequenos números apenas no sistema imunitário adulto. Apesar de dificilmente detectáveis em tecidos linfóides adultos primários e secundários, as células B Ly-1 estão grandemente enriquecidas nas cavidades peritoneal e pleural de um ratinho adulto e encontram-se em pequenos números na circulação do homem adulto. A sua caracterização extensiva no sistema de ratinho revelou numerosas propriedades intrigantes, incluindo um reportório restricto de anticorpos de baixa afinidade que não sofrem facilmente mutação somática e que dão extensa reactividade cruzada com auto-antigénios e componentes da parede bacteriana. Ainda, experiências de reconstituição em ratinhos indicaram que, ao contrário das células B convencionais, as células B Ly-1 são capazes de se auto-renovarem durante toda a vida do hospedeiro e



geram a maior parte da IgM sérica e a resposta de anticorpos total a vários determinantes bacterianos tais como fosforilcolina e α 1,3-dextrano. A caracterização anterior de células B Ly-1 demonstrou que podem ser ainda distinguidas das células B convencional com base numa produção de IL-10 induzível grandemente aumentada, colocando a possibilidade de um papel imuno-regulador vasto para estas células. Apesar destas propriedades estranhas, o papel preciso das células B Ly-1 no sistema imune permanece obscura.

Os ratinhos que foram tratados continuamente desde o nascimento até à idade adulta com anticorpos neutralizantes anti-IL-10 ficaram sem células B Ly-1 conforme evidenciado pela sua ausência de células B peritoneais e o facto de terem drasticamente reduzido os níveis séricos de IgM e as respostas de anticorpos *in vivo* a α 1,3-dextrano e fosforilcolina. Encontrou-se que a eliminação de células B Ly-1 é uma consequência secundária do aumento de IFN γ endógeno e poderá ser evitada através da co-administração de anticorpos anti-IFN γ . As consequências da eliminação específica de células B Ly-1 e da IL-10 endógena na subsequente situação imunitária destes ratinhos é aqui descrita.

Exemplo G1. Efeito do tratamento anti-IL-10 sobre os níveis de citocinas endógenas em ratinhos.

Ratinhos. Ratinhos BALB/c prenhes a meio do tempo foram adquiridos à Simonsen Laboratory (Gilroy, CA).

Tratamento anti-IL-10. 5 a 10 ratinhos BALB/c da mesma idade foram injectados intraperitonealmente com um dos dois anticorpos anti-IL-10 desde o nascimento até às 8 semanas de idade de acordo com os protocolos que seguem. Nalgumas experiências, os ratinhos foram injectados três vezes por semana com anticorpo IgM de rato SXC.1 anti-IL-10 de ratinho, ver Mosmann *et*



al., (1990) J. Immunol. 145:2938-2945, (0,2 mg/injecção durante a semana um, 0,5 mg/injecção durante a semana 2, 1,0 mg/injecção durante as semanas 3 a 8), quantidades equivalentes de um controlo do isotipo designado J5/D ou volumes equivalentes (100 ou 200 µl) de tampão de fosfatos salino (PBS). Noutras experiências, os ratinhos foram injectados duas vezes por semana com 2A5, um anticorpo IgG1 de rato anti-IL-10 de ratinho (0,2 mg/injecção durante a semana 1, 0,5 mg/injecção durante a semana 2, 1 mg/injecção durante as semanas 3 a 8), quantidades equivalentes de um controlo do isotipo designado GL113 ou volumes equivalentes (100 ou 200 µl) de tampão de fosfatos salino (PBS). Ratinhos BALB/c da mesma idade não tratados foram incluídos em todas as experiências para comparação. Todos os anticorpos foram obtidos a partir de sobrenadantes de hibridoma sem soro e purificados por precipitação com sulfato de amónio. Após este regime de tratamento, os baços, timos, nódulos linfáticos e células das lavagens peritoneais reunidos foram colhidos de cada um dos quatro grupos de ratinhos e analisados por citometria de fluxo ensaios funcionais.

ELISAs para citocinas. Amostras de soros colhidas a partir de ratinhos tratados com anti-IL-10 ou ratinhos testemunha foram testados relativamente a TNF α de ratinho ou IL-6 de ratinho usando ELISAs específicas de citocinas.

O tratamento contínuo de ratinhos anti-IL-10 desde o nascimento até à idade adulta leva à presença de quantidades substanciais de IFN γ nos soros colhidos às 8 semanas, ao contrário dos ratinhos não tratados ou tratados com o controlo do isotipo, ambos sem níveis detectáveis de IFN γ nos seus soros. Para explorar melhor as perturbações de citocinas endógenas resultantes do tratamento anti-IL-10, os soros colhidos após 8 semanas de tratamento foram avaliados quanto à presença de TNF α e IL-6, usando ELISAs específicas das citocinas. Os soros de ratinhos tratados com anti-IL-10 continham níveis de TNF α



grandemente aumentados (Figura 32) e frequentemente continham níveis de IL-6 elevados (Figura 33). O aumento de TNF α e IL-6 nos ratinhos tratados com anti-IL-10 é consistente com a capacidade de suprimir a produção de monocinas *in vitro* descrita para IL-10.

Exemplo G2. Efeito do tratamento anti-IL10 nos níveis séricos de Ig de ratinho

Choque induzido por endotoxinas. Os ratinhos foram injectados intraperitonealmente com doses de endotoxina (lipopolissacáridos de *Escherichia coli* serotipo 011:B4, Sigma Chemical Co.) variando entre 1 μ g e 500 μ g. A sobrevivência foi controlada ao longo de um período de 1-6 dias.

O efeito do tratamento anti-IL-10 nos níveis de monocinas endógenas foi ainda analisado avaliando a susceptibilidade destes animais ao choque induzido por LPS, uma reacção inflamatória mediada por monocinas. Resultados apresentados anteriormente mostraram que os anticorpos monoclonais neutralizantes contra TNF α , IL-1 ou IL-6 e um antagonista fisiológico de IL-1 designado IL-1Ra, protegem eficazmente os ratinhos do choque induzido por LPS. As experiências indicaram que os ratinhos injectados com os anticorpos anti-IL-10, SXC.1 (IgM de rato) ou 2A5 (IgG1 de rato), desde o nascimento até às 8 semanas eram profundamente susceptíveis à morte por choque induzido com LPS (Figura 34). Se bem que a LD₁₀₀ para LPS nos ratinhos BALB/c de 8 semanas de idade nas instalações para animais da DNAX fosse >380 μ g/ratinho i.p., 1 μ g de endotoxina matou quase todos os ratinhos tratados com anti-IL-10 (Figura 34). Ainda não foi determinado o mecanismo preciso para este aumento de susceptibilidade, mas os dados são consistentes com uma regulação positiva generalizada das monocinas inflamatórias nos ratinhos tratados com anti-IL-10.



ELISAs para anticorpos. As amostras de soros colhidas após 8 semanas de tratamento foram testadas quanto à presença de imunoglobulinas de ratinho de todos os isotipos usando ELISAs tipo sanduiche específicas de isotipo. Os anticorpos ligados às placas empregues para esta finalidade foram os seguintes: anticorpos de rato anti-IgG1 de ratinho (3096, generosamente fornecidos por R. Coffman, DNAX); anticorpos de rato anti-IgG2a de ratinho (R8-103; Pharmingen, San Diego, CA); anticorpos de rato anti-IgG2b de ratinho (R9-91, Pharmingen); anticorpos de rato anti-IgG3 de ratinho (R2-38, Pharmingen); anticorpos de rato anti-IgA de ratinho (R5-140, Pharmingen); anticorpos de rato anti-IgE de ratinho (EM95, generosamente fornecido por R. Coffman). Os anticorpos para revestimento de placas foram usados a 1-5 µg/ml. Os anticorpos da sanduiche usados nestas ELISAs foram anticorpos de rato biotinilados anti-IgG1 de ratinho (3098B, generosamente fornecidos por R. Coffman); anticorpos de rato biotinilados anti-IgG2a de ratinho (R19-15, Pharmingen); anticorpos de rato biotinilados anti-IgG2b (R12-3, Pharmingen); anticorpos de rato biotinilados anti-IgG3 de ratinho (R40-82, Pharmingen), anticorpos de rato biotinilados anti-IgA de ratinho (2740B, generosamente fornecidos por R. Coffman); anticorpos de rato biotinilados anti-IgE de ratinho (8R35-118, Pharmingen). Estes anticorpos da sanduiche foram usados a 1-3 µg/ml, conjuntamente com peroxidase de rábano silvestre conjugado com estreptavidina (CalBiochem, La Jolla, CA) mais 1 mg/ml de substrato [2,2-azinobis(ácido 3-etilbenzotiasolinsulfúrico); Sigma]. Os ELISAs foram quantificados usando imunoglobulinas purificadas de mieloma de ratinho.

O tratamento contínuo de ratinhos com anti-IL-10 desde o nascimento até à idade adulta conduziu a uma redução marcada dos níveis de IgM sérica comparado com os níveis de IgM séricos normais observados nos ratinhos tratados com o controlo do isotipo. A medição dos outros isotipos de imunoglobulina nos soros colhidos após 8 semanas de tratamento está apresentado na Figura 35. Os níveis de cada um dos isotipos de imunoglobulina



nos três grupos de ratinhos testemunha (*i.e.* não tratados, tratados com PBS ou tratados com um anticorpo controlo do isotipo) não variaram significativamente das gamas anteriormente documentadas para os níveis de Ig séricas em ratinhos normais. No entanto, foram observadas numerosas alterações nos níveis de Ig sérica em ratinhos tratados com anti-IL-10. Estes ratinhos mostraram uma redução marcada nos níveis séricos de IgA semelhante à redução previamente descrita para a IgM sérica e um aumento drástico de IgG2 α e IgG2 β (Figura 35). Os restantes isotipos (IgG1, IgG3, IgE) ficaram inalterados ou aumentaram duas a quatro vezes nalgumas experiências.

Exemplo G3. A eliminação de células B Ly-1 em ratinhos tratados com anti-IL-10 é transitória.

Imunofluorescência. As células lavadas foram coradas com combinações dos seguintes reagentes: anticorpo fluoresceinado anti-IgM de ratinho (DS-1, Pharmingen, San Diego, CA); anticorpo de rato biotinilado anti-IgD de ratinho (11-26c, produzido por J. Kearney, U. Birmingham, Ala.); anticorpo fluoresceinado anti-CD3 de ratinho (145-2C11, Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN); anticorpo biotinilado anti-B220 de ratinho (RA3-6B2; Caltag, S.F.); e um anticorpo de rato biotinilado anti-granulócitos/eosinófilos de ratinho (8C5; produzido por R. Coffman, DNAX). Os reagentes biotinilados foram usados conjuntamente com estreptavidina conjugado com ficoeritrina (Becton-Dickinson, Mountais View, CA). As células foram analisadas usando um FACScan e as células mortas foram excluídas com base no ângulo directo e no desvio lateral. Os resultados mostram as intensidades de fluorescência de 5000 células vivas contadas para cada grupo experimental.

Os ratinhos tratados com anti-IL-10 foram avaliados após paragem do tratamento anti-IL-10 para determinar se a eliminação de células B Ly-1 nestes animais era irreversível. Vários grupos de ratinhos foram injectados com



anticorpos anti-IL-10 desde o nascimento até às 8 semanas de idade, após o que se parou o tratamento. Cada um dos grupos foi então analisado relativamente à presença de células B Ly-1 peritoneais imediatamente ou em tempos diferentes durante as 8 semanas após o termo do tratamento. É importante que não se observaram diferenças significativas nos rendimentos das células totais das lavagens peritoneais colhidas aos diferentes tempos. Em várias experiências desta natureza os ratinhos permaneceram sem células B Ly-1 peritoneais durante as 3 semanas iniciais após o termo do tratamento anti-IL-10. Após aquele intervalo de tempo, as células B Ly-1 começaram a aparecer na cavidade peritoneal, com um complemento normal de células B Ly-1 observado às 8 semanas após findo o tratamento anti-IL-10 (Figura 36). A reconstituição do compartimento de células B peritoneais foi caracterizado por um aparecimento inicial de células B B220brilhanteIgMdull aproximadamente 4 semanas após o tratamento anti-IL-10 ter parado, seguido algumas semanas mais tarde do aparecimento de células B B220dullIgMbrilhantes (Figura 36).

Exemplo G4. Aumento dos números de células T e granulócitos peritoneais em ratinhos tratados com anti-IL-10

Contagens diferenciais de células hemopoiéticas. Suspensões celulares derivadas dos baços e de lavagens peritoneais foram usadas para preparar sedimentos de células em lâminas para análise da morfologia celular. As amostras foram coradas com Wright's-Giemsa (Sigma, St. Louis) e analisadas por microscopia relativamente alinfócitos, macrófagos, granulócitos, eosinófilos e mastócitos.

Apesar dos ratinhos tratados continuamente desde o nascimento até às 8 semanas de idade ficarem sem células B peritoneais, o número total de células da lavagem peritoneal obtido de tais ratinhos não variou significativamente relativamente aos ratinhos testemunha. As contagens



diferenciais de células hemopoiéticas realizadas nas células da lavagem peritoneal colhidas de ratinhos tratados com anti-IL-10 indicou que isto reflecte um aumento nos granulócitos/eosinófilos e aparentemente linfócitos não B (Tabela G1). A fenotipagem com marcadores de superfície das células da lavagem peritoneal dos ratinhos tratados com anti-IL-10 revelou aumentos das células Ig-negativas Ly-1 brilhante (Figura 37C), células Ig-negativas CD3-positivas, células Mac1- right, Ig-negativas (Figura 38) e células 8C5-brilhante Ig-negativas. Estas análises indicam um aumento de linfócitos T Ly-1 -positivos, CD3-positivos e confirmam (Tabela G1) um aumento nos granulócitos que expressam as marcas de superfície Mac1 e 8C5.

TABELA I: PROPORÇÕES DE SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS HEMATOPOIÉTICAS EM RATINHOS TRATADOS COM ANTI-IL-10 OU EM RATINHOS TESTEMUNA

	Linfó- citos	Macró- fagos	Neutró- filos	Eosinó- filos	Mastó- citos
<u>Peritoneu[†]</u>					
Não tratado	74	22	1,8	1,7	0,5
Tratado PBS	66	29	1,4	34,3	0,3
Tratado controlo do isótipo	64	31	1,2	4,5	0,3
Tratado anti-IL-10	44	22	18,0	16,0	0
<u>Baço[†]</u>					
Não tratado	94	2,7	2,3	0,5	0
Tratado PBS	92	3,6	6,6	1,4	0
Tratado controlo do isótipo	96	1,2	1,8	0,6	0
Tratado anti-IL-10	92	2,4	5,0	0,9	0

[†] Todos os grupos tinham aproximadamente o mesmo número de células peritoneais e do baço/ratinho; os números representam percentagem de células totais contadas)



Exemplo G5. Ratinhos tratados com anti-IL-10 respondem ao antigénio TNP-Ficoll independente do timo.

Respostas específicas de anticorpos. As respostas específicas de anticorpos contra TNP-Ficoll foram determinadas após injeção intraperitoneal dos ratinhos com 10 µg de TNP-Ficoll (Proporcionado pelo Dr. James Mond, USUHS) e colheita dos soros 5 ou 10 dias mais tarde. As injeções com anticorpos anti-IL-10 ou com anticorpo testemunha continuaram entre a exposição ao antigénio e a colheita do soro. Os anticorpos específicos de TNP foram quantificados usando um ELISA.

Os ratinhos tratados com anti-IL-10 são deficientes na sua capacidade para induzir respostas de anticorpos *in vivo* a dois antigénios tipo II independentes do timo, fosforilcolina e α 1,3-dextrano. A Figura 39 indica que os ratinhos tratados com anti-IL-10 desenvolvem *in vivo* respostas normais de anticorpos contra um terceiro antigénio tipo II independente do timo TNP-Ficoll. Esta resposta é consistente com as nossas observações anteriores de que as células B do baço de ratinhos tratados com anti-IL-10 desenvolvem uma resposta proliferativa normal após estimulação com anticorpos anti-IgM, o presumível análogo policlonal de antigénios tipo II independentes do timo.

Estudo H. A administração contínua de anticorpos anti-IL-10 retarda o estabelecimento de auto-imunidade em ratinhos NZB/W

Sumário

A administração contínua de anticorpos anti-IL-10 a ratinhos BALB/c modifica os níveis endógenos de auto-anticorpos, plex TNF α e IFN γ , três imunomediadores que se sabe afectarem o desenvolvimento de auto-



imunidade em ratinhos NZB/W "predispostos para lupus". Para explorar as consequências da neutralização de IL-10 em ratinhos NZB/W, os animais foram injectados 2-3 vezes por semana desde o nascimento até aos 8-10 meses com anticorpos anti-IL-10 ou com anticorpos para controlo do isotipo. O tratamento com anti-IL-10 retardou substancialmente o estabelecimento de auto-imunidade em ratinhos NZB/W conforme controlado pela sobrevivência global como pelo desenvolvimento de proteinúria, nefrite renal ou auto-anticorpos. A sobrevivência aos 9 meses foi aumentada de 10% para 80% nos ratinhos tratados relativamente aos controlos. Esta protecção contra a auto-imunidade pareceu ser devida a uma regulação positiva, induzida por anti-IL-10, do $\text{TNF}\alpha$ endógeno, uma vez que os ratinhos NZB/W protegidos desenvolveram rapidamente auto-imunidade quando foram introduzidos anticorpos neutralizantes anti- $\text{TNF}\alpha$ às 30 semanas nos ratinhos tratados com anti-IL-10 a longo prazo. Estes dados indicam que os antagonistas de IL-10 serão benéficos no tratamento de lupus eritematoso sistémico humano.

O ratinho híbrido (NZB x NZW) F1 desenvolve uma doença auto-imune grave que se assemelha muito ao lupus eritematoso sistémico em humanos. Os ratinhos NZB/W desenvolvem espontaneamente uma glomerulonefrite fatal mediada por complexos imunes por volta dos 6-9 meses em animais fêmea e 12-18 meses em animais macho. Tentativas anteriores para definir a causa subjacente à auto-imunidade em ratinhos NZB/W tem focado o papel potencial dos genes MHC. De facto, o interferão γ ($\text{IFN}\gamma$), uma citocina que regula positivamente a expressão dos antígenos MHC classe II numa grande variedade de tipos celulares, acelera o desenvolvimento da auto-imunidade em ratinhos NZB/W. Vários estudos recentes sugeriram que o gene $\text{TNF}\alpha$, que está situado dentro do complexo MHC, pode estar envolvido na patogénese de nefrite provocada por lupus em ratinhos NZB/W. Estes estudos revelaram que os ratinhos NZB/W produzem níveis excepcionalmente baixos de $\text{TNF}\alpha$ e que isto



está correlacionado com um polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição no gene j de $\text{TNF}\alpha$ e com um polimorfismo em repetições em tandem de dinucleótidos na região reguladora 5' do gene de $\text{TNF}\alpha$. A importância destas observações é apoiada pelo facto da terapia de substituição com $\text{TNF}\alpha$ recombinante retardar significativamente o desenvolvimento de nefrite em ratinhos NZB/W.

IL-10 é uma citocina produzida por subséries de células T activadas, células e macrófagos, os quais medeiam uma variedade de propriedades imuno-estimuladoras e imuno-supressoras no ratinho e no homem em ensaios *in vitro*. Num esforço recente para avaliar o papel fisiológico de IL-10, ratinhos BALB/c foram tratados continuamente desde o nascimento até às 8 semanas de idade com anticorpos neutralizantes anti-IL-10. Consistente com as propriedades *in vitro* conhecidas de IL-10, ratinhos tratados com anti-IL-10 são caracterizados por níveis elevados de $\text{IFN}\gamma$ e $\text{TNF}\alpha$ endógenos. $\text{IFN}\gamma$ elevado por sua vez conduz à eliminação de uma subsérie numericamente pequena de linfócitos B, designados células B Ly1 ou CD5 ou B-1, uma população da qual deriva a maior parte dos auto-anticorpos. Estes estudos em ratinhos normais sugerem que a neutralização de IL-10 pode produzir algumas consequências desejáveis em ratinhos NZB/W, *i.e.*, aumento de $\text{TNF}\alpha$ endógeno e redução da produção de auto-anticorpos e algumas consequências indesejáveis, *i.e.*, aumento do $\text{IFN}\gamma$ endógeno. Estuda-se aqui os efeitos globais deste tratamento contínuo anti-IL-10 sobre o desenvolvimento de auto-imunidade em ratinhos fêmea NZB/W. Os resultados sugerem que a neutralização de iL-10 retarda significativamente o estabelecimento de auto-imunidade nestes ratinhos devido a uma regulação positiva de $\text{TNF}\alpha$ endógeno.

Ratinhos. Ratinhos NZB/W F1 foram reproduzidos no biotério do DNAX Research Institute usando fêmeas NZB adquiridas à Jackson Laboratory



(Bar Harbor, ME) e os machos NZW foram adquiridos à Simonsen Laboratories (Gilroy, CA). Apenas os ratinhos fêmea F1 foram utilizados devido ao rápido estabelecimento da auto-imunidade apresentado.

Tratamento anti-IL-10. Grupos de 17-23 ratinhos fêmea B/W F1 foram tratados com um mAb IgM ou mAb IgG de rato contra IL-10, designado SXC.1 ou JES 2A5. 21-23 ratinhos fêmea B/W F1 com a mesma idade por grupo foram tratados com mAbs testemunha do isotipo correspondente, designados J5/D (IgM) ou GL113 (IgG). Os mAbs anti-IL-10 e os mAbs para controlo do isotipo foram colhidos como ascistes de ratinhos labro (nu/nu), purificados por duas precipitações diferenciais com sulfato de amónio, dialisados contra tampão de fosfatos salino (PBS) e quantificados por electroforese de proteínas e medição da densidade óptica. O tratamento consistiu em 3 partes: (a) desde o nascimento até à 1ª semana, 0,2 mg de mAb por ratinho foi injectado intraperitonealmente (i.p.) 4 vezes em IgM ou duas vezes em IgG, (b) 2ª semana 0,5 mg de mAb por ratinho foi injectado i.p. 3 vezes com IgM ou duas vezes com IgG e (c) desde a 3ª semana até à idade adulta 1 mg de mAb por ratinho foi injectado i.p. 3 vezes com IgM ou duas vezes com IgG por semana. Estudos preliminares, indicaram que este regime poderá manter a concentração de IgM de rato em soro de ratinhos à volta de 50 µg/ml.

Avaliação da doença renal. Mediu-se a proteinúria colorimetricamente usando bastonetes Albustix (Miles Laboratores, Inc., Elkhart, IN) e graduado de acordo com o seguinte código: vestígios= 10 mg/dl; 1+ = 30 mg/dl; 2+ = 100 mg/dl; 3+ = 300 mg/dl 4+ = 1,000 mg/dl. A gravidade histológica da glomerulonefrite foi graduada numa escala de 0 a 2+ com base na intensidade e grau de alterações histopatológicas, 0 = rins sem lesões glomerulares; 1+ = lesões suaves, e.g. matriz mesangial aumentada, celularidade mesangial/glomerular, formação crescente ou presença de exudatos inflamatórios e adesões capsulares;



sem moldes tubulares evidentes; 2+ = lesões graves, e.g., arquitectura glomerular obliterada em mais de 70% dos glomérulos com extensiva formação de moldes tubulares.

ELISA para auto-anticorpos. Anticorpos séricos específicos para DNA de cadeia dupla ou simples (ds- ou ss-DNA) foram quantificados por ELISA. resumidamente, 5 mg/ml de ds- ou ss-DNA foi usado para cobrir placas de ELISA (Flow Laboratories, McLean, VA) numa incubação durante a noite a 4°C. As placas revestidas com antígeno foram subsequentemente bloqueadas durante 1 h com PBS contendo 0,05% de Tween 20, 0,02% de NaN_3 e depois incubado durante 1 h à temperatura ambiente com os soros a testar ou com soros padrão diluídos a 1:100. As placas foram então lavadas com PBS 0,05% Tween 20 e incubadas durante 1 h com 1 µg/ml de anticorpos anti-IgG ou anti-IgM de rato conjugados com peroxidase de rábano silvestre (HRP) (Zymed Laboratories, Inc. S. San Francisco, CA). Mediu-se a absorvância usando um leitor de microplacas Vmax (Molecular Devices, Menlo Park, CA) 30 min após a adição de 1 mg/ml de 2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbentiazolina-6-sulfónico); ABTS (Sigma Chemicals, St. Louis, MO). Os títulos de anti-DNA foram expressos como unidades, usando um padrão de referência consistindo num conjunto de soros reunidos de ratinhos MRL/MpJ-1pr-lpr de 4 meses de idade fornecido pelo Dr. Shelby Umland da Schering-Plough Corp. Uma diluição a 1:100 deste soro padrão foi assumida arbitrariamente como sendo 100 unidades/ml.

Concentração sérica de Ig e $\text{TNF}\alpha$. Para ELISA de Ig, placas revestidas com 1 µg/ml de anticorpos de cabra anti-IgG de rato (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD) foram incubados com soros diluídos a 1:1000 ou 1:5000, depois com anticorpos de cabra anti-IgG ou anti-IgM conjugados com HRP (Zymed Laboratories, Inc.) e revelada a cor. As



concentrações de IgG e de IgM, forma determinadas a partir de uma curva padrão construída incubando com concentrações conhecidas dos nossos lotes, os quais eram a mistura de proteínas de mieloma.

Para a ELISA de $\text{TNF}\alpha$, as placas revestidas com 5 $\mu\text{g/ml}$ de mAb anti- $\text{TNF}\alpha$ de ratinho (MP6-XT3.11) foram incubadas com os soros a testar diluídos a 1:10, em seguida com o mAb de rato anti- $\text{TNF}\alpha$ de ratinho (MP6-XT22) conjugado com HRP e revelada a cor.

Os requerentes depositaram culturas separadas de *E. coli* MC1061 portadoras de pH5C, pH15C e pBCRF1(SRa) na American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA (ATCC), com os números de acesso 68191, 68192 e 68193, respectivamente. Estes depósitos foram feitos nas condições estabelecidas pela ATCC para depósitos de culturas para fins de patente, que assegura que o depósito estará disponível ao US Commissioner of Patents and Trademarks conforme 35 USC 122 e 37 CFR 1.14 e estará disponível ao público quando da publicação de uma patente U.S., a qual requer que o depósito seja mantido. A disponibilidade da estirpe depositada não deve ser pensada como uma autorização para realizar o invento em contravenção com os direitos garantidos sob a autoridade de qualquer governo de acordo com as leis sobre patentes.



LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

(i) REQUERENTE: Rene de Waal Malefyt, Di-Hwei Hsu, Anne O'garra e Hergen Spits

(ii) TÍTULO DO INVENTO: Utilização de Interleucina-10 para tratar o choque séptico

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 2

(iv) ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA :

- (A) DESTINATÁRIO: Stephen C. Macevicz, DNAX Research Institute
- (B) RUA: 901 California Avenue
- (C) CIDADE: Palo Alto
- (D) ESTADO: California
- (E) PAÍS: USA
- (F) CÓDIGO POSTAL: 94304

(v) FORMA LEGÍVEL EM COMPUTADOR:

- (A) TIPO DE MEIO: disquetes de 3,5 polegadas
- (B) COMPUTADOR: Macintosh SE
- (C) SISTEMA OPERATIVO: Macintosh 6.0.1
- (D) SOFTWARE: Microsoft Word 4.0

(vi) DADOS SOBRE O PRESENTE PEDIDO:

- (A) NÚMERO DO PEDIDO:
- (B) DATA DE ENTREGA:
- (C) CLASSIFICAÇÃO:

(vii) DADOS SOBRE PEDIDOS ANTERIORES:

- (A) NÚMERO DO PEDIDO:
- (B) DATA DE ENTREGA:

(viii) INFORMAÇÃO SOBRE PROCURADOR/AGENTE:

- (A) NOME: Stephen C. Macevicz
- (B) NÚMERO DE REGISTO: 30,285
- (C) NÚMERO DA REFERÊNCIA/DOCKET: DX0221

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DAS SEQUÊNCIAS:



- (A) COMPRIMENTO: 160 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADEIA:
- (D) TOPOLOGIA: linear

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

Ser	Pro	Gli	Gln	Gli	Tre	Gln	Ser	Glu	Asn	Ser	Cis	Tre	His	Fen	
				5					10					15	
Pro	Gli	Asn	Leu	Pro	Asn	Met	Leu	Arg	Asp	Leu	Arg	Asp	Ala	Fen	
				20					25					30	
Ser	Arg	Val	Lis	Tre	Fen	Fen	Gln	Met	Lis	Asp	Gln	Leu	Asp	Asn	
				35					40					45	
Leu	Leu	Leu	Lis	Glu	Ser	Leu	Leu	Glu	Asp	Fen	Lis	Gli	Tir	Leu	
				50					55					60	
Gli	Cis	Gln	Ala	Leu	Ser	Glu	Met	Ile	Gln	Fen	Tir	Leu	Glu	Glu	
				65					70					75	
Val	Met	Pro	Gln	Ala	Glu	Asn	Gln	Asp	Pro	Asp	Ile	Lis	Ala	His	
				80					85					90	
Val	Asn	Ser	Leu	Gli	Glu	Asn	Leu	Lis	Tre	Leu	Arg	Leu	Arg	Leu	
				95					100					105	
Arg	Arg	Cis	His	Arg	Fen	Leu	Pro	Cis	Glu	Asn	Lis	Ser	Lis	Ala	
				110					115					120	
Val	Glu	Gln	Val	Lis	Asn	Ala	Fen	Asn	Lis	Leu	Gln	Glu	Lis	Gli	
				125					130					135	
Ile	Tir	Lis	Ala	Met	Ser	Glu	Fen	Asp	Ile	Fen	Ile	Asn	Tir	Ile	
				140					145					150	
Glu	Ala	Tir	Met	Tre	Met	Lis	Ile	Arg	Asn						
				155					160						

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DAS SEQUÊNCIAS:

- (A) COMPRIMENTO: 147 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADEIA:
- (D) TOPOLOGIA: linear

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

Tre Asp Gln Cis Asp Asn Fen Pro Gln Met Leu Arg Asp Leu Arg
5 10 15

Asp Ala Fen Ser Arg Val Lis Tre Fen Fen Gln Tre Lis Asp Glu
20 25 30

Val Asp Asn Leu Leu Leu Lis Glu Ser Leu Leu Glu Asp Fen Lis
35 40 45

Gli Tir Leu Gli Cis Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Fen Tir
50 55 60

Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala Glu Asn Gln Asp Pro Glu Ala
65 70 75

Lis Asp His Val Asn Ser Leu Gli Glu Asn Leu Lis Tre Leu Arg
80 85 90

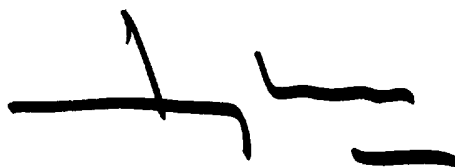
Leu Arg Leu Arg Arg Cis His Arg Fen Leu Pro Cis Glu Asn Lis
95 100 105

Ser Lis Ala Val Glu Gln Ile Lis Asn Ala Fen Asn Lis Leu Gln
110 115 120

Glu Lis Gli Ile Tir Lis Ala Met Ser Glu Fen Asp Ile Fen Ile
125 130 135

Asn Tir Ile Glu Ala Tir Met Tre Ile Lis Ala Arg.
140 145

Lisboa, 10 de Fevereiro de 2000



JORGE CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 14
1200 LISBOA



REIVINDICAÇÕES

1. A utilização de interleucina-10 ou um seu análogo, agonista ou antagonista na produção de uma composição farmacêutica para administração a um hospedeiro, de forma a modular a inflamação ou função imune mediada pelas células T num hospedeiro, em que a referida inflamação ou função imune mediada pelas células T é acompanhada de um nível anormal do factor de necrose tumoral alfa.

2. A utilização da Reivindicação 1, em que a referida interleucina-10 ou um seu análogo, agonista ou antagonista, é usado na produção de uma composição farmacêutica para administração a um hospedeiro de forma a modular a inflamação, em que a referida inflamação é acompanhada de um nível anormal de factor de necrose tumoral alfa.

3. Uma utilização da Reivindicação 1 ou Reivindicação 2, em que a interleucina-10 é usada na produção da referida composição.

4. Uma utilização de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a referida administração também modula os níveis de interleucina-1 ou de interleucina-6.

5. Uma utilização de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o referido nível anormal é elevado.

6. Uma utilização de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o referido nível anormal é acompanhado de uma infecção microbiana.



7. Uma utilização de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o referido nível anormal é acompanhado de febre, hipotensão, necrose dos tecidos, acidose metabólica ou disfunção de órgãos.

8. Uma utilização da Reivindicação 6, em que a referida infecção microbiana provoca um estado de choque séptico, choque tóxico, meningite meningocócica ou malária.

9. Uma utilização de qualquer uma das Reivindicações 1 a 7, em que o referido hospedeiro sofre de uma infecção bacteriana.

10. Uma utilização da Reivindicação 9, em que a referida infecção bacteriana é por uma bactéria Gram-negativa.

11. Uma utilização da Reivindicação 10, em que o referido hospedeiro apresenta sintomas de choque séptico.

12. Uma utilização da Reivindicação 9, em que a referida infecção bacteriana é por uma bactéria Gram-positiva.

13. Uma utilização da Reivindicação 12, em que o referido hospedeiro apresenta sintomas de choque tóxico.

14. A utilização da interleucina-10 na produção de uma composição farmacêutica para tratamento de choque séptico num hospedeiro.

15. Uma utilização de interleucina-10 na produção de uma composição farmacêutica para tratamento de choque térmico num hospedeiro.

16. A utilização de um antagonista da interleucina-10 na produção de uma composição farmacêutica para tratamento de uma perturbação auto-imune num hospedeiro.

17. Uma utilização da Reivindicação 16, em que a referida perturbação auto-imune é mediada pelas células B.

18. Uma utilização da Reivindicação 16, em que a referida perturbação auto-imune é mediada por $TNF\alpha$.

19. Uma utilização de qualquer uma das Reivindicações 16 a 19, em que o referido antagonista da interleucina-10 é uma molécula de anticorpo.

20. Uma utilização da Reivindicação 19, em que a referida molécula de anticorpo é capaz de se ligar à interleucina-10.

21. Uma utilização de qualquer uma das Reivindicações 16 a 20, em que a referida administração modula pelo menos um de entre factor de necrose tumoral alfa, interleucina-6 ou interleucina-1.

22. Uma utilização de qualquer uma das Reivindicações 16 a 19, em que o referido hospedeiro é um ratinho.

23. Uma utilização da Reivindicação 22, em que ao referido ratinho é um ratinho NZB/W.

Lisboa, 10 de Fevereiro de 2000



JORGE CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 14
1200 LISBOA

1/63

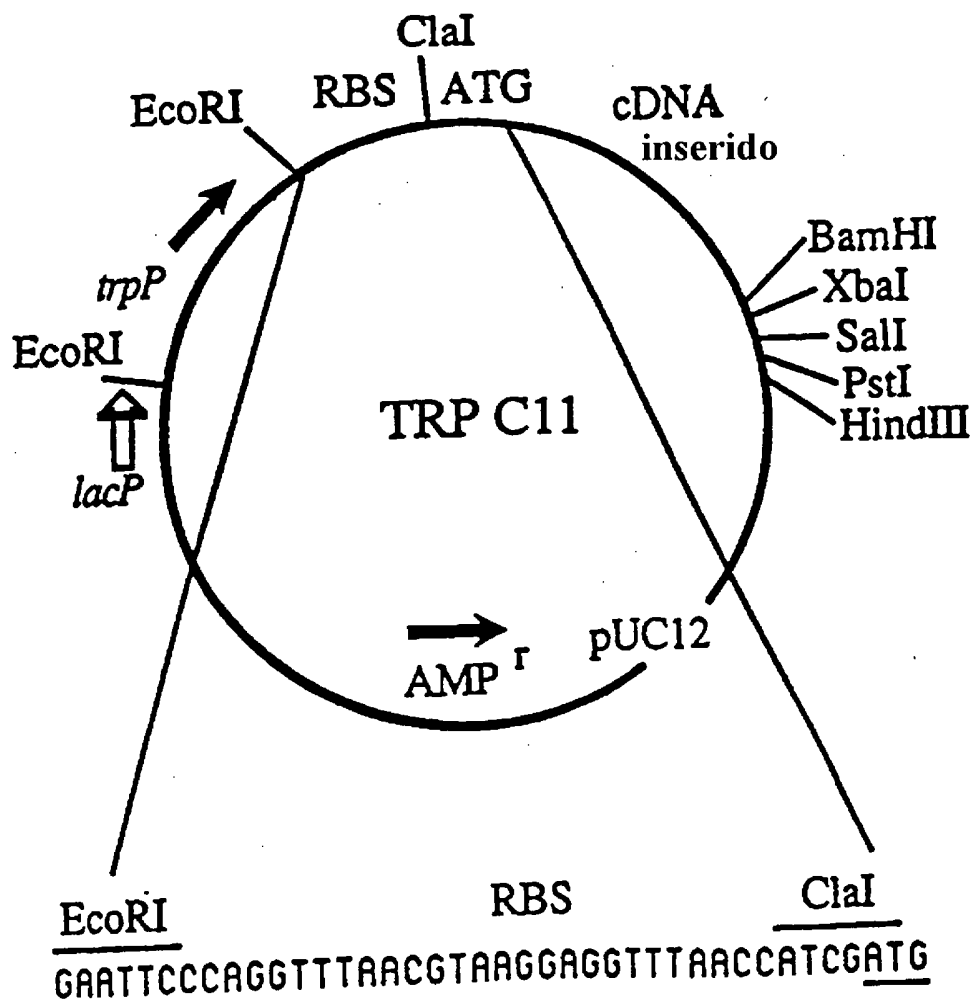


FIGURA 1

2/63

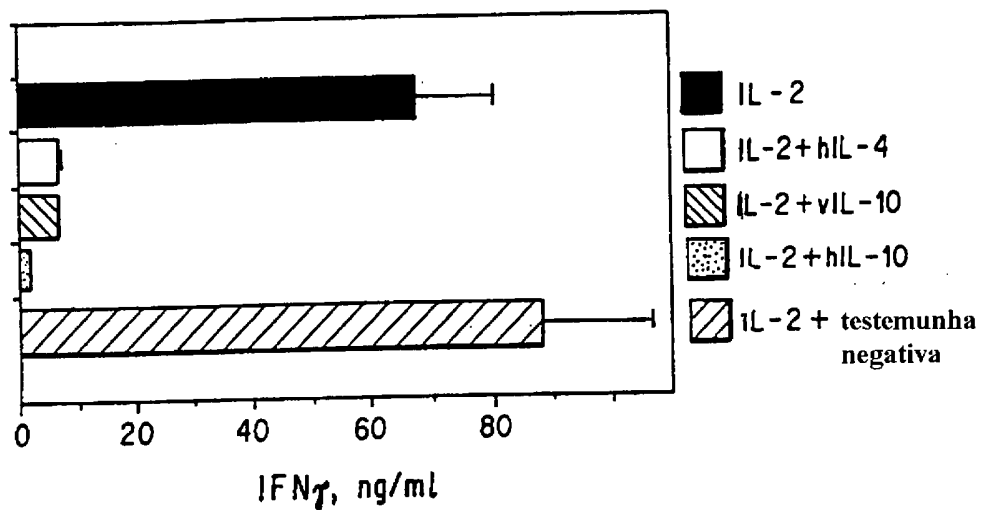


FIG. 2A

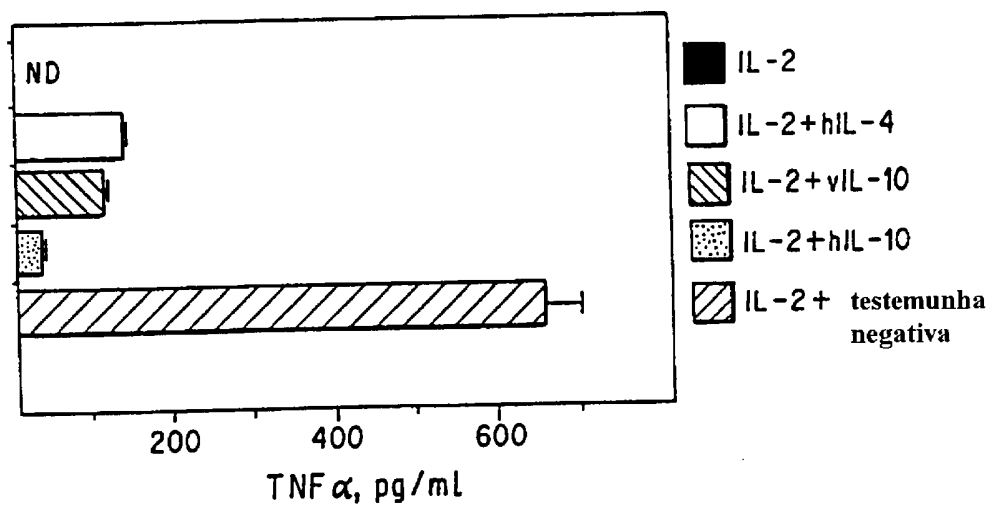


FIG. 2B

3/63

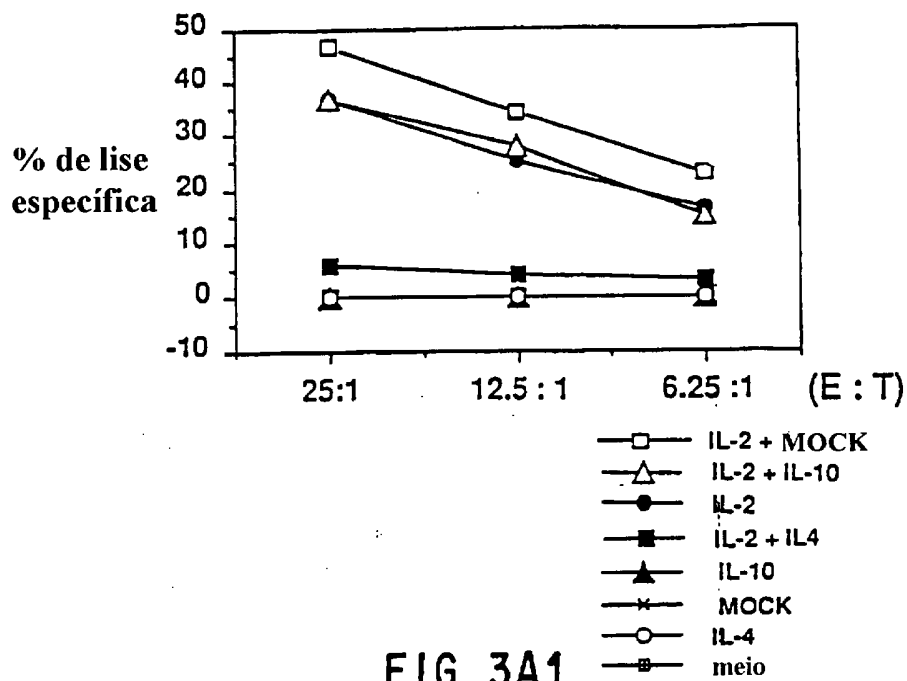


FIG. 3A1

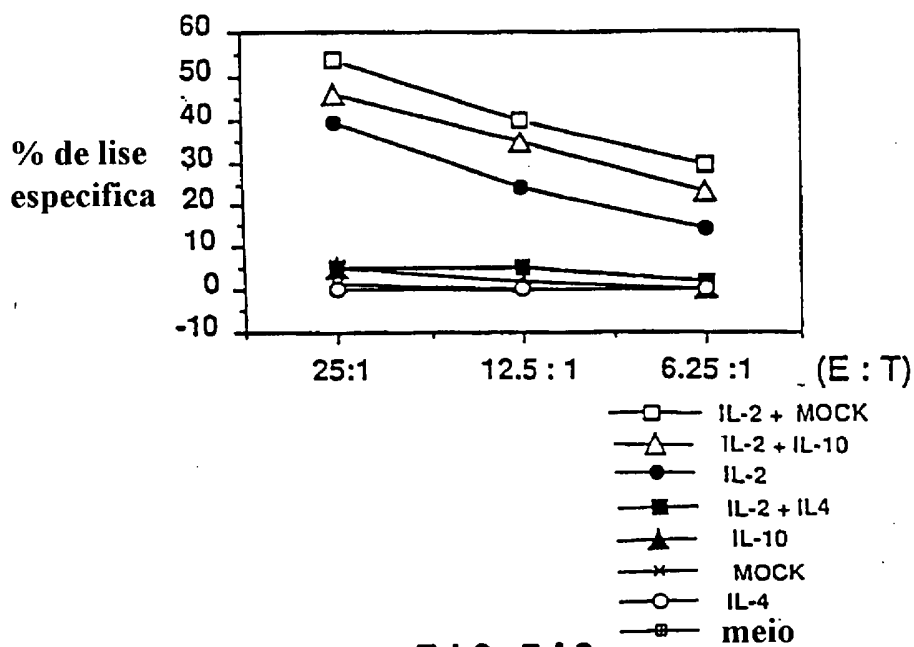


FIG. 3A2

4/63

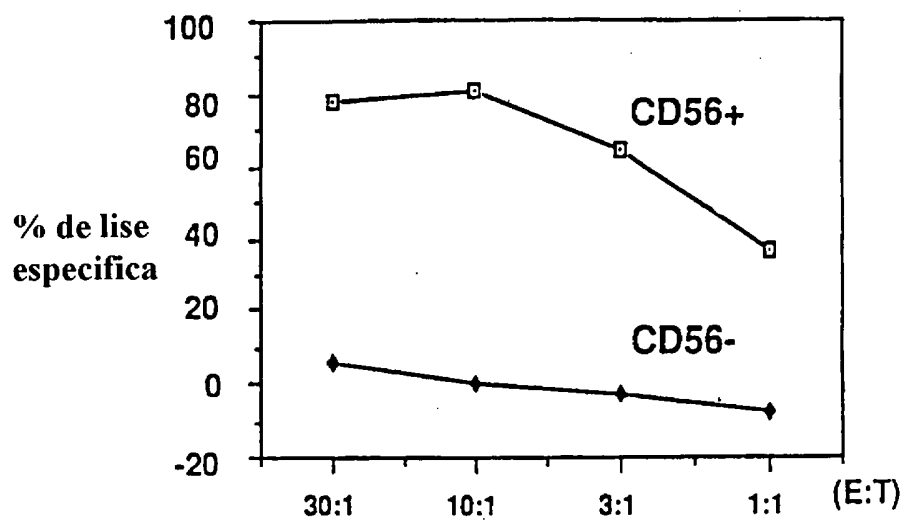


FIGURA 3B

5/63

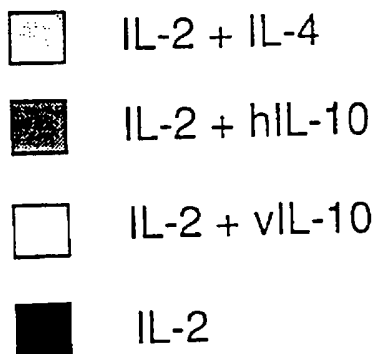
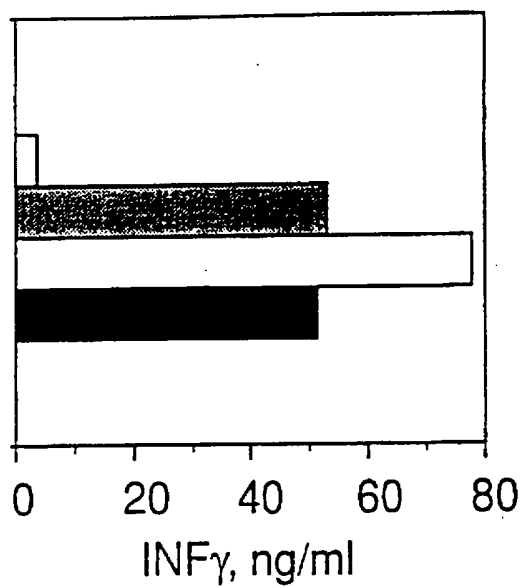


FIGURA 4A

6/63

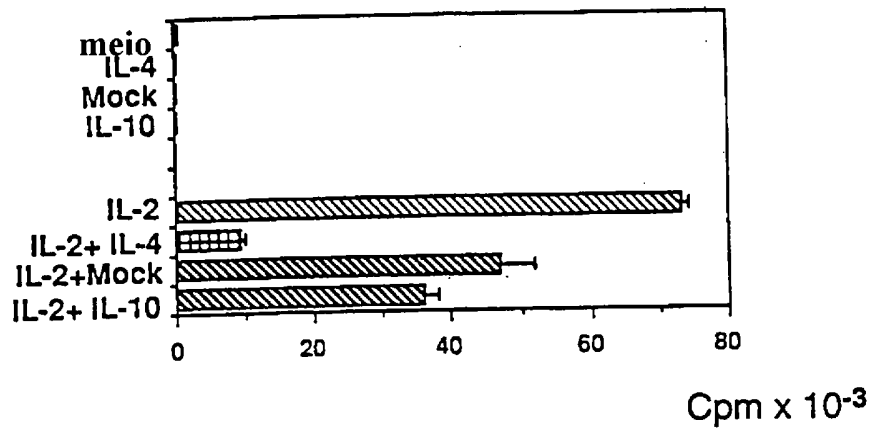


FIG. 4B1

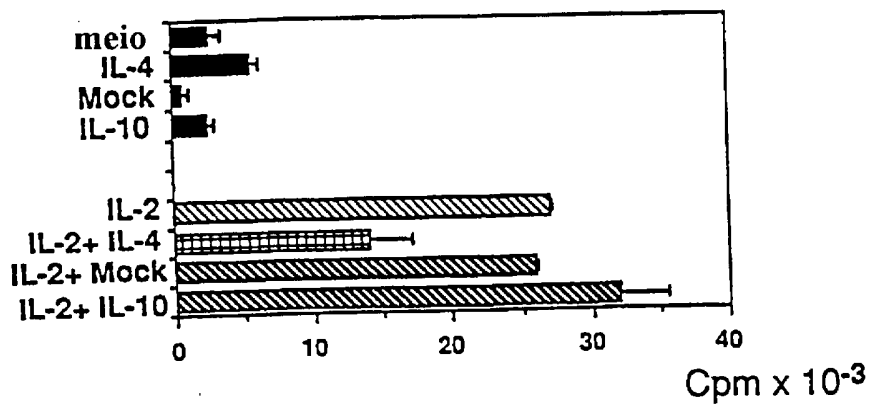


FIG. 4B2

Handwritten signature or mark.

7/63

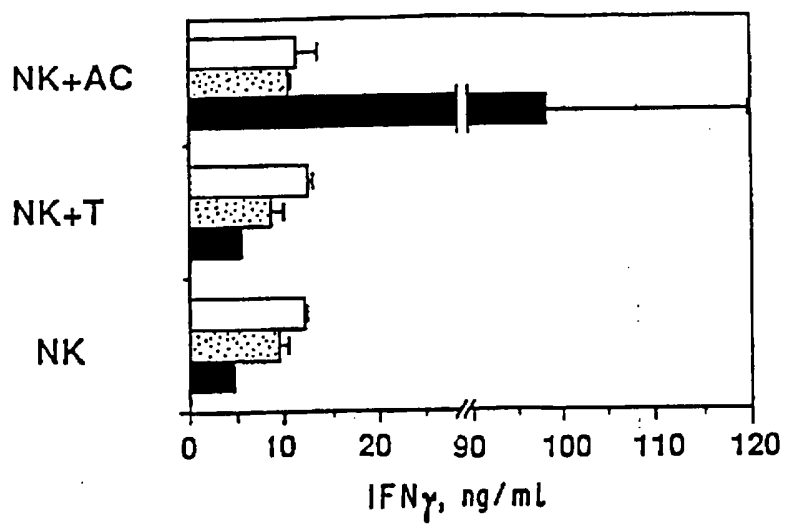


FIG. 5A

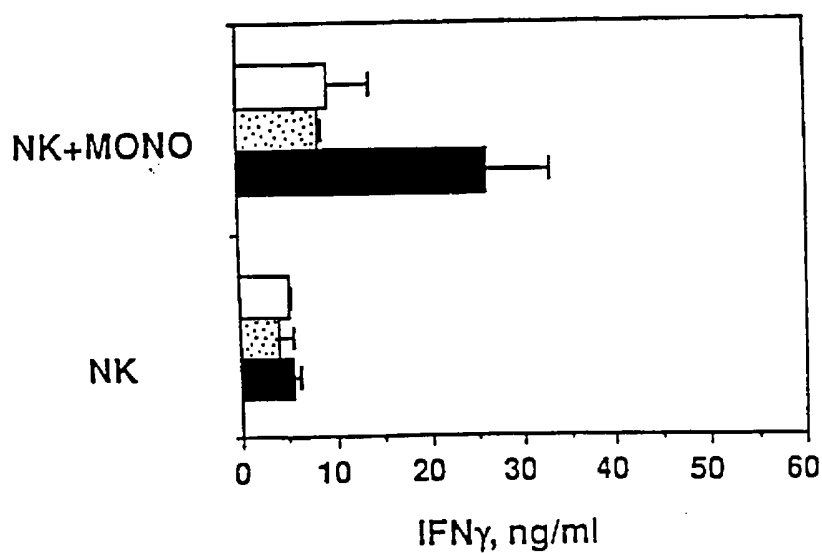


FIG. 5B

8/63

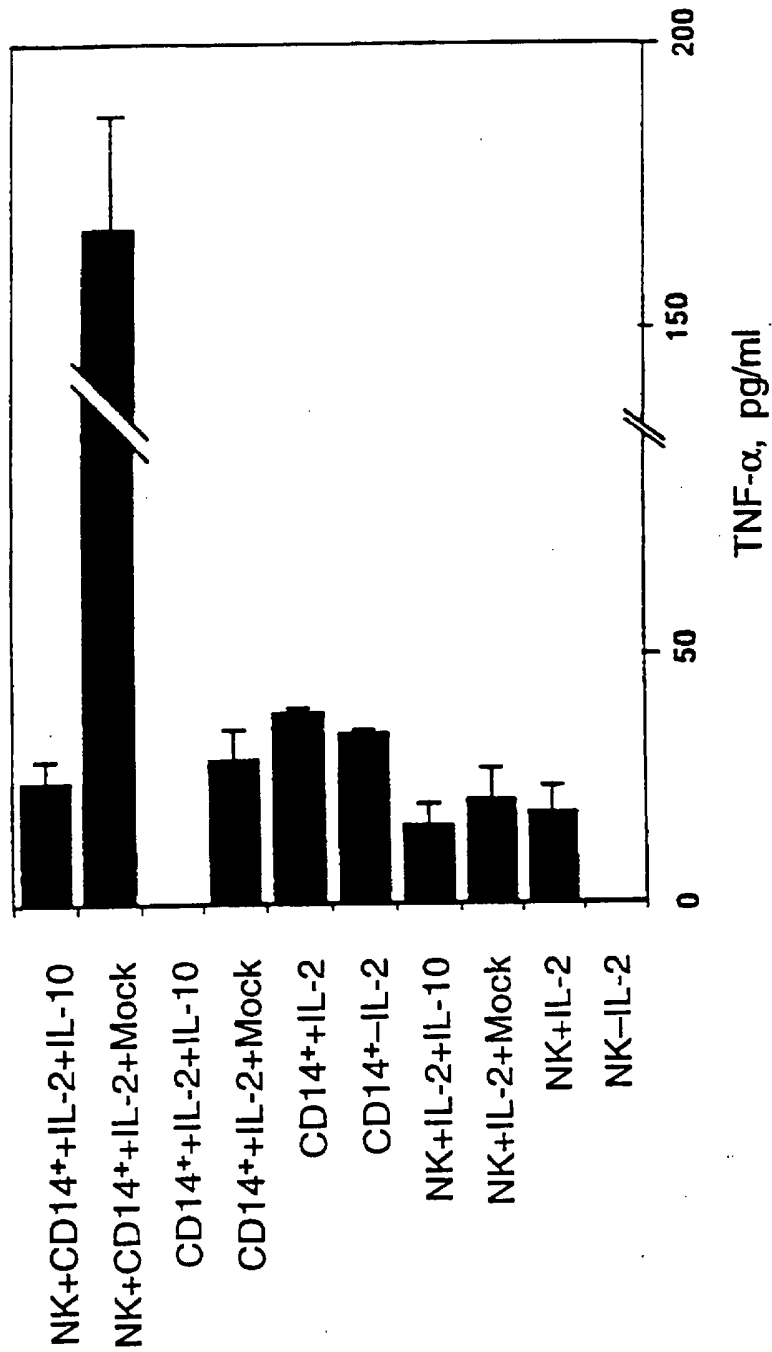


FIGURA 5C

11

9/63

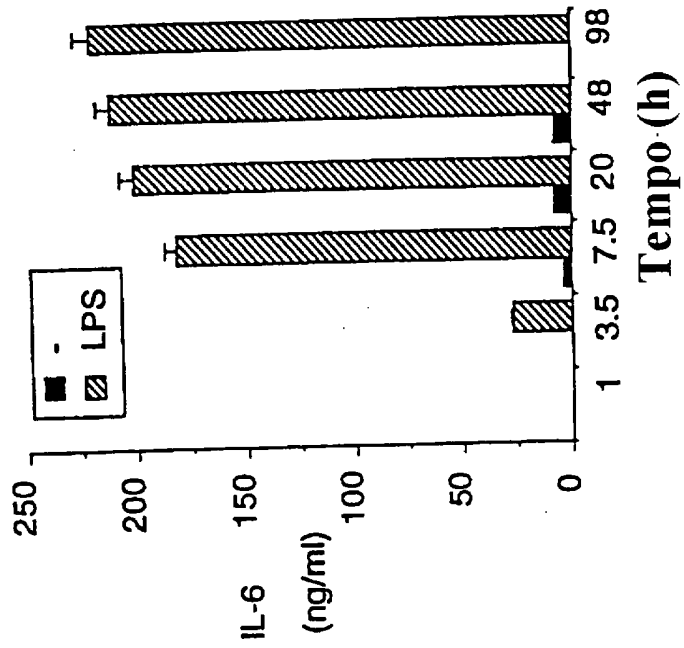


FIG. 6B

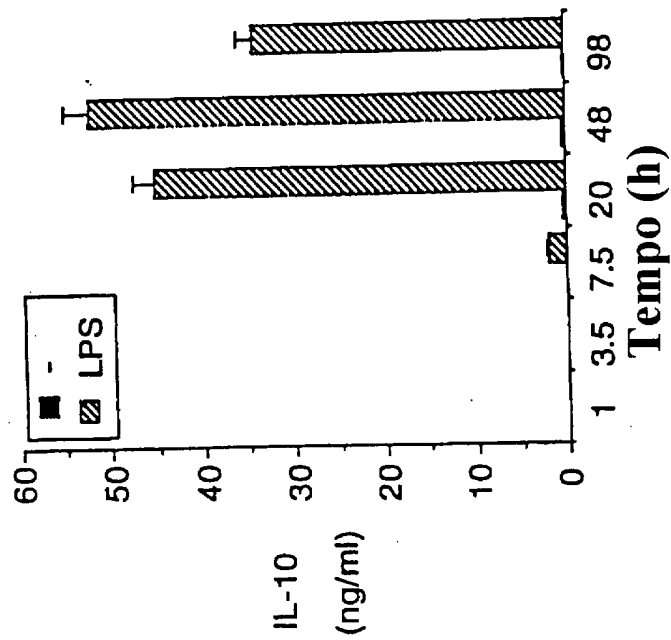


FIG. 6A

10/63

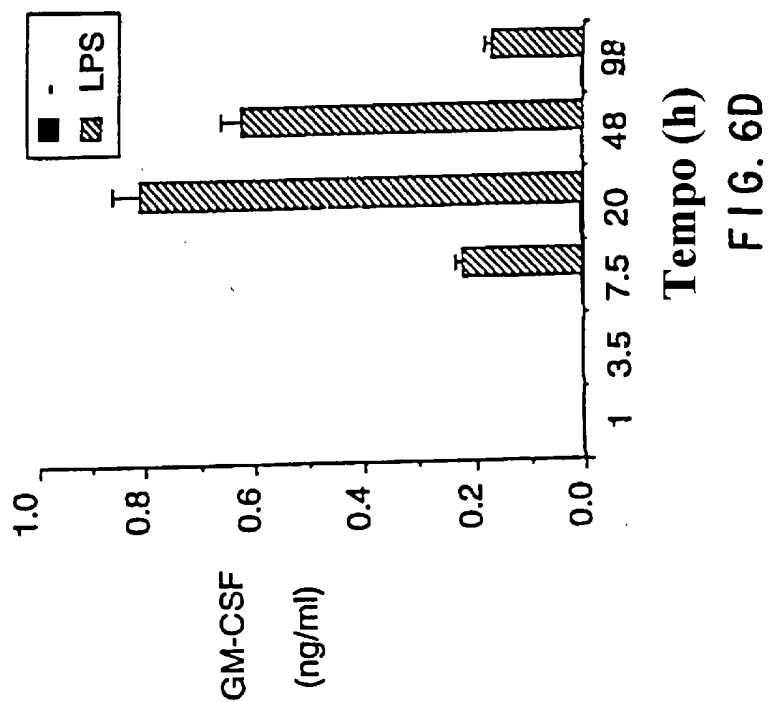


FIG. 6D

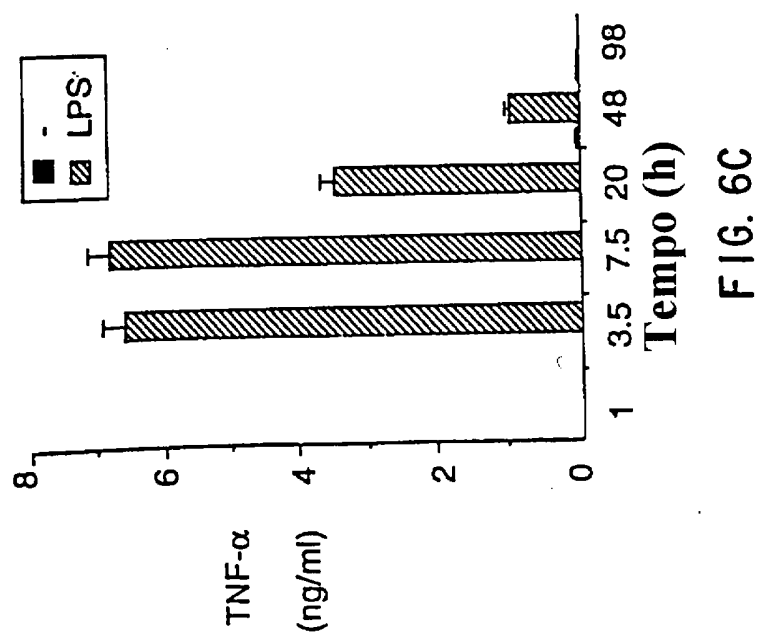


FIG. 6C

11/63

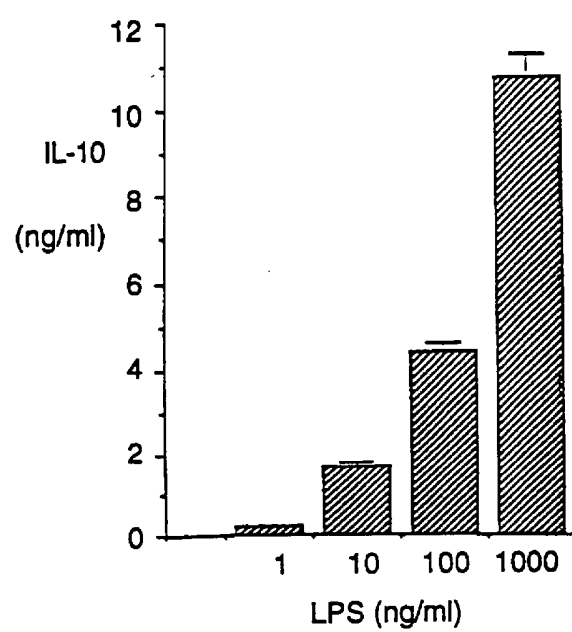


FIGURA 7

12/63

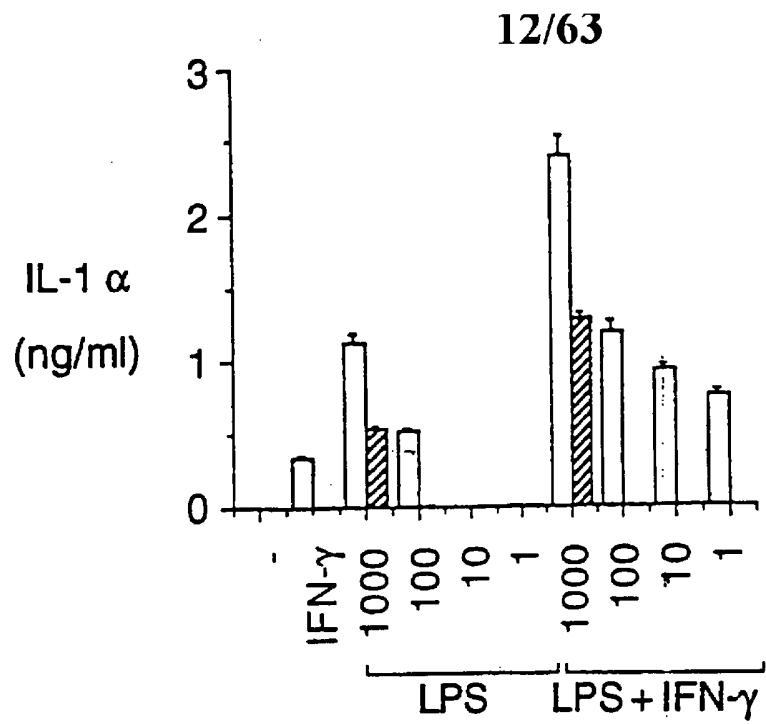


FIG. 8A

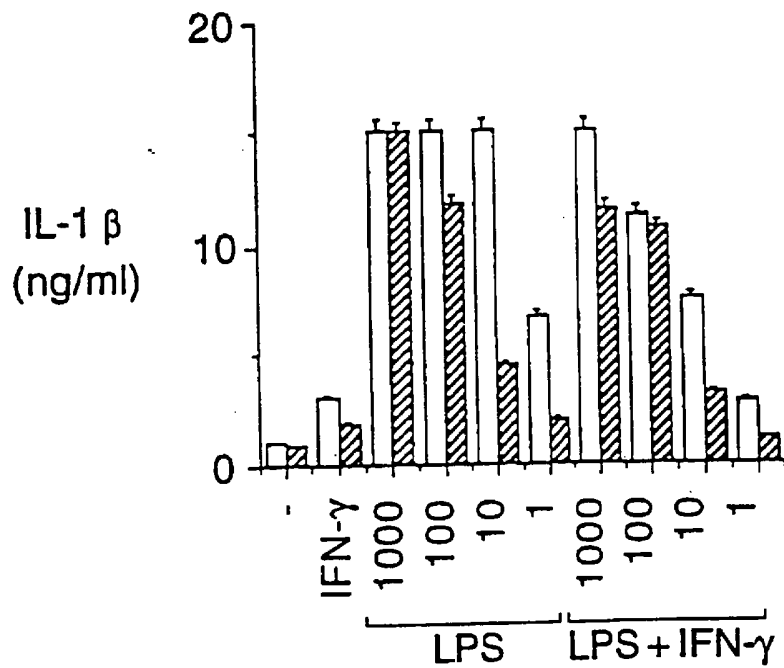


FIG. 8B

13/63

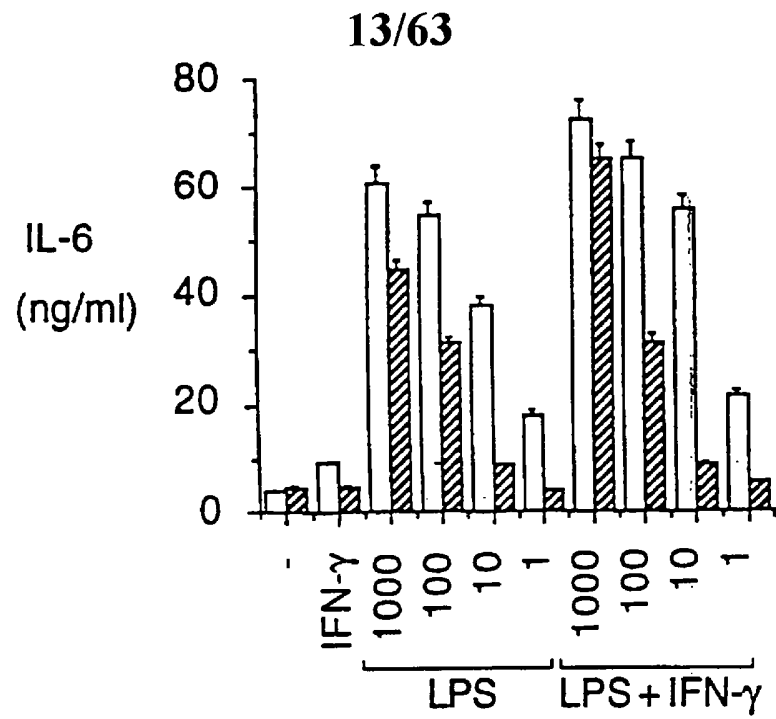


FIG. 8C

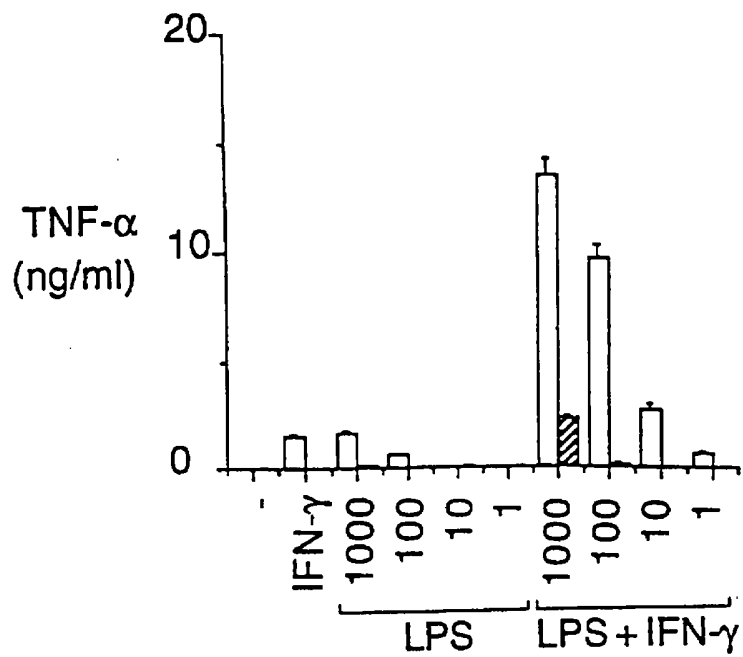


FIG. 8D

Handwritten signature or initials.

14/63

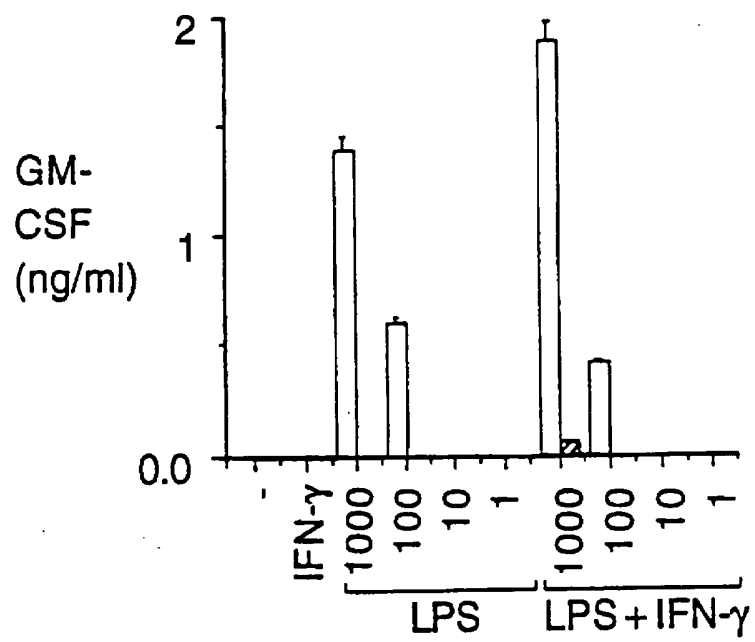


FIG. 8E

15/63

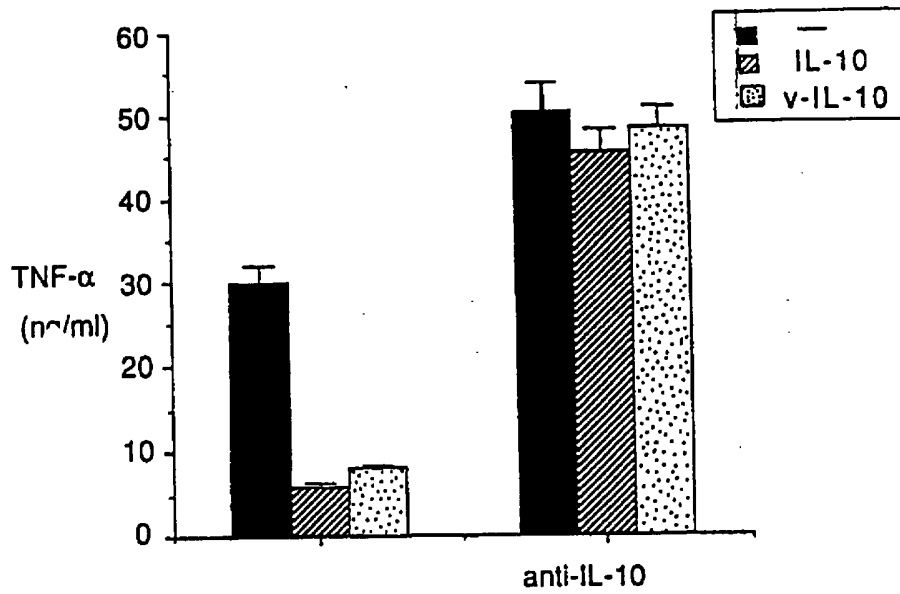


FIG. 9A

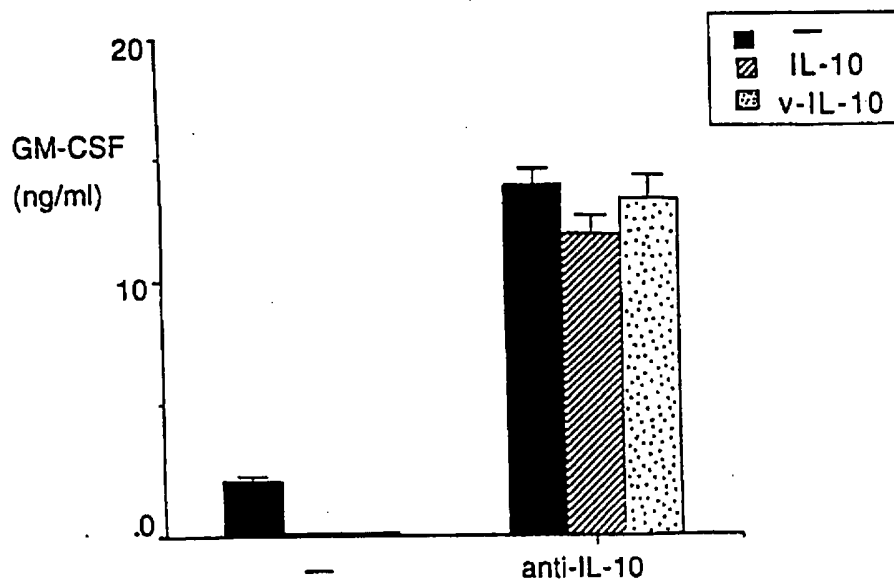


FIG. 9B

16/63

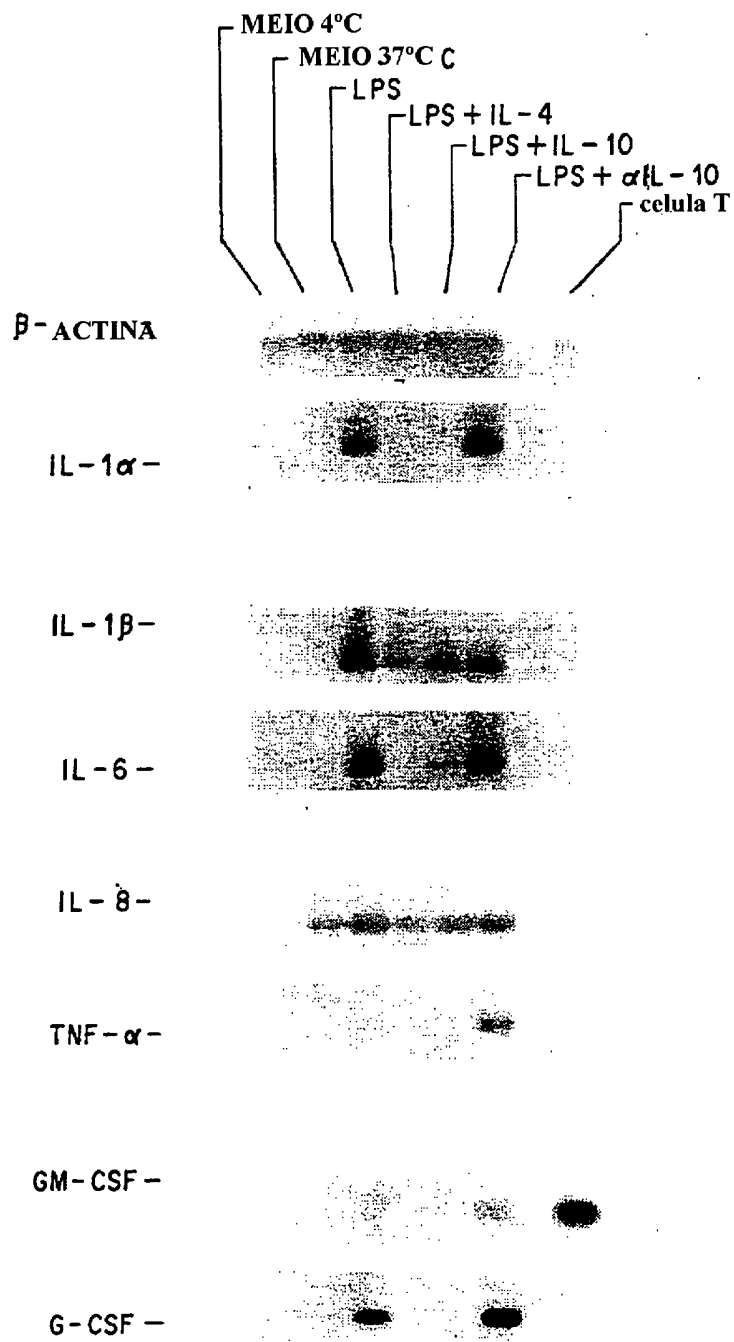


FIG. 10

Handwritten signature or mark.

17/63

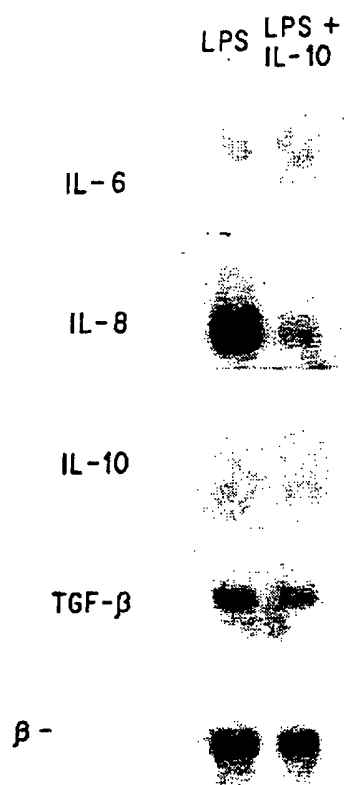
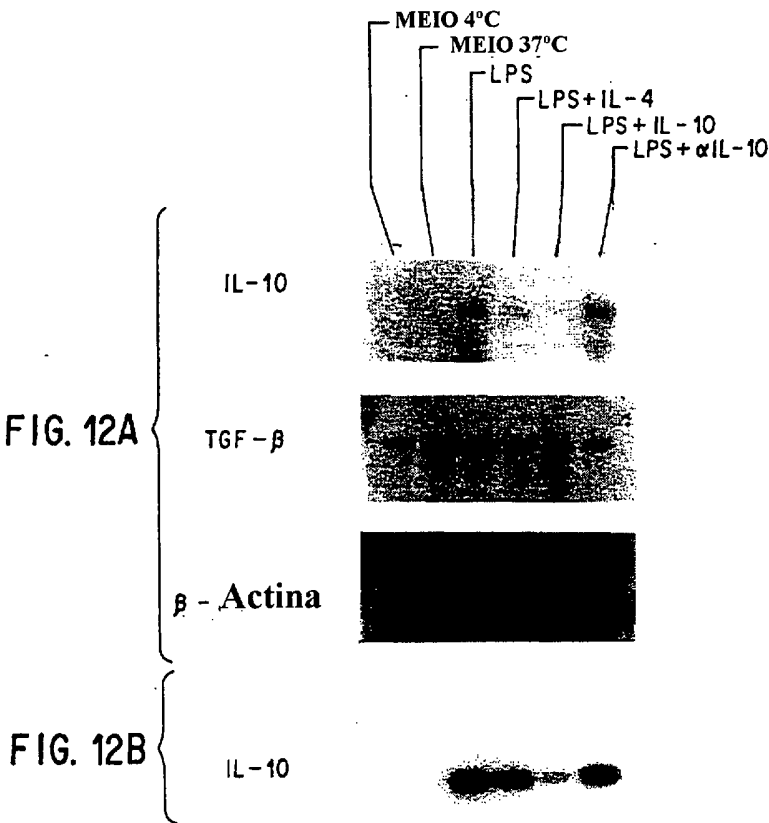


FIG. 11

Handwritten signature or initials.

18/63



Handwritten marks at the top right of the page.

19/63

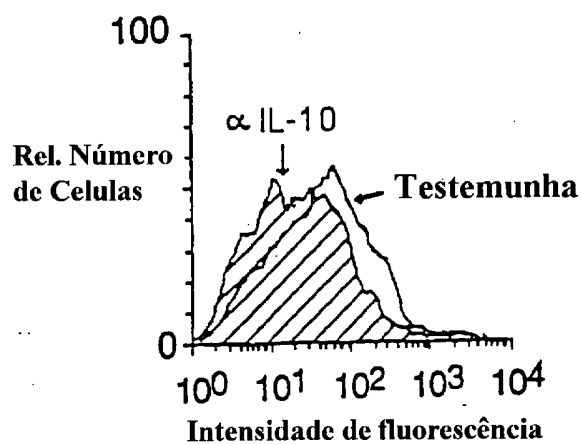


FIG. 13A

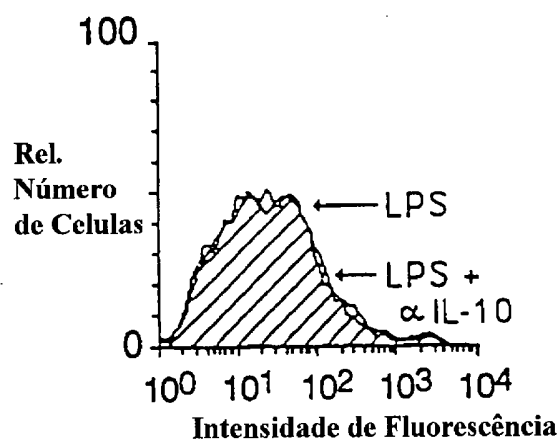


FIG. 13B

20/63

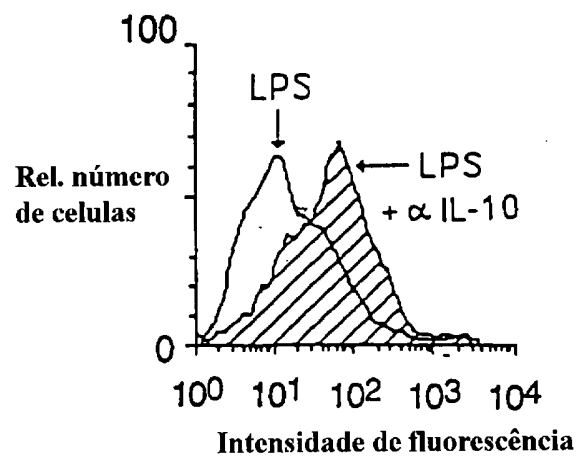


FIG. 13C

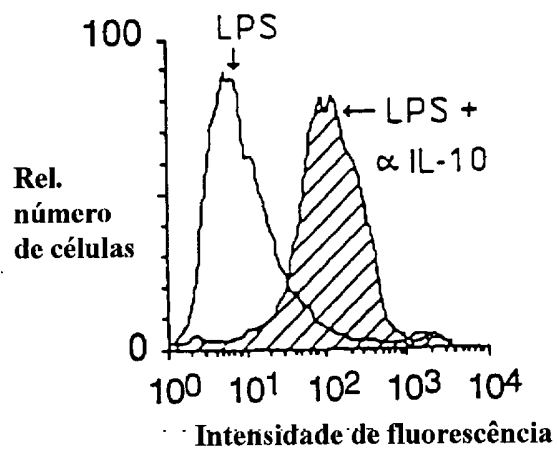


FIG. 13D

21/63

Celulas
apresentadas de
antígeno

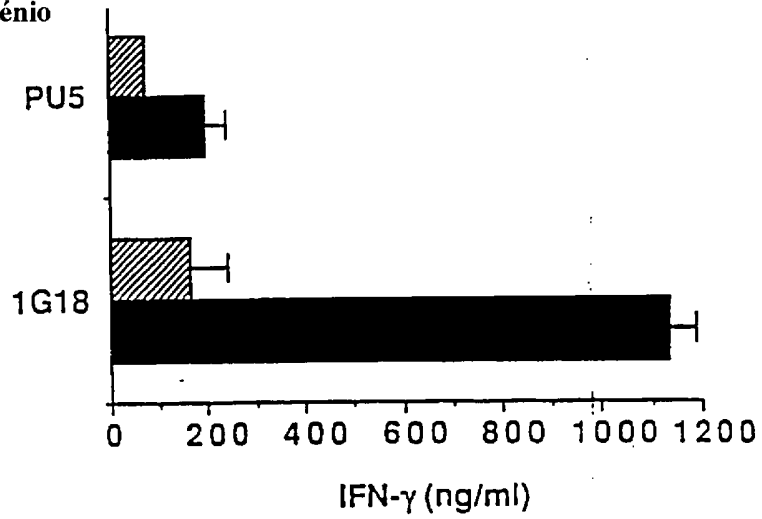


FIG. 14A

T celulas que
respondem

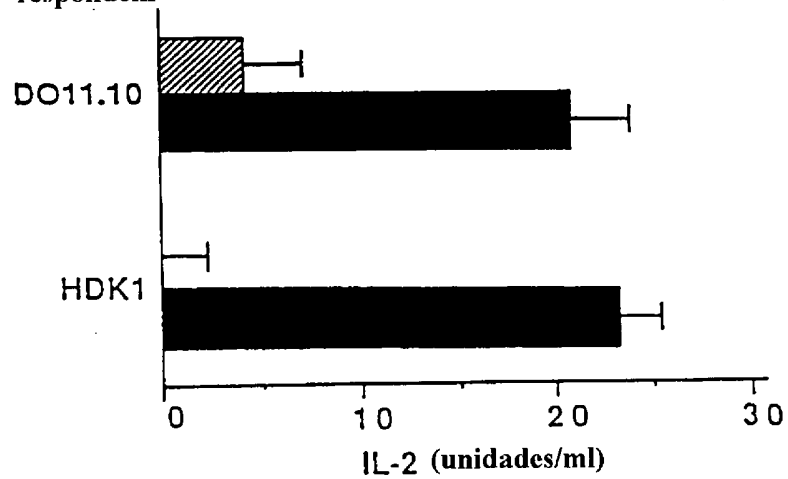


FIG. 14B

Handwritten marks, possibly a signature or initials.

FIG. 15A

22/63

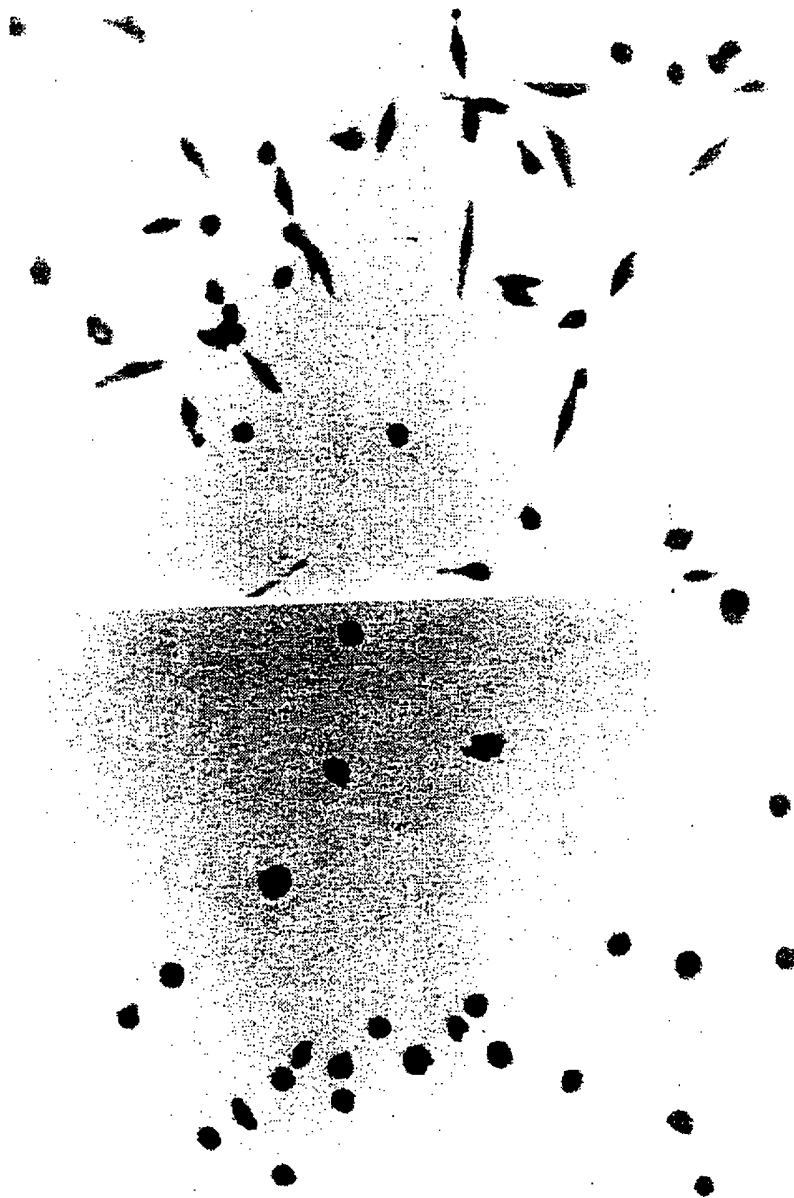


FIG. 15B

23/63

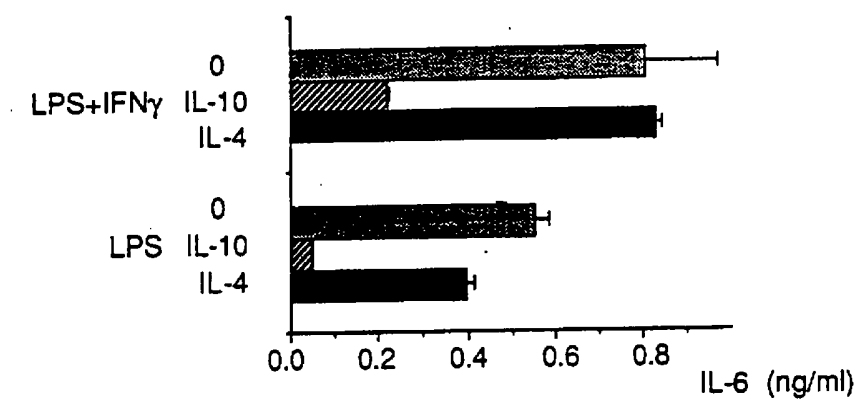


FIGURA 16A

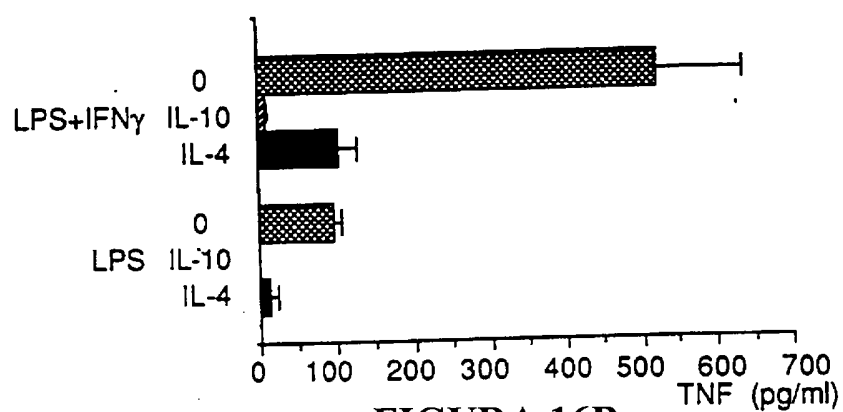


FIGURA 16B

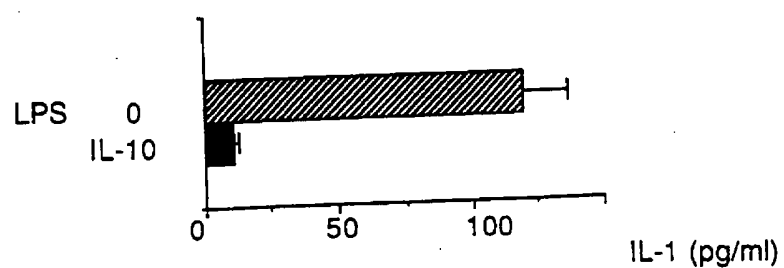


FIGURA 16C

24/63

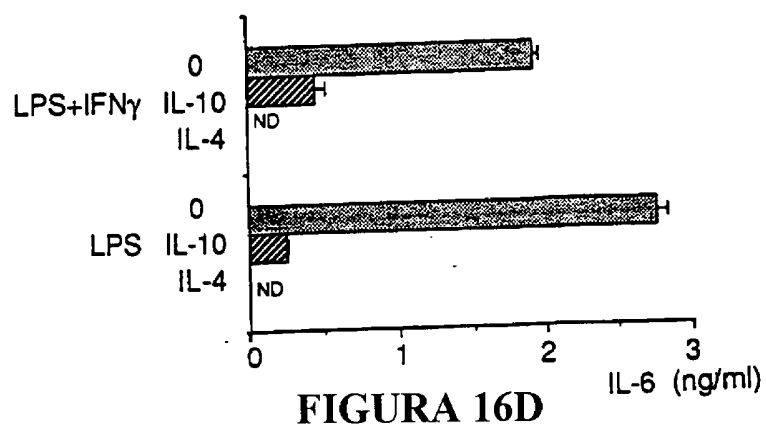


FIGURA 16D

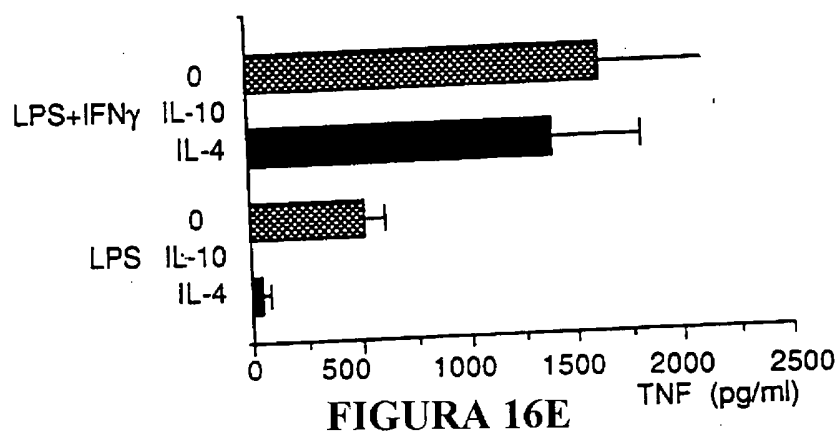


FIGURA 16E

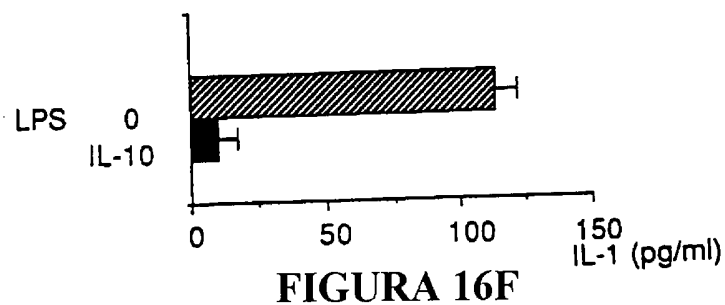


FIGURA 16F

Handwritten signature or mark.

25/63

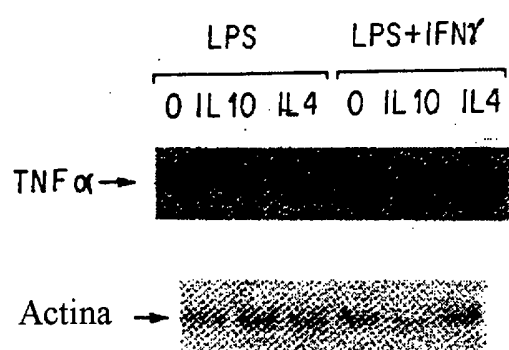


FIG. 17A

Nível de expressão de HPRT

Factor de diluição do cDNA	0			IL-4			IL-10		
	CPM	*		CPM	*		CPM	*	
LPS [1:9	19831	1 x		14993	1.35		22203	0.89	
+ 1:27	12196	1 x		9496	1.28		14478	0.84	
IFN γ [1:81	5595	1 x		6002	0.93		7322	0.76	
LPS [1:9	16197	1 x		16485	0.98		20925	0.77	
+ 1:27	7521	1 x		9609	0.78		12676	0.59	
IFN γ [1:81	3924	1 x		4694	0.84		5507	0.71	

P388D1 RNA total

Média	Pg/transfêrência
CPM	
16212	1111
8309	370
3791	123
2037	41
1181	14

* Factor de correção

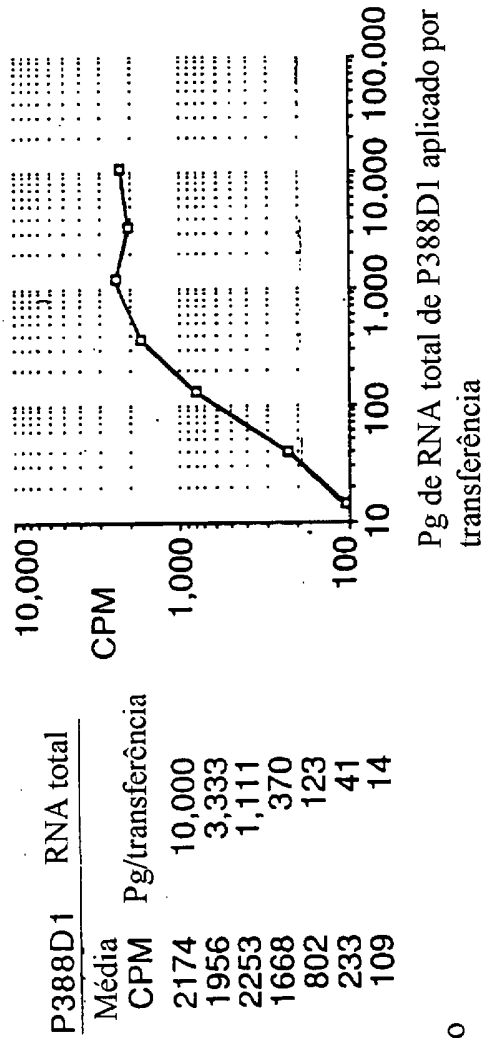
FIGURA 17B1

11

Nível de expressão TNF α

Factor de diluição do cDNA	0				IL-4				IL-10			
	CPM	*pgRNA	CPM	*pgRNA	CPM	*pgRNA	CPM	*pgRNA	CPM	*pgRNA	CPM	*pgRNA
LPS [1:9	1260	1x	300	1987	2682	Plateau	1232	1034	200			
+ 1:27	984	1x	160	601	769	110	713	589	90			
IFN γ [1:81	722	1x	110	358	332	57	411	312	50			
LPS [1:9	1114	1x	210	1620	1587	330	1387	1068	200			
	896	1x	120	517	403	60	460	271	45			
	472	1x	72	480	403	60	310	220	33			

Curva padrão para a expressão de TNF α



* Factor de correção

FIGURA 17B2

Nível de expressão de HPRT		Nível de expressão do TNF	
Factor de diluição do cDNA		P388D1 Média do CPM	RNA total Pg/transfêrência
LPS + IFN γ	1:9	3292	3333
	1:27	2260	1111
	1:81	1008	370
LPS	1:9	682	123
	1:27	493	41
	1:81	121	14
		31	0
Nível de expressão de HPRT		Nível de expressão de IL-6	
Factor de diluição do cDNA		P388D1 Média do CPM	RNA total Pg/transfêrência
LPS + IFN γ	1	617	3333
	1:3	602	1111
	1:9	213	370
LPS	1	158	123
	1:3	55	41
	1:9	21	14
		19.5	0

28/63

FIGURA 17C

11

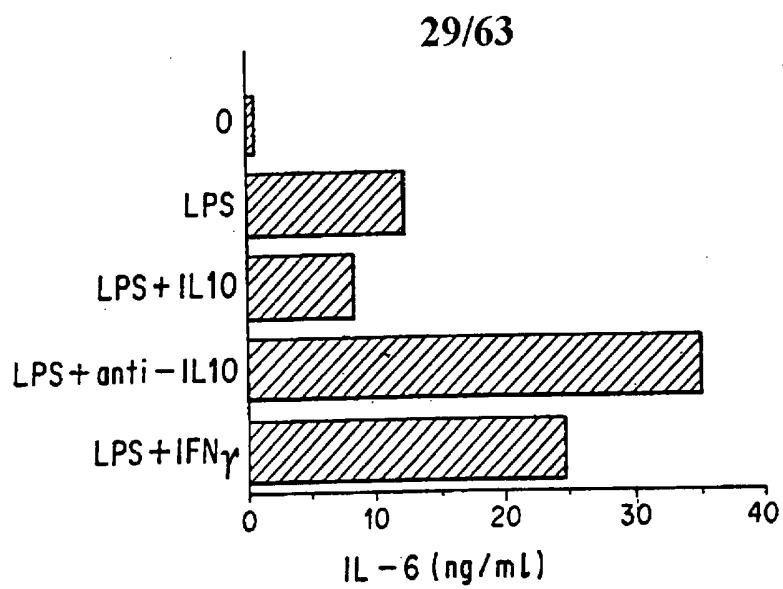


FIG. 18A

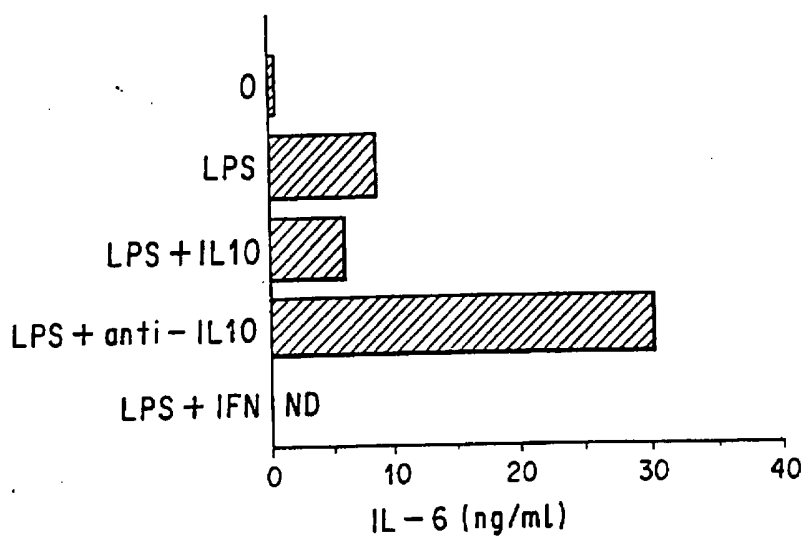


FIG. 18B

Handwritten signature or mark.

30/63

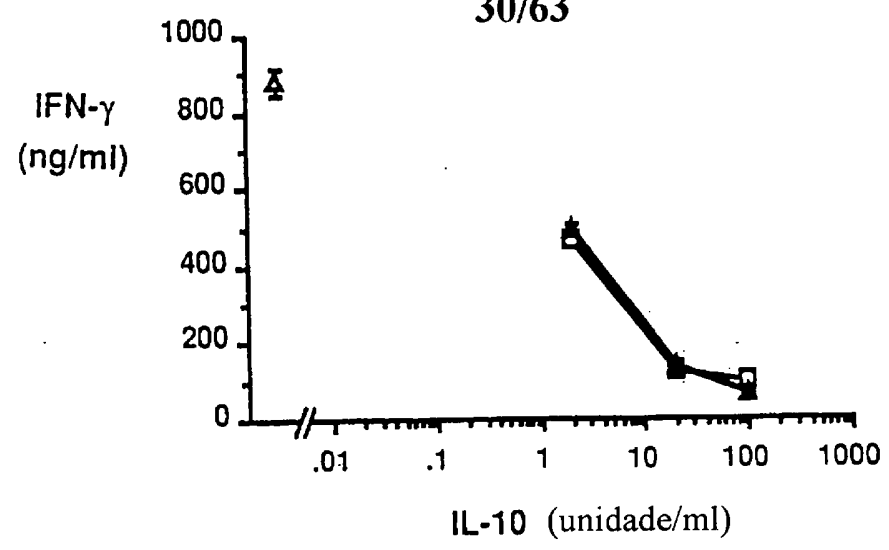
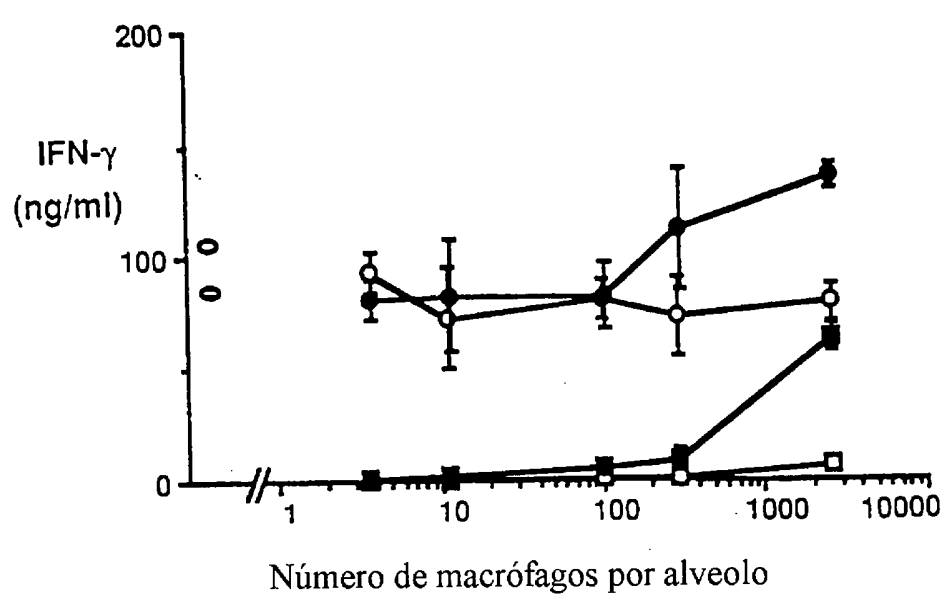


FIG. 19A



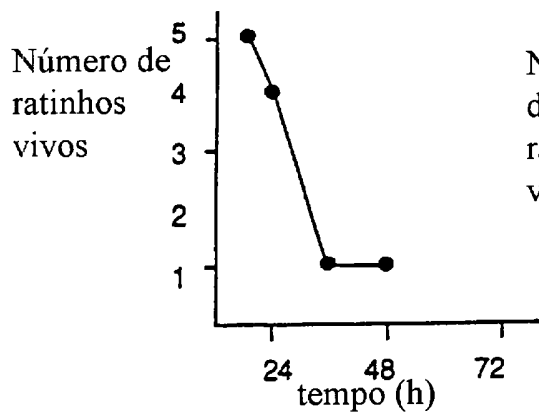


FIGURA 20A

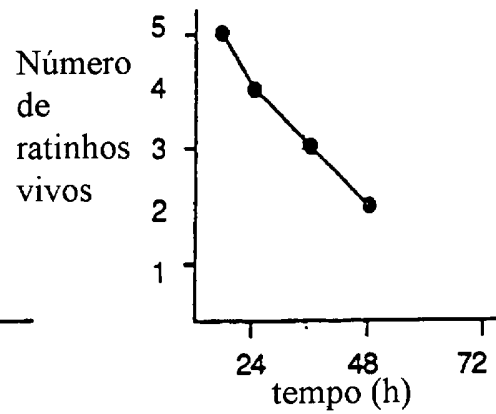


FIGURA 20B

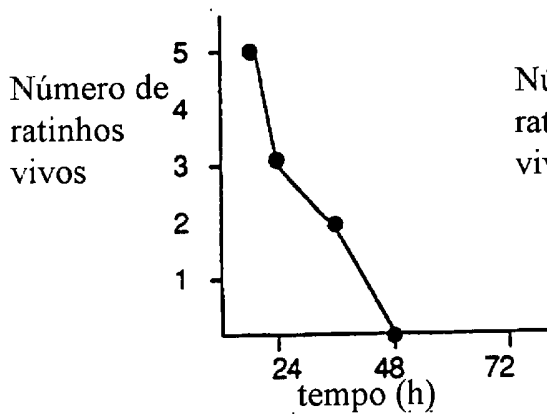


FIGURA 20C

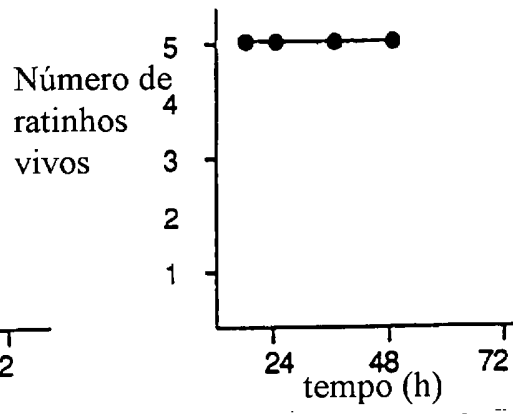


FIGURA 20D

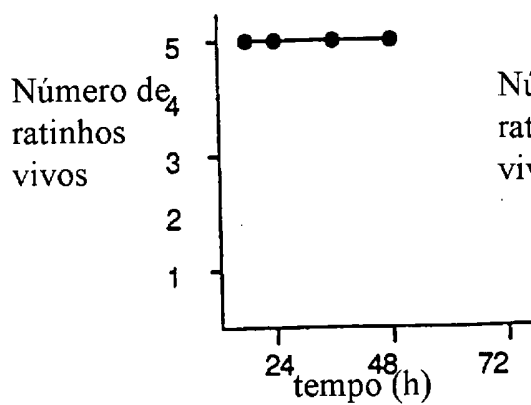


FIGURA 20E

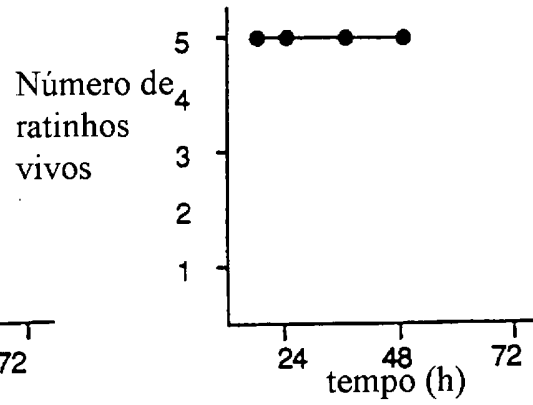


FIGURA 20F

32/63

- △ PBS
- 0.05 µg IL-10
- 0.1 µg IL-10
- ▲ 0.5 µg IL-10
- 1.0 µg IL-10
- 10.0 µg IL-10

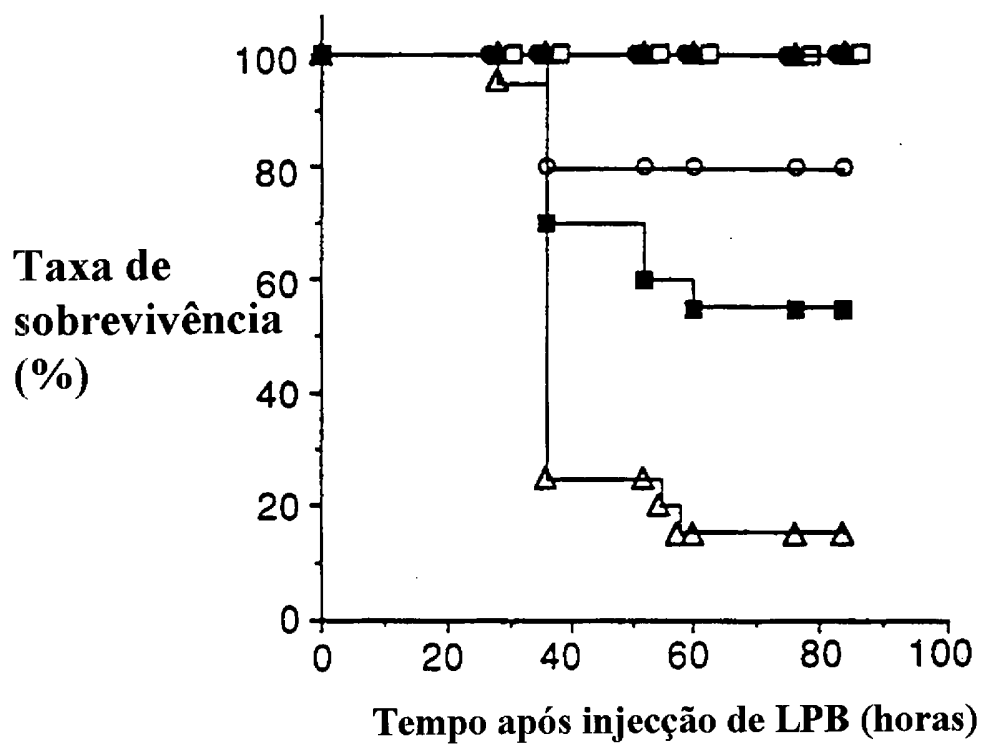
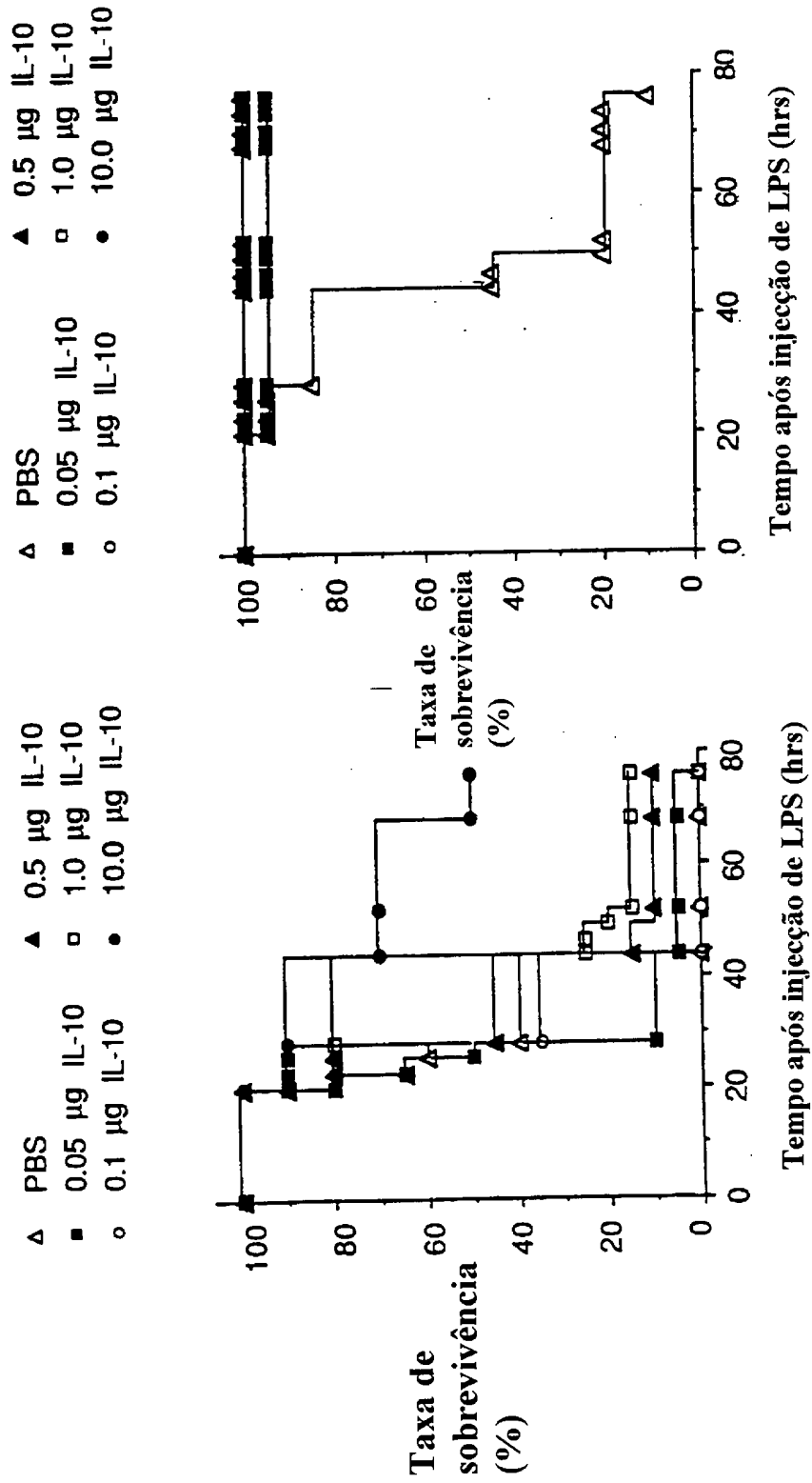


FIGURA 21



34/63

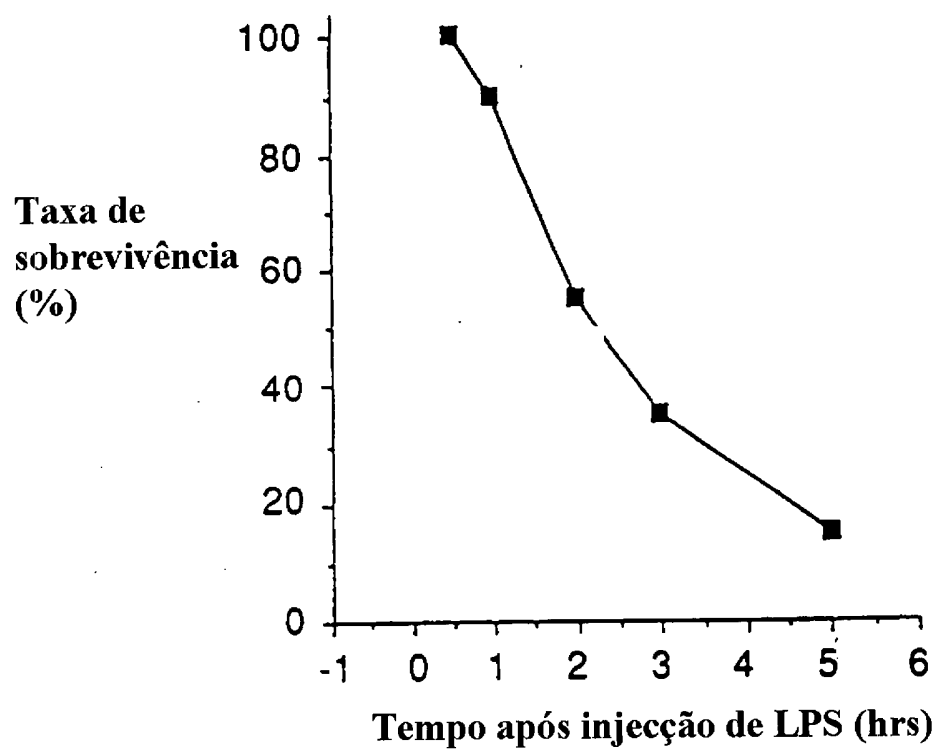


FIGURA 23

Handwritten signature or mark.

35/63

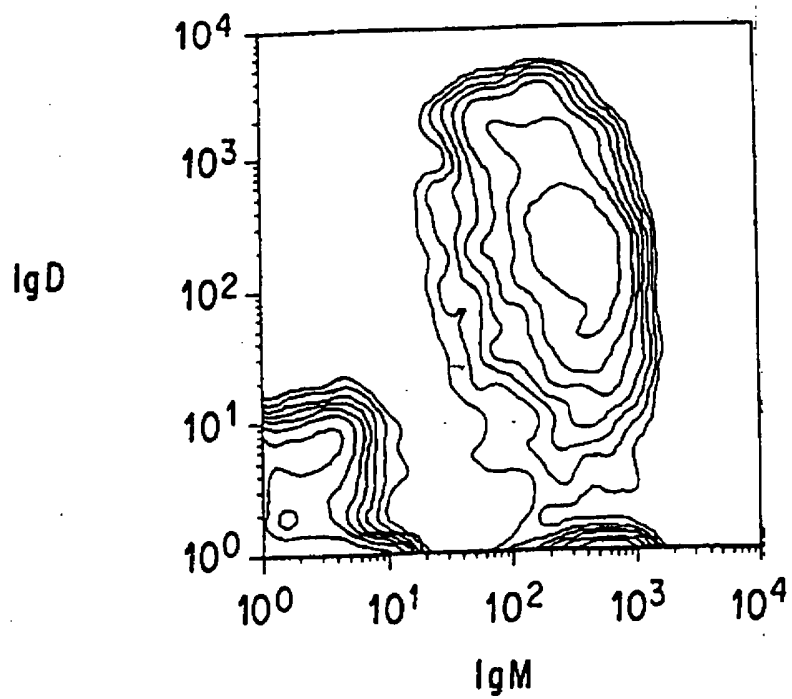


FIG. 24A

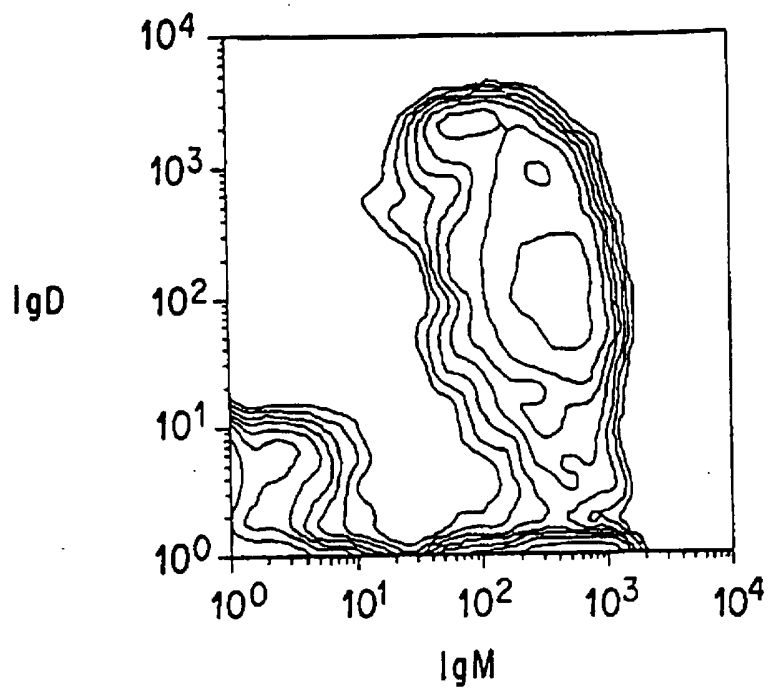


FIG. 24B

Handwritten marks and scribbles at the top right of the page.

36/63

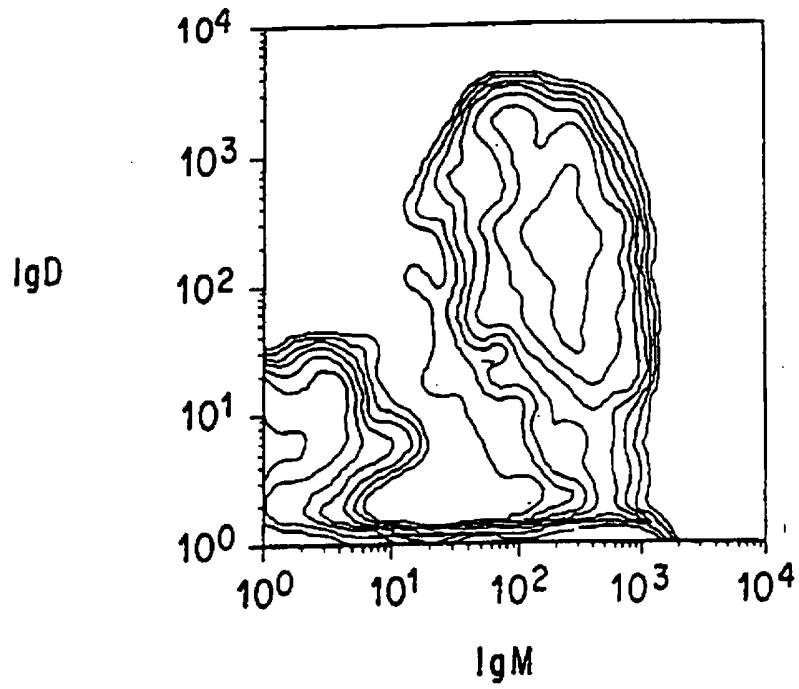


FIG. 24C

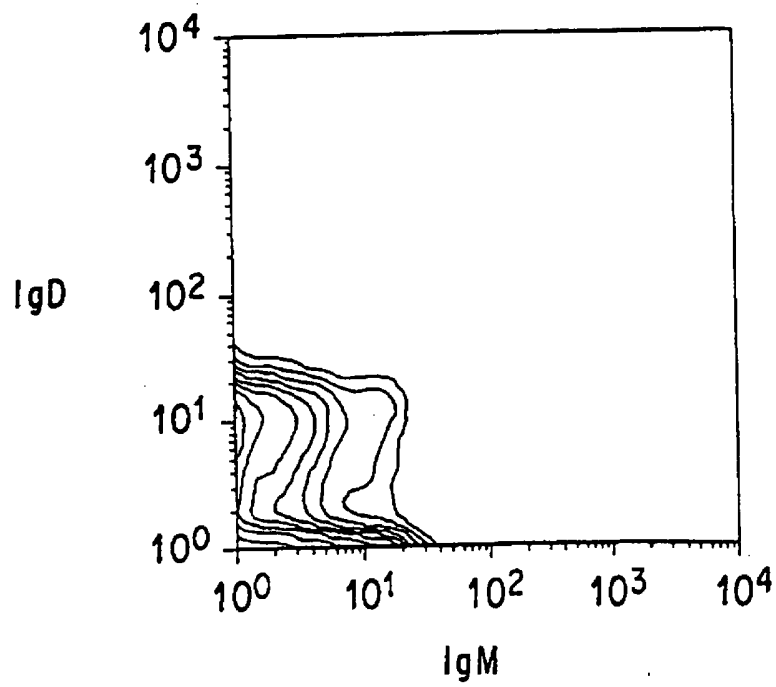


FIG. 24D

37/63

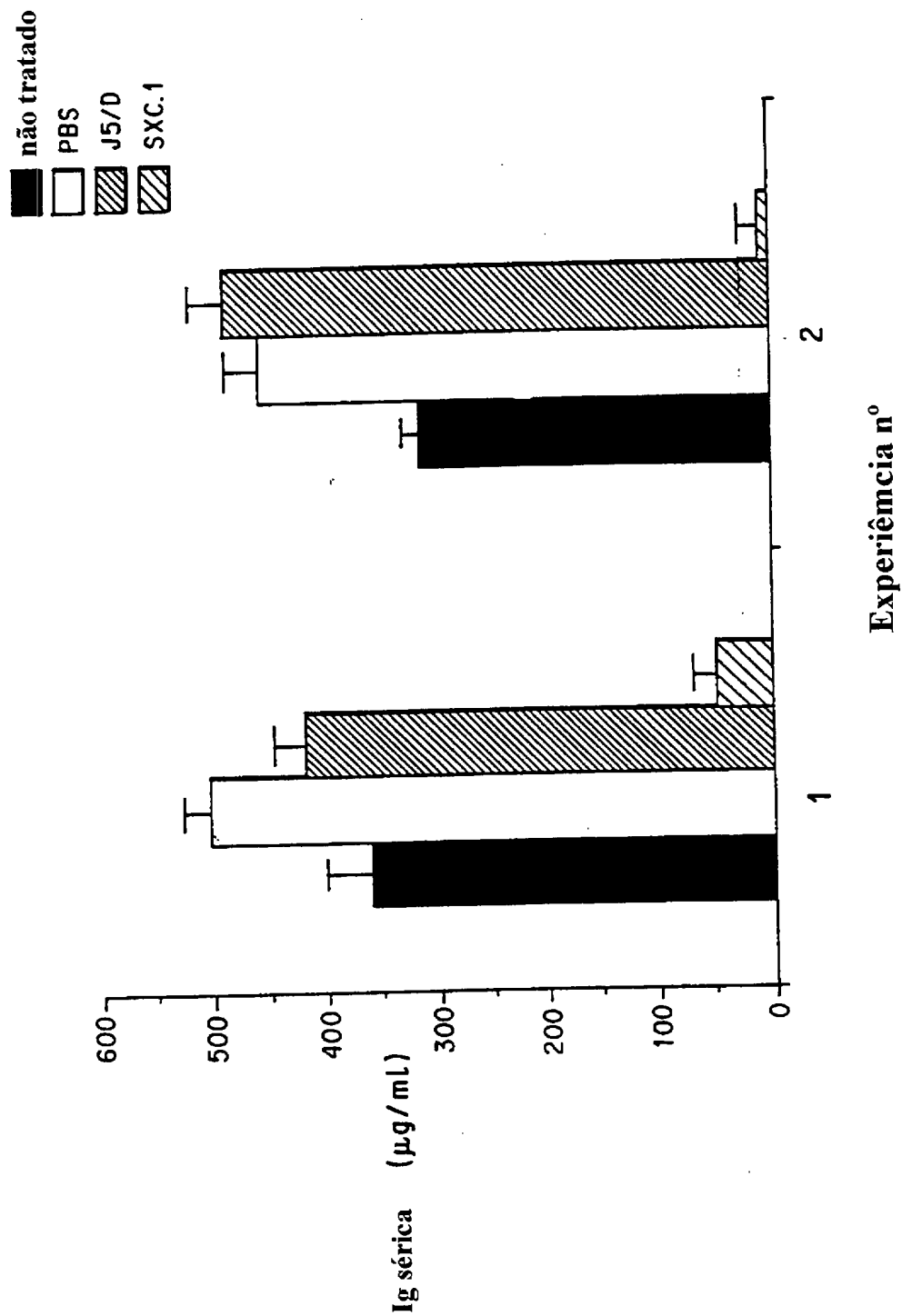


FIG. 25

Handwritten signature or mark.

38/63

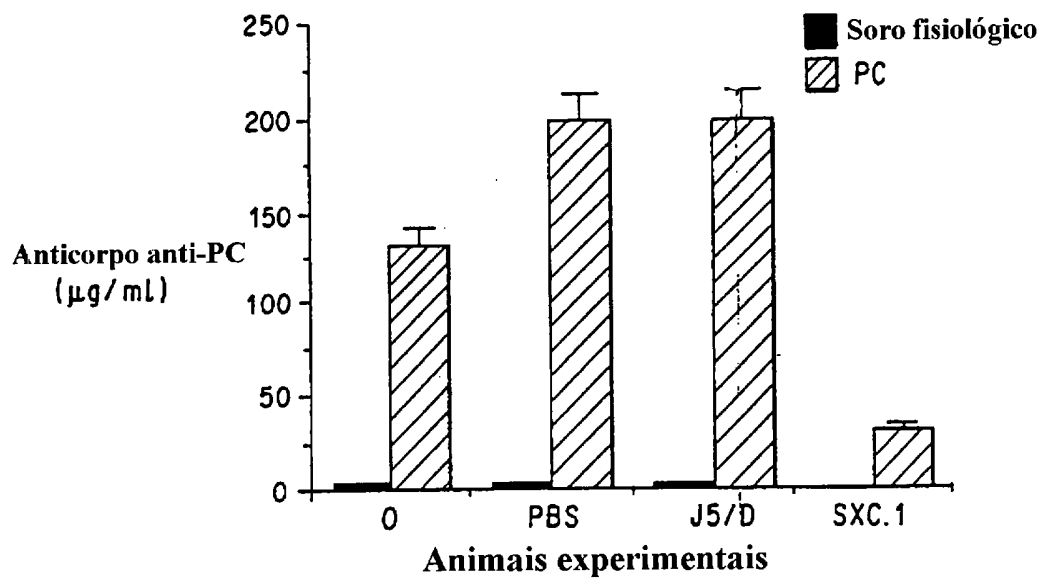


FIG. 26A

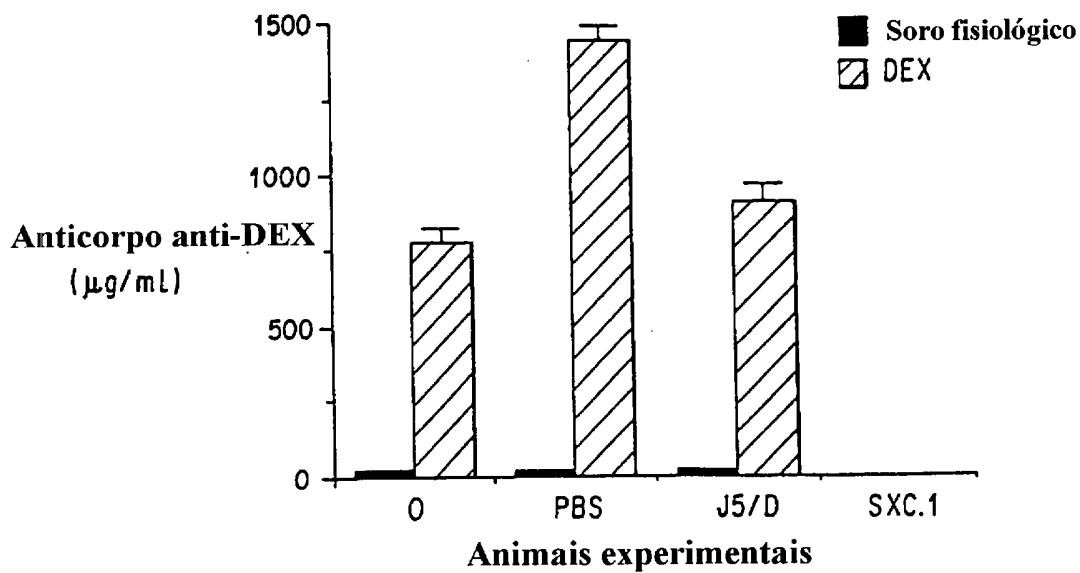


FIG. 26B

39/63

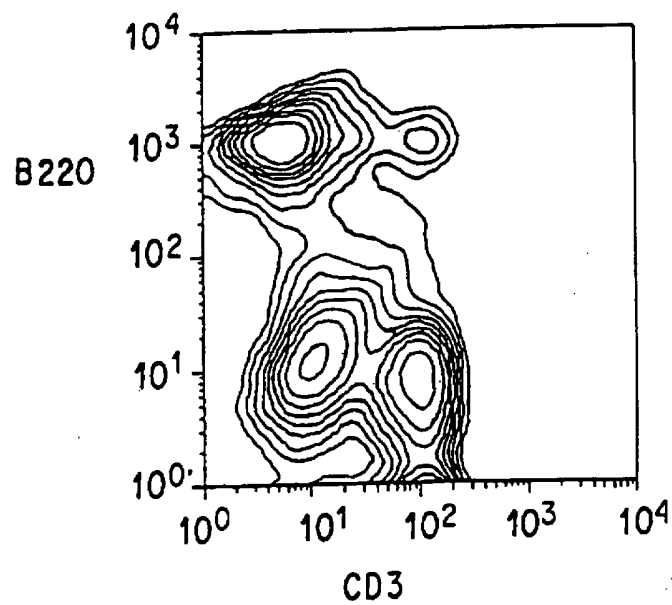


FIG. 27A

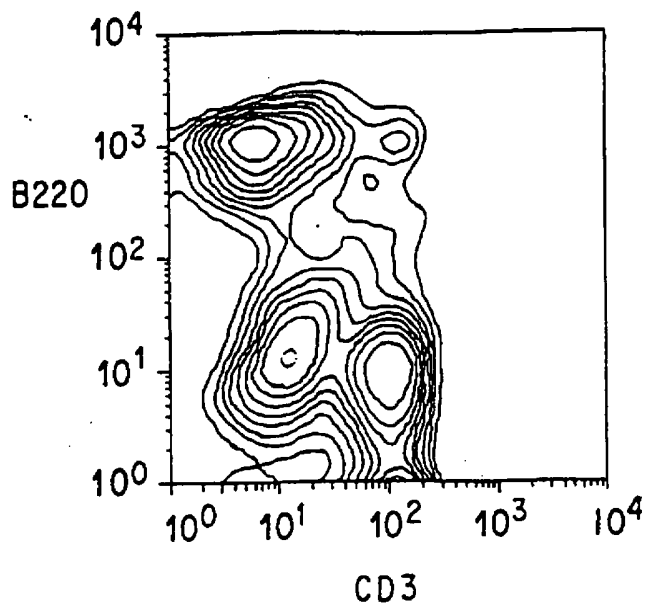


FIG. 27B

Handwritten signature or mark.

40/63

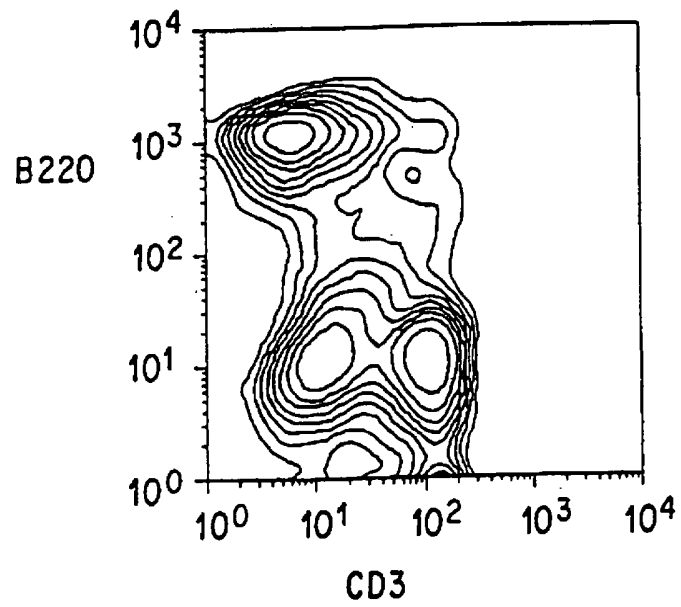


FIG. 27C

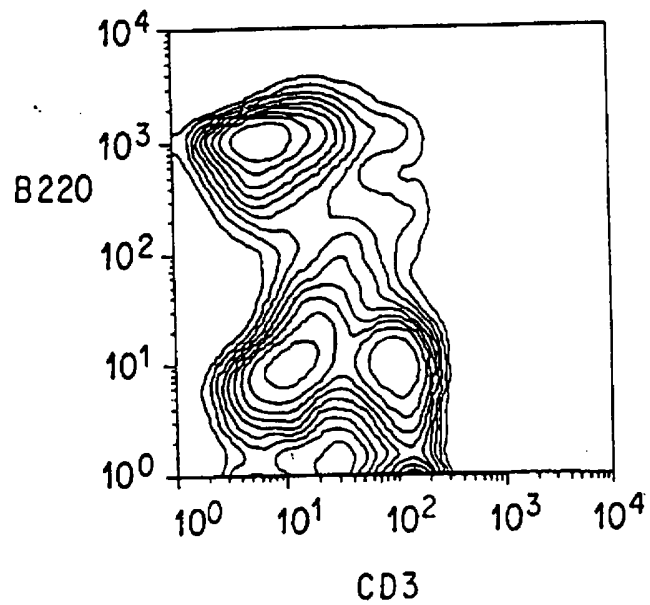
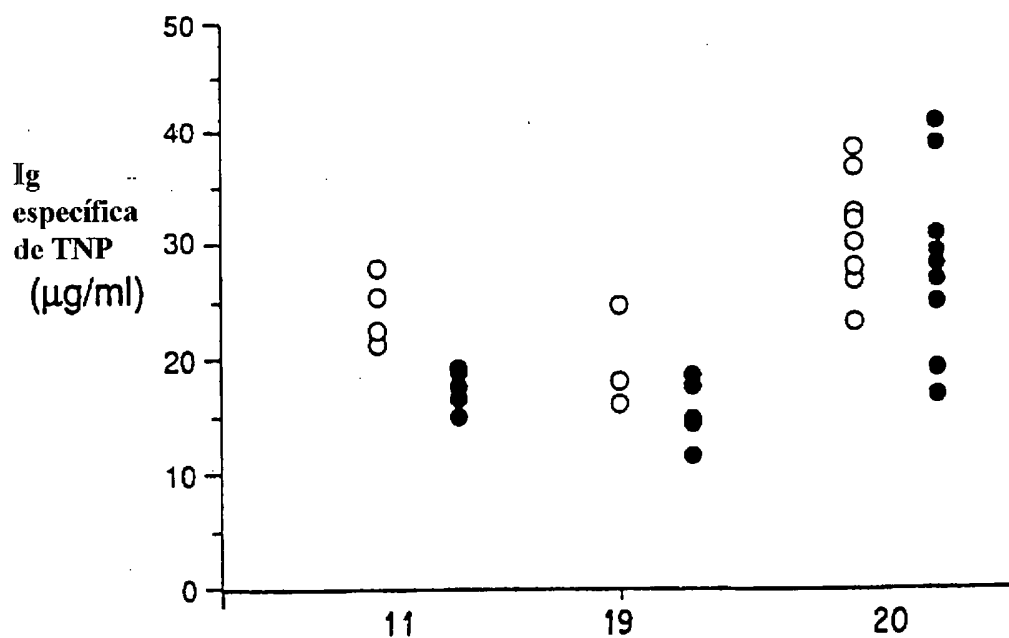


FIG. 27D

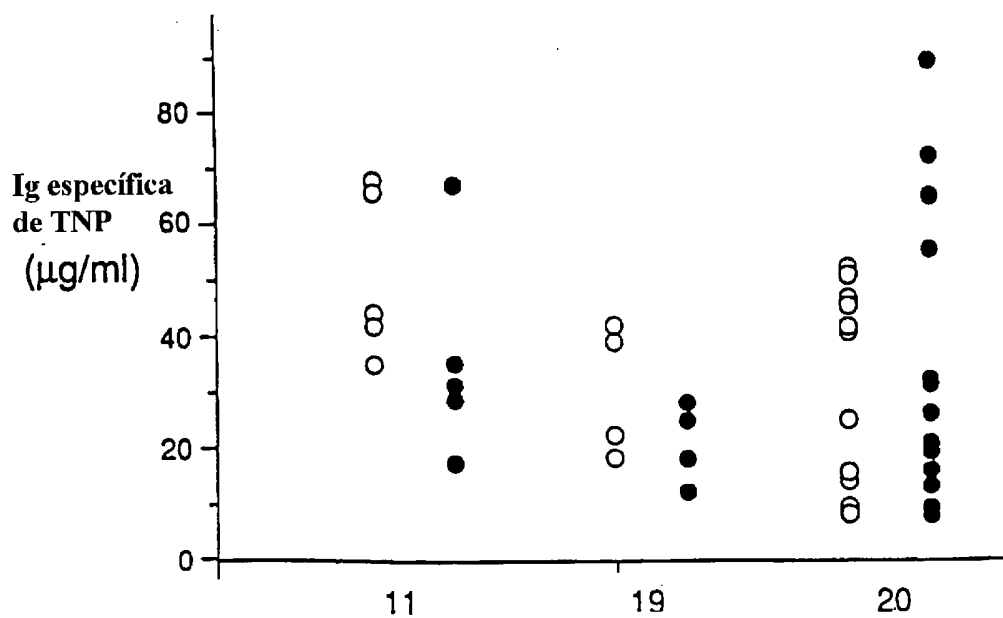
Handwritten signature or mark.

41/63



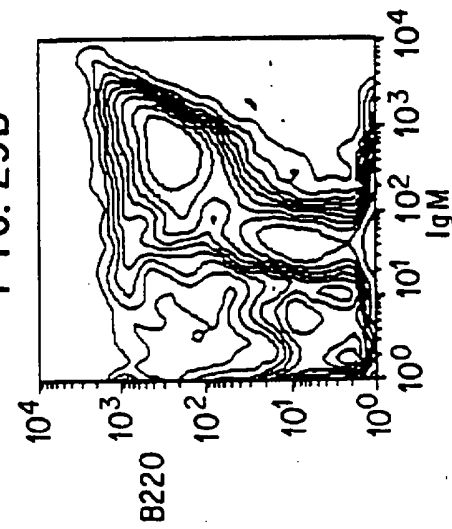
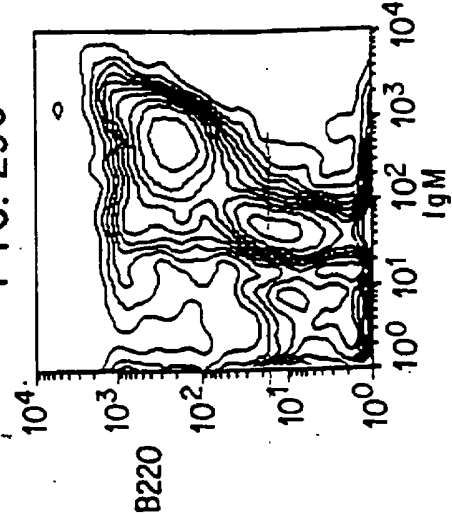
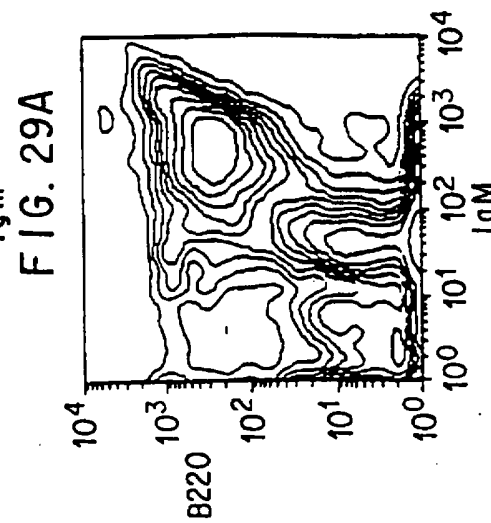
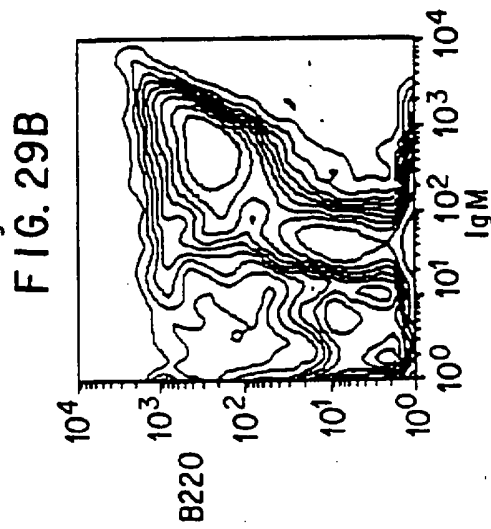
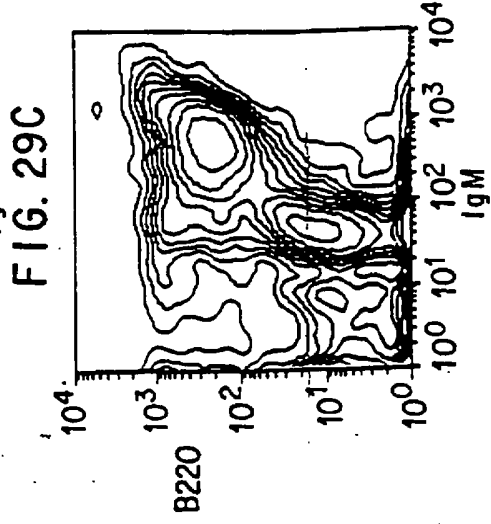
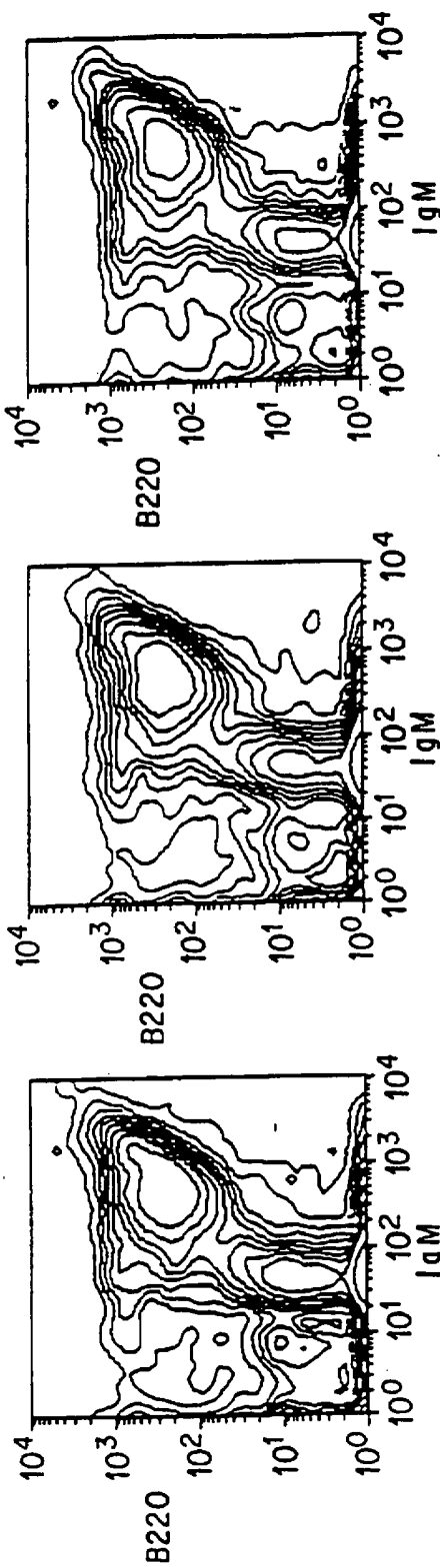
Experiência nº

FIG. 28A



Experiência nº

FIG. 28B

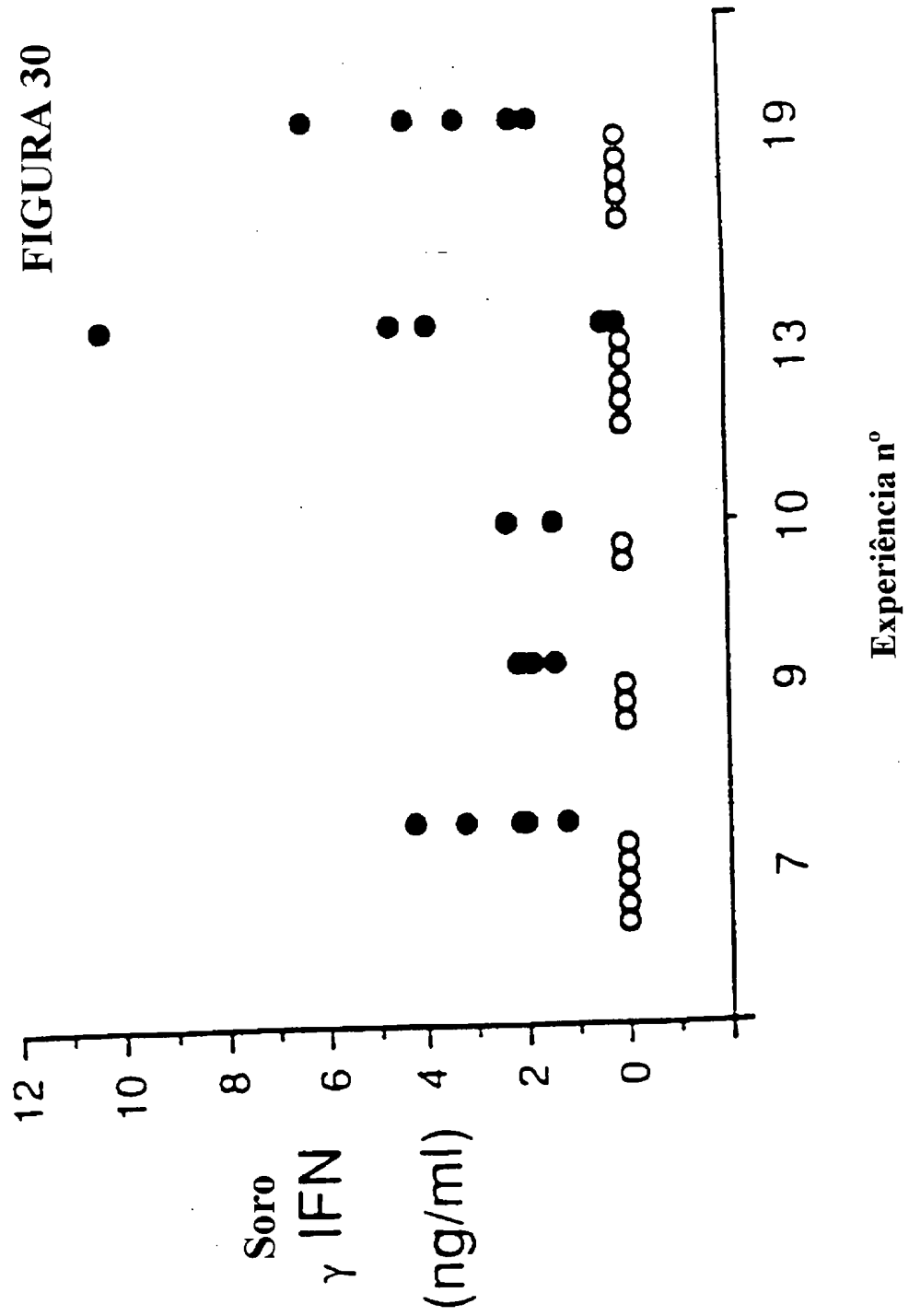


11

11

43/63

FIGURA 30



44/63

Handwritten signature or mark.

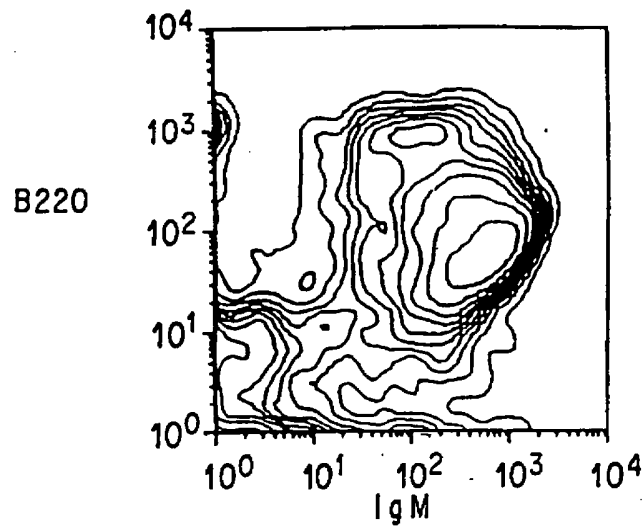


FIG. 31A

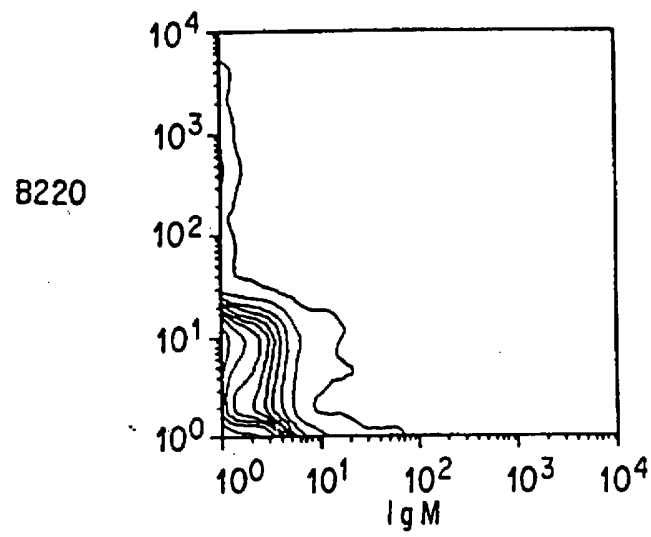


FIG. 31B

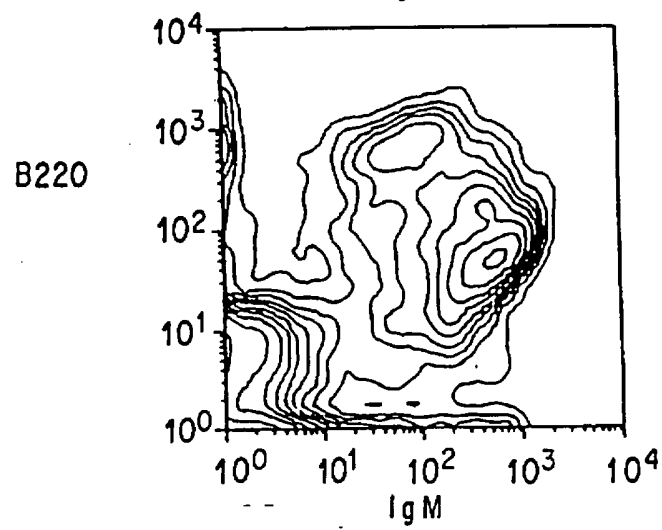


FIG. 31C

45/63

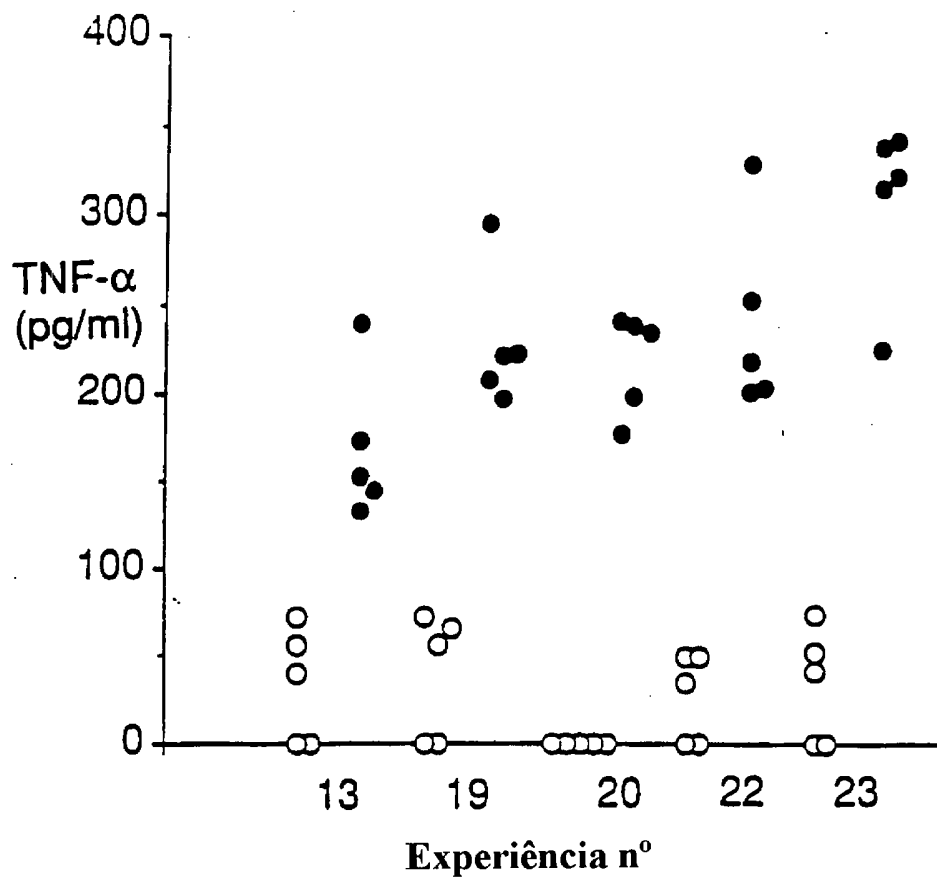


FIGURA 32



Handwritten signature or mark.

47/63

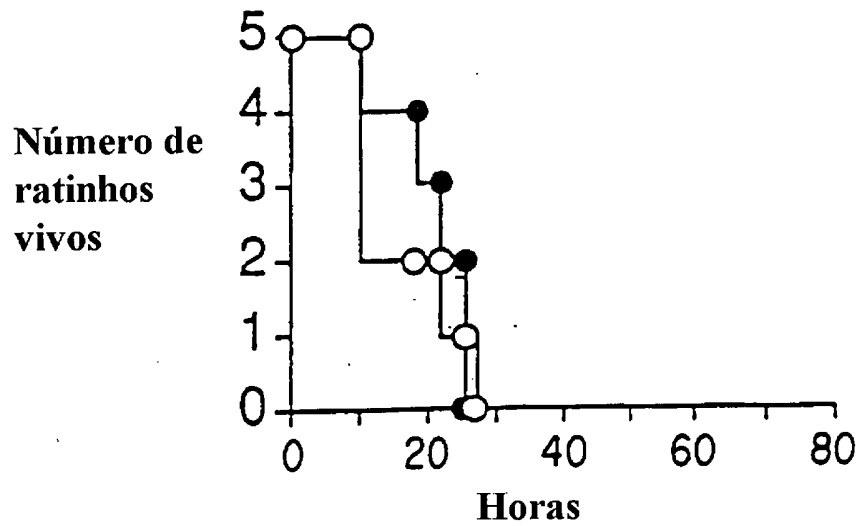


FIG. 34A

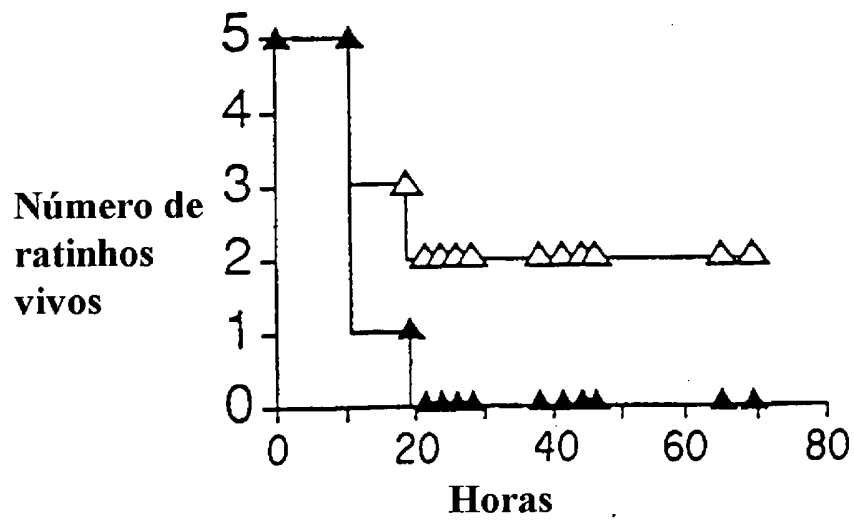


FIG. 34B

Handwritten scribbles at the top right of the page.

48/63

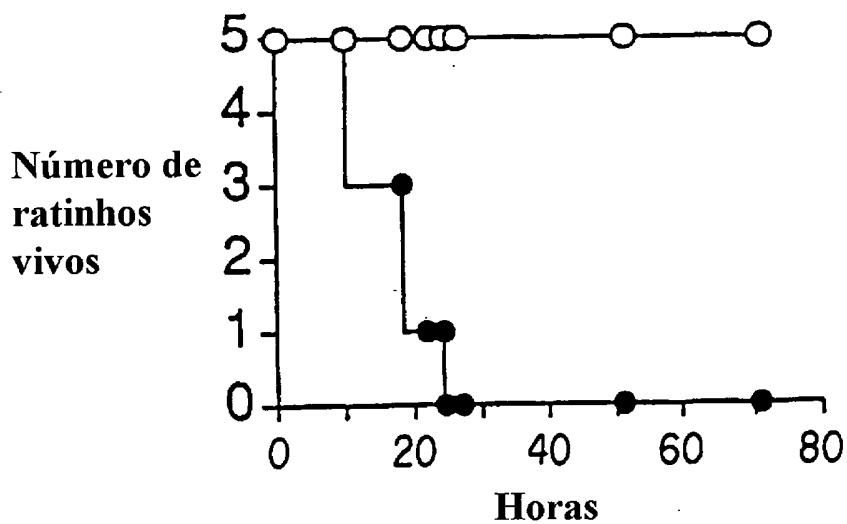


FIG. 34C

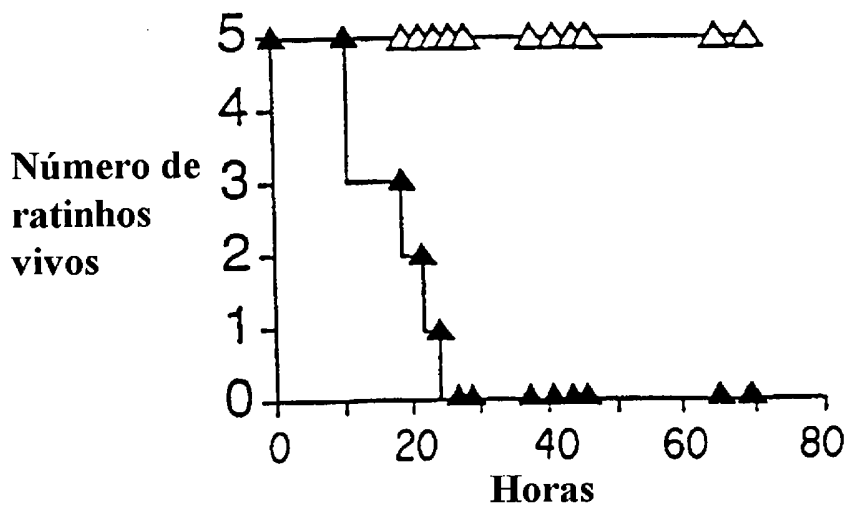


FIG. 34D

Handwritten scribbles.

49/63

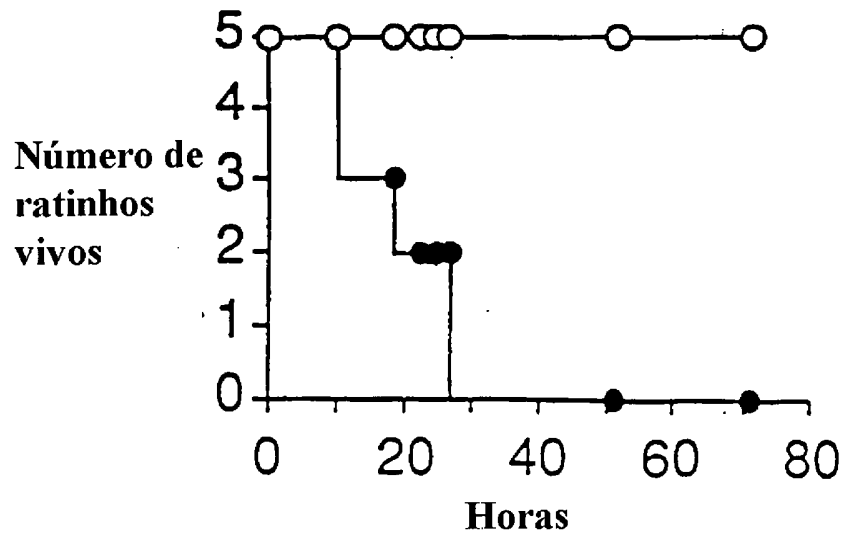


FIG. 34E

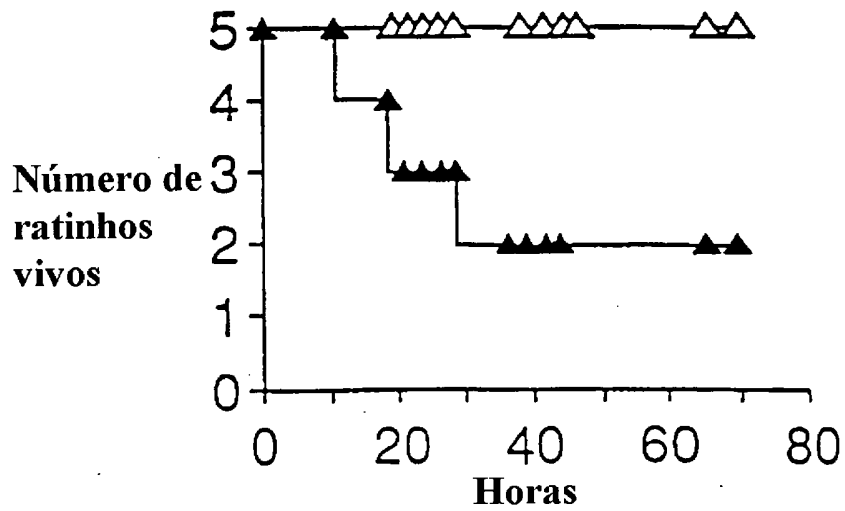


FIG. 34F

▨ não tratado
 ▩ PBS
 □ controle do isótipo
 ■ Anti-IL-10

▨ não tratado
 ▩ PBS
 □ controle do isótipo
 ■ Anti-IL-10

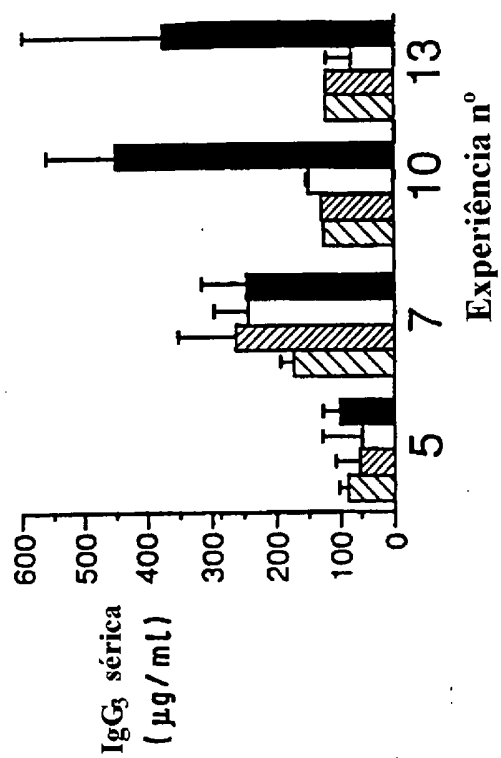


FIG. 35B

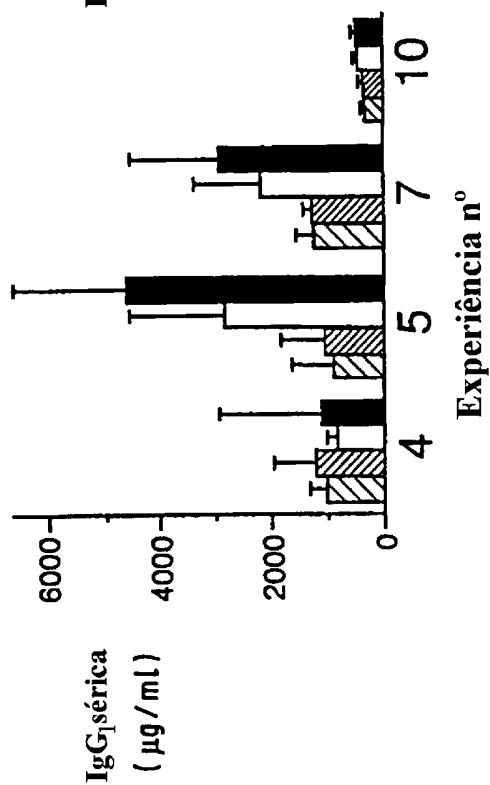


FIG. 35A

▨ Não tratado
 ▩ PRS
 □ Controlo do Isótopo
 ■ Anti-IL - 10

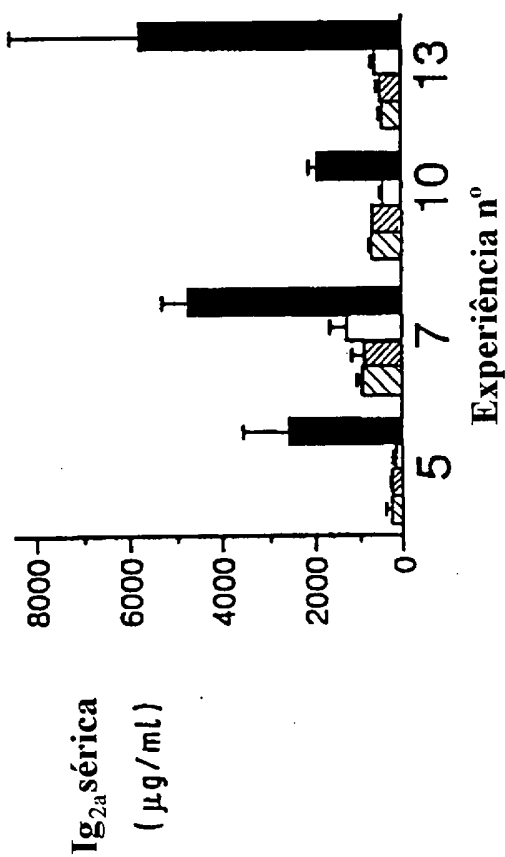


FIG. 35C

▨ Não Tratado
 ▩ PBS
 □ Controlo do Isótopo
 ■ Anti - IL - 10

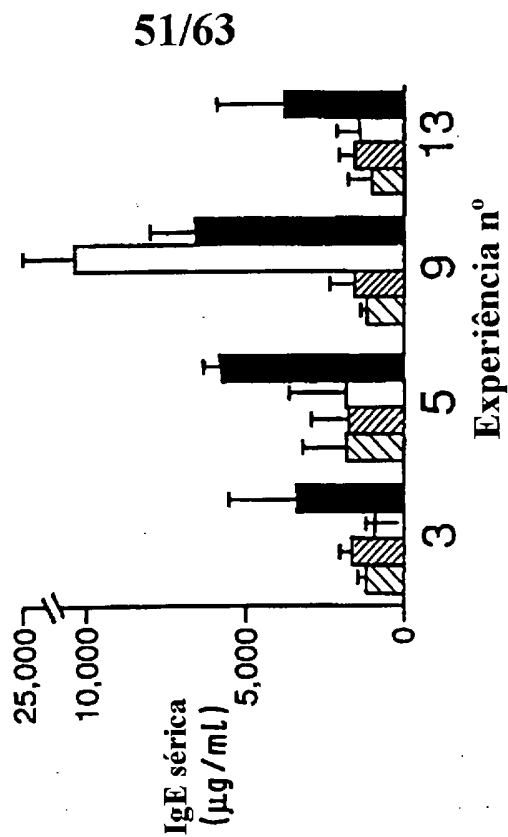


FIG. 35D

51/63

▨ Não tratado
 ▩ PBS
 □ Controlo do isótopo
 ■ Anti-IL-10

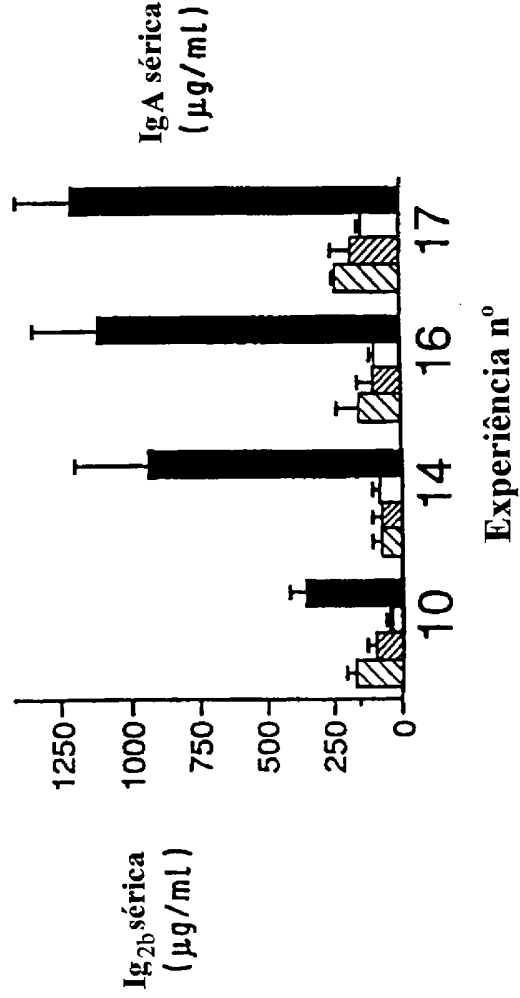


FIG. 35E

▨ Não tratado
 ▩ PBS
 □ Controlo do isótopo
 ■ Anti-IL-10

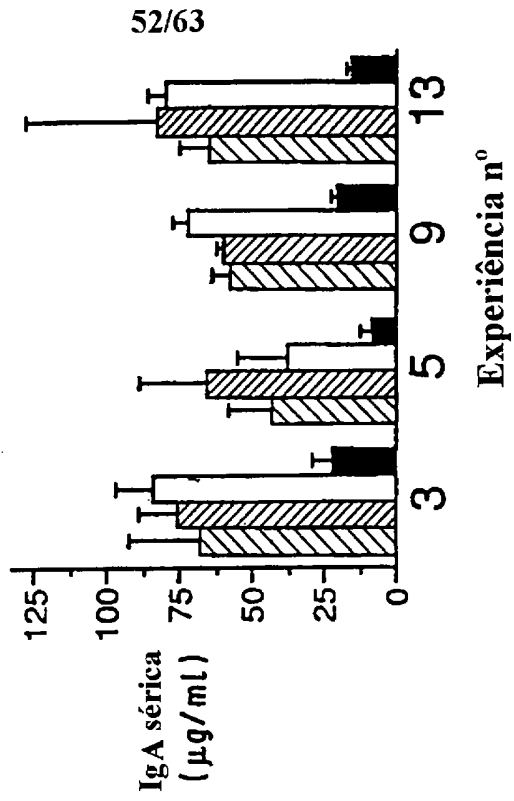


FIG. 35F

11

53/63

B220 Controlo do isótopo

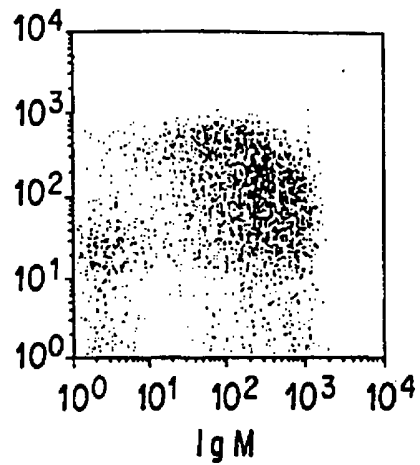


FIG. 36A

B220 Controlo do isótopo

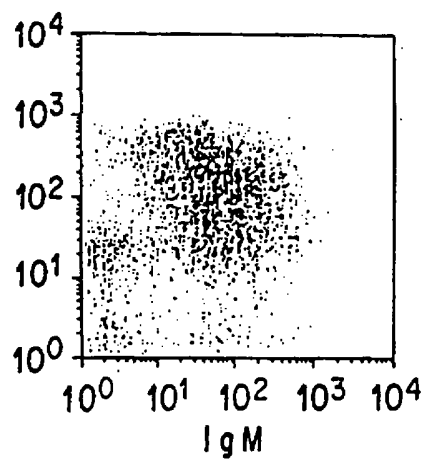


FIG. 36B

B220 Controlo do isótopo

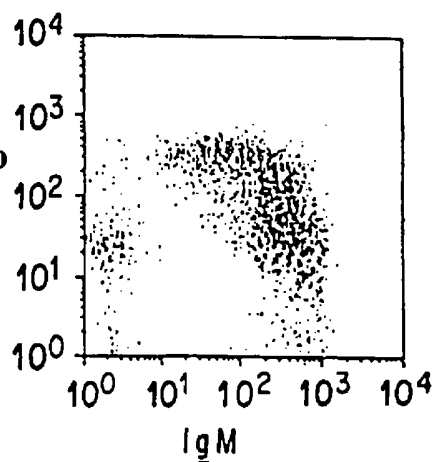


FIG. 36C

Handwritten signature or mark.

54/63

B220 anti-IL-10

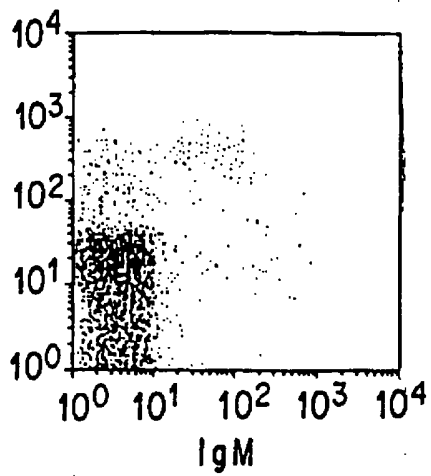


FIG. 36D

B220 anti-IL-10

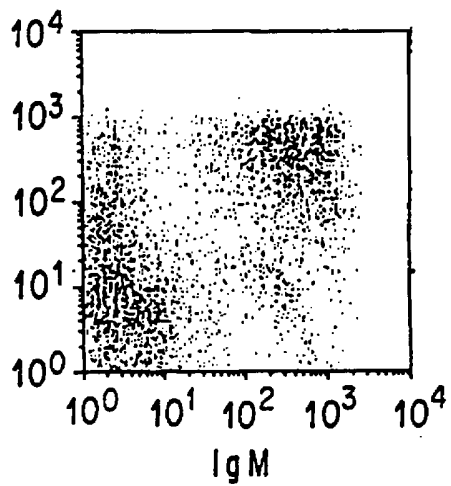


FIG. 36E

B220 anti-IL-10

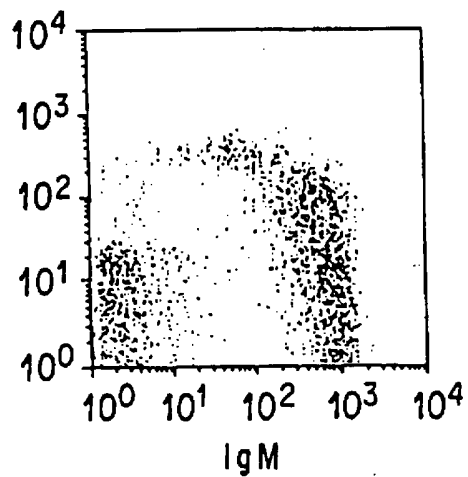


FIG. 36F

55/63

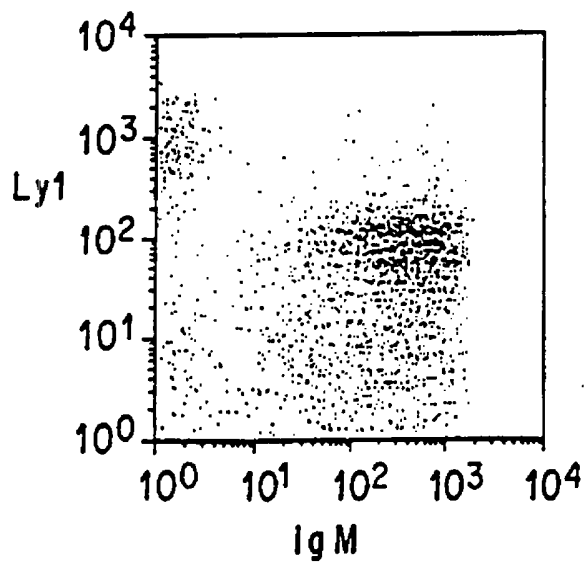


FIG. 37A

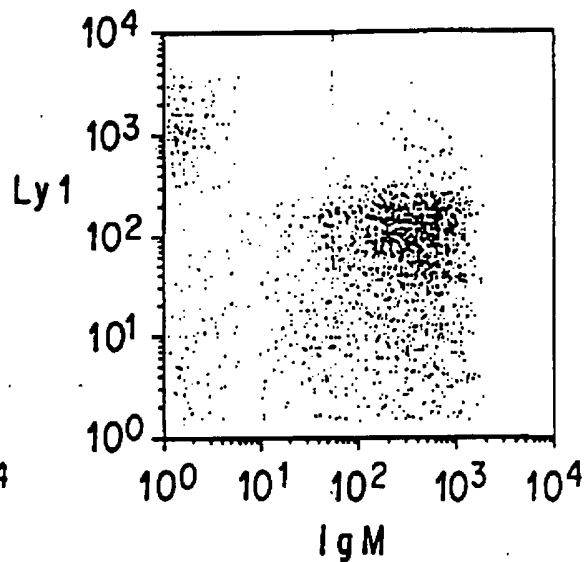


FIG. 37B

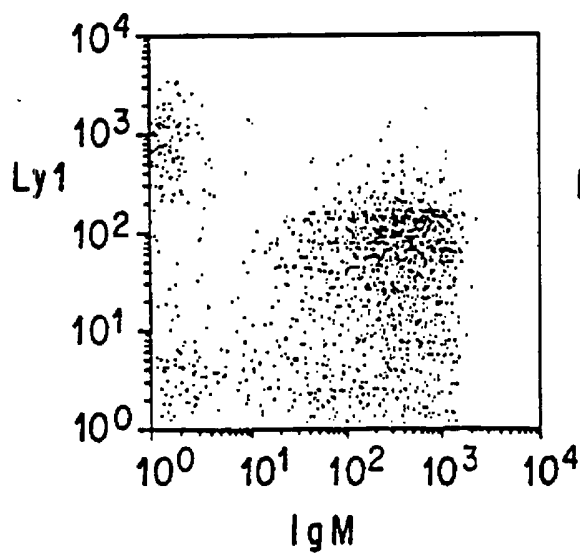


FIG. 37C

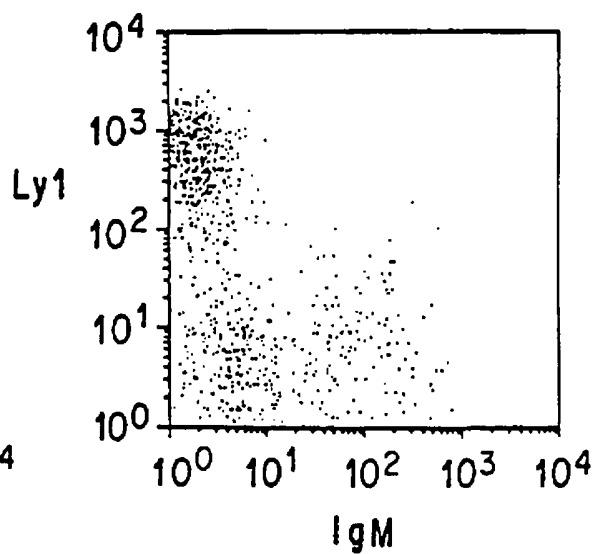


FIG. 37D

Handwritten scribbles at the top right of the page.

56/63

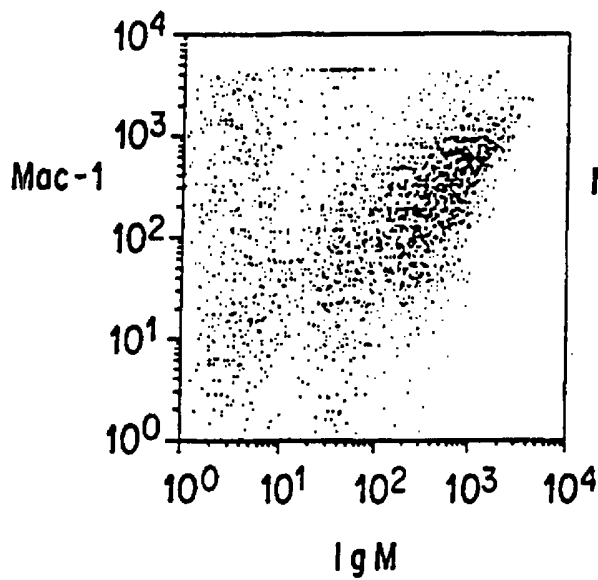


FIG. 38A

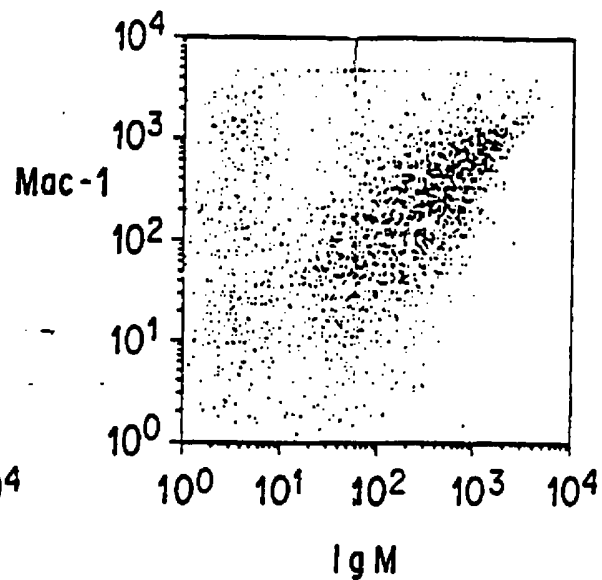


FIG. 38B

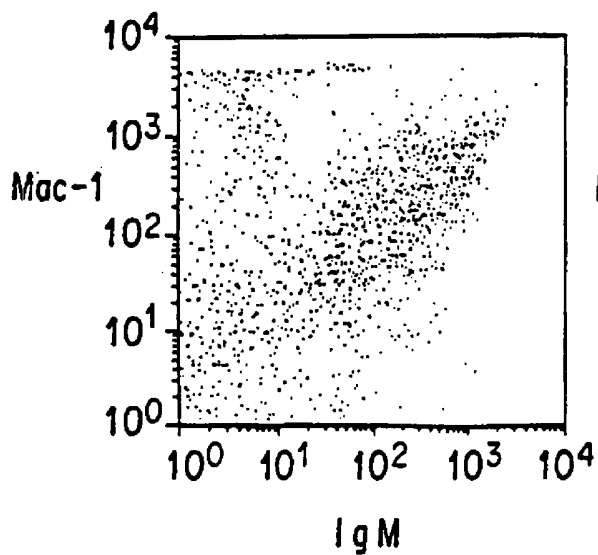


FIG. 38C

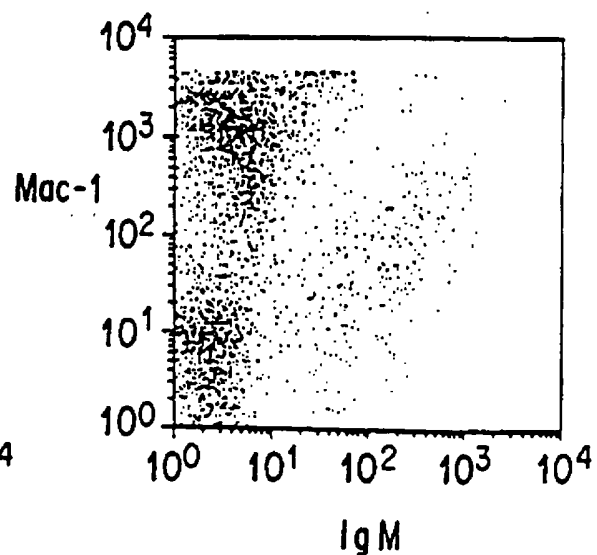


FIG. 38D

11

57/63

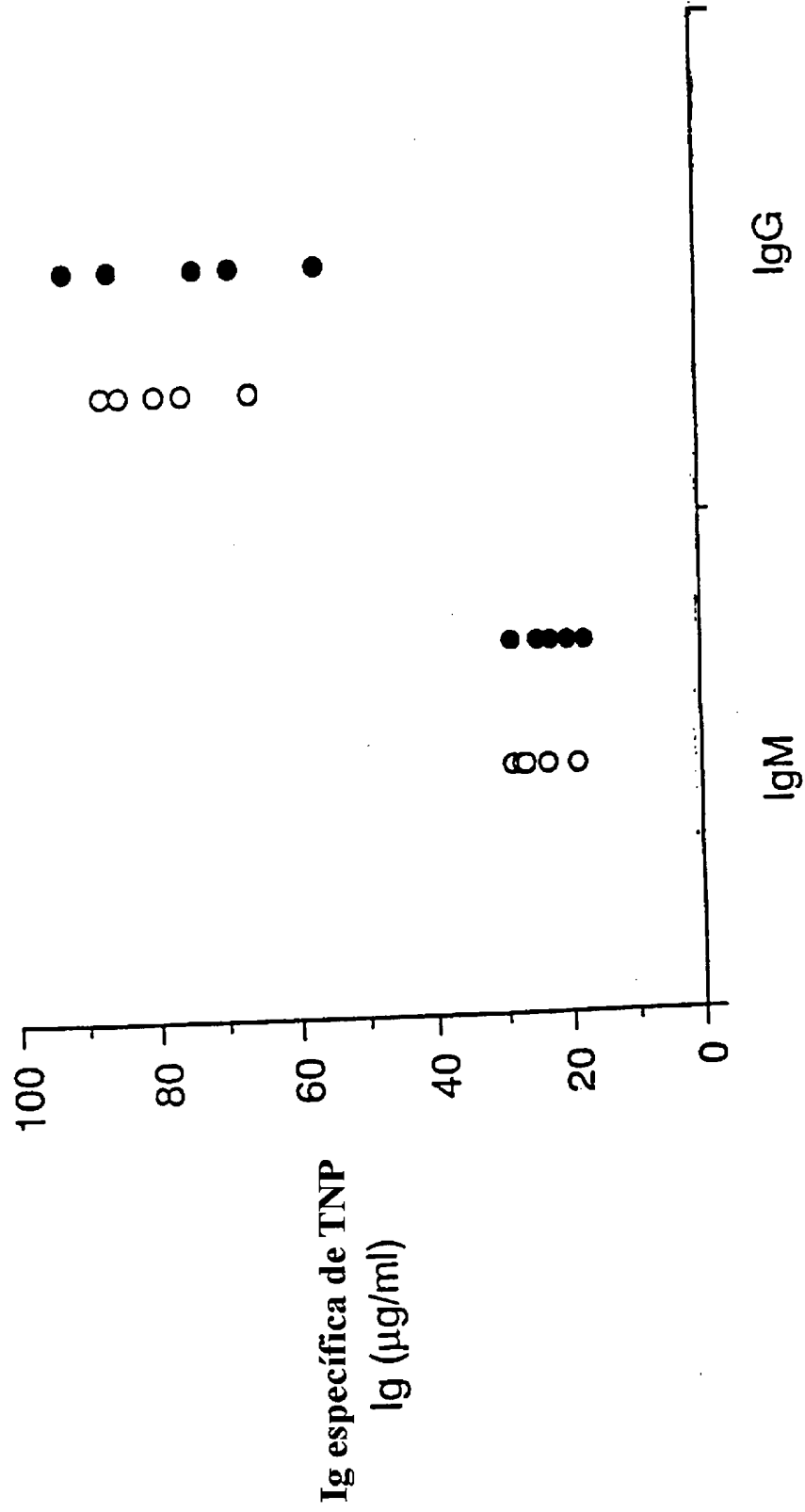


FIGURE 39

11

58/63

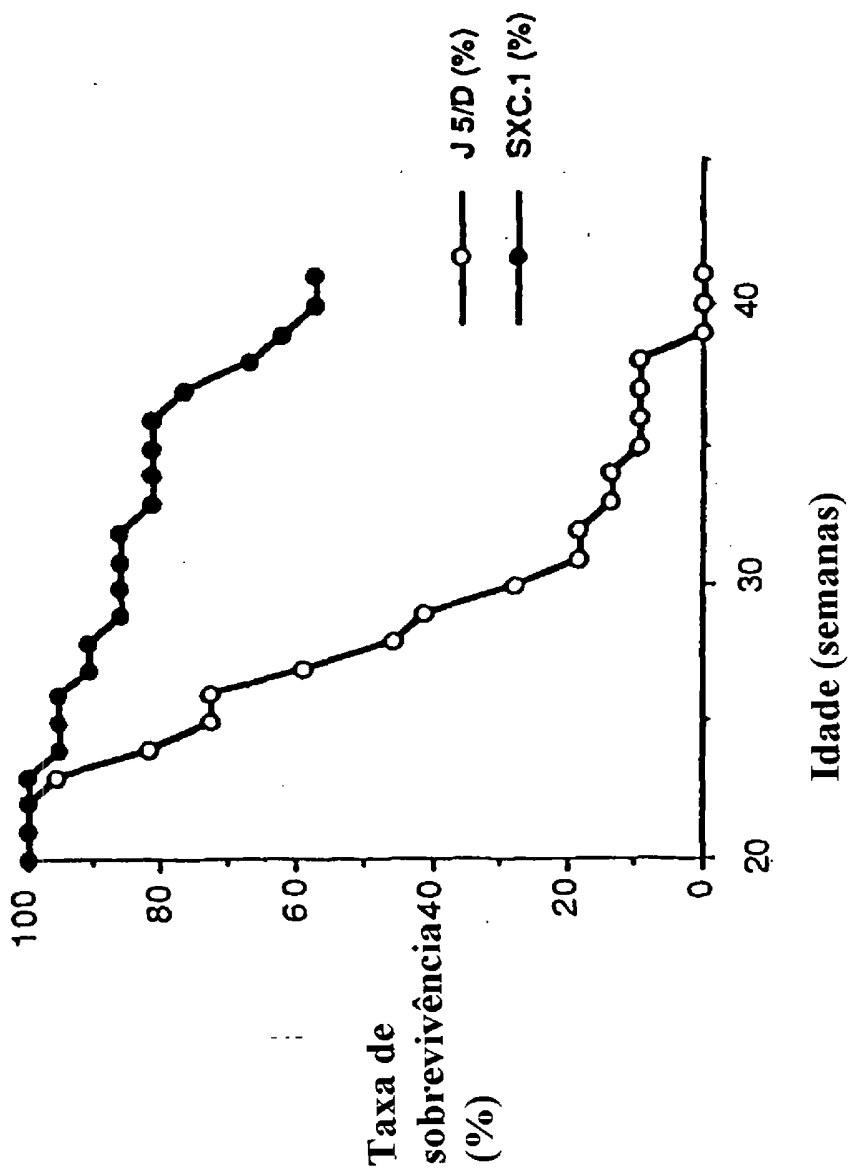


FIGURE 40

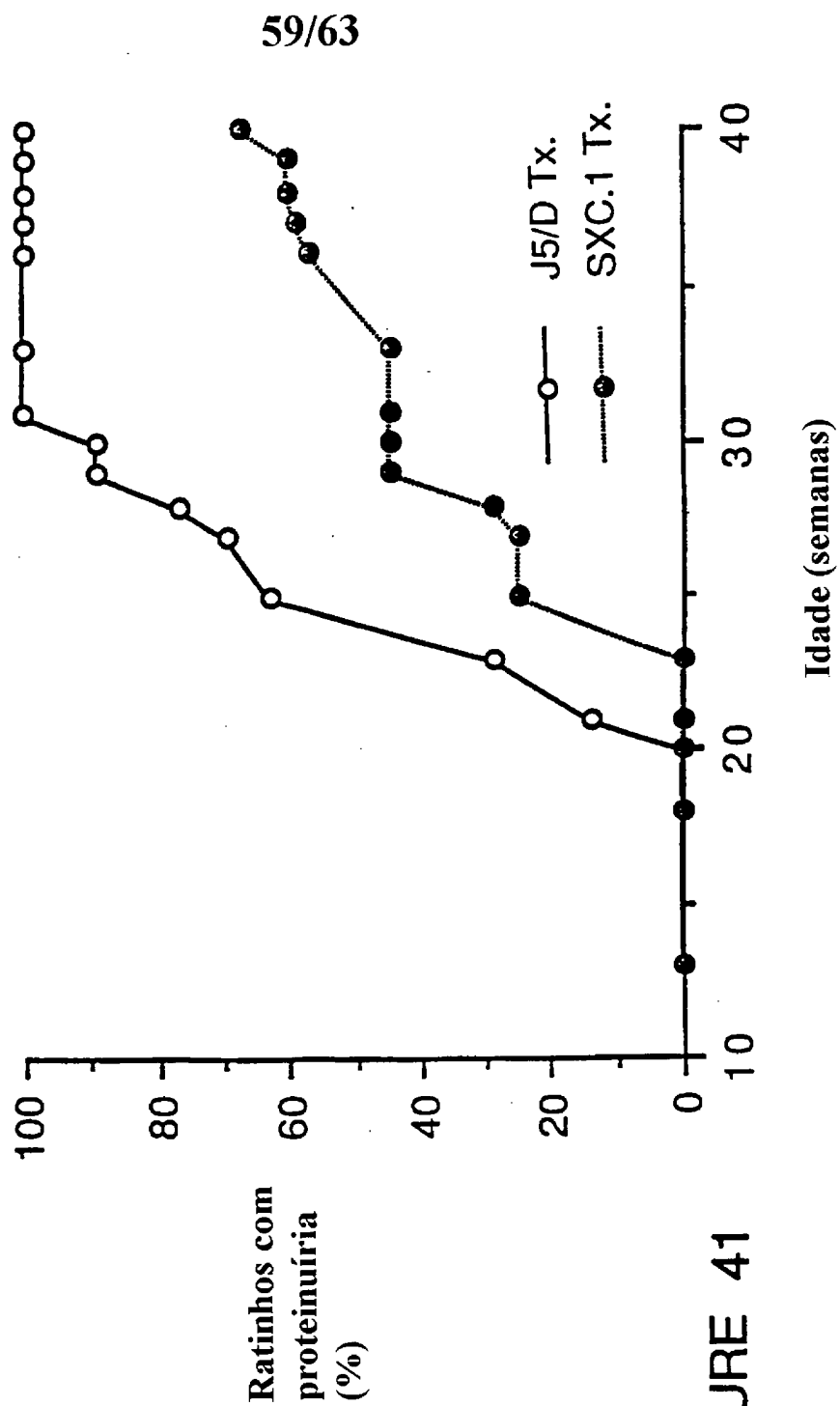


FIGURE 41

60/63



FIG. 42A



FIG. 42B

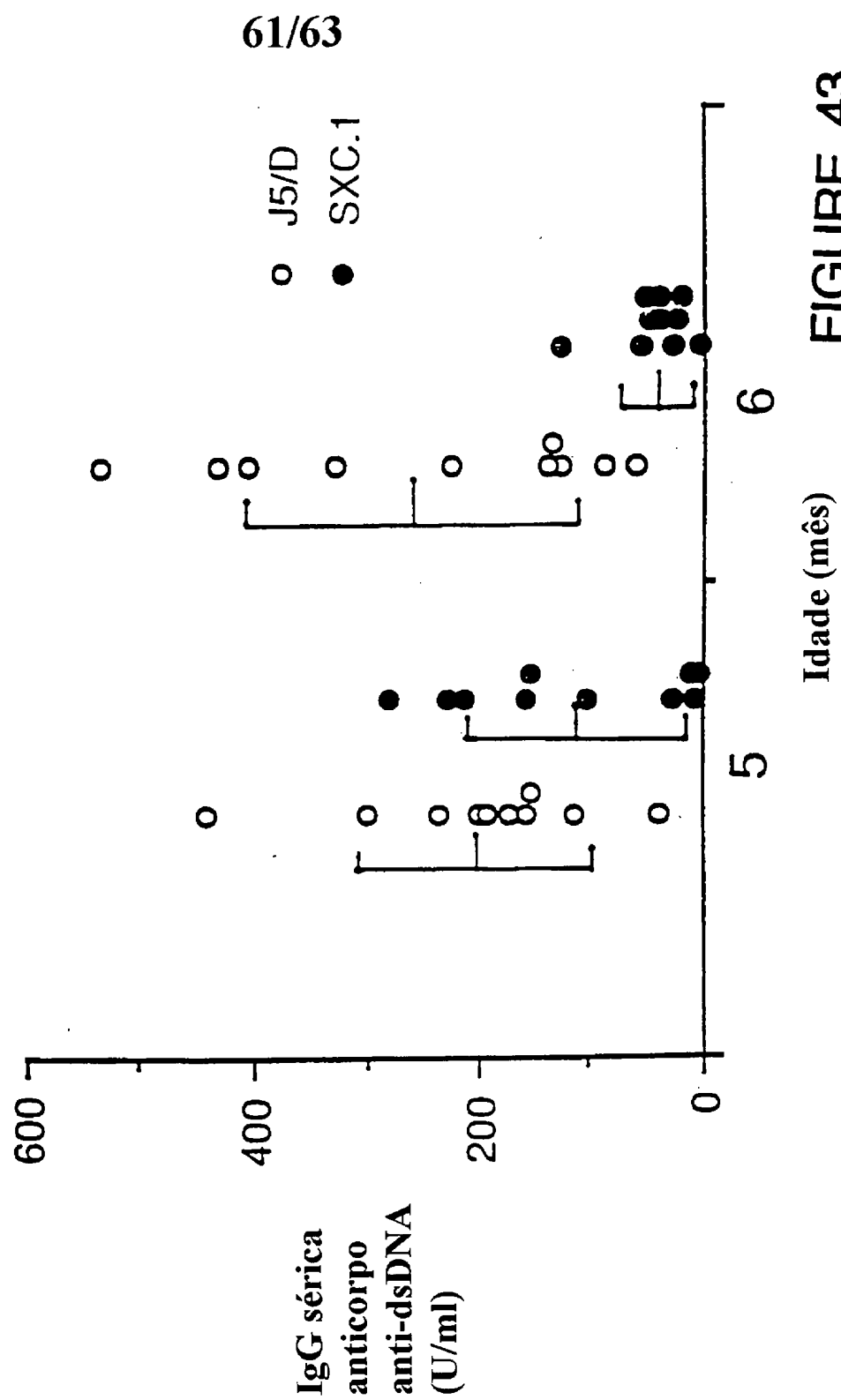
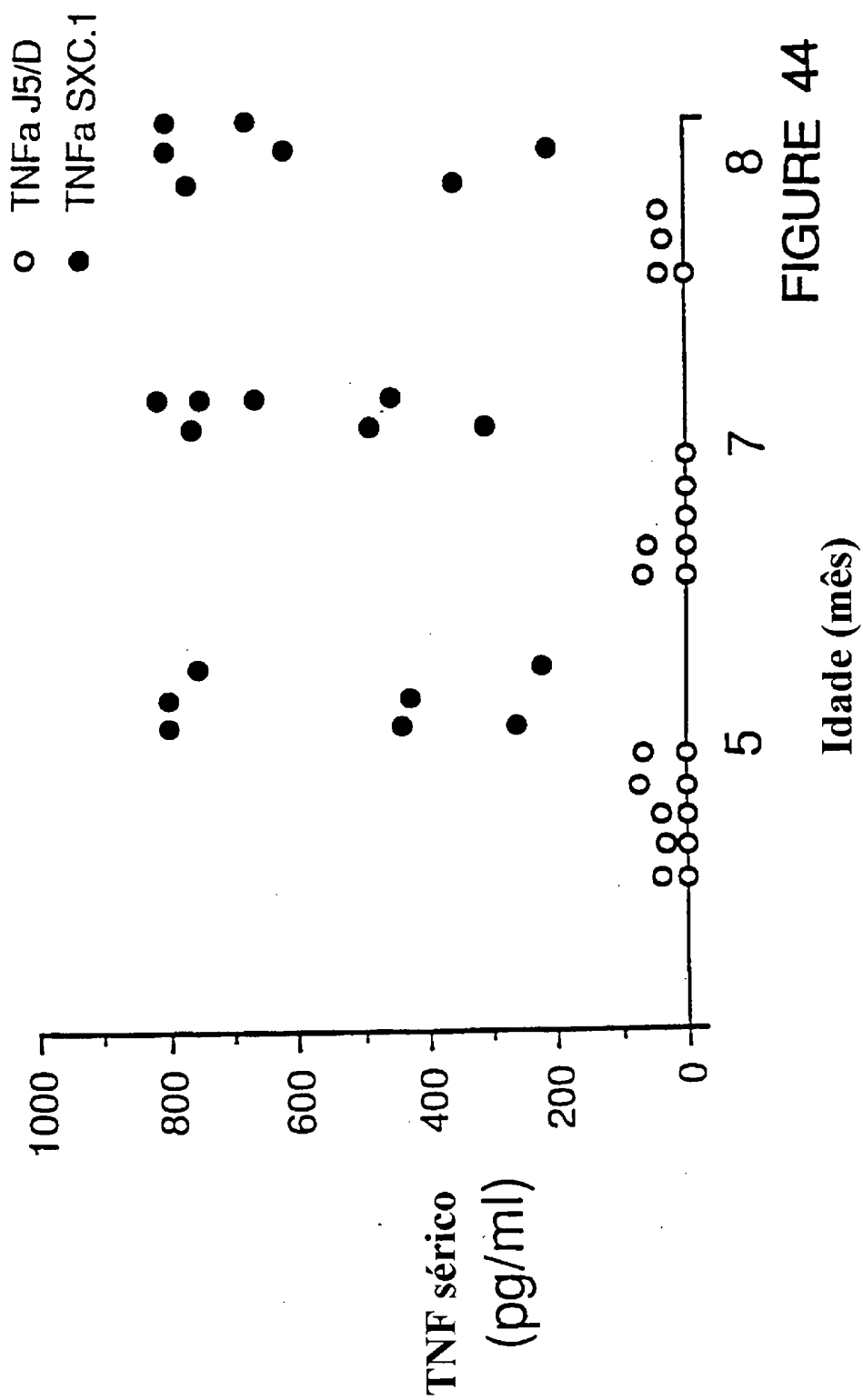


FIGURE 43

11

62/63



63/63

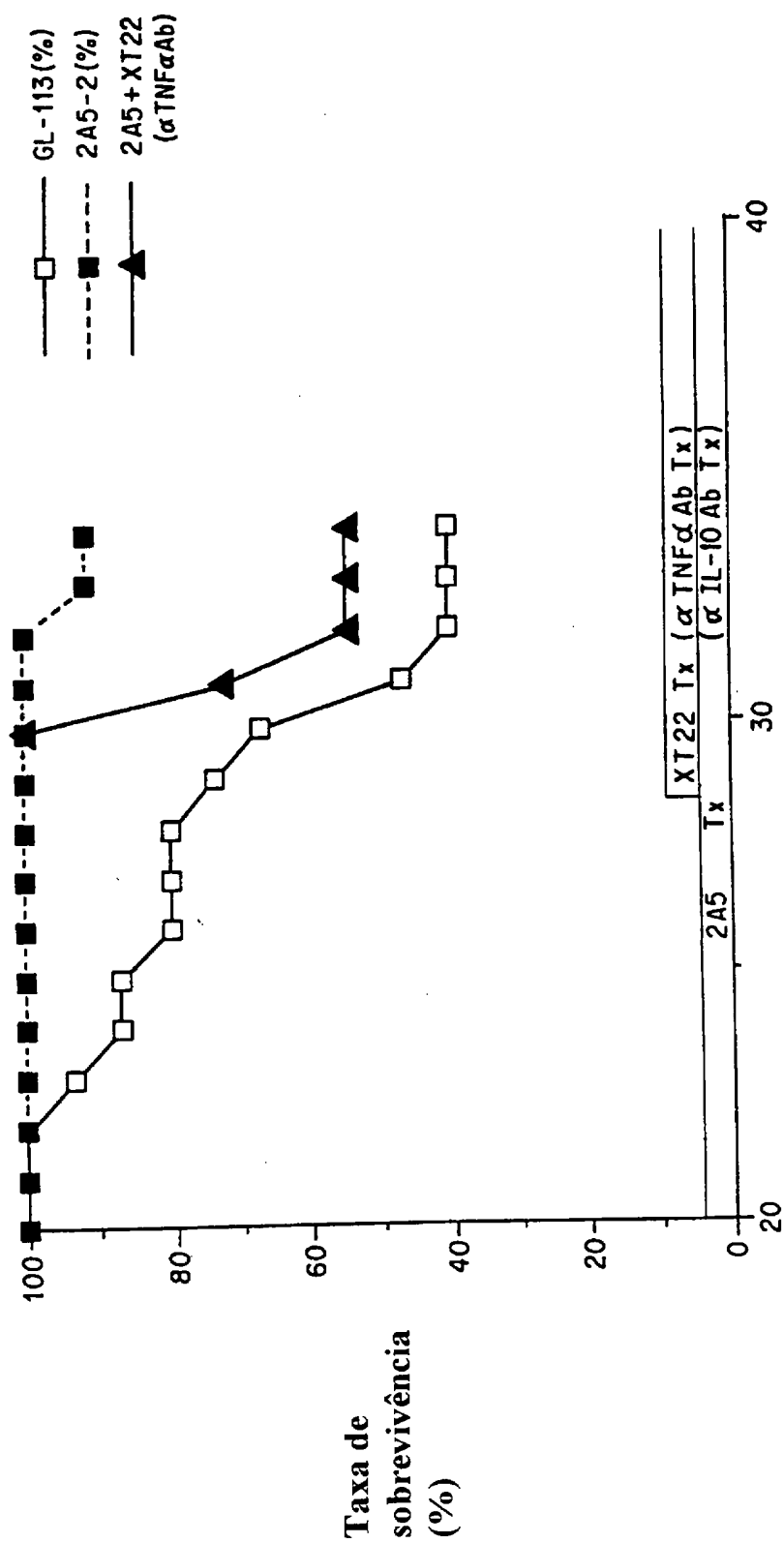


FIG. 45