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

(21) PI 0717744-5 A2

* B R P I 0 7 1 7 7 4 4 A 2 *

(22) Data de Depósito: 16/10/2007
(43) Data da Publicação: 12/11/2013
(RPI 2236)

(51) Int.Cl.:
C07K 16/28
A61K 31/713
C12N 15/11
C07K 14/705
A61K 39/395
A61P 29/00
G01N 33/68

(54) Título: LIGANTE DE 4-1BB EM DOENÇAS INFLAMATÓRIAS

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 16/10/2006 US 60/852,022, 11/05/2007 US 60/917,561, 11/05/2007 US 60/917,561

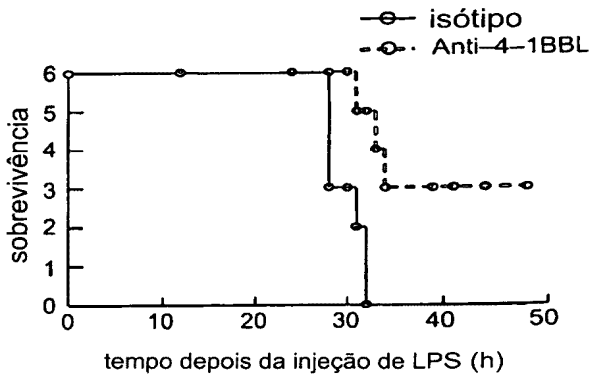
(73) Titular(es): The Scripps Research Institute

(72) Inventor(es): Jiahuai Han, Young Jun Kang

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

(86) Pedido Internacional: PCT US2007022103 de 16/10/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/057171de 15/05/2008



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"LIGANTE DE 4-1BB EM DOENÇAS INFLAMATÓRIAS".**

Pedidos Relacionados

Esse pedido reivindica a prioriada do pedido provisório U.S nº de série 60/852.022, depositado em 16 de outrubo de 2006, do pedido provisório U.S nº de série 60/917,561, depositado em 11 de maio de 2007, ambos os quais são incorprados aqui por referência em sua totalidade.

Afirmação com Referência à Pesquisa Federalmente Patrocinada

Trabalho com relação a esse pedido foi sustentado por uma subvenção do Governo U.S. (GM67101, AI41637, e AI54696). O governo pode ter certos direitos na invenção.

Antecedentes da Invenção

A produção de citocinas pró-inlfamatórias, tal como fator de necrose de tumor (TNF) em macrófagos, é essencial para o início de respostas imunes inatas e manutenção do estado inflamatório sistêmico que acompanha doenças tais comos sépsis (Beutler, Nature 430:257-63 (2004); Cohen, Nature 420:885-91 (2002)). receptores de tipo Toll (TLRs) são sensores imunes inatos primários, cada um respondendo a moléculas específicas de origem microbiana (Janeway & Medzhitov, Annu. Rev. Immunol. 20:197-216 (2002)). TLR4 é o receptor para a endotoxina de lipopolissacarídeo (LPS), e responde a LPS por recrutamento de adaptadores de sinalização, tais como gene de resposta primária de diferenciação mielóide 88 (MyD88) e receptor de interleucina 1/Toll/proteína de adaptador de resistência (TRIF) (também conhecido como TICAM-1). Esse recrutamento permite a interação e ativação de membros da família de IRAK e fator associado ao receptor de TNF 6 (TRAF6), que subsequentemente ativam as trajetórias de cinase de MAP e NF-kapaB que controlam produção de citocina inflamatória (Akira & Takeda, Nat. Rev. Immunol. 4:499-51 1 (2004)).

Embora as trajetórias de cinase de MAP e NF-kapaB sejam ativadas transitoriamente em macrófagos no período de umas poucas horas de tratamento com lipopolissacarídeo (LPS), a produção de citocinas pró-inlfamatórias tipo TNF pode dura até 24 horas. Assim, a produção de citoci-

nas inflamatórias é parte de um processo de inflamação que é caracterizado por uma iniciação seguido por uma fase "sustentada" tardia. A fase sustentada normalmente termina quando há uma resolução do disparo inflamatório. Produção de citocina inflamatória é muito importante na manutenção de um estado inflamatório e no desenvolvimento de doenças inflamatórias uma vez que muitos dos eventos que culminam em um rompimento na regulação de inflamação ocorrem perto do fim de uma resposta inflamatória sustentada. Portanto, produção de TNF sustentado está associada à patologia de muitas doenças inflamatórias.

Assim, um agente que pode afetar a produção de TNF sustentado seria útil para o desenvolvimento da terapêutica para o tratamento de doenças inflamatórias.

Sumário da Invenção

A presente invenção envolve a descoberta do papel de ligante de 4-1BB (4-1BBL) na produção de citocinas pró-inlfamatórias importantes na mediação de ativação de macrógafo. Em particular, a invenção envolve a descoberta que 4-1BBL age em eventos de sinalização de fase tardia que são importantes para a produção sustentada de fator de necrose de tumor (TNF) que resulta em inflamação. A função de 4-1BBL na produção de citocina de fase tardia é independente de 4-1BB. Assim, a invenção refere-se a uma nova função de 4-1BBL que é independente deu seu receptor 4-1BB e provê um método para a produção de redução de uma citocina inflamatória. A invenção também provê agentes de bloqueamento e antagonistas de 4-1BBL, bem como artigos de fabricação e composições farmacêuticas compreendendo tais antagonistas e agentes de bloqueamento. Além disso, a invenção provê métodos para a separação quanto a antagonistas e agentes de bloqueamento de 4-1BBL. Um aspecto da invenção é uma composição farmacêutica compreendendo um agente de bloqueamento de 4-1BBL e um veículo farmaceuticamente aceitável, em que o agente de bloqueamento de 4-1BBL é selecionado do grupo que consiste em (a) um anticorpo antagonístico específico para 4-1BBL; (b) um oligonucleotídeo eficaz para reduzir expressão de um ácido nucleico de 4-1BBL em uma célula; e (c) um 4-1BB

solúvel. Uma quantidade terapeuticamente eficaz do agente de bloqueamento pode ser empregado na composição.

Um aspecto da invenção é uma combinação farmacêutica compreendendo um agente de bloqueamento de 4-1BBL e um segundo medicamento que é um fármaco anti-inflamatório, em que o agente de bloqueamento de 4-1BBL é selecionado do grupo que consiste em (a) um anticorpo antagonístico específico para 4-1BBL; (b) um oligonucleotídeo eficaz para reduzir expressão de um ácido nucleico de 4-1BBL em uma célula; e (c) um 4-1BB solúvel. Uma quantidade terapeuticamente eficaz do agente de bloqueamento e/ou o fármaco anti-inflamatório pode ser empregada na composição. O fármaco anti-inflamatório pode ser um anticorpo específico para fator de necrose de tumor.

Um outro aspecto da invenção é um anticorpo humanizado ou quimérico específico para 4-1BBL.

Um outro aspecto da invenção é um 4-1BB solúvel que liga especificamente com um 4-1BBL de mamífero. em algumas concretizações, o 4-1BBL de mamífero é aquele de um ser humano, camundongo, coelho, porco ou cavalo. Em algumas concretizações, a 4-1BB solúvel tem uma sequência que corresponde a aminoácido 23 até aminoácido 186 do polipeptídeo de 4-1BB de ser humano; aminoácido 24 a aminoácido 187 do polipeptídeo de 4-1BB de camundongo; aminoácido 1 a aminoácido 186 do polipeptídeo de 4-1BB de ser humano; a aminoácido 1 até aminoácido 187 do polipeptídeo de 4-1BB de camundongo; ou uma região correspondente em um outro 4-1BB de mamífero. Em alguma concretização, um 4-1BB solúvel tem a sequência de SEQ ID NO: 7, 8, 20 ou 21.

Um outro aspecto da invenção é um artigo de fabricação compreendendo um recipiente contendo um agente de bloqueamento de 4-1BBL e instruções para o uso do agente de bloqueamento de 4-1BBL para a redução de inflamação e/ou a redução de produção de uma citocina inflamatória. Em algumas concretizações, as instruções para o uso do agente de bloqueamento de 4-1BBL inclui instruções para o uso do agente de bloqueamento de 4-1BBL no tratamento de uma condição inflamatória. Uma quantidade

terapeuticamente eficaz do agente de bloqueamento pode ser provido no recipiente.

Em algumas concretizações, a condição inflamatória é artrite reumatóide, artrite reumatóide juvenil, artrite psoriática, psoríase, espondilite aquilosante, doença de Crohn, artrite reumatóide, artrite crônica juvenil de início sistêmico, osteoporose, ou síndrome do intestino irritável.

Um outro aspecto da invenção é um método para a produção de redução de uma citocina inflamatória em um mamífero compreendendo a administração de um agente de bloqueamento de 4-1BBL ao mamífero. Uma quantidade terapeuticamente eficaz do agente de bloqueamento pode ser administrada. Em alguma concretização, o método ulteriormente compreende a identificação de um mamífero que sofre de ou em risco para uma condição inflamatória. Em algumas concretizações, o mamífero é um ser humano, camundongo, coelho, porco ou cavalo.

Um outro aspecto da invenção é um método para a redução de inflamação em um mamífero compreendendo administração de um agente de bloqueamento de 4-1BBL ao mamífero. Uma quantidade terapeuticamente eficaz do agente de bloqueamento pode ser administrada. Em algumas concretizações, o mamífero é um ser humano, camundongo, coelho, porco ou cavalo.

Um outro aspecto da invenção é um método de separação para um agente de bloqueamento de 4-1BBL queenvolve (a) contato de uma célula que expressa 4-1BBL com um agente candidato; e (b) determinação de se o agente candidato diminui a produção de uma citocina inflamatória, ou se o agente candidato previne oligomerização de 4-1BBL, em que o agente candidato é um agente de bloqueamento de 4-1BBL se ele diminuir a produção de uma citocina inflamatória ou prevenir oligomerização de 4-1BBL. Em algumas concretizações, a citocina inflamatória é um fator de necrose de tumor ou IL-6. Em algumas concretizações, a célula é uma célula de ser humano, um macrógafo, e/ou uma célula de RAW264.7.

Um outro aspecto da invenção é um método para a separação quanto a um agente de bloqueamento de 4-1BBL que envolve (a) adminis-

tração de um agente candidato a um mamífero; e (b) determinação de se o agente candidato reduz inflamação, ou diminui produção de uma citocina inflamatória, no mamífero, em que o agente candidato é um agente de bloqueamento de 4-1BBL se ele reduzir inflamação, ou diminuir produção de uma citocina inflamatória, no mamífero. Em algumas concretizações, o mamífero tem uma condição inflamatória. Em algumas concretizações, a citocina inflamatória é um fator de necrose de tumor ou IL-6. Em algumas concretizações, a produção da citocina inflamatória é diminuída por 20%, 25%, 30% ou mais do que 30%. Em algumas concretizações, o mamífero é um camundongo, rato, coelho, ou porco.

Em algumas concretizações da invenção, o 4-1BBL é um 4-1BBL de mamífero. Em algumas concretizações, o 4-1BBL é aquele de um ser humano, camundongo, rato, coelho porco ou cavalo. Em algumas concretizações, o 4-1BBL tem a sequência indicada na SEQ ID NO: 1 ou 2. Em algumas concretizações, o agente de bloqueamento é um anticorpo quimérico ou de ser humano específico para 4-1BBL. Em algumas concretizações, o agente de bloqueamento é um oligonucleotídeo tendo uma sequência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 10-15, 22-38, e 45-56. Em algumas concretizações, o agente de bloqueamento é um 4-1BB solúvel que se liga a 4-1BBL de ser humano. Em algumas concretizações, um 4-1BB solúvel tem uma sequência que corresponde a aminoácido 23 até aminoácido 186 do polipeptídeo de 4-1BB de ser humano; aminoácido 24 a aminoácido 187 do polipeptídeo de 4-1BB de camundongo; aminoácido 1 a aminoácido 186 do polipeptídeo de 4-1BB de ser humano; ou a aminoácido 1 até aminoácido 187 do polipeptídeo de 4-1BB de camundongo. Em algumas concretizações, o agente de bloqueamento é um 4-1BB solúvel tendo a sequência indicada na SEQ ID NO: 7, 8, 20 ou 21. Em alguma concretização, a citocina inflamatória é um fator de necrose de tumor ou IL-6.

A não ser que de outra maneira definido, todas os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado que comumente entendido por aquele de habilidade comum na técnica à qual essa invenção pertença. Embora métodos e materials similares ou equivalentes àqueles

descritos aqui possam ser usados para praticar a invenção, métodos e materiais adequados são descritos abaixo. Todas as publicações, pedidos de patente e outras referências mencionados aqui são incorporados por referência em sua totalidade. Designações de aminoácidos podem incluir a totalidade de designações de nome, três letras, única letra como comumente entendido por aquele de habilidade comum na técnica à qual essa invenção pertença. Em caso de conflito, o presente relatório, incluindo definições, controlarão. Além disso, os materiais, métodos, e exemplos são apenas ilustrativo e não pretende-se ser limitante. Outras características e vantagens da invenção estarão evidentes a partir da seguinte descrição detalhada e a partir das reivindicações.

Descrição dos Desenhos

Figura 1A-D são resultados que demonstram que 4-1BBL é uma proteína de interação de TLR4. (A) Crescimento de células de levedura transfectadas com plasmídios de expressão que codificam aminoácidos 653-839 de TLR4 e aminoácidos 5-254 de 4-1BBL (clone 1), aminoácidos 3-254 de 4-1BBL (clone 2), p38alfa (AF) negativo dominante, p53 ou lamin, on meio que carece histidina. 4-1BBL, mas não proteínas não-relacionadas, interagem com o domínio intracelular de TLR4. (B) Imunoensaio de células de 293T transfectadas com plasmídio vazio (Controle) ou plasmídio que expressa 4-1BBL etiquetado com hemaglutinina (HA-4-1BBL) e TLR4 ou IL-3R etiquetado com Flag, lisadas por 24 horas depois da transfecção; dois terços dos lisados foram imunoprecipitados (IP) com anti-hemaglutinina (HA). TLR4, mas não IL-3R, foi puxado para baixo por 4-1BBL. (C) Imunoensaio de células de 293T transfectadas com plasmídios que expressam 4-1BBL etiquetado com GFP e TLR4 etiquetado com Flag, TLR4 que carece do domínio cistólico (TLR4-deltaCyt), TLR4 que carece do domínio extracelular (TLR4-deltaExt) ou IL-3R (esquerdo) ou TLR4 etiquetado com Myc ou TLR4 com a substituição de P712H (TLR4-P712H; direito); lisados foram imunoprecipitados com antiFlag ou antiMyc. O domínio intracelular de TLR4 está envolvido na interação com 4-1BBL, e porções distintas do domínio de TLR4 Toll-IL-IR interagem com 4-1BBL e MyD88. (D) Imunoensaio de células de

293T transfectadas com plasmídio que expressa TLR4 etiquetado com Flag e GFP sozinho ou 4-1BBL etiquetado com GFP, 4-1BBL que carece do domínio cistólico (4-1BBL-deltaCyt), 4-1BBL que carece do domínio extracelular (4-1BBL-deltaExt) ou 4-1BBL contendo o único domínio cistólico (4-1BBL-Cyt). O domínio cistólico de 4-1BBL e associação com a membrana celular são exigidos para 4-1BBL para interagir com TLR4. IP: imunoprecipitação; IB: imunoblot. Resultados são representativos de dois a três expriencias independentes.

Figura 2A-D são resultados que demonstram o efeito *in vivo* de inibição de 4-1BBL. (A) Sobrevivência de camundongos de tipo selvagem e deficientes de 4-1BBL injetados intraperitonealmente com 0,5 mg de LPS por 25 g de peso de corpo. Camundongos de supressão (KO) de 4-1BBL eram resistentes ao efeito letal de LPS. Sobrevivência de camundogos de tipo selvagem injetados intraperitonealmente com 300 μg de LPS (B) ou 500 μg de LPS (C) por 25 g de peso de corpo juntamente com controle de isotipo IgG2a ou anti-4-1BBL (250 μg por 25 g de peso de corpo). O efeito letal de LPS nos camundogos de tipo selvagem foi atenuado pela administração de anti-4-1BBL. (D) ELISA de TNF soro oriundo de camundongos de tipo selvagem ou de 4-1BBL injetados com LPS. Produção de TNF induzida por LPS era muito menor em camundongos de 4-1BBL KO em comparação com camundongos de tipo selvagem. Teste de classificação de Log foi usado em (A) e (B). $P = 0,0017$ in (A); $P = 0,018$ no painel a esquerda (B); $P = 0,048$ no painel a direita de (B). Dados em (C) são apresentados como média ± D.P. *, $P < 0,005$, **, $P < 0,001$ (teste t de Estudante).

Figura 3A-H são resultados que demonstram que 4-1BBL é exigido para a produção de TNF sustentado em macrófagos estimulados por LPS. (A) ELISA de TNF, IL-6, IL-10 ou a cadeia de p40 de IL- 12 (IL-12p40) em meio de cultura macrófagos peritoneais deficientes de 4-1BBL (4-1BBLKO) ou de tipo selvagem não-tratados a esquerda (nenhum) ou tratados por 24 horas com LPS (100 ng/mL; LPS). A direita no fundo, produção de IL-6 induzida por IL-1beta (10 ng/mL; controle). Macrófagos deficientes de 4-1BBL produziam menos TNF, IL-6 e IL- 12 do que produziam macrófagos

de tipo selvagem. (B & C) ELISA da produção de TNF em meio de cultura de tipo selvagem e macrófagos deficientes de 4-1BBL (B) ou macrófagos deficientes de 4-1BB (4-1BB KO; C) tratados com LPS (tempo, eixo horizontal). 4-1BBL era essencial para a produção de TNF durante tempos posteriores depois da estimulação de LPS, mas 4-1BB não era necessário para a promoção de produção de TNF sustentado induzida por LPS. (D) PCR quantitativo de TNF mRNA por macrófagos deficientes de 4-1BBL e de tipo selvagem tratados com LPS (tempo, eixo horizontal). AU: unidades arbitrárias. TNF mRNA definhado em quantidades similares em macrófagos deficientes de 4-1BBL e de tipo selvagem a duas horas depois da estimulação de LPS, mas houve muito menos TNF mRNA em células deficientes de 4-1BBL do que nos macrófagos de tipo selvagem em tempos tardios depois da estimulação de LPS. (E) RNA dot blot de uma análise de continuação nuclear de TNF e transcrição de desidrogenase de fosfato de gliceraldeído (GAPDH; controle) avalia macrófagos deficientes de 4-1BBL e de tipo selvagem estimulados com LPS (100 ng/mL; tempo, raias acima). transcrição de Tnf disparado por LPS a 1 hora depois da estimulação de LPS tanto em macrófagos deficientes de 4-1BBL quanto de tipo selvagem, mas transcrição de Tnf foi reduzida em macrófagos deficientes de 4-1BBL em tempos tardios depois do tratamento de LPS. (F) Análise de PCR de tempo real da estabilidade de TNF mRNA em macrófagos deficientes de 4-1BBL e de tipo selvagem a 3 horas depois da estimulação de LPS. Actinomicina D (10 μg/mL) foi usada para inibir transcrição. Valores são a percentagem que permanece em relação ao valor a 0 hora (conjunto a 100%). A deleção de 4-1BBL tinha uma influência considerável na estabiliade de TNF mRNA. (G) EMSA de extratos nucleares oriundos de macrófagos deficientes de 4-1BBL e de tipo selvagem estimulados LPS (tempo, raias acima), avaliados com sondas radiomarcadas (margem a esquerda). Deleção de 4-1BBL não tinha influência na ativação de NF-kapaB induzido por LPS ou ativação induzida por LPS do fator de transcrição AP-1. (H) Imunoblot de lisados de macrófagos deficientes de 4-1BBL ou de tipo selvagem tratados com LPS (tempo, raias acima). Trajetórias de cinase de MAP e NF-kapaB não são significativamente afetadas por

deleção de 4-1BBL, p-, fosforilado. *, P < 0,01, e **, P < 0,005, versus controle (teste t de Estudante). Dados são média ± D.P. de triplicatos (A-D) e são representativos de dois a três experiências (A-H).

Figura 4A-D são resultados que demonstram que 4-1BBL é exigido para a produção de TNF sustentado em macrófagos de RAW264.7. (A) Células de RAW 264.7 foram estavelmente transfectadas com siRNA de controle contendo pSupressor, ou 4-1BBL-siRNA Nº I ou Nº 2. Os níveis de proteína de 4-1BBL foram medidos por imunomanchamento. (B) Produção de TNF foi medida células de supressão de 4-1BBL e de controle foram tratadas com LPS (100 ng/mL) pelos tempos indicados. (C) Produção de TNF foi medida células de supressão de 4-1BBL e de controle foram tratadas com peptdoglicano (PG, 10 μg/mL), poly I:C (25 μg/mL), LPS (100 ng/mL), CpG (5 μg/mL), ou meio de cultura por 24 horas. Tanto siRNAs eficazmente suprimimidas de expressão de 4-1BBL em células de RAW264.7 (A) quanto inibidas de produção de TNF induzido por ligante LPS e outro TLR (B e C). 4-1BBL não tem nenhum papel ativação de NF-kapaB induzida por LPS em células de RAW264.7 como refletida em degradação de I-kapaB-alfa (D). Dados são apresentados como média + d.p. de três experiências independentes feitas em duplicata. *, P< 0,05, e **, P< 0,01 versus controle. Resultado em (a) é representativo de 3 experiências.

Figura 5A-B são resultados que demonstram que 4-1BB não está envolvido em produção de TNF induzido ppor LPS em macrófagos de RAW264.7. (A) Células de RAW264.7 foram estavelmente transfectadas com siRNA de controle contendo pSupressor, 4-1BB-siRNA Nº 1 ou Nº 2. 4-1BB mRNA foi examinado por RT-PCR. (B) Produção de TNF foi medida no células de supressão de 4-1BB e de controle depois do tratamento de LPS (100 ng/mL) por 24 horas. RNA de interferência pequena eficazamente suprimiu produção de 4-1BB em células de RAW264.7 (A), mas nenhum efeito foi observado na produção de TNF induzido por LPS (B). Dados são apresentados como média ± d.p. de três experiências independentes feitas em duplicata.

Figura 6A-D são resultados que demonstram que 4-1BBL está

envolvido em produção de TNF induzido por ligantes de TLR em macrófagos. (A) Células de 293T foram transfectadas com um (controle) vazio ou vetores de expressão de HA-4-1BBL, juntamente com Flag- TLR2, Flag-TLR3, Flag-TLR4, ou Flag-TLR9. As células foram lisadas 24 horas depois da transfecção. Os lisados de células foram imunomanchados com anticorpos de antiFlag, ou foram imunoprecipitados com anti-HA e então imunomanchados com anticorpos de anti-HA e de antiFlag. Todos os TLRs testados foram puxados para baixo por 4-1BBL nos ensaios de co-imunoprecipitação. (B) Macrófagos deficientes de 4-1BBL e de tipo selvagem foram tratados com Pam3 (1 μg/mL), Polyl:C (25 μg/mL), LPS (100 ng/mL), R848 (100 nM), CpG (5 μg/mL), IL- Ibeta (10 ng/mL), ou meio de cultura (nenhum). A produção de TNF foi medida depois da 24 horas do tratamento. Produção de TNF induzido por (ligante de TLR2) de Pam3, (ligante de TLR3) de Polyl:C, (ligante de TLR7&8) de R848, (ligante TLR9) CpG foram reduzidos em células de 4-1BBL KO. (C) Macrófagos deficientes de TLR4 e de tipo selvagem foram tratados com 0, 1, 2,5 ou 5 μg/mL de CpG DNA e incubados por 24 horas, ou (D) tratados com 1 μg/mL de CpG DNA e sobrenadante de cultura foi coletado nos pontos de tempo indicados para medir produção de TNF. Uma pequena mas redução estatisticamente significativa em produção de TNF induzido por TLR9 em macrófagos deficientes de TLR4 quando uma baixa dose CpG (1 μg/mL) foi usada. Dados são apresentados como média ± d.p. de triplicatos. *, P<0,05, **, P<0,01 , e ***, P< 0,005. Resultados são representativos de duas a quatro experiências.

Figura 7A-F são resultados que demonstram que indução de 4-1BBL e localização de superfície de célula é exigido para produção de TNF sustentado em macrófagos tratados com LPS. (A) Imunoblot de 4-1BBL em lisados oriundo de macrófagos de tipo selvagem e macrófagos deficientes em TLR4 (TLR4 KO), MyD88 (MyD88 KO) ou TRIF (TRIF KO), tratados com LPS (tempo, raias acima). LPS induz expressão total de 4-1BBL em macrófagos em modo dependente de TLR4, MyD88, e TRIF. (B) PCR semiquantitativa de 4-1BBL mRNA em macrófagos de tipo selvagem deixada sem pré-tratamento (nenhum) ou pré-tratada por 1 hora com inibidores de NF-kapaB

(20 μM de sulfasalazina), p38 (10 μM SB203580), Jnk (5 μM SP600125) ou MEK (10 μM PD98059) e então tratada com LPS (tempo, raias acima). 4-1BBL mRNA induzido por LPS foi eficazmente inibido pelo inibidor de NF-kapaB sulfasalazina e o inibidor de proteassoma MG-132 (dados não-mostrados). Além disso, o inibidor de p38 SB203580, o inibidor de Jnk SP600125, e o inibidor de Mek PD98059 também tinham alguns efeitos inibitórios na expressão de 4-1BBL. (C) Análise de RCR de tempo real da estabilidade de 4-1BBL mRNA induzido por LPS (1 hora do tratamento; LPS) ou 4-1BBL mRNA ectopicamente expresso a 18 horas depois da infecção com adenovírus recombinante que codifica 4-1BBL (Adv). Actinomicina D foi usada para inibir transcrição. Valores são a percentagem que permanecem em relação ao valor a 0 hora (conjunto a 100%). Alterações induzidas por LPS em estabilidade de mRNA foram também envolvidas em Expressão de 4-1BBL induzido por LPS. (D) Citometria de fluxo de expressão de 4-1BBL por macrófagos peritoneais de tipo selvagem tratados com LPS (tempo, chave): expressão de superfície a direita; expressão total a esquerda em células tornadas permeáveis com 0,1% saponina. 4-1BBL induzido por LPS está localizado em uma superfície de célula. (E) Microscopia de imunofluorescência de macrófagos peritoneais de tipo selvagem pré-incubados por 1 hora com (+) ou sem (-) brefeldin A (3 μg/mL), então tratados com com LPS (tempo, margem a esquerda) e imunomanchados com anti-4-1BBL. Ampliação original, x 100. Brefeldin A bloqueia translocalização de proteína à superfície celular por inibição de sua translocalização a partir do retículo endoplásmico para o aparelho de Golgi. (F) PCR semiquantitativa de 4-1BBL e TNF mRNA em lisados de células tratadas como descrito em E. Brefeldin A nem afetados a aumento induzido por LPS em 4-1BBL mRNA nem influenciados de TNF mRNA induzido por LPS depois da 1 hora, não reduziu TNF mRNA a 2, 4 e 6 horas. GAPDH (A,B,F): desidrogenase de fosfato de gliceraldeído (controle de carregamento). Data são representativos de três experiências independentes.

Figura 8A-F são resultados que indicam que ligantes de TLR, mas não IL-1beta, induzem expressão de 4-1BBL em macrófagos. Macróga-

fos de tipo selvagem foram tratados com LPS, IL-I beta, Poly I:C, peptdoglicano, CpG DNA, ou R848 por períodos de tempo como indicados. Sobrenandantes de cultura de célula tratadas como nada (nenhum), LPS, ou IL-I beta por 24 horas foram coletados e níveis de IL-6 foram medidos por ELISA. Dados em (B) são apresentados como média ± d.p. de triplicatos. Expressão de 4-1BBL foi analisada por Western blotting com anticorpos de anti-4-1BBL. GAPDH foi usado como um controle. Resultados são representativos de dois a três experiências.

Figura 9A-G são resultados que indicam que a expressão e reticulação de 4-1BBL disparam a produção de TNF. Imunoblot de 4-1BBL (acima) e ELISA da produção de TNF (abaixo) por macrófagos de tipo selvagem (A), macrófagos de tipo selvagem e deficientes de 4-1BB (B), macrófagos de tipo selvagem e deficientes de TLR4 (C), macrófagos de tipo selvagem e deficientes de TLR2 (D) ou macrófagos de tipo selvagem e deficientes de TRIF (E) infectados com várias doses (raias acima e eixos horizontais) de adenovírus que expressa nada (Controle) ou 4-1BBL. PFU: unidades de formação de placa. Produção de TNF induzido por expressão de 4-1BBL em um modo dependente de dose (A) que não necessita 4-1BB (B). indução de TNF é parcialmente diminuída em macrófagos isolados de TLR4-/- camundongos (C) e era menor em macrogáfos deficientes de TLR2 (D). Indução de TNF era independente de TRIF uma vez que deficiência de TRIF não tinha efeito sobre produção de TNF induzido por 4-1BBL (E). (F) ELISA da produção de TNF por macrófagos de tipo selvagem ou macrófagos deficientes em 4-1BBL, MyD88, TRIF, TLR2, TLR4 ou tanto MyD88 quanto TRIF, tratados por 24 horas com Fc anti-humano de cabra (AntiFc; 1,5 μg/mL), 4-1BB-Fc (5 μg/mL), tanto juntos ou só meio de cultura (nenhum). Reticulação de mais do que duas moléculas de 4-1BBL é necessária para disparar a produção de TNF. (G) ELISA da produção de TNF por macrófagos de tipo selvagem incubados por 24 horas com meio de cultura (nenhum) ou LPS sozinho ou em combinação com Fc, 4-1BB-Fc ou anti-4-1BBL (alfa-4-1BBL; 0, 2 ou 5 μg/mL, com anticorpo de isotipo IgG2a adicionado a um total de 5 μg/mL cada). Tanto anticorpos de 4-1BB-Fc quanto anti-4-1BBL

inibiram a produção de TNF induzido por LPS. *, P <0,05, **, P < 0,01 , e ***, P < 0,005, versus controle (teste t de Estudante). Dados são a média ± d.p. de amostras em triplicata e são representativos de duas a quatro experiências.

FIG 10A-I indicam que dois complexos de TLR4 sequenciais existem. (A) Imunoensaio de macrófagos de tipo selvagem tratados com LPS (tempo, raias acima); lisados de célula total (Lisados; topo) ou lisados imunoprecipitados com antiTLR4, anti- MyD88 ou anti-4-1BBL foram analisados por imunoblot com anti-4-1BBL, antiTLR4 e/ou anti-MyD88. Contorno tracejado, anticorpo de isotipo (controle negativo para a imunoprecipitação); contorno sólidos, controle positivo para imunoblot de 4-1BBL ou MyD88. Em macrógafos tratados com LPS, o complexo de MyD88-TLR4 é responsável pelas respostas celulares iniciais, e o complexo de 4-1BBL-TLR4 está envolvido na sustentação da produção de TNF. (B) Flag-TLR4, mas não flag-4-1BBL, foi puxado para baixo MyD88 que indica que MyD88 não é capaz de interagir com 4-1BBL. (C) 4-1BBL interage com TRAF6, mas não TRAF2. (D) Supressão de TRAF6 diminuiu a produção de citocina induzida por IL-Ibeta, LPS e PolyLC, , mas não tem nenhum efeito sobre produção de IL-6 induzida por TNF. (E) EMSA de extrato nuclear oriundos de macrófagos de tipo selvagem infectados (tempo, raias acima) com adenovírus que expressa GFP (Adv-GFP) ou 4-1BBL (Adv-4-1BBL), analisados com sondas radiomarcadas (margem a esquerda). LPS (direita ao fundo), amostra tratada com LPS (controle positivo para NF-kapaB). Expressão de CREB e C/EBP ativadas por 4-1BBL mas não NF-kapaB. (F) Imunoblot de várias proteínas (margem a esquerda) em lisados totais de células tratadas como descrito em E. (G) ELISA da produção de TNF por macrófagos de tipo selvagem inectados com adenovírus que expressa 4-1BBL, tratados por 6 h depois da infecção com inibidores de NF-kapaB (20 μM de sulfasalazina), p38 (10 μM de SB203580), Jnk (5 μM de SP600125) ou MEK (10 μM de PD98059) e analisados por 24 hora depois da infecção. *, P < 0,01 , e **, P < 0,005, versus controle (teste t de Estudantet). (H) Topo, PCR semiquantitativo de TNF mRNA em macrófagos de tipo selvagem infectados com adenovírus que ex-

pressa 4-1BBL (tempo, raias acima). Fundo, estabilidade de TNF mRNA em macrófagos de tipo selvagem infectados por 18 horas com adenovírus ou tratados por 1 hora com LPS. Actinomicina D foi usada para inibir transcrição. Valores são a percentagem que permanece em relação ao valor a 0 hora (conjunto a 100%). Dados representam a média ± d.p. de triplicatos (G) e são representativos de duas (A,G,H), três (E) ou quatro (F) experiências. Nenhuma degradação de IkapaBalfa foi observada em células que ultra-expressam 4-1BBL (F). Expressão de 4-1BBL disparou alguma fosforilação de p38, Jnk e Erk (F), e inibição de p38, Jnk e Erk (mas não NF-kapaB) reduziu produção de TNF mediada por 4-1BBL (G). Deleção de 4-1BBL resultou transcrição de TNF mRNA induzido por LPS mais baixa em tempos tardios, enquanto ultra-expressão de 4-1BBL resultou em mais TNF mRNA (H). Transcritos de TNF tinham semi-vidas em células que ultra-expressam células tratadas com LPS e 4-1BBL (H). (I) Um modelo da sinalização sequencial em macrógafos tratados com LPS. Ligação de TLR4-LPS leva a expressão dependente de MyD88 e TRIF de genes inflamatórios incluindo TNF no período de umas poucas horas. 4-1BBL é induzido por essa resposta precoce e desloca para a superfície celular onde interage com TLR e inicia sinalização para a expressão sustentada de genes inflamatórios tal como TNF.

Figura 11A-F sumariza daos que ilustram o envolvimento de 4-1BBL em indução de IL-6. 4-1BBL-/-camundongos produzem significativamente menos IL-6 em resposta a LPS do que camundongos de tipo selvagem (A). Macrófagos oriundos de camundongos de tipo selvagem produziram significativamente mais IL-6 do que macrófagos oriundos de camundongos de 4-1BBL-/- (B). Macrófagos de tipo selvagem tratados com Pam3, PolyLC, LPS, R848, e CpG produziram significativamente mais IL-6 do que macrófagos de 4-1BBL/- tratados com os mesmos indutores (C). Macrófagos incubados com LPS e 4-1BB-Fc produziram significativamente menos IL-6 do que macrófagos incubados com LPS sozinho, e macrófagos incubados com LPS e concentrações crescentes de anticorpos de anti-4-1BBL exibiam níveis descrescentes da produção de IL-6 (D). Células de RAW264.7 em que a expressão de 4-1BBL é reduzida por siRNA específico de 4-1BBLs signifi-

cativamente menos IL-6 do que células de RAW264.7 tratadas com siRNA de controle (E). Células em que expressão de 4-1BBL é reduzida por siRNA específico de 4-1BBL tratadas com peptdoglicano (PG, 10 μg/mL), PolyI:C (25 μg/mL), LPS (100 ng/mL), CpG (5 μg/mL) produzem significativamente menos IL-6 do que células transfectadas com siRNA de controle e tratadas com peptdoglicano (PG, 10 μg/mL), PolyI:C (25 μg/mL), LPS (100 ng/mL), CpG (5 μg/mL) (Figura 11F).

Figura 12 é um diagrama esquemático que ilustra os domínios estruturais de 4-1BBL de camundongo (A) e 4-1BBL de ser humano (B). "Cyt" indica domínio citoplásmico, "TM" indica domínio transmembrana, "Ext" indica domínio extracelular e "Sig" indica peptídeo de sinal.

Figura 13 é um diagrama esquemático que ilustra os domínios estruturais de 4-1BB de camundongo (A), 4-1BB de ser humano (B), e proteína de fusão de Ig-Fc de 4-1BB-humano de camundongo solúvel (C). "Cyt" indica domínio citoplásmico, "TM" indica domínio transmembrana, "Ext" indica domínio extracelular e "Sig" indica peptídeo de sinal.

Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção envolve a revelação do papel de ligante de 4-1BB (4-1BBL) na produção de citocinas pró-inlfamatórias na ativação de macrógafo. Em particular, a invenção envolve a revelação que 4-1BBL age em eventos de sinalização de fase tardia que resultam em produção de citocinas inflamatórias sustentadas tal como TNF que leva a inflamação utlra-sustentada. A função de 4-1BBL em sinalização de fase tarda é independente de 4-1BB. Assim, a invenção provê agentes de bloqueamento de 4-1BBL, bem como composições farmacêuticas e artigos de fabricação compreendendo tais agentes de bloqueamento que podem ser usados nos métodos para a produção de redução de citocina inflamatória tais como TNF e IL-6 de um modo independente de 4-1BB. A invenção provê métodos para a redução de inflamação, métodos para a produção de redução de citocina inflamatória, bem como métodos para a separação quanto a agentes de bloqueamento de 4-1BBL.

Polipeptídeos de 4-1BBL e ácidos nucleicos.

Os estudos descritos aqui mostram que indução inicial de expressão de TNF e produção de TNF sustentado em macrófagos são regulados por eventos de sinalização de fase precoce e tardia. Produção de TNF mediada por receptor de tipo Toll 4 (TLR) em geral ocorre no período de umas poucas horas e é sustentada por quase um dia (vide Galanos e outros, Proc. Natl. Acad. ScL USA 76: 5939-43 (1979). Produção de TNF sustentado envolve sinalização de TLR tardio que é controlada por um ligante de 4-1BB de superfície de célula (4-1BBL). O 4-1BBL funciona independentemente do gene de resposta primária de diferenciação mielóide 88 (MyD88) e o receptor de interleucina 1/Toll/proteína de adaptador de resistência (TRIF), mas é dependente do fator associado a receptor de TNF 6 (TRAF6). Assim, o signalosome TLR4/MyD88/TRIF é responsável pela expressão de fase de iniciação e precoce de genes inflamatórios, enquanto o 4-1BBL é responsável pela fase tardia de produção de TNF sustentado. O 4-1BBL é um das proteínas induzida precocemente em macrófago em resposta a estímulos inflamatórios e é apenas induzido na fase precoce da ativação de macrógafo. O 4-1BBL recentemente sintetizado desloca sobre a superfície celular para gerar uma nova fase de sinalização para a produção de TNF sustentado de fase tardia. Assim, doenças associadas a ultraprodução de uma citocina inflamatória tal como, por exemplo, TNF ou IL-6, ou de outro modo supressão na regulação de respostas inflamatórias sustentadas pode ser tratada com agentes que podem inibir ou reduzir a atividade de polipeptídeo de 4-1BBL ou da expressão de um ácido nucleico de 4-1BBL.

4-1BBL (ligante de 4-1BB) é um membro da família de TNF da glicoproteína de superfície de célula de tipo II no antígeno activado que apresenta células tais como macrófagos e células B ativadas células tais como células B ativadas. Polipeptídeos de 4-1BBL são conhecidos na técnica e podem ser de qualquer fonte, por exemplo, de um camundongo, um coelho, um porco, um cachorro, uma vaca, um macaco, ou um ser humano. Um exemplo de um polipeptídeo de 4-1BBL de camundongo é o seguinte (Número de acesso de GenBank NP_033430):

1 MDQHTLDVED TADAlphaRHPAGT SCPSDAALLR DTGLLADAAL LSDTVRPTNA

51 ALPTDAAYPA VNVRDREAAW PPALNFCSRH PKLYGLVALV LLLLIAACVP

101 IFTRTEPRPA LTITTSPNLG TRENNADQVT PVSHIGCPNT TQQGSPVFAK

151 LLAKNQASLC NTTLNWHSQD GAGSSYLSQG LRYEEDKKEL VVDSPGLIYV

201 FLELKLSPTF TNTGHKVQGW VSLVLQAKPQ VDDFDNLALT VELFPCSMEN

251 KLVDRSWSQL LLLKAGHRLS VGLRAYLHGA QDAYRDWELS YPNTTSFGLF

301 LVKPDNPWE (SEQ ID NO: 1)

Um exemplo de um polipeptídeo de 4-1BBL de ser humano é o seguinte (Número de acesso de GenBank P41273):

1 MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA LVAGLLLLLL LAAACAVFLA

51 CPWAVSGARA SPGSAASPRL REGPELSPDD PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV

101 LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR

151 RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ

201 GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS

251 PRSE (SEQ ID NO: 2)

4-1BBL pode ser identificado com base na função ou sequência. Por exemplo, embora a invenção seja baseada, em parte, na revelação que em macrófagos, 4-1BBL-media a produção de TNF de um modo que é independente de 4-1BB, 4-1BBL é também conhecido como interagindo com 4-1BB, um membro da superfamília de receptor de TNF das proteínas de transmembrana expresso nas células CD4 e CD8 ativadas para produzir um sinal co-estimulatório durante a ativação de receptor de célula T. Watts, Annu. Rev. Immunol. 23:23-68 (2005). Além disso, os domínios funcionais de 4-1BBL de ser humano e camundongo são ilustrados Figura 12.

"4-1BBL" ou "polipeptídeo de 4-1BBL," como usado aqui, inclui qualquer fragmento biologicamente ativo do polipeptídeo de comprimento total como qualquer fragmento que é adequado para o uso como um imunógeno para aumentar anticorpo dirigido a um 4-1BBL biologicamente ativo. Assim, um polipeptídeo de 4-1BBL pode ter uman sequência de aminoácidos que é substancialmente idêntica à sequência indicada na SEQ ID NO: 1 ou 2. Em geral, o termo "substancialmente idêntica" significa uma sequência de aminoácidos difere da sequência de referência apenas por substituições de aminoácidos conservadores, ou exemplo, substituição de um aminoácido

para um outra da mesma classe (por exemplo, valina para glicina, argina para lisina) ou por uma ou mais substituições, deleções ou inserções não conservadoras localizadas nas posições da sequência de aminoácidos que não destrõem a função da proteína. Uma sequência de polipeptídeos (ou ácidos nucleicos) é substancialmente idêntica à sequência de referência se ela exiba cerca de 50% de homologia, por exemplo, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou mais do que 95% de homologia à sequência de referência. Um polipeptídeo de 4-1BBL, por exemplo, pode ser pelo menos cerca de 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou mais do que 90% idêntica a SEQ ID NO: 1 e 2.

Um ácido nucleico de 4-1BBL é um polímero de DNA ou RNA que codifica um polipeptídeo de 4-1BBL. um ácido nucleico de 4-1BBL pode ser DNA genômico bem como RNA mensageiro. Ele pode ser incorporado em um vetor de plasmídio vector ou DNA viral. Ele pode ser de fita único ou de fita dupla, circular ou linear. Exemplos de ácidos nucleicos de 4-1BBL incluem, sem limitação, aqueles que codificam as sequências de polipeptídeos de 4-1BBL de camundongo e ser humano indicadas na SEQ ID nº 1 e 2. Um exemplo de um ácido nucleico de 4-1BBL que codifica o polipeptídeo de 4-1BBL de camundongo (SEQ ID NO: 1) é a seguinte sequência que pode ser encontrada no GenBank sob o número de acesso NM_009404:

1 atggaccagc acacacttga tgtggaggat accgcggatg ccagacatcc

51 agcaggtact tcgtgcccct cggatgcggc gctcctcaga gataccgggc

101 tcctcgcgga cgctgcgctc ctctcagata ctgtgcgccc cacaaatgcc

151 gcgctcccca cggatgctgc ctaccctgcg gttaatgttc gggatcgcga

201 ggccgcgtgg ccgcctgcac tgaacttctg ttcccgccac ccaaagctct

251 atggcctagt cgctttggtt ttgctgcttc tgatcgccgc ctgtgttcct

301 atcttcaccc gcaccgagcc tcggccagcg ctcacaatca ccacctcgcc

351 caacctgggt acccgagaga ataatgcaga ccaggtcacc cctgtttccc

401 acattggctg ccccaacact acacaacagg gctctcctgt gttcgccaag

451 ctactggcta aaaaccaagc atcgttgtgc aatacaactc tgaactggca

501 cagccaagat ggagctggga gctcatacct atctcaaggt ctgaggtacg

551 aagaagacaa aaacgagttg gtggtagaca gtcccgggct ctactacgta

601 tttttggaac tgaagctcag tccaacattc acaaacacag gccacaaggt

651 gcagggctgg gtctctcttg ttttgcaagc aaagcctcag gtagatgact

701 ttgacaactt ggccctgaca gtggaactgt tcccttgctc catggagaac

751 aagttagtgg accgttcctg gagtcaactg ttgctcctga aggctggcca

801 ccgcctcagt gtgggtctga gggcttatct gcatggagcc caggatgcat

851 acagagactg ggagctgtct tatcccaaca ccaccagctt tggactcttt

901 cttgtgaaac ccgacaaccc atgggaatga (SEQ ID NO: 3)

Um exemplo de um ácido nucleico de 4-1BBL que codifica o polipeptídeo de 4-1BBL de ser humano (SEQ ID NO: 2) é a seguinte sequência que pode ser encontrada em GenBank sob o número de acesso U03398:

1 gtcatggaat acgcctctga cgcttcactg gaccccgaag ccccgtggcc

51 tcccgcgccc cgcgctcgcg cctgccgcgt actgccttgg gccctggtcg

101 cggggctgct gctgctgctg ctgctcgctg ccgcctgcgc cgtcttcctc

151 gcctgccccc gggccgtgtc cggggctcgc gcctcgcccg gctccgcggc

201 cagcccgaga ctccgcgagg gtcccgagct ttcgcccgac gatcccgccg

251 gcctcttgga cctgcggcag ggcatgtttg cgcagctggt ggcccaaaat

301 gttctgctga tcgatgggcc cctgagctgg tacagtgacc caggcctggc

351 aggcgtgtcc ctgacggggg gcctgagcta caaagaggac acgaaggagc

401 tggtggtggc caaggctgga gtctactatg tcttctttca actagagctg

451 cggcgcgtgg tggccggcga gggctcaggc tccgtttcac ttgcgctgca

501 cctgcagcca ctgcgctctg ctgctggggc cgccgccctg gctttgaccg

551 tggacctgcc acccgcctcc tccgaggctc ggaactcggc cttcggtttc

601 cagggccgct tgctgcacct gagtgccggc cagcgcctgg gcgtccatct

651 tcacactgag gccagggcac gccatgcctg gcagcttacc cagggcgcca

701 cagtcttggg actcttccgg gtgacccccg aaatcccagc cggactccct

751 tcaccgaggt cggaataacg cccagcctgg gtgcagccca cctggacaga

801 gtccgaatcc tactccatcc ttcatggaga cccctggtgc tgggtccctg

851 ctgctttctc tacctcaagg ggcttggcag gggtccctgc tgctgacctc

901 cccttgagga ccctcctcac ccactccttc cccaagttgg accttgatat

951 ttattctgag cctgagctca gataatatat tatatatatt atatatatat

1001 atatatttct atttaaagag gatcctgagt ttgtgaatgg actttttttag

1051 aggagttgtt ttgggggggg ggtcttcgac attgccgagg ctggtcttga

1101 actcctggac ttagacgatc ctcctgcctc agcctcccaa gcaactggga

1151 ttcatccttt ctattaattc attgtactta tttgcctatt tgtgtgtatt

1201 gagcatctgt aatgtgccag cattgtgccc aggctagggg gctatagaaa

1251 catctagaaa tagactgaaa gaaaatctga gttatggtaa tacgtgagga

1301 atttaaagac tcatccccag cctccacctc ctgtgtgata cttgggggct

1351 agctttttte tttctttctt ttttttgaga tggtcttgtt ctgtcaacca

1401 ggctagaatg cagcggtgca atcatgagtc aatgcagcct ccagcctcga

1451 cctcccgagg ctcaggtgat cctcccatct cagcctctcg agtagctggg

1501 accacagttg tgtgccacca cacttggcta actttttaat ttttttgcgg

1551 agacggtatt gctatgttgc caaggttgtt tacatgccag tacaatttat

1601 aataaacact catttttcc (SEQ ID NO: 4)

Um ácido nucleico de 4-1BBL pode também codificar um fragmento das sequências de polipeptídeos indicado na SEQ ID NO: 1 e 2 com a condição que o ácido nucleico codifique um polipeptídeo biologicamente ativo ou fragemento que é adequado para o uso como um imunógeno para aumentar anticorpo específico de 4-1BBL como discutido acima.

Agentes de Bloqueamento de 4-1BBL em geral

Um agente de bloqueamento de 4-1BBL pode ser uma macromolécula ou uma molécula pequena que inibe ou reduz a expressão e/ou atividade de 4-1BBL. Um agente de bloqueamento de 4-1BBL pode inibir ou reduzir a atividade de 4-1BBL. Exemplos de tais agentes de bloqueamento de 4-1BBL incluem, sem limitação, um anticorpo específico de 4-1BBL, uma forma solúvel de 4-1BB, e um agente ou molécula pequena que interfere com translocalização de proteína para a superfície celular tal como Brefeldin A. Esses agentes de bloqueamento de 4-1BBL agem por interferência com oligomerização de 4-1BBL e/ou interferem com sua interação com moléculas de sinalização apropriadas, por exemplo, TLRs e TRAF6, nos eventos de sinalização de fase tardia envolvidos na produção de TNF. O termo "oligomerização de 4-1BBL" como usado aqui, refere-se à formação de um agregado de moléculas de 4-1BBL que é necessária para a produção mediada por 4-1BBL de citocinas inflamatórias tal como, por exemplo, TNF ou IL-6. Oligomerização 4-1 refere-se à formação de um agregado de mais do que

duas moléculas de 4-1BBL, por exemplo, um agregado de três ou quatro moléculas de 4-1BBL. Um agente de bloqueamento de 4-1BBL pode também interferir com translocalização de proteína para a superfície celular como localização de superfície de célula de 4-1BBL é exigida para o funcionamento adequado durante fase de sinalização tardia.

Um agente de bloqueamento de 4-1BBL pode também agir por inibição de ou redução de expressão de um ácido nucleico de 4-1BBL. Um agente de bloqueamento de 4-1BBL pode agir no nível transcritivo ou traducional tal que a quantidade de 4-1BBL produzida pela célula é alterada. Um agente de bloqueamento de 4-1BBL pode diminuir a produção de transcritos de 4-1BBL mRNA ou diminuir a estabilidade dos transcritos de mRNA. Esses agentes de bloqueamento incluem, sem limitação, um oligonucleotídeo tais como um RNA de antissenso, uma siRNA e uma ribozima. Tal agente de bloqueamento de 4-1BBL com base em oligonucleotideo pode hibridizar para dar um ácido nucleico de 4-1BBL sob condições fisiológicas (por exemplo, cerca de 37°C, pH de 7 a 7,8, e concentrações fisiológicas de eletrólito) ou a condições rigoras ou altamente rigorosas e inibir ou reduzir expressão do ácido nucleico de 4-1BBL. Esses agentes de bloqueamento podem também incluir inibidores de outras moléculas que estão envolvidas na atividade ou expressão de 4-1BBL.

Um oligonucleotídeo é um polímero de nucleotídeos de ribose ou nucleotídeos de desoxirribose tendo mais do que 3 nucleotídeos de comprimento. Um oligonucleotídeo pode incluir nucleotídeos de ocorrência natural; sintéticos, modificados ou pseudo-nucleotídeos tais como fosforotiolatos; bem como nucleotídeos tendo um rótulo detectável tal como P^{32}, biotina ou digoxigenina.

Um oligonucleotídeo que pode reduzir a expressão de um ácido nucleico de 4-1BBL, que é um oligonucleotídeo da invenção, pode ser totalmente complementar ao ácido nucleico de 4-1BBL. Alternativamente, alguma variabilidade entre as sequências podem ser permitidas. Um oligonucleotídeo que pode hibridizar para dar um ácido nucleico de 4-1BBL sob condições fisiológicas, por exemplo, temperaturas fisiológicas e concentrações de

sal, ou sob condições de hibridização rigorosas ou altamente rigorosas, é suficientemente complementar para inibir expressão de um ácido nucleico de 4-1BBL. Em geral, condições de hibridização rigorosas são selecionados serem cerca de 5°C mais baixas do que o ponto de fusão térmico (Tm) para a sequência específica a uma condição iônica definida e pH. No entanto, condições rigorosas incluem temperaturas na faixa de cerca de 1°C a cerca de 20°C mais baixas do que o ponto de fusão térmico da sequência selecionada, dependendo do grau desejado de severidade como de outra maneira qualificada aqui. Oligonucleotídeos inibitórios que compreendem, por exemplo, 2, 3, 4, ou 5 ou mais extensões de nucleotídeos contíguos que são precisamente complementares a uma sequência de codificação de 4-1BBL, cada um separado por uma extensão de nucleotídeos contíguos que não são complementares às sequências de codificação adjacentes, podem inibir a função de um ácido nucleico de 4-1BBL. Em geral, cada extensão de nucleotídeos contíguos é pelo menos 4, 5, 6, 7, ou 8 ou mais nucleotídeos de comprimento. Sequências de intervenção não complementares podem ser 1, 2, 3, ou 4 nucleotídeos de comprimento. Aquele versado na técnica pode facilmente usar o ponto de fusão calculado de um oligonucleotídeo hibridizado para dar um ácido nucleico de senso para estimar o grau de desemparelhamento que será tolerado para a inibição de expressão de um ácido nucleico alvo particular. Um agente de bloqueamento de 4-1BBL com base em oligonucleotideo da invenção incluem, por exemplo, um RNA de interferência pequena (siRNA), um ácido nucleico de antissenso ou uma ribozima.

Um agente de bloqueamento de 4-1BBL inibe ou reduz a expressão e/ou atividade de 4-1BBL por qualquer quantidade tal como, por exemplo, por 2%, 5%, 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, 95% ou 100%. A atividade de 4-1BBL pode ser determinada usando-se métodos conhecidos na técnica incluindo os métodos descritos aqui, tal como, sem limitação, analisando quanto a produção de TNF sustentado, determinação de se 4-1BBL interage com TLRs ou TRAF6, por exemplo, e determinação de se 4-1BBL esteja a uma superfície celular. A expressão de 4-1BBL pode se determinada também usando-se métodos conhecidos na técnica incluindo, sem limitação,

hibridização de northern para determinar o nível de transcrito de 4-1BBL ou hibridização de western para determinar o nível de polipeptídeo de 4-1BBL. Exemplos de vários tipos de agentes de bloqueamento de 4-1BBL são discutidos em detalhes abaixo.

Anticorpo Específico de 4-1BBL

Um agente de bloqueamento de 4-1BBL pode ser um anticorpo antagonístico dirigido contra um polipeptídeo de 4-1BBL. O termo "anticorpo" refere-se a uma molécula de imunoglobolina, por exemplo, um anticorpo monoclonal, e uma porção imunologicamente ativa de uma molécula de imunoglobolina. Um anticorpo monoclonal é uma população de moléculas de anticorpo que liga especificamente com a particular epítopo de antígeno. Porções imunologicamente ativas da molécula de imunoglobolinas incluem fragmentos de F(ab) e F(ab')2. Um anticorpo de anti-4-1BBL pode ser, sem limitação, um anticorpo de camundongo, quimérico, humanizado e/ou totalmente humano. Um anticorpo de camundongo é um anticorpo derivado totalmente de uma fonte de camundongo por exemplo, um anticorpo derivado de hibridoma de camundongo gerado a partir da fusão de uma célula de mieloma de camundongo e uma célula de linfócito B de camundongo. Um anticorpo quimérico é um anticorpo que tem regiões variáveis derivadas de uma fonte não humana, por exemplo, camundongo ou primata, e regiões constantes derivads de uma fonte de ser humano. Um anticorpo humanizado tem regiões de ligação de antígeno, por exemplo, regiões de determinação de complementaridade, derivado de uma fonte de camundongo, e as regiões variáveis restantes e regiões constantes derivadas de uma fonte de ser humano. Um anticorpo totalmente humano oriundo de células humanas ou derivadas de camundongos transgênicos que portam genes de anticorpo de ser humano.

Um anticorpo dirigido contra polipeptídeo de 4-1BBL é um anticorpo específico de 4-1BBL, e como tal, se ligará a um polipeptídeo de 4-1BBL sem ligação a um polipeptídeo que não é 4-1BBL. Um anticorpo específico de 4-1BBL é um anticorpo de antagonista pelo fato de que interfere como ou bloqueia função de 4-1BBL adequada. Por exemplo, vide Figura

2A-D. Um anticorpo de antagonista pode, por exemplo, interferir com oligomerização de mais do que dois 4-1BBL ou bloqueia ligação a moléculas de sinalização a jusante envolvidas na produção de TNF sustentado, por exemplo, TLRs ou TRAF6, tal que produção de citocina inflamatória é reduzida. Por exemplo, tal anticorpo de antagonista pode ligar com dois 4-1BBL e prevenir a formação de um agregado de mais do que dois 4-1BBL que é necessário para mediar produção de citocina. Tal anticorpo de antagonista pode também se ligar a 4-1BBL em uma região que preclude ligando-se a moléculas de sinalização a jusante tais como, por exemplo, TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9 e TRAF6 que são necessárias para mediar produção de citocina.

Se o anticorpo de anti-4-1BBL é um anticorpo de antagonista pode ser misturado usando-se métodos descritos aqui. Por exemplo, a produção de citocina inflamatória tal como TNF pode ser determinado na presença ou na ausência do anticorpo. Um anticorpo é um anticorpo de antagonista se sua presença resultar em uma diminuição no nível e duração de produção de citocina inflamatória.

Métodos para gerar anticorpos são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, um anticorpo policlonal de 4-1BBL pode ser preparado por imunização de um mamífero adequado com um polipeptídeo de 4-1BBL isolado ou um fragmento antigênico do polipeptídeo de 4-1BBL. O mamífero pode ser, por exemplo, um coelho, um cabra, ou um camundongo. O polipeptídeo de 4-1BBL ou fragmento antigênico pode ser expresso usando-se tecnologia de DNA recombinante, preparado por síntese química, ou purificado usando-se técnicas de purificação de proteína padrão. No tempo apropriado depois da imunização, moléculas de anticorpo podem ser isoladas do mamífero, por exemplo, do sangue ou outro fluido do mamífero, e ulteriormente purificadas usando-se técnicas padrão que incluem, sem limitação, precipitação usando-se sulfato de amônio, cromatografia de filtração de gel, cromatografia de troca de íons ou cromatografia por afinidade usando-se proteína A. Além disso, as celulas de produção de anticorpo do mamífero podem ser isoladas ou usadas para preparar células de hibridoma que se-

cretam anticorpos monoclonais de 4-1BBL. Técnicas para a preparação de células de hibridoma de secreção de anticorpo monoclonal são conhecidos na técnica. Vide, por exemplo, Kohler e Milstein, Nature 256:495-97 (1975) e Kozbor e outros, Immunol Today 4: 72 (1983). Anticorpos monoclonais de 4-1BBL podem também ser preparadas usando-se outros métodos conhecidos na técnica, tal como, por exemplo, expressão de uma molécula de DNA recombinante, ou separação de um biblioteca de imunoglobulina combinatorial recombinante usando-se polipeptídeo de 4-1BBL.

Métodos para gerar anticorpos monoclonais quiméricos e humanizidos são também conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, métodos que envolvem tecnologia de DNA recombinante. Um anticorpo quimérico pode ser produzido por expressão de um ácido nucleico que codifica uma região variável não humana e uma região constante de ser humano de uma molécula de anticorpo. Vide, por exemplo, Morrison e outros, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 86: 6851 (1984). Um anticorpo humanizado pode ser produzido por expressão de um ácido nucleico que codifica regiões de ligação de antígeno de não-humano (regiões de determinação de complementaridade) e uma região variável de ser humano (sem regiões de ligação de antígeno) e regiões constantes de ser humano. Vide, por exemplo, Jones e outros, Nature 321 :522-24 (1986); e Verhoeven e outros, Science 239:1534-36 (1988). Anticorpos totalmente humanos podem podem ser produzidos por imunização de camundongos transgênicos engenheirados que expressam apenas genes de cadeia leve ou pesada. Nesse caso, anticorpos monoclonais terapeuticamente úteis podem então ser obtidos usando-se tecnologia de hibridoma convencional. Vide, por exemplo, Lonberg & Huszar, Int. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995). Ácido nucleicos e técnicas envolvidos no projeto e produção de anticorpos são bem conhecidos na técnica. Vide, por exemplo, Batra e outros, Hybridoma 13:87-97 (1994); Berdoz e outros, PCR Métodos Appl. 4: 256-64 (1995); Boulianne e outros, Nature 312:643-46 (1984); Carson e outros, Adv. Immunol. 38:274-31 1 (1986); Chiang e outros, Biotécnicas 7:360-66 (1989); Cole e outros, Mol. Cell. Biochem. 62:109-20 (1984); Jones e outros, Nature 321 : 522-25 (1986); Larrick e outros, Biochem Bio-

phys. Res. Commun. 160:1250-56 (1989); Morrison, Annu. Rev. Immunol. 10:239-65 (1992); Morrison e outros, Proc. Nat 'l Acad. ScL USA 81 : 6851-55 (1984); Orlandi e outros, Pro. Nat 'l Acad. Sci. U.S.A. 86:3833-37 (1989); Sandhu, Crit. Rev. Biotechnol. 12:437-62 (1992); Gavilondo & Larrick, Biotécnicas 29: 128-32 (2000); Huston & George, Hum. Anticorpos. 10: 127-42 (2001); Kipriyanov & Le Gall, Mol. Biotechnol. 26: 39-60 (2004).

4-1BB Solúvel

Um agente de bloqueamento de 4-1BBL também pode ser uma molécula de 4-1BB solúvel. 4-1BB é um membro da família de receptor de TNF de proteínas de transmembrana tipo I expresso nas células T ativadas. Vide Watts, Annu. Rev. Immunol. 23:23-68 (2005). Um exemplo de a 4-1BB de camundongo é o seguinte sequência, que pode ser encontrada em GenBank sob o número de acesso NP_035742:

1 MGNNCYNVVV IVLLLVGCEK VGAVQNSCDN CQPGTFCRKY NPVCKSCPPS

51 TFSSIGGQPN CNICRVCAGY FRFKKFCSST HNAECECIEG FHCLGPQCTR

101 CEKDCRPGQE LTKQGCKTCS LGTFNDQNGT GVCRPWTNCS LDGRSVLKTG

151 TTEKDVVCGP PVVSFSPSTT ISVTPEGGPG GHSLQVLTLF LALTSALLLA

201 LIFITLLFSV LKWIRKKFPH IFKQPFKKTT GAAQEEDACS CRCPQEEEGG

251 GGGYEL (SEQ ID NO: 5)

Um exemplo de um ser humano 4-1BB é o seguinte sequência, que pode ser encontrada em GenBank sob o número de acesso NP_001552:

1 MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP

51 NSFSSAGGQR TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS

101 MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG

151 TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE PGHSPQIISF FLALTSTALL

201 FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG CSCRFPEEEE

251 GGCEL (SEQ ID NO: 6)

Polipeptídeos de 4-1BB tipicamente incluem uma sequência de sinal, um domínio extracelular, um domínio transmembrana, e um domínio citoplásmico como mostrado na Figura 13 para os polipeptídeos de ser humano e de camundongo.

4-1BB solúvel refere-se a um polipeptídeo de 4-1BB que não está ligado, como uma proteína de transmembrane, à célula a partir da qual ele é produzido e pode inibir e/ou reduzir a atividade de 4-1BBL. Por exemplo, um 4-1BB solúvel pode ser um único polipeptídeo que consiste no domínio extracelular do 4-1BB de comprimento total. Como usado aqui, o "4-1BB de comprimento total" é o polipeptídeo expresso por uma célula que tem um ácido nucleico endógeno que o codifica. O 4-1BB de comprimento total terá um domínio extracelular, um domínio transmembrana e um domínio citoplásmico. Pode ou não pode ter um peptídeo de sinal. em contraste com isso, um 4-1BB solúvel é qualquer forma de 4-1BB outro que não o comprimento total contanto que ele não esteja ligado a uma célula como uma proteína de transmembrana. Exemplos de um polipeptídeo de 4-1BB solúvel é um polipeptídeo que corresponde ao domínio extracelular do polipeptídeo de comprimento total ou um polipeptídeo de fusão que consiste no domínio extracelular de 4-1BB fundido em seu C-terminal com um segmento de polipeptídeo não-relacionado tal como o fragmento de Fc de uma molécula de imunoglobolina, por exemplo, um fragmento de IgGi Fc, ou qualquer porção de fusão de tag de proteináceo convencional ou de fusão tais como GFP, HA, e FLAG e GST. Um 4-1BB solúvel pode ser um único polipeptídeo ou um dímero tal como o 4-1BB/Fc de camundongo discutido nos Exemplos. Um exemplo de um 4-1BB solúvel que é também um dímero é o polipeptídeo de 4-1BB de camundongo/Ig-Fc de ser humano discutidos nas seção do exemplo.

Um exemplo de um polipeptídeo de 4-1BB solúvel é o domínio extracelular de 4-1BB camundongo tendo a seguinte sequência:

23 VQNSCDN CQPGTFCRKY NPVCKSCPPS

51 TFSSIGGQPN CNICRVCAGY FRFKKFCSST HNAECECIEG FHCLGPQCTR

101 CEKDCRPGQE LTKQGCKTCS LGTFNDQNGT GVCRPWTNCS LDGRSVLKTG

151 TTEKDVVCGP PVVSFSPSTT ISVTPEGGPG GHSLQV (SEQ ID NO: 7)

Outro exemplo de um polipeptídeo de 4-1BB é o domínio extracelular de 4-1BB humano tendo a seguinte sequência:

SLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP

51 NSFSSAGGQR TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS

101 MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG

151 TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE PGHSP (SEQ ID NO: 8)

Outros exemplos de polipeptídeos de 4-1BB solúveis incluem os primeiros 186 aminoácidos do 4-1BB de camundongo ou os primeiros 185 aminoácidos do 4-1BB de ser humano mostrados na SEQ ID NO: 20 e 21, respectivamente.

1 MGNNCYNVVV IVLLLVGCEK VGAVQNSCDN CQPGTFCRKY NPVCKSCPPS

51 TFSSIGGQPN CNICRVCAGY FRFKKFCSST HNAECECIEG FHCLGPQCTR

101 CEKDCRPGQE LTKQGCKTCS LGTFNDQNGT GVCRPWTNCS LDGRSVLKTG

151 TTEKDVVCGP PVVSFSPSTT ISVTPEGGPG GHSLQV (SEQ ID NO: 20)

1 MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP

51 NSFSSAGGQR TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS

101 MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG

151 TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE PGHSP (SEQ ID NO: 21)

Um polipeptídeo de 4-1BB solúvel poderia também ter um ou mais aminoácidos adicionais no terminal N ou C de SEQ ID NO: 7, 8, 20 ou 21 contanto que o polipeptídeo seja capaz de inibir ou reduzir a atividade de 4-1BBL, e se o polipeptídeo for produzido por uma célula, ele não é incorporado na membrana da célula como uma proteína de transmembrana. Por exemplo, um polipeptídeo 4-1BB solúvel poderia ser uma proteína de fusão que consiste em SEQ ID NO: 7, 8, 20 ou 21 fundida a, por exemplo, transferase de glutationa S (GST), a porção de Fc IgG de ser humano, uma etiqueta de histidina, ou qualquer sequência de aminoácidos não-relacionada como discutida acima. Um polipeptídeo de 4-1BB solúvel pode também ser fragmentos do domínio extracelular, por exemplo, fragmentos de SEQ ID NO: 7, 8, 20 e 21 contanto que os fragmentos sejam biologicamente ativos, que é os fragmentos são capazes de inibir ou reduzir atividade de 4-1BBL. Métodos para determinar se os fragmentos têm atividade biológica, que é, se os fragmentos podem inibir ou reduzir atividade de 4-1BBL incluem, sem limitação, aqueles discutidos e exemplificados aqui, por exemplo, métodos para a determinação de produção de citocina inflamatória por células tais

como macrófagos em resposta a LPS e a presença de 4-1BB, um 4-1BB solúvel, e seus fragmentos biologicamente ativos, podem ser de qualquer fonte. Por exemplo, esses podem ser isolados de um camundongo, um coelho, um porco, um cachorro, uma vaca, um macaco, ou um ser humano. Eles podem ser expressos a partir de um ácido nucleico recombinante em uma célula hospedeira tal como, por exemplo, CHO, S2 e E. coli, ou um animal hospedeiro tal como, por exemplo, um porco ou um macaco ou um coelho, e então isolados usando-se técnicas de purificação de proteína conhecidas por aqueles versados na técnica. Alternativamente, eles podem ser sintetizados por métodos de conersão de síntese de peptídeo. 4-1BB solúvel pode ser obtido a partir de uma preparação do polipeptídeo de comprimento total por digestão por peptidase. Métodos para a preparação de proteínas de fusão de modo que para o polipeptídeo de Ig-Fc de ser humano de 4-1BB de camundongo são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, métodos que envolvem tecnologia de DNA recombinante. Mais especificamente, um sequência de ácidos nucleicos que codifica os domínio de 4-1BB relevantes pode estar ligada a um ácido nucleico que codifica o fragmento Fc e então expressa em uma célula hospdeira adequada. Muitos vetores de expressão que já codifica uma porção de fusão e em que um ácido nucleico que codifica 4-1BB ou um seu fragmento biologicamente ativo pode ser clonado estão disponíveis comercialmente. O 4-1BB solúvel que nós usamos é trazido de uma companhia.

RNA de antissenso Específico de 4-1BBL

Um RNA de antissenso pode ser usado para especificamente reduzir expressão de 4-1BBL, por exemplo, por inibição de transcrição e/ou tradução. Um RNA de antissenso é complementar a um ácido nucleico de senso que codifica 4-1BBL. Por exemplo, pode ser complementar ao fita de codificação de uma molécula de cDNA de fita dupla ou complementar a uma sequência de mRNA. Pode ser complementar a um fita de codificação total ou a apenas uma sua porção. Pode também ser complementar a totalidade ou parte da região de codificação de um ácido nucleico que codifica 4-1BBL. A região de não codificação inclui as regiões 5' e 3' que flanqueiam a região

de codificação, por exemplo, as sequências não-traduzidas 5' e 3'. Um RNA de antissenso tem em geral pelo menos seis nucleotídeos de comprimento, mas pode ter cerca de 8, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, ou 50 nucleotídeos longos. Oligonucleotídeos mais longos podem também ser usados. Um RNA de antissenso pode ser preparado usando-se métodos conhecidos na técnica, por exemplo, por expressão de um vetor de expressão que codifica o RNA de antissenso ou a partir de um pacote de expressão. Alternativamente, pode ser preparado por síntese química usando-se nucleotídeos de ocorrência natural ou nucleotídeos modificados projetados para aumentar estabilidade biológica do RNA ou para aumentar estabilidade fisiológica do duplex formado entre o RNA de antissenso e o ácido nucleico de senso. Exemplos de nucleotídeos modificados incluem 5-fluorouracila, 5-bromouracila, 5-clrouracila, 5-iodouracila, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitossina, 5-(carboxi-hidroxilmetil) uracila, 5- carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracila, di-hidrouracila, beta-D-galactosilqueossina, inossina, N6-isopenteniladenina, 1 - metil guanina, 1-metilinossina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2- metilguanina, 3 -metil citossina, 5 -metil citossina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracila, 5-metoxiaminometil-2-tiouracila, beta-D-manossilqueossina, S'-metoxicarboximetiluracila, 5-metoxiuracila, 2-metitio- N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacetic, wibutoxossina, pseudouracila, queossina, 2-tiocitossina, 5-metil-2-tiouracila, 2-tiouracila, 4-tiouracila, 5- metiluracila, ácido uracil-5-oxacético metiléster, ácido uracil-5-oxacético, 5-metil-2-tiouracila, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracila, (acp3)w, e 2,6- diaminopurina. Assim, um RNA de antissenso da invenção pode incluir nucleotídeos modificados bem como nucleotídeos naturais, e pode ter qualquer comprimento disicutido acima que é complementar as sequências providas na SEQ ID NO: 3 e 4.

SiRNA Específico de 4-1BBL

RNAs de interferências pequenas podem ser usados para especificamente reduzir tradução de 4-1BBL tal que o nível de polipeptídeo de 4-1BBL seja reduzido. SiRNAs mediam gene pós-transcritivo que silenciam de

um modo específico de sequência. Vide, por exemplo, http://www.ambion.com/techlib/hottopics/rnai/rnai_may2002_print.html (última correção 10 de maio de 2006). Uma vez que incorporado em um complexo de silenciação induzido por RNA, siRNA media clivagem do transcrito de mRNA endógeno homólogo por direção do complexo ao transcrito de mRNA homólogo, que é então clivado pelo complexo. O siRNA pode ser homólogo a qualquer região da transcrito de mRNA de proteína G. A região de homologia pode ter 30 nucleotídeos ou menor de comprimento, preferível menos do que 25 nucleotídeos, e mais de preferência cerca de 21 a 23 nucleotídeos de comprimento. SiRNA é tipicamente de fita dupla e pode ter projeções de dois nucleotídeo 3', por exemplo, dinucleotídeos de UU de projeção de 3'. Métodos para o projeto de siRNAs são conhecidos por aqueles versados na técnica. Vide, por exemplo, Elbashir e outros, Nature 41 1 : 494-498 (2001); Harborth e outros, Ácido nucleico de antissenso Drug Dev. 13: 83-106 (2003). Tipicamente, um sítio-alvo que começa com AA, têm projeções de UU 3' tanto para os fitas de SiRNA de antissenso quanto de senso, e têm um teor aproximado de 50% de G/C é selecionado. SiRNAs pode ser quimicament sintetizado, criado por transcrição *in vitro*, ou expresso a partir de um vetor de expressão de siRNA ou a pacote de expressão de PCR. Vide, por exemplo, http://www.ambion.com/techlib/tb/tb_506html (última correção em 10 de maio de 2006). Quando um siRNA é expresso a partir de um vetor de expressão ou um pacote de expressão de PCR, o inserto que codifica o siRNA pode ser expresso como um transcrito den RNA que dobra em um grampo de siRNA. Assim, o transcrito de RNA pode incluir uma sequência de siRNA de senso que está ligada a sua sequência de siRNA de antissenso complementar reversa por uma sequência espaçadora que forma o laço do grampo bem como um fileira de U's na extremidade 3'. O laço do grampo pode ter de quaisquer tamanhos apropriados, por exemplo, de 3 a 30 nucleotídeos de comprimento, de preferência, de 3 a 23 nucleotídeos de comprimento, e podem ter várias sequências de nucleotídeos incluindo, AUG, CCC, UUCG, CCACC, CTCGAG, AAGCUU, CCACACC e UUCAAGAGA (SEQ ID NO: 9). SiRNAs também podem ser produzidos *in vivo* por

clivagem de RNA de fita dupla introduzido diretamente ou via um transgene ou vírus. Ampliação por uma polimerase de RNA dependente de RNA pode ocorrer em alguns organismos.

Exemplos de sequências de siRNA que podem hibridizar para dar um transcrito de mRNA de 4-1BBL incluem as seguintes sequências e suas sequências complementares:

SEQ ID nº Sequência

10 AAGACGGCGCAGGCGGCAGCG

11 AAGAGGCCGGCGGGATCGTCG

12 ATAGTAGACTCCAGCCTTGGC

13 ATTCCGACCTCGGTGAAGGG

22 AAGAGGCCGGCGGGAUCGUCG

23 AUAGUAGACUCCAGCCUUGGC

24 AUUCCGACCUCGGUGAAGGG

Suas sequências complementares são:

SEQ ID nº Sequência

25 CGCTGCCGCCTGCGCCGTCTT

26 CGACGATCCCGCCGGCCTCTT

27 GCCAAGGCTGGAGTCTACTAT

28 CCCTTCACCGAGGTCGGAAT

29 CGCUGCCGCCUGCGCCGUCUU

30 CGACGAUCCCGCCGGCCUCUU

31 GCCAAGGCUGGAGUCUACUAU

32 CCCUUCACCGAGGUCGGAAU

RNA de interferência pequena que direciona 4-1BBL de camundongo também incluem:

5'-GCTCTATGGCCTAGTCGCT-3' (SEQ ID NO: 14);

5'-GCAAAGCCTCAGGTAGATG-3' (SEQ ID NO: 15)

5'-GCUCUAUGGCCUAGUCGCU-3' (SEQ ID NO: 33)

5'-GCAAAGCCUCAGGUAGAUG-3' (SEQ ID NO: 34)

Suas sequências complementares são:

AGCGACTAGGCCATAGAGC (SEQ ID NO: 35)

CATCTACCTGAGGCTTTGC (SEQ ID NO: 36)

AGCGACUAGGCCAUAGAGC (SEQ ID NO: 37)

CAUCUACCUGAGGCUUUGC (SEQ ID NO: 38)

Sequências de siRNA adicionais da invenção incluem SEQ ID NO: 18 e 19 e suas sequências complementares, bem como as seguintes:

AAGACGGCGCAGGCGGCAGCGTT (SEQ ID NO: 45)

AAGAGGCCGGCGGGAUCGUCGTT (SEQ ID NO: 46)

AUAGUAGACUCCAGCCUUGGCTT (SEQ ID NO: 47)

AUUCCGACCUCGGUGAAGGGTT (SEQ ID NO: 48)

CGCUGCCGCCUGCGCCGUCUUTT (SEQ ID NO: 49)

CGACGAUCCCGCCGGCCUCUUTT (SEQ ID NO: 50)

GCCAAGGCUGGAGUCUACUAUTT (SEQ ID NO: 51)

CCCUUCACCGAGGUCGGAAUTT (SEQ ID NO: 52)

GCUCUAUGGCCUAGUCGCUTT (SEQ ID NO: 53);

GCAAAGCCUCAGGUAGAUGTT (SEQ ID NO: 54)

AGCGACUAGGCCAUAGAGCTT (SEQ ID NO: 55)

CAUCUACCUGAGGCUUUGCTT (SEQ ID NO: 56).

Um siRNA da invenção pode também ser quimicamente modificado para aumentar sua estabilidade sob condições fisiológicas tal como no soro, no circulação, ou em uma célula de mamífero. siRNAs quimicamente modificados da invenção incluem aqueles que são siRNAs conjugados com colesterol, encapsulados com lipídio e ligados a anticorpo. RNAs de interferência pequenas da invenção podem também ser conjugados com outras molécula de lipídio hidrofóbicas tal como lipoproteína de alta densidade para formar conjugados lipofílicos, ou eles podem ter uma cadeia principal de fosforotioato e modificações de açúcar de 2'-O-metila nas fitas de senso ou de antissenso. Conjugados lipofílicos de siRNAs incluem aqueles conjugados para cadeias de alquila, saturadas tais como estearoíla (C18) e docosanila (C22) bem como aqueles conjugados para um híbrido de ácido litocólico e oleilamina (litocolicoleíla, C43).

Ribozima Específica de 4-1BBL

Um agente de bloqueamento de 4-1BBL pode também ser uma

ribozima. A ribozima é uma molécula de RNA com atividade catalítica que é capaz de clivar um ácido nucleico de fita único tal como um mRNA que tem uma região homóloga. Vide, por exemplo, Cech, Science 236: 1532-1539 (1987); Cech, Ann. Rev. Biochem. 59:543-568 (1990); Cech, Curr. Opin. Struct. Biol. 2: 605-609 (1992); Couture e Stinchcomb, Trends Genet. 12: 510-515 (1996). Uma ribozima pode ser usada cataliticamente para clivar um transcrito de mRNA de 4-1BBL e desse modo inibe tradução do mRNA. Vide, por exemplo, Haseloff e outros, Patente U.S. nº 5.641.673. Uma ribozima tendo especificidade para um ácido nucleico de 4-1BBL pode ser projetada com base na sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 3 e 4. Métodos de projeção e construção de uma ribozima que pode clivar uma molécula de RNA em trans de certo modo que sequência altamente específica foi desenvolvida e foi descrita na técnica. Vide, por exemplo, Haseloff e outros, Nature 334:585-591 (1988). A ribozima pode ser direcionada para um RNA específico por engenheiramento de uma região de "hibridização" discreta para dar a ribozima. A região de hibridização contém uma sequência complementar ao RNA alvo que permite que a ribozima especificamente hibridize com o alvo. Vide, por exemplo, Gerlach e outros, EP 321.201. A sequência alvo podem ser um segmento de cerca de 10, 12, 15, 20, ou 50 nucleotídeos contíguos selecionados da sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 3 ou 4. Sequências complementares mais longas podem ser usadas para aumentar a afinidade de sequência de hibridização para o alvo. As região de clivagem e hibridização da ribozima podem ser integralmente relacionada; assim, na hibridização para dar RNA alvo através das regiões complementares, a região catalítica da ribozima pode clivar o alvo. Alternativamente, um mRNA que codifica um 4-1BBL pode ser usado para selecionar RNA catalítico tendo uma atividade de ribonuclease específica de uma combinação de moléculas de RNA. Vide, por exemplo, Bartel & Szostak, Science 261 : 141 1-1418 (1993).

Outros Agentes de Bloqueamento de 4-1BBL

Agentes de bloqueamento de 4-1BBL também incluem inibidores de outras moléculas que estão envolvidas na atividade ou expressão de 4-

1BBL, incluindo oligonucleotídeos que reduzem a expressão dessas moléculas ou inibidores da atividade das próprias moléculas. Moléculas que estão envolvidas na atividade ou expressão de 4-1BBL incluem, por exemplo, NF-kapaB; CREB; C/EBP; os TLRs incluindo TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, e TLR9; MyD88; TRIF; p38; Jnk; Mek; e TRAF6. Oligonucleotídeos que reduzem a expressão dessas moléculas são similares a oligonucleotídeos tais como aqueles descritos acima para agentes de bloqueamento de 4-1BBL à base de oligonucleotídeo. Esses incluiriam siRNA (por exemplo, SEQ ID NO: 18 e 19), um ácido nucleico de antissenso ou uma ribozima dirigido contra a molécula selecionada que está envolvida na atividade ou expressão de 4-1BBL. Inibidores de atividade incluem, por exemplo, o inibidor de NF-kapaB sulfasalazina, o inibidor de proteassoma MG-132, o inibidor de p38 inhibitor SB203580, o inibidor de Jnk SP600125, e o inibidor de Mek PD98059.

Redução de Inflamação

Agentes de bloqueamento de 4-1BBL podem ser empregados para prevenir ou tratar condições de doença inflamatória. Agentes de bloqueamento de 4-1BBL reduzirão a inflamação por redução da ultraprodução de uma citocina inflamatória tal como, por exemplo, TNF ou IL-6. Assim, em uma concretização, a invenção provê um método para a produção de redução de uma citocina inflamatória em um mamífero. O mamífero pode ser um que sofre de uma condição inflamatória ou um mamífero em risco para tal condição.

Condições inflamatórias incluem, sem limitação, artrite reumatóide, artrite reumatóide juvenil, artrite psoriática, psoríase, espondilite aquilosante, doença de Crohn, síndrome do intestino irritável, artrite crônica juvenil de início sistêmico, e osteoporose. Um mamífero que sofre de uma condição inflamatória pode ser identificado com base nos sintomas conhecidos da condição. Por exemplo, um mamífero que sofre de doença de Crohn ou artrite reumatóide pode exibir um aumento no nível ou na duração da produção de citocinas pró-inlfamatórias tais como, por exemplo, IL-I , IL-6, MCP-I e TNF em comparação com um mamífero que não sofre da mesma espécie. O aumento pode ser qualquer quantidade tal como, por exemplo, 5%, 10%,

15%, 20% ou mais do que 20%. Outros sintomas de uma condição inflamatória incluem, sem limitação, inflamação patológica e destruição da articulação. Um mamífero em risco para uma condição inflamatória pode ser identificado com base em uma aberração genética como discuto em, por exemplo, Vyse & Todd, Cell 85:31 1-18 (1996); Kinne e outros, Arthritis Research 3:319-330 (2001) e Rioux & Abbas, Nature 435:584-9 (2005)).

Agentes de bloqueamento de 4-1BBL may podem ser administrados de numerosas maneiras. Exemplos de rotas de administração incluem administração parenteral, intravenosa, intradérmica, subcutânea, oral, por inalação, transdérmica (tópica), transmucosal, e retal. Administração sistêmica pode ser qualquer meio transmucosal ou transdérmico. Um agente de bloqueamento à base de polipeptídeo, por exemplo, pode ser administrado por injeção sob a pele quando necessário ou como determinado pelo médico. Esses podem também ser injetados por infusão IV durante várias horas. Um agente de bloqueamento de 4-1BBL com base em oligonucleotideo tal como um antissenso ou siRNA pode ser inserido em um vetor e usado como vetor de terapia genética. Um vetor de terapia genética pode ser fornecido a um indivíduo por injeção intravenosa, administração local ou por injeção estereotática. Vide, por exemplo, a patente U.S. nº 5.328.470 e Chen e outros, PNAS 91 :3054 (1994). Assim, um agente de bloqueamento de 4-1BBL pode ser administrado a um indivíduo por injeção direta a um sítio de tecido ou gerado in situ. Alternativamente, pode ser modificado para direcionar células selecionadas e então administradas sistematicamente. Por exemplo, moléculas de antissenso podem ser modificadas tal que elas se liguem a receptores ou antígenos expressos em uma superfície de célula selecionada. Outros agentes de bloqueamento de molécula tipo pequena podem ser administrados oralmente.

Agentes de bloqueamento de 4-1BBL podem ser usados sozinho ou em combinação com um segundo medicamento, por exemplo, uma medicação anti-inflamatória conhecida tais como, por exemplo, Adalimumab (Humira®), Efalizumab (Raptiva®), Etanercept (Enbrel), Infliximab (Remicade®), metotrexate (Rheumatrex), e Omalizumab (Xolair®).

A dosagem a ser administrada a um mamífero pode ser qualquer quantidade apropriada para reduzir atividade ou expressão de 4-1BBL ou. A dosagem pode ser uma dose eficaz ou um sua fração apropriada. Isso dependerá dos parâmetros dos pacientes individuais incluindo idade, condição física, tamanho, peso, condição a ser tratada, da severidade da condição, e de qualquer tratamento concorrente. Fatores que determinam as dosagens apropriadas são bem conhecidos por aqueles versados na técnica e podem ser considerados com experimentação rotineira. Por exemplo, determinação das propriedades fisicoquímicas, toxicológicas e farmacocinéticas podem ser feitas usando-se ensaios biológicos ou químicos padrão e através do uso de técnicas de modelação matemática conhecidas na química, técnicas farmacológicas e toxicológicas. A utilidade terapêutica e regime de dosagem podem ser extraplados a partir dos resultados de tais técnicas e através do uso de modelos farmacocinéticos e/ou farmacodinâmicos apropriados. A quantidade precisa a ser administrada a um paciente será de responsabilidade do médico acompanhante. No entanto, agentes de bloqueamento de 4-1BBL podem ser administrados oralmente ou por injeção a uma dose de desde cerca de 0,05 a cerca de 2000 mg/kg de peso do mamífero, de preferência de cerca de 1 a cerca de 200 mg/kg de peso do mamífero. Um agente de bloqueamento à base de nucleotídeo pode ser administrado (por exemplo, oralmente ou por injeção) a uma dose de desde 0,05 a 500 mg/kg de peso do mamífero, de preferência de 0,5 to 50 mg/kg de peso do mamífero. A faixa de dose para seres humanos adultos é em geral de 4 a 40.000 mg/dia e de preferência de 40 a 4.000 mg/dia. Como certos agentes da invenção são de ação longa, pode ser vantajoso administrar uma dose inicial de 80 a 4.000 mg no primeiro dia e então uma dose menor de 20 a 1.000 mg nos dias subsequentes. Um paciente pode também insistir em uma dose mais baixa ou uma dose tolerável por razões médicas, razões fisiológicas ou virualmente quaisquer outras razões. A quantidade eficaz do segundo medicamento formulado como um componente de uma combinação farmacêutica segurirá as recomendações do segundo fabricante do medicamento, do julgamento do médico acompanhante, e será orientada pelos protocolos e fato-

res adminsitrativos para as quantidades e dosagens indicadas na PHYSICIAN'S DESK REFERENCE.

A eficácia do método do tratamento pode ser avaliada por monitoração do paciente nos sinais ou sintomas conhecidos de um distúrbio. Por exemplo, melhoramento da inflamação pode ser detectado por monitoração dos níveis e duração da produção de citocina pró-inflamatória, por exemplo, produção de IL-1, IL-6, TNF ou MCP-1. Qualquer diminuição no nível ou duração da produção de citocina pró-inflamatória, por exemplo, uma diminuição de 5%, 10%, 15%, 20% ou mais do que 20% indica um melhoramento no paciente.

Composições farmacêuticas de agentes de bloqueamento de 4-1

Um agente de bloqueamento de 4-1BBL pode ser incorporado em um composição farmacêutica que seja adequada para a administração a um mamífero (aqui uma composição farmacêutica da invenção). Uma composição farmacêutica da invenção tipicamente compreende o agente ativo e um veículo farmaceuticamente aceitável. Como usado aqui, a frase "veículo farmaceuticamente aceitável" significa quaisquer e todos os solventes, meio de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes de retardamento de absorção e isotônico, e similares conhecidos na técnica a serem compatíveis com a administração farmacêutica a um mamífero. Exceto insofar como qualquer agente ou meio seja incompatível com o composto ativo, seu uso na composição farmacêutica da invenção é contemplado. Além disso, compostos ativos suplementares podem também ser incluídos nas composições farmacêuticas. Por exemplo, a composição farmacêutica da invenção pode também incluir um segundo medicamento anti-inflamatório como descrito acima.

Uma quantidade terapeuticamente eficaz do agente de bloqueamento pode ser usada nas composições e nos métodos da invenção. Tal quantidade terapeuticamente eficaz de agente de bloqueamento é em geral suficiente para reduzir atividade ou expressão de 4-1BBL ou em uma célula ou tecido de interesse, ou em um mamífero. Em algumas concretizações a quantidade terapeuticamente eficaz do agente de bloqueamento é uma

quantidade suficiente para reduzir inflamação. Exemplos de quantidades terapeuticamente eficazes de agentes de bloqueamento são as dosagens descritas na seção exposta acima. Assim, agentes de bloqueamento de 4-1BBL podem ser administrados a uma dose de desde cerca de 0,05 a cerca de 2000 mg/kg de peso do mamífero, de preferência de cerca de 1 a cerca de 200 mg/kg de peso do mamífero. Um agente de bloqueamento à base de nucleotídeo pode ser administrado oralmente ou por injeção a uma dose de desde 0,05 a 500 mg/kg de peso do mamífero, de preferência de 0,5 a 50 mg/kg de peso do mamífero, por exemplo, de 1, 3, 5 mg/kg. A faixa de dose para seres humanos adultos é em geral de 4 a 40.000 mg/dia e de preferência de 40 a 4.000 mg/dia. Como certos agentes da invenção são de ação longa, pode ser vantajoso administrar uma dose inicial de 80 a 4.000 mg no primeiro dia então uma dose mais baixa de 20 a 1.000 mg nos dias subsequentes.

Uma composição farmacêutica da invenção é formulada a ser compatível com a rota pretendida de adminitração. Soluções ou suspensões usdadas para a aplicação parenteral, intradérmica ou subcutânea pode incluir (1) um diluente estéril tais como água para injeção, solução salina, óleos fixos, polietileno glicóis, glicerina, propileno glicol ou outros solventes sintéticos; (2) agentes antibacterianos tais como álcool benzílco ou metil parabenos; (3) antoxidantes tal como ácido ascórbico ou bissulfito de sódio; (4) agentes de quelação tal como ácido etilenodiaminatetra-acético; (5) tampões tais como acetatos, citratos ou fosfatos e agentes para o ajuste de tonicidade tal como cloreto de sódio ou dextrose. pH pode ser ajustado com ácidos ou bases, tal como ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. A preparação parenteral pode ser encerrada em ampolas, seringas descartáveis ou frascos com múltiplas doses.

Composições farmacêuticas podem também ser formuladas e administradas com base na natureza do agente de bloqueamento de 4-1BBL. Agentes de bloqueamento de 4-1BBL de tipo oligonucleotídeo tal como siRNA podem ser fornecidos usando-se sistemas de fornecimento com base em vetor tais com aqueles descritos em Li & Rossi, Methods Mol. Biol.

309:261-72 (2005), usando-se injeções intravenosas de alta pressão de siRNA e siRNAs quimicamente modifico incluindo conjugado de colesterol, lipídio encapsulado e ligado a anticorpo como descrito em Song e outros, Nat. Med. 9:347-51 (2003); Soutschek e outros, Nature 432: 173-178 (2004); Morrissey e outros, Nat. Biotechnol 23:1002-1007 (2005); Song e outros, Nat. Biotechnol. 23:709-717 (2005); e Wolfrum e outros, Nat. Biotechnol. 25: 1 149-1 157 (2007). Agentes de bloqueamento de 4-1BBL de tipo oligonucleotídeo tais como siRNA e ribozimas podem também ser fornecidos usando-se lipossoma catiônica tais como aquelas descritas por Yano e outros, *In vivo* Antitumor Activity of a New Cationic Liposome siRNA Complex, in N ON- VIRAL GENE THERAPY, Springer Tokyo, 2005.

Composições farmacêuticas adequadas para a injeção incluem soluções ou dispersões aquosas estéreis e pós estéreis para preparação extemporânea de soluções ou dispersões injetáveis estéreis. Para a administração intravenosa, veículos adequados incluem solução salina fisiológica, água bacterioestática, ou solução salina tamponada por fosfato. Composições devem ser estéreis e estáveis sob as condições de fabricação e amarzenagem e devem ser preservadas contra contaminação por micro-organismos tais como bactérias e fungos. O veículo pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol e polietileno glicol líquido), e suas misturas adequadas. A fluidez adequada pode ser alcançada, por exemplo, por uso de um revestimento tal como lecitina, por manutenção do tamanho de partícula exigido no caso de dispersão e por uso de tensoativos. Prevenção da ação de micro-organismos pode ser alcançada usando-se vários agentes antibacterianos e antifúngicos tais como, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, e timerosal. Outros ingredients tal como agente isotônico ou um agente que retarda a absorção (por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina) podem ser incluídos.

Soluções estéreis injetáveis podem ser preparadas por incorporação do gente ativo na quantidade exigida em um solvente apropriado com uma ou uma combinação de ingredientes discutidos acima, como exigido,

seguido por esterilização filtrada.

Dispersões podem ser preparadas por incorporação do composto ativo em um veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e outros ingredientes exigidos discutido acima. No caso de pós-estéreis para a preparação de soluções injetáveis, métodos preferidos de preparação incluem secagem a vácuo e secagem por congelamento que fornecem um pó do ingrediente ativo e qualquer ingrediente adicional desejado de uma solução filtrada estéril anteriormente.

Composições orais podem incluir um diluente inerte ou um veículo comestível. Elas podem ser encerradas em cápsulas de gelatin ou compridas para formar comprimidos. Para a finalidade de administração terapêutica oral, o composto ativo pode ser incorporado com excipientes e usado na forma de comprimidos, trociscos, ou cápsulas. Composições orais podem também ser preparadas usando-se um veículo de fluido. Agentes de ligação farmaceuticamente compatíveis e materiais auxiliares podem ser incluídos como parte da composição. Os compirmidos, pílulas, cápsulas, trociscos e similares podem conter qualquer um dos seguintes ingredients ou composto de uma natureza similar: um ligante tal como celulose microcristalina, goma de tragacanto ou gelatina; um excipiente tal como amido ou lactose; um agente de desintegraçã tal como ácido algínico ou amido de milho; um lubrificante tal como estearato de magnésio; um agente de deslizamento tal como dióxido de silício coloidal; um agente adoçante tal como sacarose ou sacarina; ou um agente aromatizante tal como hortelã-pimenta, salicilato de metila ou aromatizante de laranja.

Para a administração por inalação, a composição pode ser fornecida na forma de um spray em aerosol a partir de um distribuidor ou recipiente pressurizado que contém um propelente adequado, por exemplo, um gás tal como dióxido de carbono ou um nebulizador.

Para a administração transmucosal ou transdérmica, penetrantes conhecidos na técnica a serem apropriados à barreira a ser permeada podem ser usados. Esses incluem detergentes, sais de bile e derivados de ácido fusídico para as administrações transmucosais, que podem ser reali-

zadas usando-se sprays nasais, por exemplo. Para a administração transdérmica, os compostos ativos são formulados para formar pomadas, bálsamos, géis ou cremes como em geral conhecidos na técnica.

Em uma concretização, os agentes da invenção podem ser preparados com veículos que protegerão o agente contra eliminação rápida do corpo, tal como uma formulação controlada tais como implantes e sistemas de fornecimento microencapsulados. Polímeros biocompatíveis biodegradáveis podem ser usados. Esses incluem acetato de etileno vinila, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, e ácido polilcticó. Métodos para a preparação de tais formulações estarão evidentes por aqueles versados na técnica. Suspensões lipossomais, incluindo aquelas direcionadas para células infectadas com anticorpos monoclonais para antígenos virais podem também ser usadas como veículos farmaceuticamente aceitáveis. Essas podem ser preparadas usando-se métodos conhecidos na técnica.

Composições parenterais ou orais podem ser formuladas em forma de dosagem unitária para a facilidade de administração e uniformidade de dosagem. A frase "forma de dosagem unitária" refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para o indivíduo a ser tratado, cada unidade contendo uma quantidade predeterminada de composto ativo calculado para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o veículo farmacêutico exigido. A especificação para as formas de dosagem unitária é dependente das únicas características do composto ativo e do efeito particular a ser alcançado.

A preparação farmacêutica do vetor de terapia genética pode incluir o vetor de terapia genética em um diluente aceitável pode compreender uma matriz de liberação em que o veículo de fornecimento de gene é assentado.

Uma composição farmacêutica da invenção pode ser incluída em um recipiente, embalagem ou distribuído juntamente com instruções para a administração. Tais artigos de fabricação incluirão instruções para o uso do agente de bloqueamento de 4-1BBL para o tratamento de inflamação sustentada. Além disso, tais artigos de fabricação pode incluir instruções

para o uso de um segundo medicamento para o tratamento de inflamação.

Separação de ensaio

A invenção também inclui métodos de separação para novos agentes de bloqueamento de 4-1BBL. Novos agentes de bloqueamento de 4-1BBL podem ser identificados com base em sua habilidade de interferir com oligomerização de 4-1BBL, interação de 4-1BBL com outras moléculas de sinalização tal como translocação de TRAF6 ou TLRs, ou 4-1BBL para uma membrana celular.

Um agente de bloqueamento de 4-1BBL que pode prevenir oligomerização de 4-1BBL pode ser identificado em uma célula com base no ensaio na presença e na ausência de um agente candidato. Um agente candidato, cuja presença media a ligação de dois 4-1BBL, é um agente de bloqueamento de 4-1BBL pelo fato de que ele preveniria oligomerização de 4-1BBL, isto é, a formação de um agregado de três ou mais 4-1BBL. Em geral, a ligação de dois 4-1BBL pode ser detectada usando-se métodos padrão incluindo, sem limitação, a levedura de dois sistemas híbridos (vide Fields & Song, Nature 340:245-46 (1989) e o ensaio de complementação de fragmento de proteína (vide http://www.abrf.org/JBT/Articles/JBT0012/jbt0012.html (última visita em 8 de setembro de 2006) tal como o ensaio de complementação de beta-lactamase. No sistema de dois híbridos de levedura, duas proteínas de fusão de 4-1BBL podem ser expressas em uma célula de levedura. Uma proteína de fusão consiste em 4-1BBL fundido para um domínio de ligação de DNA, e uma segunda proteína de fusão consiste em 4-1BBL fundida para um domínio de ativação de transcrição. A ligação de 4-1BBL leva a ativação e um gene reporter que permite a levedura desenvolver-se em um meio definido. No ensaio de complementação de beta-lactamase, dois fragmentos de beta-lactamase, Bla(a) e Bla(b), que consistem de aminoácidos 26-196 e 198-290, respectivamente, podem ser fundidos com 4-1BBL por um ligador $(Gli_2ser)_3$. Células transfectadas com um par de 4-1BBL-Bla(a) e 4-1BBL-Bla(b) são carregadas com CCF2/AM. CCF2/AM difunde-se através de uma membrana celular, e as estearases citoplásmica hidrolisam suas funcionalidades de éster, liberação do substrato de beta-lactamase CCF2.

Excitação do doador de cumarina em CCF2 a 409 nm leva a FRET ao aceitante de fluoresceína que gera emissão de fluorescência verde a 520 nm. A ligação de dois 4-1BBL traz dois fragmentos de beta-lactamase em proximidade que resultam em uma forma completa de beta-lactamase. Essa beta-lactamase ulteriormente hidrolisa CCF2 e separa doador e aceitante que leva a rompimento de FRET. Como um resultado, o doador de cumarina isolada emite fluorescência azul a 447 nm. Isso pode ser observado sob o microscopio ou medição por citômetro de fluxo. A ligação de dois

Um agente de bloqueamento de 4-1BBL que pode inibir ou reduzir interação de 4-1BBL com moléculas de sinalização pode ser identificado usando-se métodos à base de célula. Exemplos de tais ensaios são descritos aqui. Um método à base de célula para a identificação de um agente de bloqueamento de 4-1BBL que pode inibir ou reduzir interação de 4-1BBL com moléculas de sinalização, por exemplo, TLR ou TRAF6, com (b) um agente candidato, e então a determinação de se 4-1BBL interage com a molécula de sinalização. Alternativamente, um agente que inibe interação de 4-1BBL com TLR ou TRAF6 pode ser identificado usando-se uma célula baseada em separação similar àquela descrita acima para a agregação de 4-1BBL. Por exemplo, proteína de ligação de DNA de levedura de 4-1BBL e domínio ativador de transcrição de levedura de TRAF6, ou proteína de ligação de DNA de levedura de TRAF6 e domínio ativador de transcrição de levedura de 4-1BBL podem ser usados em um sistema de dois híbridos de levedura como descritos acima. Similarmente, proteínas de fusão que consistem de 4-1BBL-Bla(a) e TRAF6-Bla(b) ou TRAF 6-Bla(a) e 4-1BBL-Bla(b) podem ser usadas para analisar a interação de 4-1BBL e TRAF6 como descritas acima.

Um agente de bloqueamento de 4-1BBL que pode inibir ou reduzir translocação de 4-1BBL para uma superfície celular pode ser identificado por contato de uma célula que expressa 4-1BBL com um agente selecionado e determinação de se o 4-1BBL está localizado em uma membrana celular. Tal célula pode ser um célula de mamífero tal com linha de célula de RAW264.7.

Um agente de bloqueamento de 4-1BBL pode também ser identificado usando-se um modelo à base de célula ou modelo de animal de inflamação. Exemplos de ensaios à base de célula são descritos aqui. Por exemplo, uma célula que expressa uma citocina inflamatória tal como TNF, IL-6, IL-I ou MCP-I em resposta à estimulação apropriada, por exemplo, exposição a LPS, é posta em contato com um agente candidato. Produção de citocina inflamatória por uma célula que foi posta em contato com o agente candidato é comparada com aquela em uma célula que não foi posta em contato com o agente candidato. Para ensaios à base de célula, qualquer célula capaz de produzir uma citocina inflamatória em resposta à estimulação tal como LPS que dispara inflamação pode ser usada. Essas células incluem, por exemplo, uma célula de RAW264.7, macrófago de camundongo primário, e um monócito de ser humano primário. Similarmente, agentes de bloqueamento de 4-1BBL pode ser identificado usando-se um modelo de animal de inflamação. Por exemplo, a um mamífero pode ser administrado um agente candidato e a produção de citocina inflamatória tal como TNF ou IL-6, ou outros fenótipos observáveis associados à inflamação ultrassustentada tal como aumento da temperatura de corpo ou inchamento da junta pode ser determinado e comparado com aquele de um animal similar que não foi administrado o agente candidato.

A invenção sera ulteriormente descrita nos seguintes exemplos, que não limitam o escopo da invenção descritos nas reivindicações.

EXEMPLOS

Exemplo 1 - Materias e IMétodos

Camundongos e reagentes.

TLR2-, TLR4-, MyD88-, TRIF (LPS2) e tanto camundongos de TRIF- quanto deficientes de MyD88 foram descritos por Hoebe e outros, Nature 424:743-48 (2003); e Kim e outros, J. Exp. Med. 197: 1441-52 (2003). Camundongos deficientes de 4-1BBL foram retrocruzados oito vezes a camundongos de C57BL/6 como descritos por DeBenedette e outros, J. Immunol. 163:4833-41 (1999). Camundongos deficientes de 4-1BB foram retrocruzados pelo menos sete vezes com camundongos C57BL/6 como descri-

tos por Vinay, J. Immunol. 173:4218-29 (2004). Camundongos emparelhados por seco e idade foram usados nas mesmas experiências.

A preparação e cultura de macrófagos peritoneais, células de RAW264.7 e 293T são como descritas por Kim e outros, J. Exp. Med. 197:1441 -52 (2003). A camundongos de tipo selvagem (WT) deficientes de 4-1BBL emparelhados por sexo e por idade foram injetados intraperitonealmente com LPS. Amostras de soro de sangue foram coletadas ou a sobrevivência foi monitorada. Os protocolos para o uso de animais foram aprovados pelo Institutional Animal Care e Use Committee at The Scripps Research Institute.

Os seguintes reagentes foram usados: $Pam_3CisSer(Lys)_4$ (microcoleções de EMC GmbH); LPS oriundo de O111:B4 de E.coli (List Biological Laboratories); R-848 e CpG DNA estabilizado por fosforotioato (Invivogen); poly I:C (Amersham Biosciences); peptdoglicano (Fluka); IL-I beta e TNF (R&D systems); 4-1BB-Fc de camundongo recombinante e anti-4-1BBL (R&D systems); anticorpos monoclonais para 4-1BBL (clone TKS-I, e-Bioscience); antiFlag eram (Sigma); anti-GFP eram (Clontech); anticorpos contra HA, Myc, MyD88, TLR4, e TRAF6 (Santa Cruz Biotechnology); IgG de anticabra de burro de 594 conjugados de Alexa Fluor (Molecular Probes); anti-AU-1 (Covance); anti-GAPDH (Chemicon); brefeldin A (Biolegend); e sulfasalazina, SB203580, SP600125, e PD98059 (Calbiochem).

Plasmídios, adenovírus recombinantes PCR.

Vetores de expressão de mamífero foram construídos usando-se ou 4-1BBL cDNA de ser humano de domínio de comprimento total deletado extracelular (deltaExt), ou de domínio deletado cistólico (deltaCit), ou eles foram construídos com TLR4 cDNA de ser humano de mutante de pro712his de comprimento total, dedomínio deletado extracelular (deltaExt), ou de domínio deletado cistólico (deltaCit). Esses cDNAs foram usados ou com GFP (em pEGFP-CI), Flag (em pcDNA3), ou HA (em pcDNA3). 4-1BBL de camundongo de expressão de adenovírus-5 defeituoso de replicação (Adv-4-1BBL), ou nenhum transgene como um controle (Adv-controle), foi gerado usando-se o método de "resgate de dois plasmídios" como descrito para 4-

1BBL de ser humano em Bukczynski e outros, proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101 :1291 -1296 (2004).

PCR semiquantitativo foi realizado como descrito por Kim e outros, J. Exp. Med. 197:1441-52 (2003). Para PCR de tempo real, 0,5 μg de RNA total foi usado para preparar cDNA usando-se oligo(dT)i2 como um iniciador. O kit de SYBR green PCR Master Mix (Biossistemas aplicados) foi usado na análise de PCR de tempo real.

4-1BBL cDNA de ser humano de domínio cistólico de comprimento total, de domínio deletado extracelular (deltaExt), ou de domínio deletado cistólico (deltaCit) foi clonado em vetores de expressão de mamífero fundidos com GFP (pEGFP-Cl), flag (em pcDNA3), ou HA (em pcDNA3). Adenovírus-5 defeituoso de replicação que expressa 4-1BBL de camundongo (Adv-4-1BBL) ou nenhum transgene como um controle (Adv-controle), foram gerados usando-se o mesmo método, como descrito anteriormente por Bukczynski e outros, proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101 :1291-1296 (2004). Oligonucleotídeos foram clonados em pSuppressor para expressar fitas de siRNA que direciona 4-1BBL de camundongo (Nº 1 , 5'-GCTCTATGGCCTAGTCGCT-3' (SEQ ID NO: 14); Nº 2, 5'-GCAAAGCCTCAGGTAGATG-3' (SEQ ID NO: 15)), 4-1BB de camundongo (Nº 1 , 5'-ACCTGTAGCTTGGGAACATTT-3' (SEQ ID NO: 16); Nº 2, 5'-AATACAATCCAGTCTGCAAGA-3' (SEQ ID NO: 17)), ou nenhum (controle). Fitas de cDNA de IL3R, TLR 2, 3, 4 ou 9 de ser humano foram clonadas em vetores de expressão pcDNA3-flag.

Tranfecção.

Células 293T foram transfectadas com os vetores de expressão usando-se Lipofectamina 2000 após o protocolo do fabricante (Invitrogen), e lisados de células foram preparados depois da 24 horas. Para a tranfecção de siRNA, linha de célula de macrófago de camundongo RAW264.7 era transitoriamente tranfectada com siRNA que direciona TRAF6 de camundongo (Nº 1, 5'-GGAUCAUCAAGUACAUUGUTT-3' (SEQ ID NO: 18); Nº 2, 5'- GGGCUACGAUGUGG AGUUUTT-3' (SEQ ID NO: 19); siRNA pré-projetado da Ambion) ou GFP como um controle usando-se PolyAmine (Am-

bion). Depois de 2 dias de tranfecção, células foram incubadas com estimulantes. Lisados de células ou sobrenadantes de cultura foram preparados depois da 24 horas para analisar a supressão de TRAF6 por Western bloting ou produção de TNF-alfa por ELISA.

Ensaios de deslocamento de mobilidade eletroforética, de experiência nuclear, e de dois híbridos de levedura.

Extratos nucleares foram preparados de acordo com o protocolo anteriormente descritos. Radiomarcação de oligonucleotídeos específicos com [[gama]^{32}P] ATP e EMSA foram realizadas como recomendado pelo protocolo de Promega. Taxa de transcrição de TNF foi medida por análise da experiência como descrito em Han e outros, Biochim. Biophys. Acta 1090:22-28 (1991). A separação de dois híbridos foi realizada como descrito usando-se uma biblioteca de cDNA de baço ou cérebro fetal de ser humano mista como descrito por Han e outros, Nature 386:296-299 (1997). Uma porção de estensão de Tlr4 de ser humano do domínio de proteína intracellular (aminoácidos 653-839) foi subclonada em vetor de pAS2 e foi usado como uma isca. 5 x 10^6 transformantes foram visualizados.

Geração de linhas de células estáveis de supressão de 4-1BBL ou 4-1BB. Células de RAW 264.7 foram estavelmente transfectadas com o vetor vazio, pSuppressor-4-1BBL, ou 4-1BB. Para a seleção de células, células foram incubadas em meio de cultura contendo 500 μg/mL of G418 por 2 semanas e então foram combinadas. Células foram mantidas em meio contendo G418.

Citometria de fluxo.

Macrófagos peritoneais eram suspensos em PBS, 5% de FCS, 0,01% de azida de sódio (tampão de FACS) no gelo. Expressão de 4-1BBL de superfície foi avaliada usando-se anticorpos específicos de 4-1BBL (clone TKS-I , eBioscience) conjugados com ficoeritrina. Expressão de 4-1BBL total foi avaliada depois que as células foram fixadas e foram permeabilizadas em tampões de fixação-permeabilização (Biolegend). As células foram manchadas com anticorpos de 4-1BBL conjugados por hicoeritrina no tampão de permeabilização e então foram lavadas com tampão de FACS. IgG2a de rato

conjugado por ficoeritrina, K foi usado como o controle de isotipo.

Imunoistoquímica e imunoensaios.

Macrófagos peritoneais foram semeados nos vidros de cobertura e foram fixados com 4% de paraformaldeído e então foram permeabilizados pela incubação em PBS contendo 0,5% de Triton X-100. Depois do bloqueamento com 2% de BSA, células foram incubadas com anti-4-1BBL de camundongo seguido por incubação em IgG de anticabra de burro de 594 conjugados por Alexa Fluorescência foram visualizadas usando-se software AxioVision 3.1 (Carl Zeiss, Inc.). Sobrenadantes oriundos de cultura de macrófago ou soros de sangue de camundongo foram coletados e concentrações de TNF ou IL-6 foram medidas por kits de ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA) (eBioscience) após o protocolo do fabricante. Os anticorpos usados nos procedimentos de imunoprecipitação e imunomanchamento são indicados nas legendas das figuras. Os procedimentos experimentais são como descritos em Zhou e outros, Mol. Cell. Biol. 26:3824-34 (2006).

Medição de Citocinas.

Sobrenadantes oriundos de cultura de macrófago ou soros de sangue de camundongo foram coletados, e concentrações de TNF-alfa ou IL-6 foram medidas por kit de ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA) (eBioscience) após o protocolo do fabricante.

Análise estatística.

Diagramas de Kaplan-Meier foram construídos e um teste de classificação log foi usado para determinar as diferenças na sobrevivência de camundongos. A significância estatística de diferenças no TNF do soro foi determinada por teste t de Estudantes.

Exemplo 2 - 4-1BBL é uma proteína de interação de TLR4

Uma separação de dois híbridos de levedura foi usada para identificar proteínas que interagem com o domínio intracelular de TLR4. Células de levedura foram transfectadas com pAS2-TLR4(653- 839 aa) juntamente com 4-1BBL (5-254 aa) (Clone 1), 4-1BBL (3-254 aa) (Clone 2), p38((AF), p53, ou Lamin no vetor de pGAD10. A interação de "isca e rapina" foi verificada por crescimento de levedura em um meio que carece de histi-

dina. Dois dos sete clones positivos foram encontrados para serem 4-1BBL, uma proteína de transmembrana de tipo de célula de tipo II de superfície de célula (vide Goodwin e outros, Eur. J. Immunol. 23:2631 -2641 (1993) e Alderson e outros, Eur. J. Immunol. 24:2219-2227 (1994)). 4-1BBL, mas não proteínas não-relacionadas, interage com o domínio intracelular de TLR4 como indicado pela constatação que células de levedura contendo o domínio intracelular de TLR4 codificado no vetor de isca e 4-1BBL codificado no vetor de rapina eram capazes de desenvolver-se no meio que carece de histidina devido à expressão mediada por interação do gene repórter de His 3. (Figura IA).

Para confirmar a interação, HA-4-1BBL foi foi coexpresso com ou sem receptor de flag-TLR4 ou flag-IL-3 (IL-3R) em 293 células, e essa associação foi determinada por coimunoprecipitação. Células de C293T foram transfectadas com vetor de pcDNA3 vazio (Controle) ou o vetor de expressão de 4-1BBL em combinação com o vetor de pcDNA3 vazio, o vetor de expressão de flag-TLR4 ou flag-IL-3R. As células foram lisadas 24 horas depois da transfecção. 2/3 de lisados de célula foram imunoprecipitados com anticorpos de anti-HA. Os lisados e imunoprecipitados foram imunomanchados com anticorpos de antiFlag e anti-HA, e resultados indicam que TLR4, mas não IL-3R, foi puxado para baixo por 4-1BBL (Figura IB).

Para caracterizar a interação entre 4-1BBL e TLR4, as seguintes experiências foram conduzidas.

Imunoensaios foram conduzidos usando-se células de 293T transfectadas com plasmídios que expressam GFP-4-1BBL e ou, Flag-TLR4, Flag-TLR4 sem o domínio cistólico (deltaCit), Flag-TLR4 sem o domínio extracelular (deltaExt), Flag-IL-3R, Myc-TLR4, ou Myc-TLR4-P712H (Lps^d). Lisados de células foram imunoprecipitados com antiFlag ou antiMyc, e um lisado de célula e imunoprecipitados foram imunomanchados com os anticorpos indicados. Resultados indicam que o domínio intracelular de TLR4 está envolvido em sua interação com 4-1BBL, no entanto, mutação (Lps^d), Pro712H) no domínio de TLR4 TIR não tinha efeito substancial na interação entre TLR4 e 4-1BBL (FIG 1C). Uma vez que mutação de Lps^d rompe a inte-

ração entre o domínio de TIR e MyD88 mas não rompe a estrutura do domínio de TIR (vide Xu e outros, Nature 408: 111-15 (2000)), porções distintas do domínio de TLR4 TIR podem interagir com 4-1BBL e MyD88.

Além disso, imunoensaios foram conduzidos usando-se células de 293T transfectadas com o vetor de expressão de flag-TLR4 juntamente com vectores que expressam GFP, GFP-4-1BBL, GFP-4-1BBL sem o domínio cistólico (deltaCit), GFP-4-1BBL sem o domínio extracelular (deltaExt), ou GFP-4-1BBL exatamente o domínio cistólico (Cit). Os lisados de células foram imunoprecipitados com anticorpos de antiFlag e foram imunomanchados com anticorpos de antiFlag e anti-GFP. Resultados indicam que para 4-1BBL interagir com TLR4, pode conter seu domínio cistólico, e pode estar associados à membrana celular, nem como 4-1BBL sem o domínio cistólico nem o domínio cistólico de 4-1BBL sozinho coimunoprecipitadio com TLR4 (Figura ID).

Exemplo 3 - Camundongos Deficientes em 4-1BBL são mais resistentes à morte induzida por LPS

Para determinar o efeito *in vivo* de 4-1BBL, camundongos deficientes de 4-1BBL foram analisados e os resultados são como se segue. Camundongos que carecem de 4-1BBL são viáveis, férteis, e saudáveis. Esses camundongos têm órgãos linfóides normais de ave, mas exibem defeitos em memória de célula T de $CD8^+$ T a vírus. Os números de macrófagos peritoneais em camundongos de tipo selvagem e decientes de 4-1BBL são comparáveis (dados não-mostrados). Injeção intraperitoneal de LPS para dentro de camundongos deficientes de 4-1BBL e camundogos de tipo selvagem revelaram que camundongos deficientes de 4-1BBL foram mais resistentes do que camundogos de tipo selvagem ao efeito letal de LPS (Figura 2A).

Notavelmente, o efeito letal de LPS nos camundogos de tipo selvagem foi atenuado por administração de anti-4-1BBL (Figura 2B,C). O efeito *in vivo* de deleção de 4-1BBL poderia ser um resultado de uma falta de produção de TNF mediada por 4-1BBL em macrófagos, e/ou uma falta de ativação de 4-1BB por 4-1BBL em células de outras linhagens. De modo interessante, uma vez que elas têm menos células assassinas naturais (NK)

células e células de NKT, camundongos que carecem de 4-1BB são também resistentes à morte disparada por injeção de LPS e galactosamina. No entanto, a resistência a LPS em camundongos deficientes de 4-1BBL e deficientes de 4-1BB deve resultar de causas diferentes uma vez que camundongos deficientes de 4-1BBL contêm números normais de células de NK e NKT (dados não-mostrados).

Exemplo 4 - 4-1BBL está envolvido na Produção de TNF sustentado

A. Estudos *In vivo*

Para determinar se 4-1BBL está envolvido em respostas de hospedeiro mediadas por TLR4, camundongos de supressão de 4-1BBL (KO) e de tipo selvagem foram desafiados com a 0,5 mg de dose de LPS de Escherichia coli como se segue. Camundongos de tipo selvagem e de 4-1BBL-/- foram injetados intraperitonealmente com 0,5 mg de LPS, e níveis de TNF no soro foram coletados a 2 e 6 horas e foram medidos.

Resultados indicam que produção de TNF induzido por LPS era muito menor em camundongos 4-1BBL KO em comparação com camundongos de tipo selvagem (Figura 2D). Especificamente, LPS induzia um rápido aumento nas concentrações de TNF no soro, que atingiu pico uma hora depois da injeção de LPS. Concentrações de TNF no soro em camundongos deficientes de 4-1BBL eram cerca das mesmas que aquelas nos camundogos de tipo selvagem a um hora depois da injeção de LPS e eram mais baixas do do que aquelas nos camundogos de tipo selvagem em tempos tardios (Figura 2D). Esses dados são consistentes nos dados *in vitro* discutidos abaixo (Figura 3A) pelo fato de que deleção de 4-1BBL apenas afetou a produção de TNF em tempos tardios depois do tratamento de LPS; no entanto, a indução de TNF *in vivo* por LPS pareceu ser mais rápida do que que *in vitro*.

B. Estudos Usando-se Macrófagos primários

Uma vez que macrófagos são as fontes primárias de TNF em camundongos desafiados por LPS (Beutler e outros, Nature 316:552-554 (1985)), macrófagos peritoneais oriundos de camundongos de tipo selvagem e 4-1BBL KO foram isolados, e a produção de TNF depois da estimulação

de LPS foi medida.

Em primeiro lugar, os efeitos de 4-1BBL sobre produção de citocina induzida por LPS em macrófagos foram determinados por medição de citocinas no meio de macrógados de tipo selvagem e deficientes de 4-1BBL 24 horas depois da estimulação de LPS. Macrógados deficientes de 4-1BBL produziram menos TNF, IL-6, e IL-12 (Figura 3A) do que macrógados de tipo selvagem. Expressão de IL-1 beta não foi infectada ou apenas modestamente não foi infectada pela ausência de 4-1BBL (Figura 3A). Macrófagos deficientes de 4-1BBL produziam quantidades de tipo selvagem de IL-6 depois da estimulação com IL-I beta, que sugere que 4-1BBL está seletivamente envolvido em respostas de citocina celular induzida por LPS (Figura 3A).

Além disso, produção de TNF a 6, 12 e 18 horas depois da indução de LPS foi também determinada. Macrófagos peritoneais oriundos de camundongos de tipo selvagem e de 4-1BBL-/- foram laminados a 2 x 10^6 por cavidade em discos de seis cavidades e então foram tratados com LPS (100 ng/mL). Níveis de TNF no meio foram determinados a 6, 12 e 18 horas. De modo interessante, produção de TNF era normal em macógrafos de 4-1BBL KO durante as primeiras três horas de estimulação de LPS, mas quase totalmente eliminada depois desse ponto de tempo (Figura 3B) que indica que 4-1BBL era essencial para disparar outros aumentos na produção de TNF, que é durante tempos posteriores depois da estimulação de LPS.

4-1BBL foi originalmente clonado como um ligante de 4-1BB, um receptor de superfície de célula T que tem uma função coestimulatória (vide Goodwin e outros, Eur. J. Immunol 23:2631 - 2641 (1993)). Uma vez que 4-1BB é também expresso em macrófagos, foi examinado se 4-1BB está envolvido em expressão de TNF mediada por 4-1BBL em células tratadas com LPS. As seguintes experiências foram conduzidas para determinar o envolvimento de 4-1BB na produção de TNF induzido por LPS.

Inesperadamente, a presença de 4-1BB não era necessário para 4-1BBL para promover a produção de TNF induzido por LPS sustentado, como as quantidades de TNF induzido por LPS eram similares no macrógafos deficientes de 4-1BB e de tipo selvagem (Figura 3C). Portanto, intera-

ções de 4-1BBL-4-1BB ou não ocorrem em macrófagos, ou eles simplismente não desempenham um papel na sustentação de produção de TNF de macrófago.

C. Estudos Usando-se Macrófagos de RA W264.7

Para determinar se a função de 4-1BBL na linha de célula de macrógafo RAW264.7 é similar àquele em células de macrógafo primário, siRNA foi usado para suprimir expressão de 4-1BBL como se segue. Resumidamente, foram estavelmente transfectadas com pSuppressor contendo siRNA de controle, ou 4-1BBL-siRNA Nº I ou Nº 2. Níveis de proteína de 4-1BBL foram medidos por imunomanchamento. Produção de TNF foi medida (1) células de supressão de 4-1BBL e de controle tratadas com LPS por 3, 9 e 24 horas e (2) células de supressão de 4-1BBL e de controle tratadas com peptdoglicano (PG, 10 μg/ml), Polyl:C (25 μg/ml), LPS (100 ng/mL), CpG (5 μg/mL), ou meio de cultura não-tratado (nenhum) por 24 horas. Resultados mostram que tanto siRNAs eficazamente suprimiram 4-1BBL em células de RAW264.7 (Figura 4A) quanto inibiram a produção de TNF induzida por ligante de LPS e outro TLR (Figuras 4B, C), assim demonstram que o papel de 4-1BBL é o mesmo em células de macrófago primário ou de RAW264.7. 4-1BBL não tem nenhum papel na ativação de NF-kapaB induzida por LPS em células de RAW264.7 uma vez que células de RAW de supressão de 4-1BBL e de controle tratadas com LPS (100 ng/mL) por 15, 30, 40, 50, 60 e 90 minutos mostraram degradação igual de I-kapaB-alfa (Figura 4D).

A seguir, expressão de 4-1BB em células de RAW264.7 foi suprimida usando-se siRNA como se segue. Células de RAW264.7 foram estavelmente transfectadas com pSuppressor contendo siRNA de controle, 4-1BB siRNA Nº I ou Nº 2. 4-1BB mRNA foi examinado por RT-PCR. Produção de TNF foi medida em células de supressão de 4-1BB e de controle depois do tratamento de LPS por 24 horas. O siRNA muito eficazamente suprimiu 4-1BB em células de RAW264.7, mas a supressão não tinha efeito sobre produção de TNF induzido por LPS (Figura 5A-B). 4-1BB deve então não estar envolvido na produção de TNF induzida por LPS em macrófagos, e assim não tem nenhuma ligação com 4-1BBL na regulação de produção de TNF

sustentado. Na soma, a função independente de 4-1BB de 4-1BBL na sustentação de produção de TNF em macrógafos tratados com LPS era também observada na linha de célula de macrógafo de RAW264.7 por supressão de 4-1BBL e 4-1BB com siRNA (Figura 4A-, C & Figura 5 A-B).

D. Estudos Transcritivos

Para determinar se 4-1BBL afeta a expressão de TNF a estágios transcritivo e/ou pós-transcritivo, Tn/mRNA em macrógafos deficientes de 4-1BBL e de tipo selvagem foi medido depois de vários períodos de tratamento com LPS (Figura 3D). Expressão de Tnf mRNA atingiu pico em quantidades similares em macrógafos deficientes de 4-1BBL e de tipo selvagem 2 horas depois da estimulação de LPS; no entanto, quantidades de TWZmRNA em células deficientes de 4-1BBL eram muito menores do que aquelas em macrófagos de tipo selvagem durante tempos posteriores depois da estimulação de LPS (Figura 3D). Esses dados são consistentes com os dados de proteína de TNF (Figura 3B), e indicam que 4-1BBL influencia a expressão de transcritos de Tnf mRNA.

Para determinar se 4-1BBL influencia a transcrição de Tnf, análise de continuação nuclear foi realizada. Transcrição de Tnf disparado por LPS 1 hora depois da estimulação de LPS tanto macrógafos deficientes de 4-1BBL e de tipo selvagem; no entanto, transcrição de Tnf foi reduzida em macrógafos deficientes de 4-1BBL em tempos tardios após o tratamento com LPS (Figura 3E).

Para determinar se as quantidade de TWZmRNA mais baixas encontradas em tempos tardios após estimulação de LPS em macrógafos deficientes de 4-1BBL foram também resultados de uma mudança na estabilidade de mRNA, mediu-se a meia-vida de TW/mRNA em macrógafos deficientes de 4-1BBL e de tipo selvagem 3 horas depois da estimulação de LPS. Deleção de 4-1BBL tinha uma influência substancial na estabilidade de 7n/mRNA (Figura 3F). Portanto, 4-1BBL influencia tanto regulação transcritiva e pós-transcritiva da produção de TNF.

Se deleção de 4-1BBL afeta ativação induzida por LPS de NF-kapaB e outros fatores de transcrição foi determinado por ensaios de deslo-

camento de eletromobilidade (EMSA) como se segue. Macrófagos de tipo selvagem e 4-1BBL -/- foram estimulados com LPS por 1, 2, 4, 8 e 12 horas e foram então coletados para a preparação de extrato nuclear. EMSA foram realizados usando-se sondas radiomarcadas. Resultados indicam que deleção de 4-1BBL não tinha nenhuma influência sobre ativação de NF-kB induzida por LPS, uma resposta precoce que atingiu pico a duas horas (Figura 3G). Isso é consistente com os dados na Figura 3B, que mostra que a produção de TNF induzido por LPS não foi afetado por deleção de 4-1BBL nas primeiras três horas. Deleção de 4-1BBL também tinha pouco ou nenhum efeito na atividade de AP-1 induzida por LPS (Figura 3G). Em contraste com isso, ativação de CREB e C/EBP induzida por LPS, que ocorria depois de 8 horas da estimulação de LPS, eram significativamente inibida por deleção de 4-1BBL (Figura 3G). A ativação de CREB e C/EBP diminuída pode contribuir para o defeito na produção de TNF sustentado em macrófagos deficientes de 4-1BBL.

Para examinar as trajetórias de sinalização induzidas por LPS, as trajetórias de cinase de MAP e NF-kapaB, macrófagos peritoneais oriundos de camundongos de 4-1BBL KO e de tipo selvagem foram tratados com LPS (100 ng/mL) por 0,5, 1 , 2, 4 e 6 horas, e lisados de células foram imunomanchados com anticorpos de anti-IkapaB-alfa, antifosfo-ERK (p-ERK), anti-fosfo-JNK (p-JNK), anti-fosfo-p38 (p-p38), anti-4-1BBL, ou anti-GAPDH. Resultados indicam que a taxa de degradação do inibidor de NF-kB (IkapaB-alfa) era a mesma nas células de 4-1BBL KO e de tipo selvagem (Figura 3H), enquanto o nível de ativação de cinase de p38 MAP, ERKI/2 e JNK/2, (fosforilação) nas células de 4-1BBL KO era igual ou levemente menor do que que nas células de tipo selvagem (Figura 3H).

Assim o sinal precoce a jusante de TLR4 parece não ser afetado por deleção de 4-1BBL, e os dados obtidos a partir de análise da ativação de trajetórias de sinalização (Figura 3H) e fatores de transcrição (Figura 3G) são consistentes com que obtinham a partir da análise da produção de TNF (Figura 3B). Além disso, suporta a noção de que a sinalização precoce de TLR4 está intacta nos macrófagos de inativação de 4-1BBL.

Exemplo 5 - 4-1BBL Interage com TLR2, TLR3, TLR4 e TLR9 e está envolvido na produção de TNF mediado por TLR2, TLR3, TLR4 e TLR9 em macrófagos

Para determinar se 4-1BBL está seletivamente envolvido nas respostas celulares mediadas por TLR4, HA-4-1BBL foi coexpresso com flag-TLR2, flag-TLR3, flag-TLR4, ou flag-TLR9 como se segue. Células de 293T foram transfectadas com o vetor de expressão de HA-4-1BBL ou vazio (controle), juntamente com flag-TLR2, flag-TLR3, flag-TLR4, ou flag-TLR9. As células foram lisadas 24 horas depois da transfecção. Lisados de células foram imunomanchados com anticorpos de antiFlag, ou foram imunoprecipitados com anti-HA e então foram imunomanchados com anti-HA e antiFlag. Resultados indicam que a totalidade de TLRs testados foram puxados para baixo por 4-1BBL nos ensaios de co-imunoprecipitação (Figura 6A). A coimunoprecipitação tem especificidade uma vez que flag-IL-3R não co-imunoprecipitam com 4-1BBL (Figura 6A).

Para determinar se 4-1BBL está envolvido em respostas celulares mediadas por TLR2, 3, 4, ou 9, a seguinte experiência foi conduzia. Macrófagos de tipo selvagem e de 4-1BBL-/- foram tratados com Pam3 (1 μg/mL), PolyI:C (25 μg/mL), LPS (100 ng/mL), R848 (100 nM), CpG (5 μg/mL), IL- I beta (10 ng/mL), ou meio de cultura não-tratado (nenhum). Produção de TNF foi medida depois da 24 horas do tratamento. Resultados indicam que a produção de TNF induzida por Pam3 (ligante de TLR2), PoliIC (ligante de TLR3), R848 (ligante de TLR7&8), CpG (ligante de TLR9) foi reduzida em células de 4-1BBL KO (Figura 6B). O efeito é TLR específico uma vez que produção de TNF induzida por IL-I beta era normal em células de 4-1BBL KO (Figura 6B). Portanto, 4-1BBL está envolvido na sinalização de muitos, se não em todos, TLRs diferentes.

Exemplo 6 - indução de 4-1BBL e localização de superfície de célula são exigidas para a produção de TNF sustentada em macrófogos tratados com LPS

4-1BBL é não-detectável na maioria dos tecidos, e níveis apenas baixos são expressos em macrófagos e células dendríticas (vide Futagawa e outros, Int. Immunol. 14:275-286 (2002)). Para analisar o papel de 4-1BBL

na produção de TNF sustentada em macrógafo tratado com LPS, macrófagos isolados de camundongos de tipo selvagem, TLR4-/-, MyD88-/-, e TRIF-/- foram tratados com LPS por 5, 1 , 2, 4, e 8 horas. Proteína de 4-1BBL foi analisada por imunomanchamento usando-se anticorpos de anti-4-1BBL. GAPDH foi usado como o controle de carregamento. Resultados indicam que LPS induz expressão rápida de 4-1BBL em macrófagos com um pico a 4 horas (Figura 7A, esquerdo 1-5 ou 1-6 raias de todos os paineis). O tempo de indução de 4-1BBL correlaciona-se bem com a produção de TNF sustentado que foi diminuída em macrófagos de inativação de 4-1BBL (Figura 3B). A expressão de 4-1BBL induzida por LPS é dependente de TLR4, MyD88, e TRIF, como é diminuída em macrófagos de TLR4-/-, MyD88-/-, e TRIF-/- (Figura 7A). Expressão de 4-1BBL foi induzida por todos os ligantes de TLR testados, mas não por IL-1 beta (Figura 8A-F). Parece que 4-1BBL é pós-traducionamente modificado depois da sua síntese (provavelmente por glicolisação), uma vez que tiras de proteína deslocadas foram observadas no SDS-PAGE (Figura 7A).

O promotor do gene que codifica 4-1BBL contém numerosos sítios de ligação de NF-kapaB, e 4-1BBL mRNA induzido por LPS foi eficazmente inibido pel inibidor de NF-KB sulfasalazina (Figura 7B) ou o inibidor de proteassoma MG-132 (dados não-mostrados). O inibidor de p38 SB203580, o inibidor de Jnk SP600125, e o inibidor de Mek PD98059 também tinham alguns efeitos inibitórios na expressão de 4-1BBL (Figura 7B). 4-1BBL mRNA induzido por LPS ($T_{1/2}$ = 67 min) era mais estável do que 4-1BBL mRNA ($T_{i/2}$ = 33 min) expresso por um vetor adenoviral em macrófagos não estimulados, que indicam que alterações induzidas por LPS em estabilidade de mRNA estavam também envolvidas na expressão de 4-1BBL induzida por LPS (Figura 7C).

Expressão de 4-1BBL em macrógafos peritoneais tratados com LPS oriundos de camundongos de tipo selvagem foi analisada por citometria de fluxo usando-se anticorpos de anti-4-1BBL. Um anticorpo de isotipo foi usado como controle. Permeabilização com 0,1% de saponina foi usada para medir 4-1BBL total. Resultados indicam que a maior parte do 4-1BBL in-

duzido por LPS está localizado na superfície celular (Figura 7D).

Para determinar se o 4-1BBL recentemente sintetizado necessita de estar em uma superfície celular a fim de regular a expressão de TNF, macrófagos peritoneais foram pré-incubados com ou sem Brefeldin A (3 μg/mL) por 1 hora e foram então tratados com LPS pelos tempos indicados. Imunomanchamento foi realizado usando-se anticorpos de anti-4-1BBL. 4-1BBL e TNF mRNA foram analisados por PCR semiquantitativo. GAPDH foi usado como controle. Brefeldin A é um inibidor específico que bloqueia a translocalização de proteína para a superfície celular por inibição de sua translocalização do retículo endoplásmico para o aparelho de Golgi Klausner e outros, J. Cell Biol. 116: 1071 -1080 (1992) (Figura 7E). Bloqueamento da translocação de 4-1BBL recentemente sintetizado para a superfície celular não afetou o aumento induzido por LPS em 4-1BBL mRNA (Figura 7F). Brefeldin Um tratamento não influenciou TNF mRNA induzido por LPS depois da 1 hora, mas não reduziu TNF mRNA at 2, 4, e 6 horas (Figura 7F), sugerindo que não apenas indução mas também a localização de superfície celular de 4-1BBL é exigido para produção de TNF sustentado.

Exemplo 7- Expressão e reticulação de 4-1BBL dispara a produção de TNF

Uma vez que a indução de 4-1BBL é exigida para produção de TNF sustentado em macrógafos tratados com LPS, foi examinado se a ultra-expressão de 4-1BBL pode disparar a produção de TNF. 4-1BBL foi expresso em macrófagos por fornecimento de gene mediado de adenovírus como descrito em Bukczynski e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101 :1291-1296 (2004). Resumidamente, macrófagos foram infectados com diferentes doses de adenovírus que codifica nenhum (controle) ou 4-1BBL, e a expressão de 4-1BBL foi determinada por imunomanchamento com e anticorpos de anti-4-1BBL. Níveis de TNF no meio 24 horas depois da infecção viral foram medidos. Resultados indicam que produção de TNF induzida por expressão de 4-1BBL de um modo dependente de dose (Figura 9A). A indução de TNF era 4-1BBL epecífico, uma vez que não houve nenhum TNF detectável no meio de células infectadas com o vírus de controle. Indução de TNF por expressão de 4-1BBL não exigiu 4-1BB, como a produção de TNF era similar

em macrófagos de tipo selvagem e deficientes de 4-1BB infectados com o adenovírus que codifica 4-1BBL (Figura 9B).

Para examinar se produção de TNF mediada por ultra-expressão de 4-1BBL é macrófagos dependentes de TLR4, MyD88, e TRIF, de tipo selvagem, TLR4-/- e TRIF-/- foram infectados com o controle ou 4-1BBL que expressa vírus, e os níveis de 4-1BBL nas células e níveis de TNF no meio foram medidos. Resultados indicam que indução da produção de TNF por expressão de 4-1BBL é parcialmente diminuída em macrófagos isolados de camundongos TLR4-/- (Figura 9C) sugerindo que além de TLR4 outros TLRs que podem interagir com 4-1BBL podem também participar na produção de TNF mediado por 4-1BBL. De fato, 4-1BBL interagiu com TLR2 e outros TLRs quando eles foram coexpressos em células de 293T (Figura 6A) e produção de TNF induzida por ultra-expressão de 4-1BBL foi reduzida em macrogáfos deficientes de TLR2 (Figura 9D). Esses resultados suportam a interpretação de que múltiplos TLRs estão envolvidos em produção de TNF mediada por 4-1BBL. Apesar do envolvimento de TLRs, deficiência de TRIF não tinha efeito sobre produção de TNF induzida por 4-1BBL (Figura 9E). Uma vez que macrófagos isolados de camundongos MyD88 não podem ser eficazmente infectados por adenovírus, a exigência de MyD88 na produção de TNF induzida por 4-1BBL tem de ser levados em conta por um outro método (vide abaixo).

4-1BBL é um membro da superfamiliar (vide Watts, T.H., Annu. Rev. Immunol. 23:23-68 (2005)). Pode ser similar a outros membros nessa superfamília pelo fato de que formação de trímero é exigida para sua função (vide Rabu e outros, J. Biol. Chem. 280:41472-41481 (2005)). Para testar essa possibilidade, macrófagos de tipo selvagem foram tratados com quimera de 4-1BB-Fc (um homodímero ligado a dissulfeto de 4-1BB), anticorpos de antiFc, ou 4-1BB-Fc e antiFc juntos, e níveis de TNF no meio foram medidos. Mais especificamente, macrófagos foram tratados com anticorpos de Fc de anti-humano de cabra (antiFc, 1,5 μg/mL), proteína de fusão de Ig-Fc de ser humano de 4-1BB de camundongo (4-1BB-Fc, 5 μg/mL), 4-1BB-Fc e antiFc juntos, ou meio de cultura não-tratado. Níveis de TNF no meio foram

medidos 24 horas mais tarde. Resultados indicam que 4-1BB- Fc podem reticular duas moléculas de 4-1BBL, mas não induzem a produção de TNF (Figura 9F). Outra reticulação de 4-1BB-Fc com anticorpos de antiFc induzia a produção de TNF, enquanto anticorpos de antiFc sozinhos não tinham qualquer efeito (Figura 9F). Parece que reticulação de mais do que duas moléculas de 4-1BBL seja necessária para disparar a produção de TNF. A exigência de 4-1BBL na produção de TNF induzida por reticulação foi confirmada por uso de cels células de 4-1BBL KO (Figura 9F).

Para determinar se sinalização de 4-1BBL necessita de macrófagos de MyD88 e TRIF, MyD88-/- e TRIF-/- foram tratados com 4-1BB-Fc, anticorpos de antiFc, e tanto anticorpos de 4-1BB-Fc e antiFc, quanto níveis de TNF no meio foram determinados. Resultados indicaram que a produção de TNF mediada por reticulação de 4-1BBL é independente de MyD88 e TRIF (Figura 9F). Em contraste com isso, a produção de TNF disparada por reticulação de 4-1BBL foi reduzida por uma margem estatisticamente significativa em macrófagos deficientes de TLR2 e deficientes de TLR4, comparada com aquela em macrófagos de tipo selvagem (Figura 9F).

Uma interpretação desses dados é que expressão e oligomerização subsequente de 4-1BBL na superfície celular dispara a produção de TNF independente de MyD88 e TRIF. Uma vez que TLR4 e outros TLRs interagem com 4-1BBL (Figura IA, IB, ID e 6A), e uma vez que TLRs formam dímeros (vide Medzhitov e outros, Nature 388:394-397 (1997)), é possível a dependência parcial de TLR4 na produção de TNF que é mediada por ultra-expressão de 4-1BBL (Figura 9C) é devido a interações de 4-1BBL-TLR4, que contribuem para a reticulação de 4-1BBL. Isso é suportado pela constatação que a ultra-expressão de produção de TNF mediada por 4-1BBL era parcialmente inibida por deleção de ou TLR4 ou TLR2 (Figura 9C-F).

Uma vez que 4-1BB-Fc e anti-4-1BBL apenas ligam duas moléculas de 4-1BBL, e sua ligação com 4-1BBL inibiria oligomerização de 4-1BBL ou evitaria que 4-1BBL interaja com outras moléculas tais como TLRs, elas foram usadas para testar essa hipótese. Macrófagos foram estimulados com LPS na presença de anticorpos de 4-1BB-Fc ou anti-4-1BBL como se

segue. Macrófagos foram incubados com LPS, LPS com 4-1BB-Fc, LPS com 0, 2, ou 5 μg/mL de anticorpos de anti-4-1BBL, ou com meio de cultura não-tratado por 24 horas. Resultados indicam que tanto anticorpos de 4-1BB-Fc quanto anti-4-1BBL inibiram a produção de TNF induzido por LPS (Figura 9G).

Como 4-1BBL foi induzido por numerosos ligantes de TLR (Figura 8A-F), produção de TNF por macrófagos deficientes de 4-1BBL estimulados com ligante de TLR2 (Pam3), ligante de TLR3 (poly I:C), ligante de TLR4 (LPS), ligante de TLR7.8 (R848) e ligante de TLR9 (CpG) foram examinados. Uma redução da produção de TNF foi observada (Figura 6B). Esses dados indicam o envolvimento de 4-1BBL na produção de TNF mediada por diferentes TLRs. Uma vez que TLRs localizados no endossoma ou retículo endoplásmico (ER), tal como TLR9, são prováveis de interagir com 4-1BBL localizado na membrana de plasma, a sinalização de 4-1BBL induzido por TLR9 pode depender de interações de 4-1BBL com outros TLRs na superfície celular. Consistente com isso é a detecção de uma pequena redução estatisticamente significativa na produção de TNF induzido por TLR9 em macrófagos deficientes de TLR4 quando uma baixa dose de CpG (1 μg/mL) foi usada (Figura 6C-D). No entanto, mecanismo(s) outros que não a interação entre 4-1BBL e superfície celular TLRs poderiam estar envolvidos na sinalização de 4-1BBL uma vez que a redução não foi significativa por deleção de TLR4 quando as células foram estimuladas com altas doses de CpG.

Exemplo 8 - Dois complexos de TLR4 sequenciais

Uma vez que indução de 4-1BBL depende da trajetória de TLR/MyD88/TRIF, e sinalização mediada por 4-1BBL é independente de MyD88 e TRIF, mas ligada a sua interação com TLR, se há complexos de sinalização de TLR4 sequenciais nos macrógafos tratados com LPS foram examinados como se segue. Macrófagos foram tratados com LPS por 0,5, 1 , 2, 4, 8 e 12 horas. Lisados de células totais foram (1) imunomanchados com anti-4-1BBL, antiTLR4, e anti-MyD88; (2) imunoprecipitados com anticorpos de antiTLR4 e então imunomanchados com antiTLR4, anti-4-1BBL, e anti-MyD88; (3) imunoprecipitados com anticorpos de anti-MyD88 e então

imunomanchados com anti-MyD88, antiTLR4, e anti-4-1BBL; ou (4) imunoprecipitados com anti-4-1BBL e então imunomanchados com anti-4-1BBL, antiTLR4, e anti-MyD88. Um anticorpo de isotipo foi usado como controle negativo para todas as imunoprecipitações. Os controles positivos para o imunomanchamento contra 4-1BBL ou MyD88 são mostrados como indicados em caixas. Resultados indicam que LPS induziram expressão de 4-1BBL entre os tempos de exposição de duas e oito horas, mas não tinham efeito sobre os níveis de proteína de TLR4 ou MyD88 (Figura 10A, Lisados de células). TLR4 foi associado ao MyD88 entre meia hora e uma hora De tempos de exposição de LPS, mas disassociado depois disso, enquanto o complexo de TLR4-4-1BBL apareceu entre as duas e 12 hora de tempos de exposição de LPS (Figura 10A, IP:TLR4). O complexo de TLR4-MyD88 foi confirmado por imunoprecipitação de MyD88 (Figura 10A, IP: MyD88). MyD88 não era capaz de puxar para baixo 4-1BBL, que indica que MyD88 e 4-1BBL não estão no mesmo complexo de TLR4. Imunoprecipitação de 4-1BBL puxado para baixo TLR4 nas células tratadas com LPS longo por 2-12 horas, mas não era capaz de puxar para baixo MyD88, confirmando que o MyD88 e 4-1BBL não estão no mesmo complexo (Figura 1OA, IP: 4-1BBL). Portanto, há dois dois complexos de TLR4 sequenciais em macrógafos tratados com LPS, um é o complexo de MyD88 que é responsável pelas respostas celulares iniciais, e o segundo é o complexo de 4-1BBL-TLR4 que está envolvido na sustentação de produção de TNF.

Para confirmar que MyD88 não é capaz de interagir com 4-1BBL, MyD88 etiquetado com AUI era ultra-expresso com flag-4-1BBL ou flag-TLR4 como se segue. Células de 293T foram transfectadas com o vetor de expressão de MyD88-AUI juntamente com o vetor de expressão de flag-4-1BBL ou flag-TLR4. As células foram lisadas 24 horas depois da transfecção, e lisados de células foram submetidos a imunoprecipitação com anticorpos de anti-AUI seguido por imunomanchamento com anticorpos de anti-Flag e antiAUI. Resultados indicam que Flag-TLR4, mas não flag-4-1BBL, foi puxado para baixo MyD88 (Figura 10B).

Para analisar quanto as proteínas que interagem com 4-1BBL, a

interação de 4-1BBL com TRAF2 e TRAF6 foi examinada como se segue. Células de 293T foram transfectadas com o vetor de expressão HA-4IBBL juntamente com vetor de expressão de TRAF2-myc ou TRAF6-myc. Lisados de células foram imunoprecipitados com anticorpos de anti-HA e imunomanchados com anticorpos sw antiMyc e anti-HA. Resultados indicam que 4-1BBL interage com TRAF6, mas não TRAF2 (Figura 10C).

Por causa da interação entre 4-1BBL e TRAF6, se TRAF6 é exigido para a produção de TNF mediada por 4-1BBL, ele foi examinado. SiRNA foi usado para suprimir TRAF6 em macrófagos de RAW264.7 como se segue. Macrófagos foram transfectados com TRAF6-siRNA Nº I ou Nº 2, ou siRNA de controle (C), e níveis de proteína de TRAF6 foram analisados por imunomanchamento contra TRAF6. Níveis de produção de TNF nas células tranfectadas com siRNA de controle, TRAF6-siRNA Nº I ou TRAF6-siRNA Nº 2 foram medidas 24 horas depois da incubação com antiFc, 4-1BB-Fc, 4-1BB-Fc e antiFc juntos, LPS, Poly I:C (25 μg/mL), IL-Ibeta (10 ng/mL), ou meio de cultura não-tratado. Níveis de IL-6 foram medidos quando as células foram tratadas com meio, LPS, ou TNF (10 ng/mL). Ambos os siRNAs eficazmente reduziram níveis de proteína de TRAF6 em células de RAW264.7 (Figura 10D). Supressão de TRAF6 e células de controle foram tratadas com 4-1BB-Fc, anticorpos de antiFc, ou anticorpos de 4-1BB-Fc e antiFc juntos, e níveis de TNF no meio foram medidos. Supressão de Produção de TNF mediada por reticulação de 4-1BBL bloqueada por TRAF6 (Figura 10D). Como esperado, supressão de TRAF6 diminuiu produção de citocina de IL-1beta, PolyI:C e LPS, mas não tem nenhum efeito sobre produção de IL-6 induzida por TNF (Figura 10D).

Para elucidar os eventos a jusante disparados por 4-1BBL, ativação de fator de transcrição foi examinada. Expressão de 4-1BBL ativou CREB e C/EBP, mas não NF-kapaB (Figura 10E), que é consistente com a observação que deleção de 4-1BBL não tinha efeito sobre ativação de NF-kapaB induzida por LPS, mas diminuiu ativação de CREB e C/EBP (Figura 3F). Similarmente, nenhuma degradação de IkapaBalfa foi observada em células que ultra-expressam 4-1BBL (Figura 10F). Expressão de 4-1BBL

disparou alguma fosforilação de p38, Jnk, e Erk (Figura 10F), e inibição de p38, Jnk, e Erk (mas não NF-kapaB) reduziu a produção de TNF mediada por 4-1BBL (Figura 10G) sugerindo que trajetórias de cinase de MAP estão envolvidas na produção de TNF mediada por 4-1BBL. A sinalização de trajetória de 4-1BBL pareceu afetar 7nf mRNA, como a deleção de 4-1BBL resultou em uma redução de transcrição de TNF mRNA induzida por LPS em tempos tardios (Figura 3E) e ultra-expressão de 4-1BBL aumentou quantidades de Tw/mRNA (Figura 10H). A meia-vida de Tnf mKNA em células que ultra-expressam 4-1BBL e nas células tratadas com células de LPS foi comparada; transcritos de Tnf exibia meia-vida similares (Figura 10H). Como LPS é conhecido para estabilizar Tnf mRNA e deleção de 4-1BBL reduziu a estabilidade de Tnf mRNA induzida por LPS (Figura 3F), 4-1BBL parece ser um mediador de estabilização de Tbnf mRNA induzida por LPS. Coletivamente, os dados descritos aqui mostram que a ativação inicial de expressão de TNF e a produção sustentada de TNF em macrófagos são reguladas por trajetórias de sinalização de fase precoce e tardia (Figura 101).

A expressão de citocinas pró-inlfamatórias é firmemente controlada por mecanismos de ativação e inativação de gene. O estudo descrito aqui mostra que ativação inicial de expressão de TNF e a produção sustentada de TNF são reguladas por trajetórias de sinalização de fase precoce e tardia (Figura 101). A trajetória de sinal bem conhecida, TLR4/MyD88/TRIF, é responsável pela expressão de fase de início e precoce de genes inflamatórios. 4-1BBL é uma das proteínas precocemente induzidas e é apenas induzida na fase precoce de ativação celular. O 4-1BBL recetemente sintetizado é deslocado sobre a superfície celular para gerar uma nova fase de sinalização para a produção de TNF sustentado. A interação entre 4-1BBL e TLR parece estar envolvida na geração de sinalização de segunda fase, e o papel de TLR no complexo de sinalização sequencial é mais provável para auxiliar a oligomerização de 4-1BBL. Os mecanismos de sinalização do complexo de 4-1BBL são diferentes daquele da sinalização de TLR4 inicial uma vez que ele é independente de MyD88 e TRIF. No entanto, ambas as fases na sinalização exigem TRAF6.

A produção de citocinas inflamatórias é parte do processo inflamatório, que é caracterizado por uma fase inicial e então fase sustentada que normalmente termina quando há uma resolução do disparo inflamatório (vide Triantafilou e Triantafilou, Trends Immunol. 23:301-304 (2002)). Muitas vezes uma supressão na regulação de inflamação ocorre no fim das respostas inflamatórias sustentadas, e a sustentação prolongada da produção de TNF está frequentemente associada à patologia de muitas doenças inflamatórias (vide Vassalli, P., Annu. Rev. Immunol. 10:41 1-452 (1992)). Portanto, a identificação de IBBL como um regulador chave na produção de TNF sustentado provê um novo alvo terapêutico para o desenvolvimento de novas intervenções para doenças inflamatórias.

Exemplo 9 - 4-1BBL desempenha um papel na indução de IL-6

IL-6 é uma citocina envolvida em inflamação. Expressão de IL-6 aumentada é implicada na patologia de vários processos de doença, incluindo artrite reumatóide (RA), artrite crônica juvenil de início sistêmico (JCA), osteoporose, e psoríase. Para mostrar que 4-1BBL participa na indução de IL-6, as seguintes experiências foram conduzidas. Em primeiro lugar, camundongos de tipo selvagem e de 4-1BBL-/- foram injetados intraperitonealmente com 0,5 mg de LPS. Então soros foram coletados a 0, 2 e 6 horas e níveis de IL-6 foram medidos. Resultados indicavam que camundongos 4-1BBL-/- produziam significativamente menos IL-6 em resposta a LPS do que camundongos de tipo selvagem (Figura 11A). Quando macrófagos peritoneais oriundos de tipo selvagem e de 4-1BBL-/- foram tratados com LPS (100 ng/mL) e os níveis de IL-6 no meio de cultura foram examinados a 3, 9 e 18 horas, resultados confirmaram que macrófagos oriundos de camundongos de tipo selvagem produziram significativamente mais IL-6 do que macrófagos oriundos de camundongos de 4-1BBL-/- (Figura 11B). Esses resultados foram comparados com os níveis de produção de IL-6 24 horas depois da macrófagos de tipo selvagem e 4-1BBL-/- foram tratados com Pam3 (1 μg/mL), Polyl:C (25 μg/mL), LPS (100 ng/mL), R848 (100 nM), CpG (5 μg/mL), IL-1 beta (10 ng/mL), TNF-alfa (10 ng/mL), ou meio de cultura não-tratado (nenhum). Macrófagos de tipo selvagem tratados com Pam3, Pol-

yl:C, LPS, R848, e CpG produziram significativamente mais IL-6 do que macrófagos de 4-1BBL-/- (Figura 11C) em contraste com isso, o nível de produção de IL-6 por macrófagos de tipo selvagem e 4-1BBL-/- eram comparáveis.

Quando macrófagos foram incubados com LPS, LPS com 4-1BB-Fc, LPS com 0, 2, ou 5 μg/mL de anticorpos de anti-4-1BBL, ou com meio de cultura não-tratado por 24 horas, e então níveis de IL-6 no meio foram medidos, resultados mostraram que macrófagos incubados com LPS e 4-1BB-Fc produziram significativamente menos IL-6 do que macrófagos incubados com LPS sozinho (Figura 11D). Macrófagos incubados com LPS e concentrações crescentes de anticorpos de anti-4-1BBL também exibiam níveis decrescentes de produção de IL-6 (Figura 11D).

Para confirmar o papel de 4-1BBL nas células de RAW 264.7 de produção de IL-6 foram estavelmente transfectadas com pSuppressor contendo siRNA de controle, ou na produção de 4-1BBL-siRNA Nº I ou Nº 2. IL-6 em células de supressão de 4-1BBL tratadas com LPS por 3, 9 e 24 horas foi medido e foi comparado com aquela de células de controle. Resultados indicavam que células de RAW264.7 em que expressão de 4-1BBL é suprimida produz significativamente menos IL-6 do que células de RAW264.7 transfectadas com siRNA de controle (FIGURA11E). Esses resultados eram consistentes com aquele visto para células de supressão de 4-1BBL e de controle tratadas com peptdoglicano (PG, 10 μg/mL), Polyl:C (25 μg/mL), LPS (100 ng/mL), CpG (5 μg/mL), ou meio de cultura não-tratado (nenhum) por 24 horas (Figura 11F).

Outras concretizações

Todas as patentes e publicações referenciadas ou mencionadas aqui são indicativas dos níveis de habilidade daqueles versados na técnica à qual a invenção pertence, e cada tal patente ou publicação está aqui incorporada por referência na mesma extensão como se ele tivesse sido incorporado por referência em sua totalidade individualmente ou indicado aqui em sua totalidade. Requerentes reservam o direito de incorporar fisicamente em seu relatório qualquer e a totalidade de materiais e informação de quaisquer tais publicações ou patentes citadas.

Os métodos e composições específicos descritos aqui são representativos de concretizações preferidas e são exemplarmente e não pretendem limitar o escopo da invenção. Outros objetivos, aspectos e concretizações ocorrerão por aqueles versados na técnica na consideração desse relatório descritivo, e estão incluídos dentro do espírito da invenção como definido pelo escopo das reivindicações. Estará prontamente evidente por aquele versado na técnica que substituições e modificações variáveis podem ser feitas na invenção reveladas aqui sem sem afastar-se do espírito da invenção. A invenção ilustrativamente descrita aqui adequadamente pode ser praticada na ausência de qualquer (quaisquer) elemento ou elementos, ou limitação ou limitações, que não são especificamente descritos aqui como essencial. Os métodos e processos ilustrativamente descritos aqui adequadamente podem ser praticados em ordens diferentes de etapas, e que eles não são necessariamente restritos às ordens de etapas indicadas aqui ou nas reivindicações. Como usado aqui e nas reivindicações anexas, as formas singulares "um," "uma," "o", "a", "os" e "as" incluem referência plural a não ser que o contexto claramente mostre de outra maneira. Assim, por exemplo, uma referência a "um anticorpo" inclui a pluralidade (por exemplo, uma solução de anticorpos ou uma série de preparações de anticorpo) de tais anticorpos, e assim por diante. Sob nenhuma circunstância a patente pode ser interpretada como sendo limitada aos exemplos específicos ou concretizações ou métodos especificamente descritos aqui. Sob nenhuma circunstância pode a linguagem de patente ser interpretada ser limitada por qualquer afirmação por qualquer examinador ou qualquer outro oficial ou empregado do escritório de Patente e de Marca registrada a não ser tal afirmação é especificamente e sem qualificação ou limitação expressamente adotado em um escritor responsivo pelos requerentes.

Os termos e expressões que foram empregados são usados como termos de descrição e não de limitação, e não pretende-se que no uso de tais termos expressões excluam qualquer equivalente das características mostradas e descritas ou suas porções, mas é reconhecido que várias modificações são possíveis dentro do escopo da invenção como reivindicadadas.

Assim, será entendido que embora a presente invenção tenha sido especificamente descrita por concretizações preferidas e características opcionais, modificação e variação dos conceitos aqui descritos aqui podem ser recorridos por aqueles versados na técnica, e que tais modificações e variações são consideradas estarem dento do escopo dessa invenção como definido pelas reivindicações anexas.

A invenção foi descrita amplamente e geralmente aqui. Cada espécie e agrupamentos subgenéricos mais estreitos caem dentro da descrição genérica também fazem parte da invenção. Isso inclui a descrição genérica da invenção com uma condição ou limitação negativa que remova qualquer assunto do gênero, independentemente de se ou não o material extirpado é relatado aqui.

Outras concretizações estão dentro das seguintes reivindicações. Além disso, onde características ou aspectos da invenção são descritos em termos de grupos de Markush, aqueles versados na técnica reconhecerão que a invenção é também desse modo descritos em termos de qualquer membro ou subgrupo individual do grupo de Markush.

Bibliografia

Galanos, C, Freudenberg, M. A. & Reutter, W. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. Proc. Natl. Acad. ScL USA 76, 5939-5943 (1979).

Beutler, B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. Nature 430, 257-263 (2004).

Cohen, J. The immunopathogenesis of sepsis. Nature 420, 885-891 (2002). 4.

Janeway, C. A., Jr. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. Annu. Rev. Immunol. 20, 197-216 (2002). Akira, S. & Takeda, K. Toll-like receptor signalling. Nat. Rev. Immunol. 4, 499-51 1 (2004).

Goodwin, R. G. e outros, Molecular cloning of a ligand for the inducible T cell gene 4-1BB: a member of an emerging family of citokine with homology to tumour necrosis factor. Eur. J. Immunol. 23, 2631 -2641 (1993).

Alderson, M. R. e outros, Molecular and biological characteriza-

tion of human 4-1BB e its ligand. Eur. J. Immunol. 24, 2219-2227 (1994).

Beutler, B. e outros, Identity of tumour necrosis factor e the macrophage-secreted factor cachectin. Nature 316, 552-554 (1985).

Watts, T. H. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. Annu. Rev. Immunol. 23, 23-68 (2005).

Xu, Y. e outros, Structural basis for signal transduction by the toll/interleukin-1 receptor domains. Nature 408, 11 1-1 15 (2000).

Futagawa, T. e outros, Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells. Int. Immunol. 14, 275-286 (2002).

Klausner, R. D., Donaldson, J. G. & Lippincott-Schwartz, J. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. J. Cell Biol. 116, 1071- 1080 (1992).

Bukczynski, J., Wen, T., Ellefsen, K., Gauldie, J. & Watts, T. H. Costimulatory ligand 4-1BBL (CDI 37L) as an efficient adjuvant for human antiviral citotoxic T cell responses. Proc. Natl. Acad. ScL U. S. A 101, 1291-1296 (2004).

Rabu, C. e outros, Production of recombinant human trimeric CD137L (4-1BBL). Crosslinking is essential to its T cell co-estimulação activity. J. Biol. Chem. 280, 41472-41481 (2005).

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C. A., Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature 388, 394-397 (1997).

Triantafilou, M. & Triantaf[iota]lou, K. Lipopolysacharide recognition: CD 14, TLRs e the LPS-activation cluster. Trends Immunol. 23, 301-304 (2002).

Vassalli, P. The pathophysiology of tumor necrosis factor. Annu. Rev. Immunol. 10, 41 1-452 (1992).

DeBenedette, M. A. e outros, Analysis of ligand de 4-1BB (4-1BBL)-deficient mice and of mice lacking both 4-1BBL e CD28 reveals a role for 4-1BBL in skin allograft rejection e in the citotoxic T cell response to influenza vírus. J. Immunol. 163, 4833-4841 (1999).

Hoebe, K. e outros, Identification of Lps2 as a key transducer of

MyD88-independent TIR signalling. Nature 424, 743-748 (2003).

Kim, S. O., Ono, K., Tobias, P. S. & Han, J. Orphan nuclear receptor Nur77 is involved in caspase-independent macrófago cell death. J. Exp. Med. 197, 1441 - 1452 (2003).

Han, J., Jiang, Y., Li, Z., Kravchenko, V. V. & Ulevitch, R. T. Activation of the transcrição factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflamation. Nature 386, 296-299 (1997).

Ge, B. e outros, TABI beta (transforming growth factor-beta-activated protein kinase 1-binding protein Ibeta), a novel splicing variant of TABI that interacts with p38alpha but not TAKI. J. Biol. Chem. 278, 2286-2293 (2003).

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> The Scripps Research Institute
Kang, Young Jun
Han, Jiahuai

<120> LIGANTE DE 4-1BB EM DOENÇAS INFLAMATÓRIAS

<130> 1361.078WO1

<140> Desconhecido
<141> 2007-10-16

<150> 60/852,022
<151> 2006-10-16

<150> 60/917,561
<151> 2007-05-11

<160> 60

<170> FastSEQ para Windows versão 4.0

<210> 1
<211> 309
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 1

```
Met Asp Gln His Thr Leu Asp Val Glu Asp Thr Ala Asp Ala Arg His
 1               5                  10                  15
Pro Ala Gly Thr Ser Cys Pro Ser Asp Ala Ala Leu Leu Arg Asp Thr
            20                  25                  30
Gly Leu Leu Ala Asp Ala Ala Leu Leu Ser Asp Thr Val Arg Pro Thr
        35                  40                  45
Asn Ala Ala Leu Pro Thr Asp Ala Ala Tyr Pro Ala Val Asn Val Arg
    50                  55                  60
Asp Arg Glu Ala Ala Trp Pro Pro Ala Leu Asn Phe Cys Ser Arg His
65                  70                  75                  80
```

Pro Lys Leu Tyr Gly Leu Val Ala Leu Val Leu Leu Leu Leu Ile Ala
85 90 95
Ala Cys Val Pro Ile Phe Thr Arg Thr Glu Pro Arg Pro Ala Leu Thr
100 105 110
Ile Thr Thr Ser Pro Asn Leu Gly Thr Arg Glu Asn Asn Ala Asp Gln
115 120 125
Val Thr Pro Val Ser His Ile Gly Cys Pro Asn Thr Thr Gln Gln Gly
130 135 140
Ser Pro Val Phe Ala Lys Leu Leu Ala Lys Asn Gln Ala Ser Leu Cys
145 150 155 160
Asn Thr Thr Leu Asn Trp His Ser Gln Asp Gly Ala Gly Ser Ser Tyr
165 170 175
Leu Ser Gln Gly Leu Arg Tyr Glu Glu Asp Lys Lys Glu Leu Val Val
180 185 190
Asp Ser Pro Gly Leu Tyr Tyr Val Phe Leu Glu Leu Lys Leu Ser Pro
195 200 205
Thr Phe Thr Asn Thr Gly His Lys Val Gln Gly Trp Val Ser Leu Val
210 215 220
Leu Gln Ala Lys Pro Gln Val Asp Asp Phe Asp Asn Leu Ala Leu Thr
225 230 235 240
Val Glu Leu Phe Pro Cys Ser Met Glu Asn Lys Leu Val Asp Arg Ser
245 250 255
Trp Ser Gln Leu Leu Leu Leu Lys Ala Gly His Arg Leu Ser Val Gly
260 265 270
Leu Arg Ala Tyr Leu His Gly Ala Gln Asp Ala Tyr Arg Asp Trp Glu
275 280 285
Leu Ser Tyr Pro Asn Thr Thr Ser Phe Gly Leu Phe Leu Val Lys Pro
290 295 300
Asp Asn Pro Trp Glu
305

<210> 2
<211> 254
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Met Glu Tyr Ala Ser Asp Ala Ser Leu Asp Pro Glu Ala Pro Trp Pro
1 5 10 15
Pro Ala Pro Arg Ala Arg Ala Cys Arg Val Leu Pro Trp Ala Leu Val
20 25 30

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

<210> 3
<211> 930
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 3
atggaccagc acacacttga tgtggaggat accgcggatg ccagacatcc agcaggtact 60
tcgtgccccc cggatgcggc gctcctcaga gataccgggc tcctcgcgga cgctgcgctc 120
ctctcagata ctgtgcgccc cacaaatgcc gcgctcccca cggatgctgc ctaccctgcg 180
gttaatgttc gggatcgcga ggccgcgtgg ccgcctgcac tgaacttctg ttcccgccac 240
ccaaagctct atggcctagt cgctttggtt ttgctgcttc tgatcgccgc ctgtgttcct 300
atcttcaccc gcaccgagcc tcggccagcg ctcacaatca ccacctcgcc caacctgggt 360

acccgagaga ataatgcaga ccaggtcacc cctgtttccc acattggctg ccccaacact 420
acacaacagg gctctcctgt gttcgccaag ctactggcta aaaaccaagc atcgttgtgc 480
aatacaactc tgaactggca cagccaagat ggagctggga gctcatacct atctcaaggt 540
ctgaggtacg aagaagacaa aaaggagttg gtggtagaca gtcccgggct ctactacgta 600
5tttttggaac tgaagctcag tccaacattc acaaacacag gccacaaggt gcagggctgg 660
gtctctcttg ttttgcaagc aaagcctcag gtagatgact ttgacaactt ggccctgaca 720
gtggaactgt tcccttgctc catggagaac aagttagtgg accgttcctg gagtcaactg 780
ttgctcctga aggctggcca ccgcctcagt gtgggtctga gggcttatct gcatggagcc 840
caggatgcat acagagactg ggagctgtct tatcccaaca ccaccagctt tggactcttt 900
10cttgtgaaac ccgacaaccc atgggaatga 930

<210> 4
<211> 1619
<212> DNA
15<213> Homo sapiens

<400> 4
gtcatggaat acgcctctga cgcttcactg gaccccgaag ccccgtggcc tcccgcgccc 60
cgcgctcgcg cctgccgcgt actgccttgg gccctggtcg cggggctgct gctgctgctg 120
20ctgctcgctg ccgcctgcgc cgtcttcctc gcctgccccc gggccgtgtc cggggctcgc 180
gcctcgcccg gctccgcggc cagcccgaga ctccgcgagg gtcccgagct ttcgcccgac 240
gatcccgccg gcctcttgga cctgcggcag ggcatgtttg cgcagctggt ggcccaaaat 300
gttctgctga tcgatgggcc cctgagctgg tacagtgacc caggcctggc aggcgtgtcc 360
ctgacggggg gcctgagcta caaagaggac acgaaggagc tggtggtggc caaggctgga 420
25gtctactatg tcttctttca actagagctg cggcgcgtgg tggccggcga gggctcaggc 480
tccgtttcac ttgcgctgca cctgcagcca ctgcgctctg ctgctggggc cgccgccctg 540
gctttgaccg tggacctgcc acccgcctcc tccgaggctc ggaactcggc cttcggtttc 600
cagggccgct tgctgcacct gagtgccggc cagcgcctgg gcgtccatct tcacactgag 660
gccagggcac gccatgcctg gcagcttacc cagggcgcca cagtcttggg actcttccgg 720
30gtgacccccg aaatcccagc cggactccct tcaccgaggt cggaataacg cccagcctgg 780
gtgcagccca cctggacaga gtccgaatcc tactccatcc ttcatggaga cccctggtgc 840
tgggtccctg ctgctttctc tacctcaagg ggcttggcag gggtccctgc tgctgacctc 900
cccttgagga ccctcctcac ccactccttc cccaagttgg accttgatat ttattctgag 960
cctgagctca gataatatat tatatatatt atatatatat atatatttct atttaaagag 1020
35gatcctgagt ttgtgaatgg actttttag aggagttgtt ttgggggggg ggtcttcgac 1080
attgccgagg ctggtcttga actcctggac ttagacgatc ctcctgcctc agcctcccaa 1140
gcaactggga ttcatccttt ctattaattc attgtactta tttgcctatt tgtgtgtatt 1200
gagcatctgt aatgtgccag cattgtgccc aggctagggg gctatagaaa catctagaaa 1260
tagactgaaa gaaaatctga gttatggtaa tacgtgagga atttaaagac tcatccccag 1320
40cctccacctc ctgtgtgata cttgggggct agctttttc tttctttctt ttttttgaga 1380
tggtcttgtt ctgtcaacca ggctagaatg cagcggtgca atcatgagtc aatgcagcct 1440
ccagcctcga cctcccgagg ctcaggtgat cctcccatct cagcctctcg agtagctggg 1500

accacagttg tgtgccacca cacttggcta acttttaat ttttttgcgg agacggtatt 1560
gctatgttgc caaggttgtt tacatgccag tacaatttat aataaacact cattttcc 1619

<210> 5
<211> 256
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 5

Met Gly Asn Asn Cys Tyr Asn Val Val Val Ile Val Leu Leu Leu Val
1 5 10 15
Gly Cys Glu Lys Val Gly Ala Val Gln Asn Ser Cys Asp Asn Cys Gln
20 25 30
Pro Gly Thr Phe Cys Arg Lys Tyr Asn Pro Val Cys Lys Ser Cys Pro
35 40 45
Pro Ser Thr Phe Ser Ser Ile Gly Gly Gln Pro Asn Cys Asn Ile Cys
50 55 60
Arg Val Cys Ala Gly Tyr Phe Arg Phe Lys Lys Phe Cys Ser Ser Thr
65 70 75 80
His Asn Ala Glu Cys Glu Cys Ile Glu Gly Phe His Cys Leu Gly Pro
85 90 95
Gln Cys Thr Arg Cys Glu Lys Asp Cys Arg Pro Gly Gln Glu Leu Thr
100 105 110
Lys Gln Gly Cys Lys Thr Cys Ser Leu Gly Thr Phe Asn Asp Gln Asn
115 120 125
Gly Thr Gly Val Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Arg
130 135 140
Ser Val Leu Lys Thr Gly Thr Thr Glu Lys Asp Val Val Cys Gly Pro
145 150 155 160
Pro Val Val Ser Phe Ser Pro Ser Thr Thr Ile Ser Val Thr Pro Glu
165 170 175
Gly Gly Pro Gly Gly His Ser Leu Gln Val Leu Thr Leu Phe Leu Ala
180 185 190
Leu Thr Ser Ala Leu Leu Leu Ala Leu Ile Phe Ile Thr Leu Leu Phe
195 200 205
Ser Val Leu Lys Trp Ile Arg Lys Lys Phe Pro His Ile Phe Lys Gln
210 215 220
Pro Phe Lys Lys Thr Thr Gly Ala Ala Gln Glu Glu Asp Ala Cys Ser
225 230 235 240
Cys Arg Cys Pro Gln Glu Glu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Tyr Glu Leu
245 250 255

<210> 6
<211> 255
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu
1 5 10 15
Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro
20 25 30
Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys
35 40 45
Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile
50 55 60
Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser
65 70 75 80
Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly
85 90 95
Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu
100 105 110
Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln
115 120 125
Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys
130 135 140
Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro
145 150 155 160
Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala
165 170 175
Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu
180 185 190
Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu
195 200 205
Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
210 215 220
Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
225 230 235 240
Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
245 250 255

<210> 7
<211> 163
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 7

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

<210> 8
<211> 163
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

```
Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro Ala Gly Thr Phe Cys Asp
 1               5                  10                  15
Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys Pro Pro Asn Ser Phe Ser
            20                  25                  30
Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile Cys Arg Gln Cys Lys Gly
        35                  40                  45
```

Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser Thr Ser Asn Ala Glu Cys
50 55 60
Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly Ala Gly Cys Ser Met Cys
65 70 75 80
Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu Thr Lys Lys Gly Cys Lys
85 90 95
Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln Lys Arg Gly Ile Cys Arg
100 105 110
Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys Ser Val Leu Val Asn Gly
115 120 125
Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro Ser Pro Ala Asp Leu Ser
130 135 140
Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly
145 150 155 160
His Ser Pro

<210> 9
<211> 9
<212> RNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<400> 9
uucaagaga 9

<210> 10
<211> 21
<212> RNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<400> 10
aagacggcgc aggcggcagc g 21

<400> 14
gctctatggc ctagtcgct 19

<210> 15
<211> 19
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<400> 15
gcaaagcctc aggtagatg 19

<210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<400> 16
acctgtagct tgggaacatt t 21

<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<400> 17
aatacaatcc agtctgcaag a 21

<210> 18
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<220>
<223> Um DNA/RNA combinado

<400> 18
ggaucaucaa guacauugut t 21

<210> 19
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<220>
<223> Um DNA/RNA combinado

<400> 19
gggcuacgau guggaguuut t 21

<210> 20
<211> 186
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 20

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

```
   Gln Cys Thr Arg Cys Glu Lys Asp Cys Arg Pro Gly Gln Glu Leu Thr
               100                 105                 110
   Lys Gln Gly Cys Lys Thr Cys Ser Leu Gly Thr Phe Asn Asp Gln Asn
           115                 120                 125
  5Gly Thr Gly Val Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Arg
       130                 135                 140
   Ser Val Leu Lys Thr Gly Thr Thr Glu Lys Asp Val Val Cys Gly Pro
   145                 150                 155                 160
   Pro Val Val Ser Phe Ser Pro Ser Thr Thr Ile Ser Val Thr Pro Glu
 10                165                 170                 175
   Gly Gly Pro Gly Gly His Ser Leu Gln Val
               180                 185


 15<210> 21
   <211> 185
   <212> PRT
   <213> Homo sapiens

 20<400> 21
   Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu
    1               5                  10                  15
   Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro
               20                  25                  30
 25Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys
           35                  40                  45
   Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile
       50                  55                  60
   Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser
 3065                  70                  75                  80
   Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly
                   85                  90                  95
   Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu
               100                 105                 110
 35Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln
           115                 120                 125
   Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys
       130                 135                 140
   Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro
 40145                 150                 155                 160
   Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala
                   165                 170                 175
```

Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro
180 185

<210> 22
<211> 21
<212> RNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<400> 22
aagaggccgg cgggaucguc g 21

<210> 23
<211> 21
<212> RNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<400> 23
auaguagacu ccagccuugg c 21

<210> 24
<211> 20
<212> RNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<400> 24
auuccgaccu cggugaaggg 20

<210> 25
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<400> 25
5cgctgccgcc tgcgccgtct t 21

<210> 26
<211> 21
<212> DNA
10<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

15<400> 26
cgacgatccc gccggcctct t 21

<210> 27
<211> 21
20<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético
25
<400> 27
gccaaggctg gagtctacta t 21

<210> 28
30<211> 20
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
35<223> Um oligonucleotídeo sintético

<400> 28
cccttcaccg aggtcggaat 20

<210> 29
<211> 21
<212> RNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<400> 29
cgcugccgcc ugcgccgucu u 21

<210> 30
<211> 21
<212> RNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<400> 30
cgacgauccc gccggccucu u 21

<210> 31
<211> 21
<212> RNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<400> 31
gccaaggcug gagucuacua u 21

<210> 32
<211> 20
<212> RNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<400> 32
cccuucaccg aggucggaau 20

<210> 33
<211> 19
<212> RNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<400> 33
gcucuauggc cuagucgcu 19

<210> 34
<211> 19
<212> RNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<400> 34
gcaaagccuc agguagaug 19

<210> 35
<211> 19
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<400> 35
agcgactagg ccatagagc 19

<210> 36
<211> 19
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<400> 36
catctacctg aggctttgc 19

<210> 37
<211> 19
<212> RNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<400> 37
agcgacuagg ccauagagc 19

<210> 38
<211> 19
<212> RNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<400> 38
caucuaccug aggcuuugc 19

<210> 39
<211> 21
<212> RNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<400> 39
accuguagcu ugggaacauu u 21

<210> 40
<211> 20
<212> RNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<400> 40
aauacaaucc agucugcaag 20

<210> 41
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<400> 41
aaatgttccc aagctacagg t 21

<210> 42
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<400> 42
tcttgcagac tggattgtat t 21

<210> 43
<211> 21
<212> RNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<400> 43
aaauguuccc aagcuacagg u 21

<210> 44
<211> 21
<212> RNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<400> 44
ucuugcagac uggauuguau u 21

<210> 45
<211> 23
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<400> 45
aagacggcgc aggcggcagc gtt 23

<210> 46
<211> 23
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<220>
<223> Um DNA/RNA combinado

<400> 46
aagaggccgg cgggaucguc gtt 23

<210> 47
<211> 23
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<220>
<223> Um DNA/RNA combinado

<400> 47
auaguagacu ccagccuugg ctt 23

<210> 48
<211> 22
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<220>
<223> Um DNA/RNA combinado

<400> 48
auuccgaccu cggugaaggg tt 22

<210> 49
<211> 23
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<220>
<223> Um DNA/RNA combinado

<400> 49
cgcugccgcc ugcgccgucu utt 23

<210> 50
<211> 23
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<220>
<223> Um DNA/RNA combinado

<400> 50
cgacgauccc gccggccucu utt 23

<210> 51
<211> 23
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<220>
<223> Um DNA/RNA combinado

<400> 51
gccaaggcug gagucuacua utt 23

<210> 52
<211> 22
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<220>
<223> Um DNA/RNA combinado

<400> 52
cccuucaccg aggucggaau tt 22

<210> 53
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotído sintético

<220>
<223> Um DNA/RNA combinado

<400> 53
gcucuauggc cuagucgcut t 21

<210> 54
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotído sintético

<220>
<223> Um DNA/RNA combinado

<400> 54
gcaaagccuc agguagaugt t 21

<210> 55
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotído sintético

<220>
<223> Um DNA/RNA combinado

<400> 55
agcgacuagg ccauagagct t 21

<210> 56
<211> 21
<212> DNA
<213>Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<220>
<223> Um DNA/RNA combinado

<400> 56
caucuaccug aggcuuugct t 21

<210> 57
<211> 23
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223>Um oligonucleotídeo sintético

<220>
<223> Um DNA/RNA combinado

<400> 57
accuguagcu ugggaacauu utt 23

<210> 58
<211> 23
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<220>
<223> Um DNA/RNA combinado

<400> 58
aauacaaucc agucugcaag att 23

<210> 59
<211> 23
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<220>
<223> Um DNA/RNA combinado

<400> 59
aaauguuccc aagcuacagg utt 23

<210> 60
<211> 23
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Um oligonucleotídeo sintético

<220>
<223> Um DNA/RNA combinado

<400> 60
ucuugcagac uggauuguau utt 23

REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica compreendendo um agente de bloqueamento de 4-1BBL e um veículo farmaceuticamente aceitável, em que o agente de bloqueamento de 4-1BBL é selecionado do grupo que consiste em (a) um anticorpo antagonístico específico para 4-1BBL; (b) um oligonucleotídeo eficaz para reduzir expressão de um ácido nucleico de 4-1BBL em uma célula; e (c) um 4-1BB solúvel.

2. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo antagonístico é um anticorpo humanizado ou quimérico específico para 4-1BBL.

3. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que o 4-1BBL tem a sequência indicada na SEQ ID NO: 1 ou 2.

4. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, em que o oligonucleotídeo tem uma sequência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 10-15, 22-38, e 45-56.

5. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, em que um 4-1BB solúvel tem uma sequência que corresponde a (a) aminoácido 1 até aminoácido 186 do polipeptídeo de 4-1BB de ser humano; (b) aminoácido 23 até aminoácido 186 do polipeptídeo de 4-1BB de ser humano; (c) aminoácido 1 até aminoácido 187 do polipeptídeo de 4-1BB de camundongo; ou (d) aminoácido 24 até aminoácido 187 do polipeptídeo de 4-1BB de camundongo.

6. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 5, em que um 4-1BB solúvel tem a sequência indicada na SEQ ID NO: 7, 8, 20 ou 21.

7. Combinação farmacêutica compreendendo um veículo, o agente de bloqueamento de 4-1BBL como definido na reivindicação 1 , e um segundo medicamento que é um fármaco anti-inflamatório.

8. Combinação farmacêutica de acordo com a reivindicação 7, em que o fármaco anti-inflamatório é um anticorpo específico para fator de necrose de tumor.

9. Combinação farmacêutica de acordo com a reivindicação 7 ou

8, em que o anticorpo antagonístico é um anticorpo humanizado ou quimérico específico para 4-1BBL.

10. Combinação farmacêutica de acordo com a reivindicação 7 ou 8, em que o 4-1BBL tem a sequência indicada na SEQ ID NO: 1 ou 2.

11. Combinação farmacêutica de acordo com a reivindicação 7 ou 8, em que o oligonucleotídeo tem uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO: 10-15, 22-38, e 45-56.

12. Combinação farmacêutica de acordo com a reivindicação 7 ou 8, em que um 4-1BB solúvel tem uma sequência que corresponde a (a) aminoácido 1 até aminoácido 186 do polipeptídeo de 4-1BB de ser humano; (b) aminoácido 23 até aminoácido 186 do polipeptídeo de 4-1BB de ser humano; (c) aminoácido 1 até aminoácido 187 do polipeptídeo de 4-1BB de camundongo; ou (d) aminoácido 24 até aminoácido 187 do polipeptídeo de 4-1BB de camundongo.

13. Combinação farmacêutica de acordo com a reivindicação 12, em que o 4-1BB solúvel tem uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO: 7-8 e 20-21.

14. Anticorpo quimérico ou humanizado específico para 4-1BBL.

15. Anticorpo de acordo com a reivindicação 14, em que o anticorpo pode ser ligar a um polipeptídeo de 4-1BBL compreendendo SEQ ID NO: 1 ou 2.

16. Agente de bloqueamento de 4-1BBL tendo uma sequência selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO: 10-15, 22-38, e 45-56.

17. 4-1BB solúvel tendo uma sequência que corresponde a (a) aminoácido 1 até aminoácido 186 do polipeptídeo de 4-1BB de ser humano; (b) aminoácido 23 até aminoácido 186 do polipeptídeo de 4-1BB de ser humano; (c) aminoácido 1 até aminoácido 187 do polipeptídeo de 4-1BB de camundongo; ou (d) aminoácido 24 até aminoácido 187 do polipeptídeo de 4-1BB de camundongo.

18. 4-1BB solúvel de acordo com a reivindicação 17, que tem a sequência de SEQ ID NO: 7, 8, 20 ou 21.

19. Método para a produção de redução de uma citocina infla-

matória em um mamífero compreendendo a administração de um agente de bloqueamento de 4-1BBL ao mamífero, em que o agente de bloqueamento de 4-1BBL é selecionado do grupo consistindo em (a) um anticorpo antagonístico específico para 4-1BBL; (b) um oligonucleotídeo eficaz para reduzir expressão de um ácido nucleico de 4-1BBL em uma célula; e (c) um 4-1BB solúvel.

20. Método de acordo com a reivindicação 19, ulteriormente compreendendo a identificação de um mamífero que sofre de ou em risco para uma condição inflamatória antes da administração do agente de bloqueamento de 4-1BBL.

21. Método de acordo com a reivindicação 19 ou 20, em que a citocina inflamatória é um fator de necrose de tumor ou IL-6.

22. Método de acordo com a reivindicação 19 ou 20, em que o mamífero é um ser humano.

23. Método de acordo com a reivindicação 19 ou 20, em que o anticorpo antagonístico é um anticorpo humanizado ou quimérico específico para 4-1BBL.

24. Método de acordo com a reivindicação 19, 20, ou 23 em que o 4-1BBL tem a sequência de SEQ ID NO: 1 ou 2.

25. Método de acordo com a reivindicação 19 ou 20, em que o agente de bloqueamento de 4-1BBL tem uma sequência selecionada do grupo que consistindo em SEQ ID NO: 10-15, 22-38, e 45-56.

26. Método de acordo com a reivindicação 19 ou 20, em que um 4-1BB solúvel tem uma sequência que corresponde a (a) aminoácido 1 até aminoácido 186 do polipeptídeo de 4-1BB de ser humano; (b) aminoácido 23 até aminoácido 186 do polipeptídeo de 4-1BB de ser humano; (c) aminoácido 1 até aminoácido 187 do polipeptídeo de 4-1BB de camundongo; ou (d) aminoácido 24 até aminoácido 187 do polipeptídeo de 4-1BB de camundongo.

27. Método de acordo com a reivindicação 26, em que um 4-1BB solúvel tem a sequência de SEQ ID NO: 7, 8, 20 ou 21.

28. Método para a redução da produção de uma citocina infla-

matória por uma célula de mamífero compreendendo o contato da célula com um agente de bloqueamento de 4-1BBL, em que o agente de bloqueamento de 4-1BBL é selecionado do grupo que consiste em (a) um anticorpo antagonístico específico para 4-1BBL; (b) um oligonucleotídeo eficaz para reduzir expressão de um ácido nucleico de 4-1BBL em uma célula; e (c) um 4-1BB solúvel.

29. Método de acordo com a reivindicação 28, em que a citocina inflamatória é um fator de necrose de tumor ou IL-6.

30. Método de acordo com a reivindicação 28 ou 29, em que o mamífero é um ser humano.

31. Método de acordo com a reivindicações 28, 29, ou 30, em que o anticorpo antagonístico é um anticorpo humanizado ou quimérico específico para 4-1BBL.

32. Método de acordo com a reivindicações 28, 29, ou 30, em que o 4-1BBL tem a sequência de SEQ ID NO: 1 ou 2.

33. Método de acordo com a reivindicação 28 ou 29, em que o agente de bloqueamento de 4-1BBL tem uma sequência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 10-15, 22-38, e 45-56.

34. Método de acordo com a reivindicação 28 ou 29, em que um agente de bloqueamenteo de 4-1BB tem uma sequência que corresponde a (a) aminoácido 1 até aminoácido 186 do polipeptídeo de 4-1BB de ser humano; (b) aminoácido 23 até aminoácido 186 do polipeptídeo de 4-1BB de ser humano; (c) aminoácido 1 até aminoácido 187 do polipeptídeo de 4-1BB de camundongo; ou (d) aminoácido 24 até aminoácido 187 do polipeptídeo de 4-1BB de camundongo.

35. Método de acordo com a reivindicação 34, em que um 4-1BB solúvel tem a sequência de SEQ ID NO: 7, 8, 20 ou 21.

36. Método para a redução de inflamação em um mamífero compreendendo a administração de um agente de bloqueamento de 4-1BBL a um mamífero, em que o agente de bloqueamento de 4-1BBL é selecionado do grupo que consiste em (a) um anticorpo antagonístico específico para 4-1BBL; (b) um oligonucleotídeo eficaz para reduzir expressão de um ácido

nucleico de 4-1BBL em uma célula; e (c) um 4-1BB solúvel.

37. Método de acordo com a reivindicação 36, em que o mamífero é um ser humano.

38. Método de acordo com a reivindicação 36, em que a inflamação está associada a ou resulta de artrite reumatóide, artrite reumatóide juvenil, artrite psoriática, psoríase, espondilite aquilosante, doença de Crohn, artrite reumatóide, artrite crônica juvel de início sistêmico, osteoporose, ou síndrome do intestino irritável.

39. Método de acordo com a reivindicação 36, em que o 4-1BBL tem a sequência de SEQ ID NO: 1 ou 2.

40. Método de acordo com a reivindicação 36, em que o anticorpo antagonístico é um anticorpo humanizado ou quimérico específico para 4-1BBL.

41. Método de acordo com a reivindicação 36, em que o agente de bloqueamento de 4-1BBL tem uma sequência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 10-15, 22-38, e 45-56.

42. Método de acordo com a reivindicação 36, em que o 4-1BB solúvel tem uma sequência que corresponde a (a) aminoácido 1 até aminoácido 186 do polipeptídeo de 4-1BB de ser humano; (b) aminoácido 23 até aminoácido 186 do polipeptídeo de 4-1BB de ser humano; (c) aminoácido 1 até aminoácido 187 do polipeptídeo de 4-1BB de camundongo; ou (d) aminoácido 24 até aminoácido 187 do polipeptídeo de 4-1BB de camundongo.

43. Método de acordo com a reivindicação 42, em que um 4-1BB solúvel tem a sequência de SEQ ID NO: 7, 8, 20 ou 21.

44. Artigo de fabricação compreendendo um recipiente contendo um agente de bloqueamento de 4-1BBL e instruções para o uso do agente de bloqueamento de 4-1BBL para a produção de redução de uma citocina inflamatória, em que o agente de bloqueamento de 4-1BBL é selecionado do grupo que consiste em (a) um anticorpo antagonístico específico para 4-1BBL; (b) um oligonucleotídeo eficaz para reduzir expressão de um ácido nucleico de 4-1BBL em uma célula; e (c) um 4-1BB solúvel.

45. Artigo de acordo com a reivindicação 44, em que as instru-

ções para o uso do agente de bloqueamento de 4-1BBL inclui instruções para o uso do agente de bloqueamento de 4-1BBL no tratamento de uma condição inflamatória.

46. Artigo de acordo com a reivindicação 45, em que a condição inflamatória é artrite reumatóide, artrite reumatóide juvenil, artrite psoriática, psoríase, espondilite aquilosante, doença de Crohn, artrite reumatóide, artrite crônica juvel de início sistêmico, osteoporose, ou síndrome do intestino irritável.

47. Artigo de acordo com qualquer uma das reivindicações 44, 45, ou 46, em que a citocina inflamatória é um fator de necrose de tumor ou IL-6.

48. Artigo de acordo com qualquer uma das reivindicações 44, 45, ou 46, em que o 4-1BBL tem a sequência de SEQ ID NO: 1 ou 2.

49. Artigo de acordo com qualquer uma das reivindicações 44, 45, ou 46, em que o anticorpo antagonístico é um anticorpo humanizado ou quimérico específico para 4-1BBL.

50. Artigo de acordo com qualquer uma das reivindicações 44, 45, ou 46, em que o agente de bloqueamento de 4-1BBL tem uma sequência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 10-15, 22-38, e 45-56.

51. Artigo de acordo com qualquer uma das reivindicações 44, 45, ou 46, em que o 4-1BB solúvel tem uma sequência que corresponde a (a) aminoácido 1 até aminoácido 186 do polipeptídeo de 4-1BB de ser humano; (b) aminoácido 23 até aminoácido 186 do polipeptídeo de 4-1BB de ser humano; (c) aminoácido 1 até aminoácido 187 do polipeptídeo de 4-1BB de camundongo; ou (d) aminoácido 24 até aminoácido 187 do polipeptídeo de 4-1BB de camundongo.

52. Artigo de acordo com qualquer uma das reivindicações 44, 45, ou 46, em que o 4-1BB solúvel tem a sequência de SEQ ID NO: 7, 8, 20 ou 21.

53. Método de separação para um agente de bloqueamento de 4-1BBL compreendendo: (a) contato de uma célula que expressa 4-1BBL

com um agente candidato; e (b) determinação de se o agente candidato diminui produção de uma citocina inflamatória, ou se o agente candidato previne oligomerização de 4-1BBL, em que o agente candidato é um agente de bloqueamento de 4-1BBL se ele diminuir a produção de uma citocina inflamatória ou prevenir oligomerização de 4-1BBL.

54. Método de acordo com a reivindicação 53, em que a célula é uma célula de ser humano.

55. Método de acordo com a reivindicação 53, em que a célula é um macrógafo.

56. Método de acordo com a reivindicação 55, em que a célula é a célula de RAW264.7.

57. Método para a visualização quanto a um agente de bloqueamento de 4-1BBL compreendendo: (a) administração a um mamífero de um agente candidato; e (b) determinação de se o agente candidato reduzir a inflamação ou diminui a produção de uma citocina inflamatória, em que o agente candidato é um agente de bloqueamento de 4-1BBL se reduzir a inflamação ou diminui a produção de uma citocina inflamatória no mamífero.

58. Método de acordo com a reivindicação 57, em que a inflamação está associada a ou resulta de artrite reumatoide, artrite reumatóide juvenil, artrite psoriática, psoríase, espondilite aquilosante, doença de Crohn, artrite reumatóide, artrite crônica juvel de início sistêmico, osteoporose, ou síndrome do intestino irritável.

59. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 53 a 58, em que a citocina inflamatória é um fator de necrose de tumor ou IL-6.

60. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 53 a 58, em que a produção da citocina inflamatória é diminuída por 20%, 25%, 30% ou mais do que 30%.

61. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 53 a 58, em que o 4-1BBL tem a sequência de SEQ ID NO: 1 ou 2.

62. Método de acordo com a reivindicação 57, em que o mamífero é um ser humano.

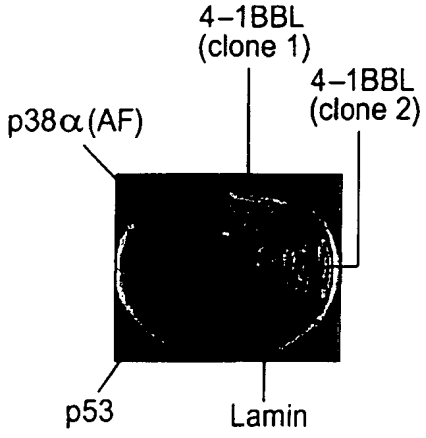


Fig. 1A

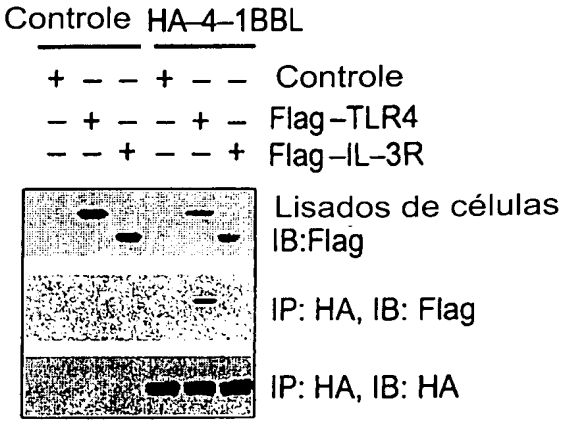


Fig. 1B

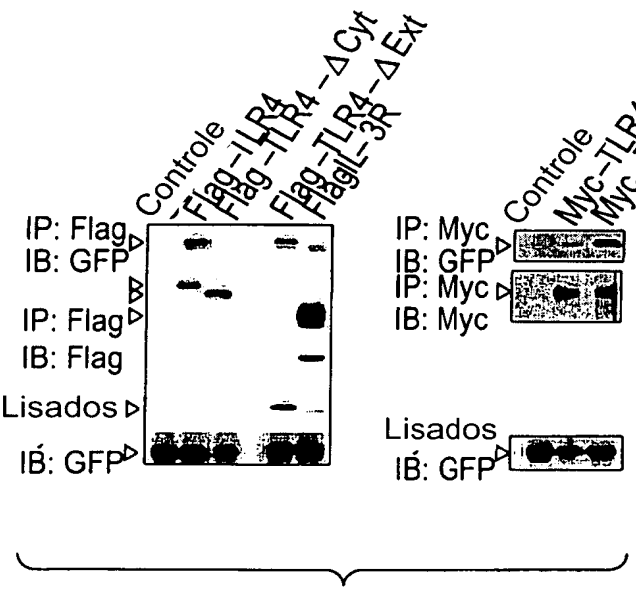


Fig. 1C

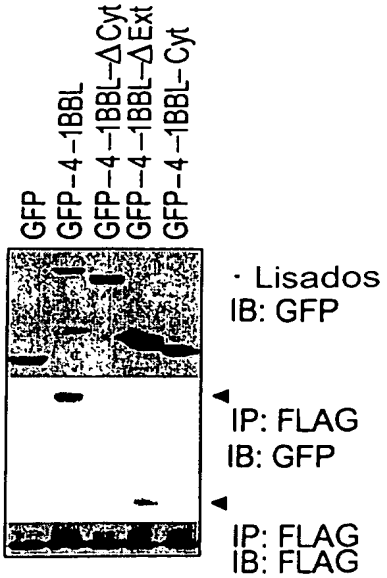


Fig. 1D

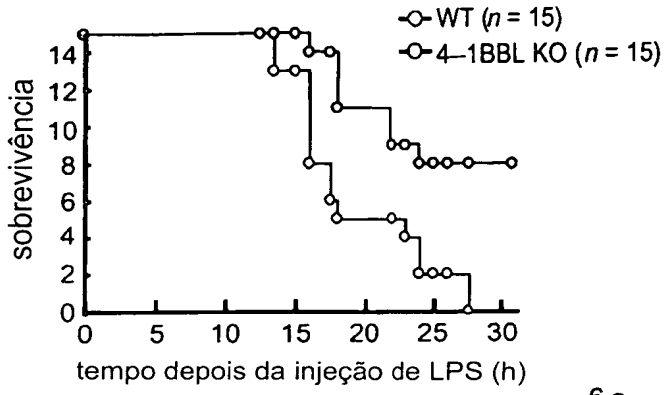


Fig. 2A

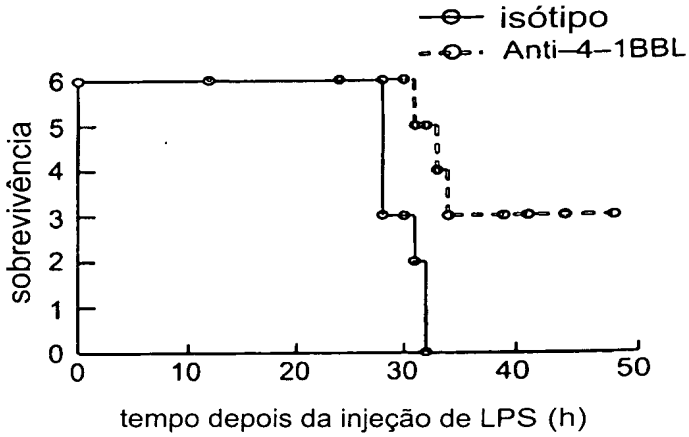


Fig. 2B

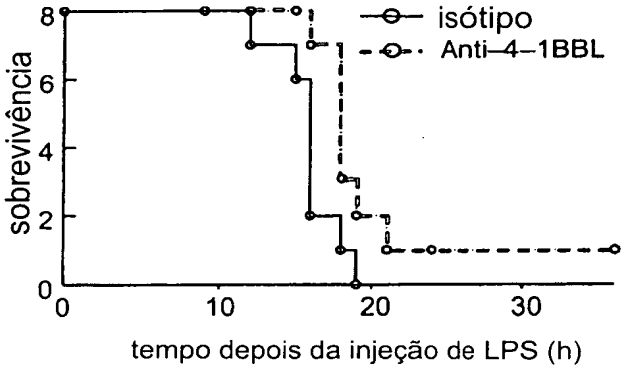


Fig. 2C

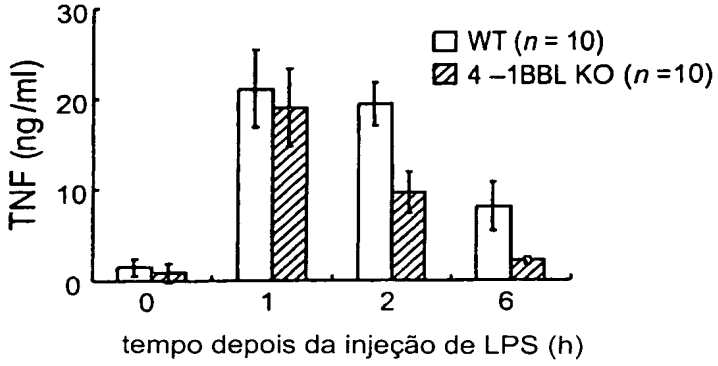


Fig. 2D

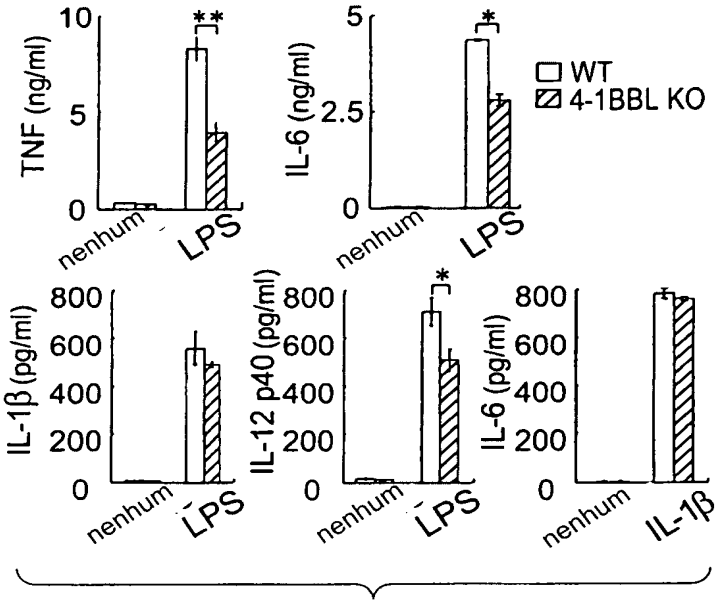

TNF (ng/ml)
10
5
0
**
nenhum
LPS
IL-6 (ng/ml)
5
2.5
0
*
nenhum
LPS
WT
4-1BBL KO
IL-1β (pg/ml)
800
600
400
200
0
nenhum
LPS
IL-12 p40 (pg/ml)
800
600
400
200
0
*
nenhum
LPS
IL-6 (pg/ml)
800
600
400
200
0
nenhum
IL-1β

Fig. 3A

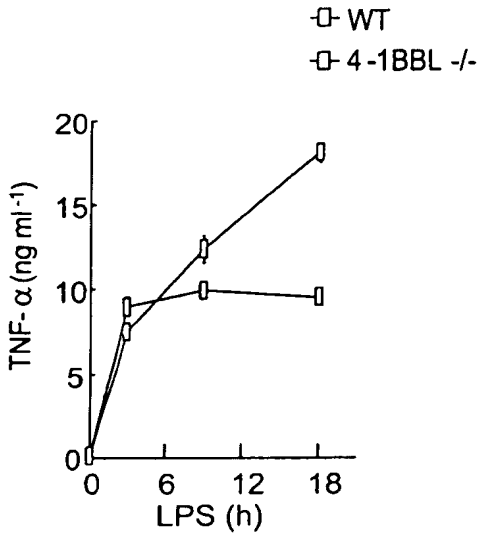

WT
4-1BBL -/-
TNF-α (ng ml-1)
20
15
10
5
0
0
6
12
18
LPS (h)

Fig. 3B

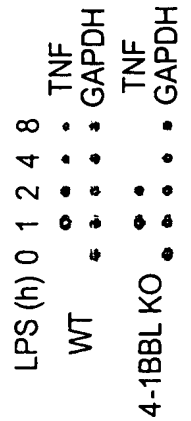


Fig. 3E

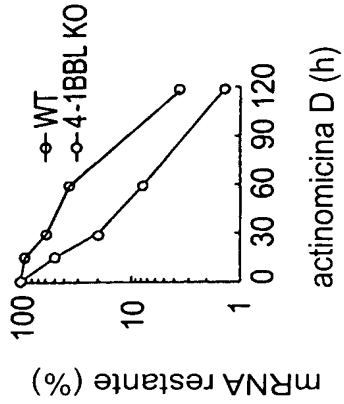


Fig. 3F

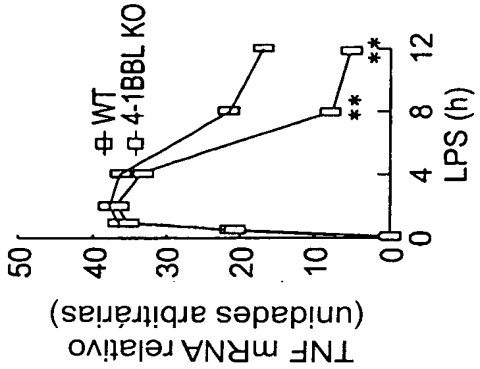


Fig. 3D

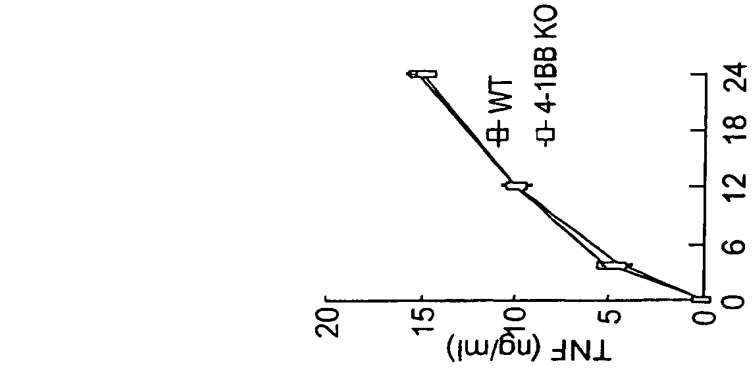


Fig. 3C

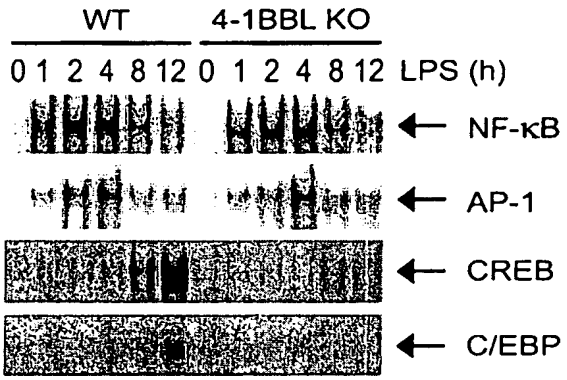

WT
4-1BBL KO
0 1 2 4 8 12 0 1 2 4 8 12 LPS (h)
NF-κB
AP-1
CREB
C/EBP

Fig. 3G

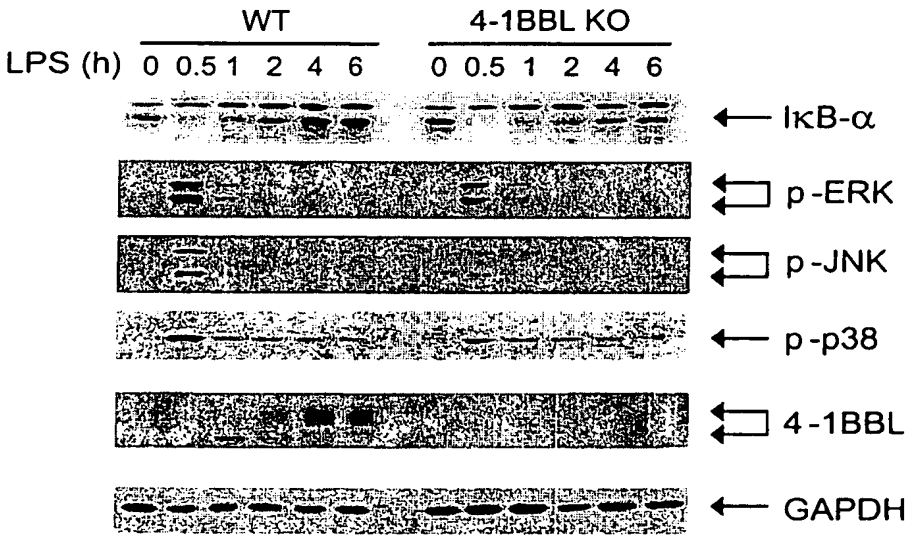

WT
4-1BBL KO
LPS (h) 0 0.5 1 2 4 6 0 0.5 1 2 4 6
IκB-α
p-ERK
p-JNK
p-p38
4-1BBL
GAPDH

Fig. 3H

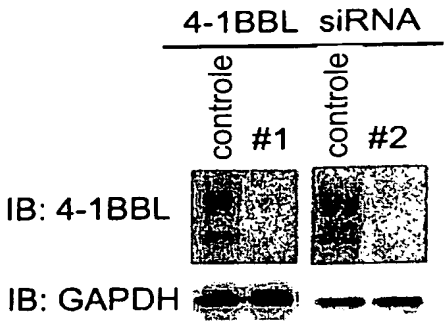


Fig. 4A

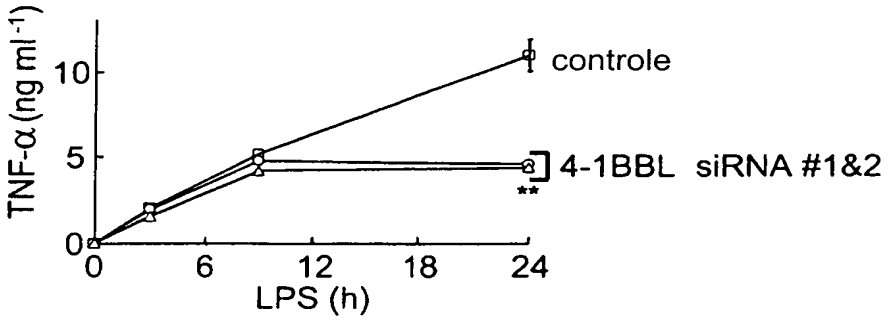


Fig. 4B

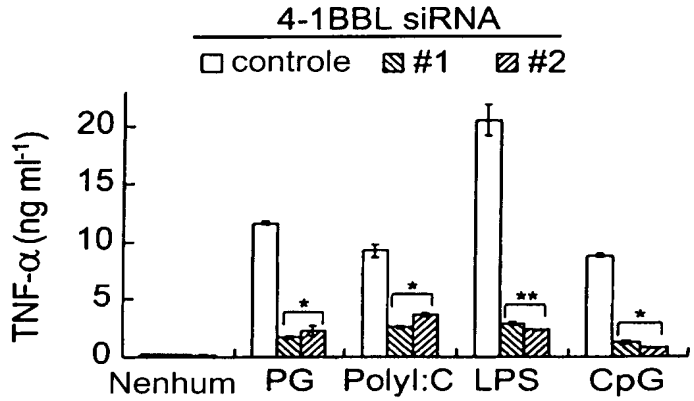


Fig. 4C

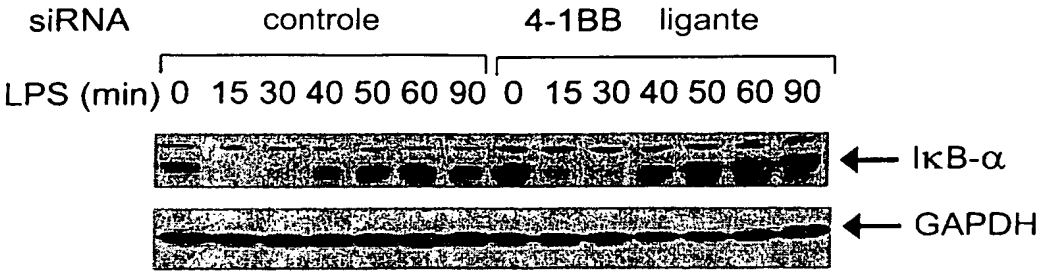


Fig. 4D

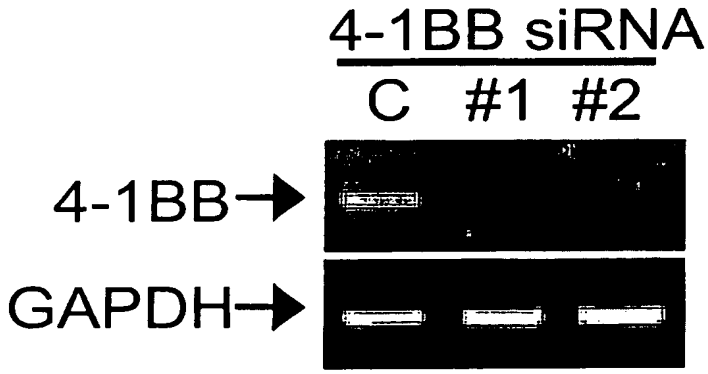

4-1BB siRNA
C #1 #2
4-1BB
GAPDH

Fig. 5A

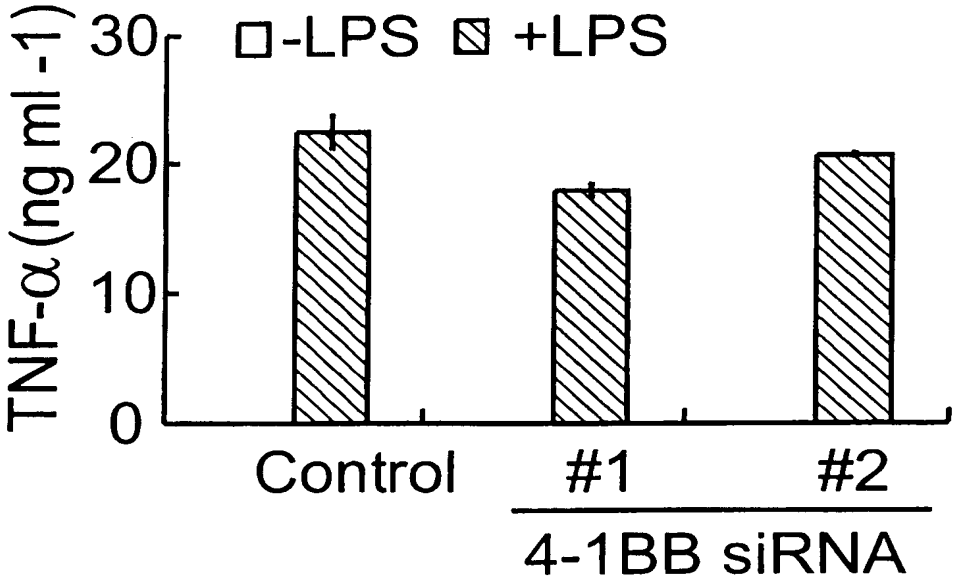

TNF-α (ng ml -1)
30
20
10
0
□-LPS ▨ +LPS
Control
#1
#2
4-1BB siRNA

Fig. 5B

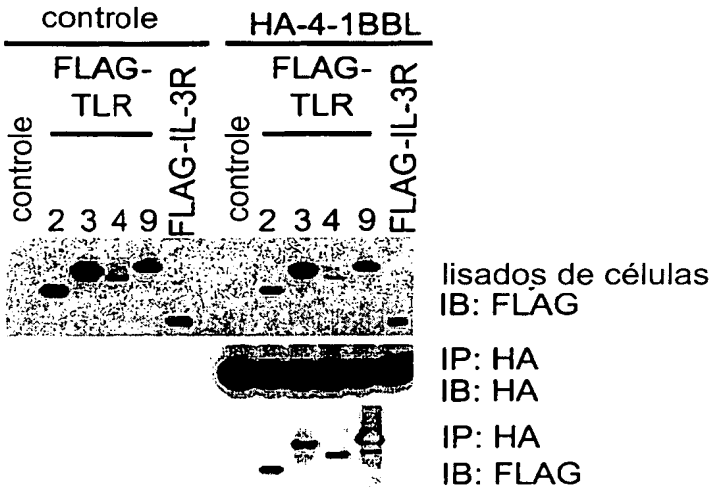

controle
HA-4-1BBL
FLAG-TLR
FLAG-IL-3R
controle
2 3 4 9
lisados de células
IB: FLAG
IP: HA
IB: HA
IP: HA
IB: FLAG

Fig. 6A

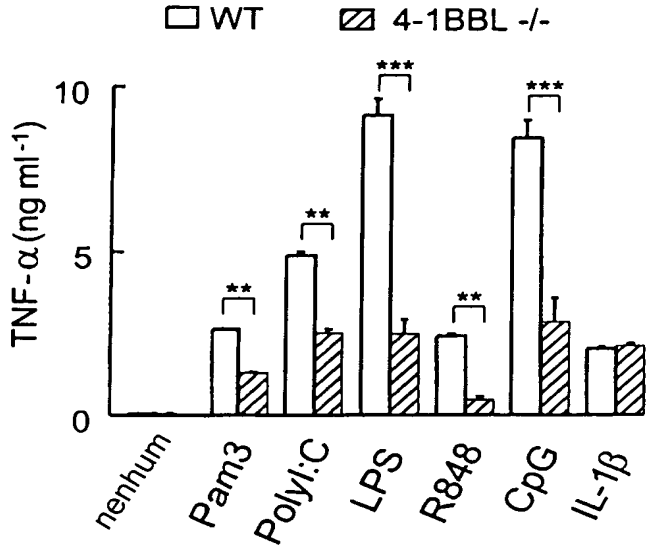

WT
4-1BBL -/-
TNF-α (ng ml-1)
10
5
0
**
**
***
**
***
nenhum
Pam3
Poly I:C
LPS
R848
CpG
IL-1β

Fig. 6B

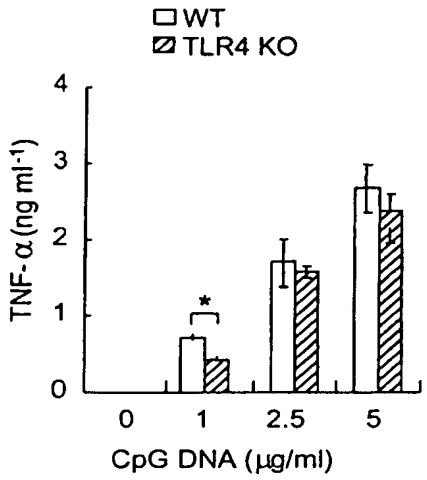

WT
TLR4 KO
TNF-α(ng ml-1)
4
3
2
1
0
*
0
1
2.5
5
CpG DNA (μg/ml)

Fig. 6C

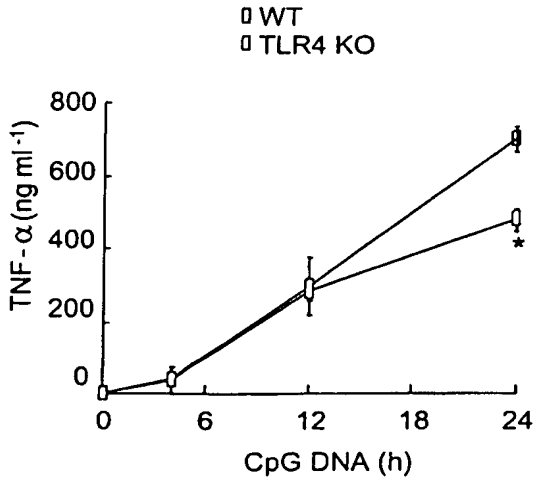

WT
TLR4 KO
TNF-α(ng ml-1)
800
600
400
200
0
*
0
6
12
18
24
CpG DNA (h)

Fig. 6D

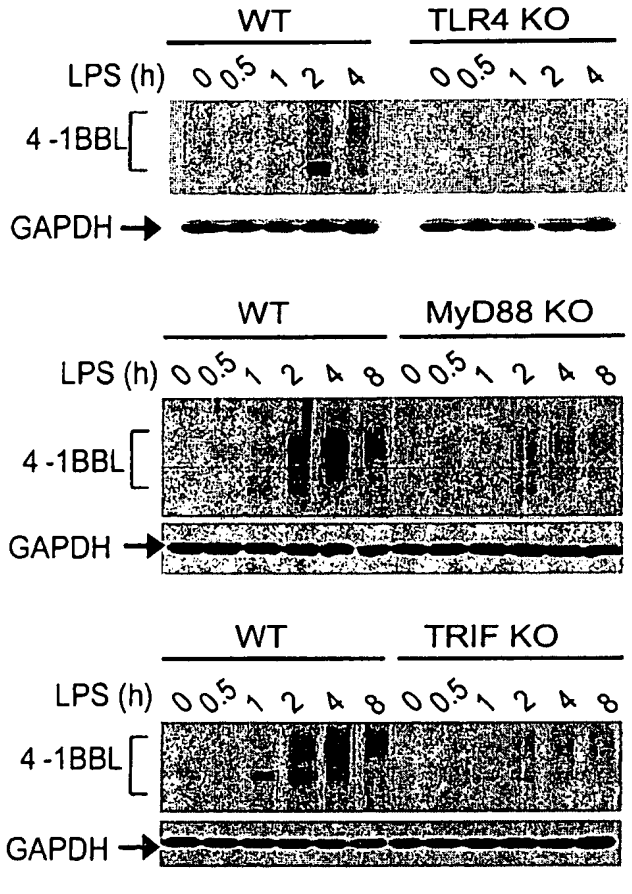

WT
TLR4 KO
LPS (h) 0 0.5 1 2 4 0 0.5 1 2 4
4 -1BBL
GAPDH
WT
MyD88 KO
LPS (h) 0 0.5 1 2 4 8 0 0.5 1 2 4 8
4 -1BBL
GAPDH
WT
TRIF KO
LPS (h) 0 0.5 1 2 4 8 0 0.5 1 2 4 8
4 -1BBL
GAPDH

Fig. 7A

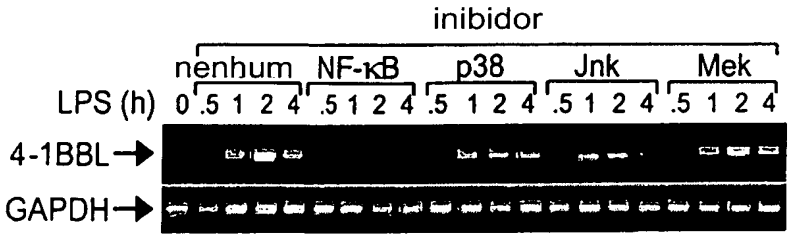

inibidor
nenhum
NF-κB
p38
Jnk
Mek
LPS (h) 0 .5 1 2 4 .5 1 2 4 .5 1 2 4 .5 1 2 4 .5 1 2 4
4-1BBL
GAPDH

Fig. 7B

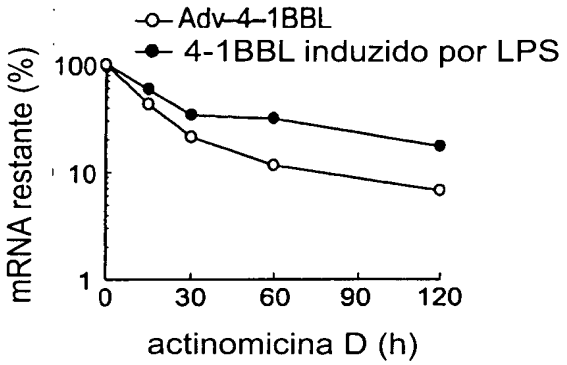

Adv-4-1BBL
4-1BBL induzido por LPS
mRNA restante (%)
100
10
1
0
30
60
90
120
actinomicina D (h)

Fig. 7C

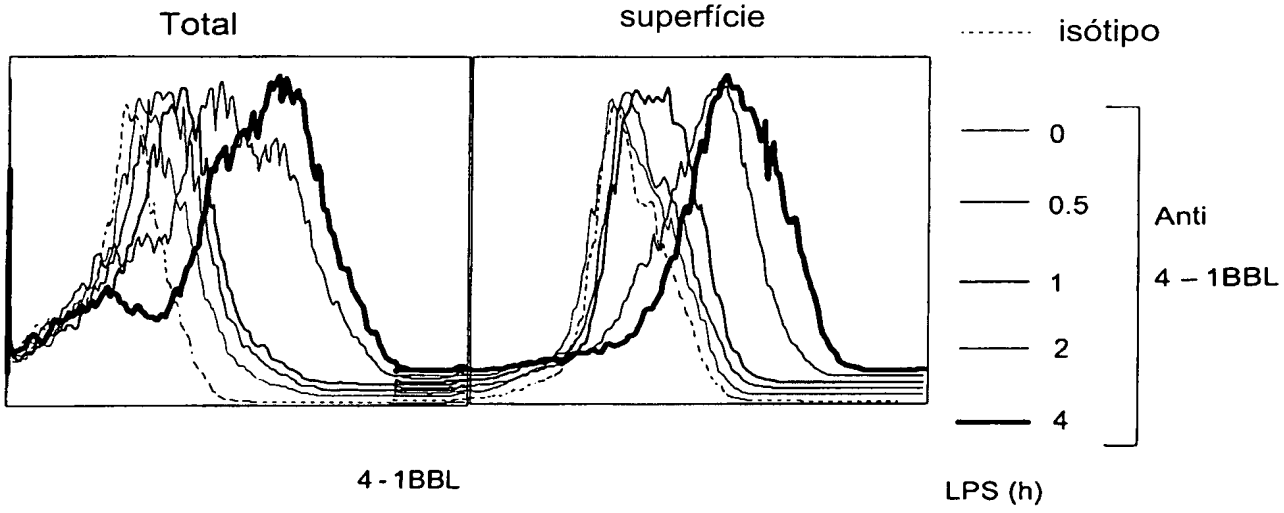

Total
superfície
isótipo
0
0.5
1
2
4
Anti
4 – 1BBL
4 - 1BBL
LPS (h)

Fig. 7D

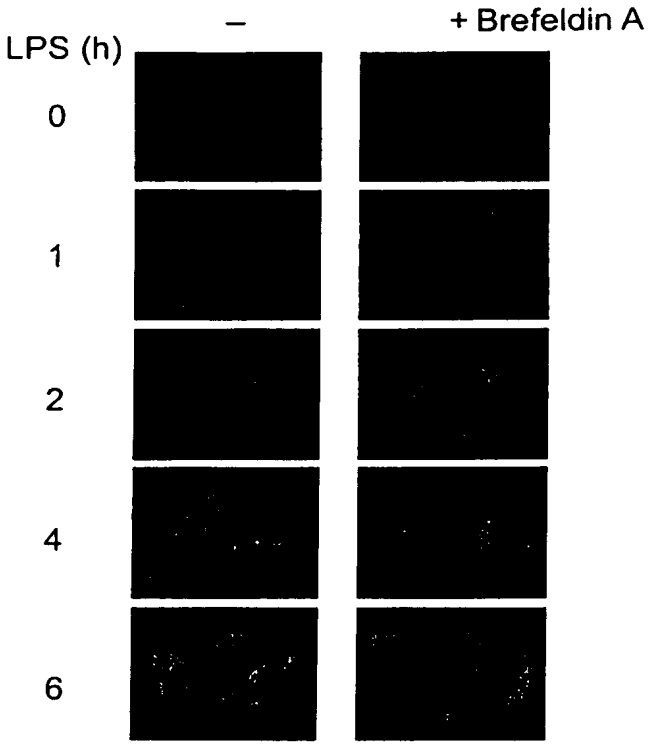

–
+ Brefeldin A
LPS (h)
0
1
2
4
6

Fig. 7E

–
+Brefeldin A
LPS (h) 0 1 2 4 6 0 1 2 4 6
4-1BBL
TNF
GAPDH

Fig. 7F

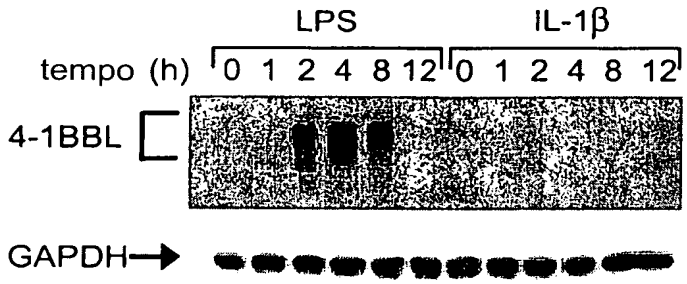


Fig. 8A

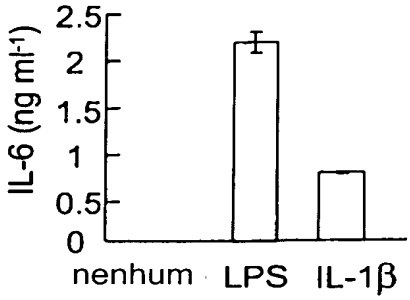


Fig. 8B

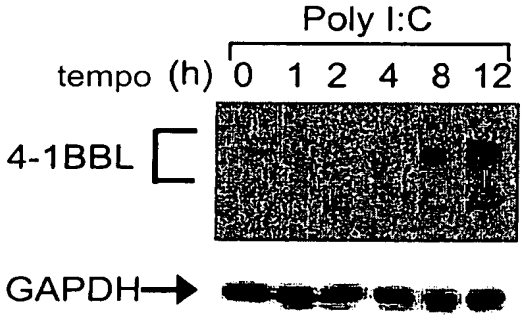


Fig. 8C

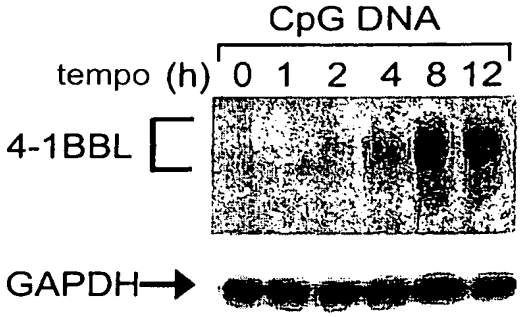


Fig. 8D

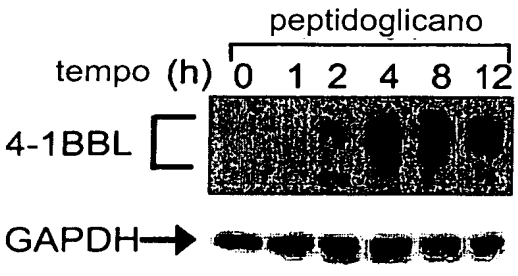


Fig. 8E

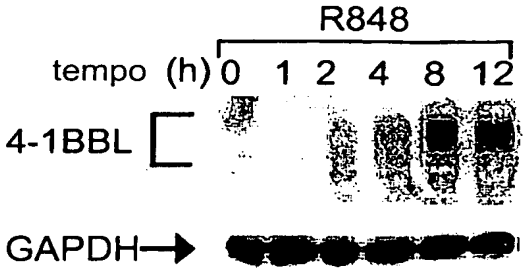


Fig. 8F

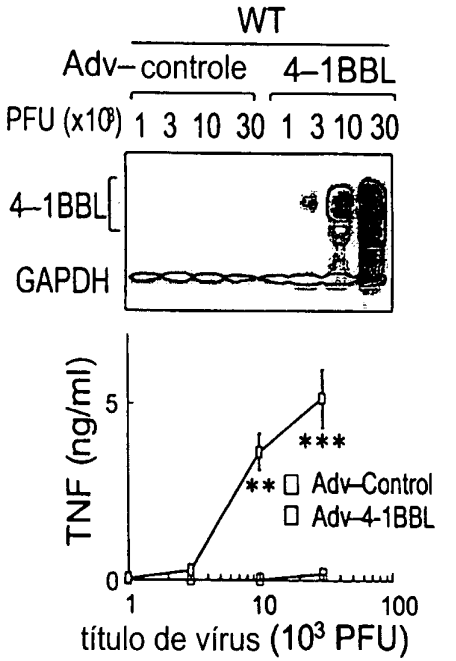


Fig. 9A

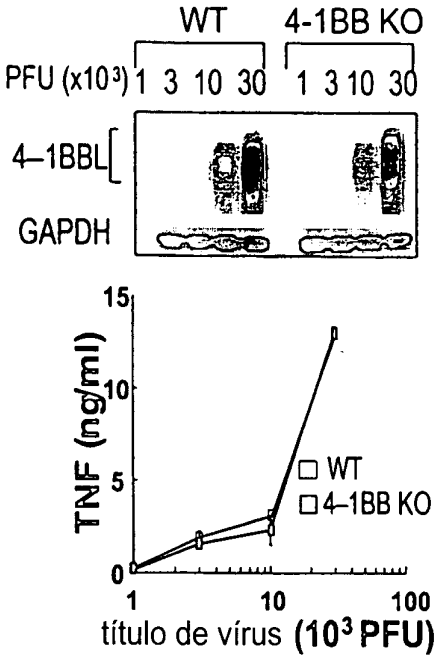


Fig. 9B

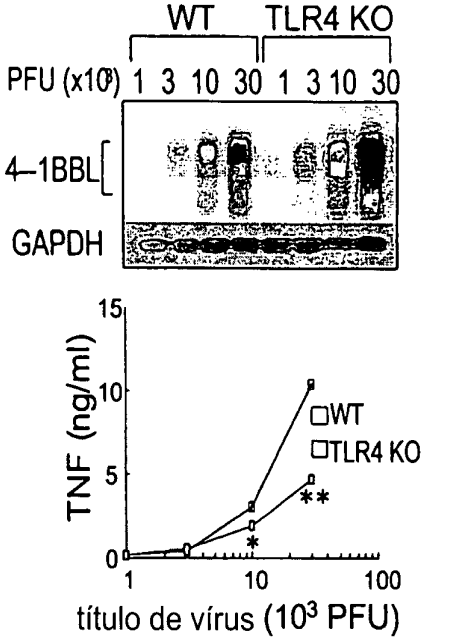


Fig. 9C

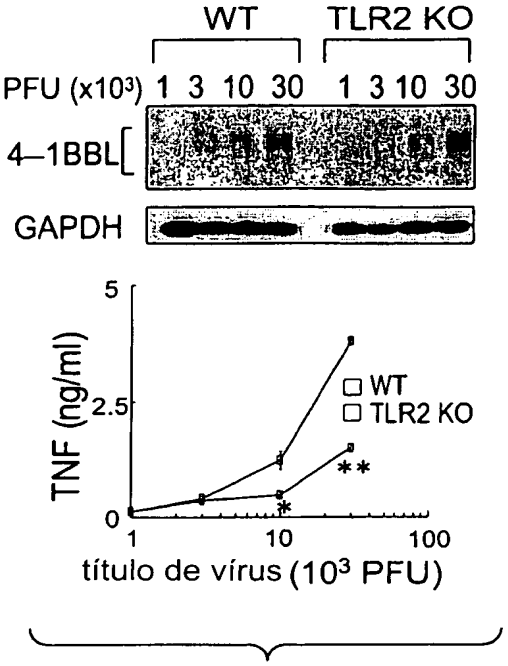


Fig. 9D

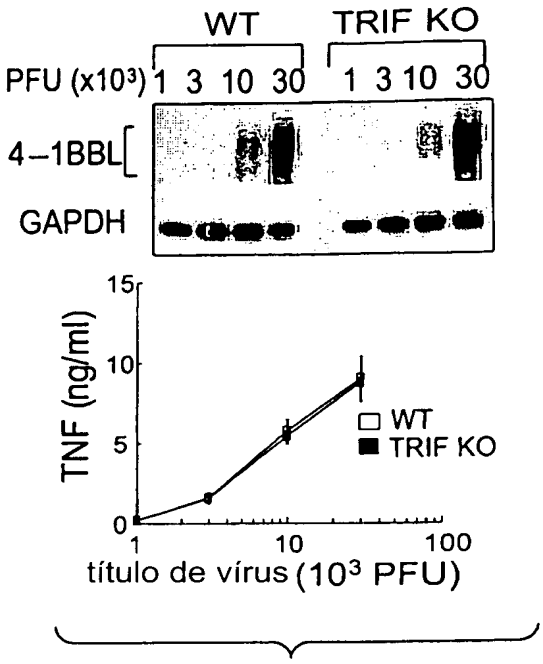


Fig. 9E

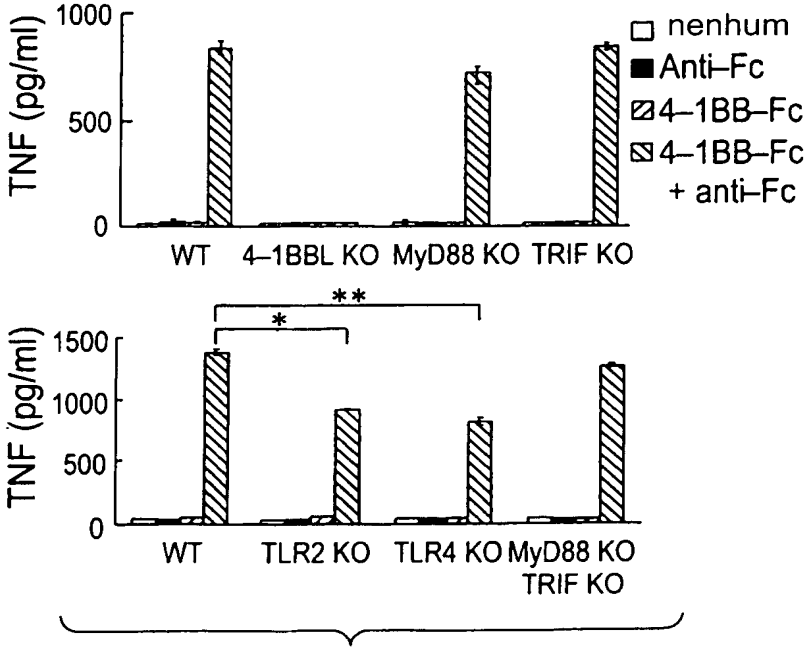


Fig. 9F

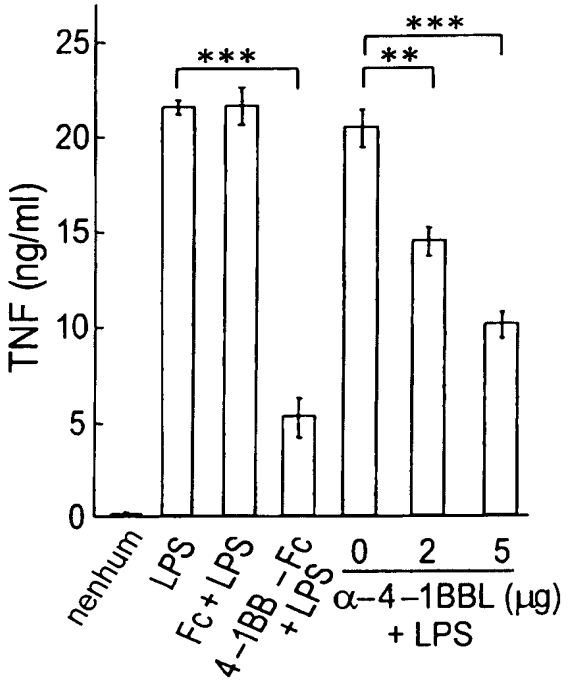


Fig. 9C

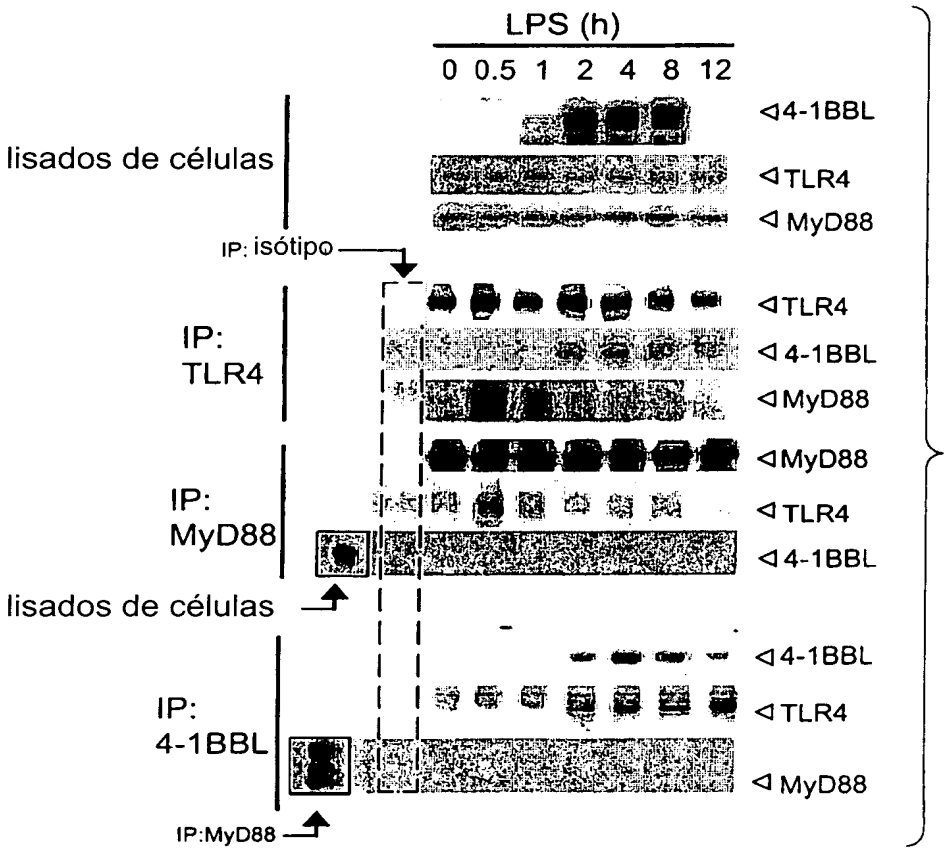


Fig. 10A

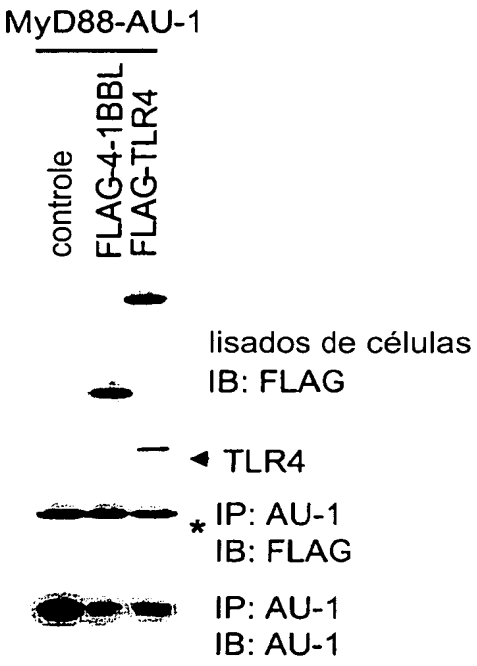


Fig. 10B

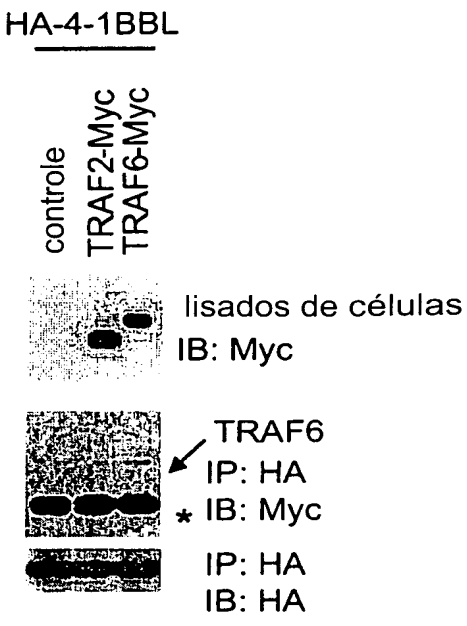


Fig. 10C

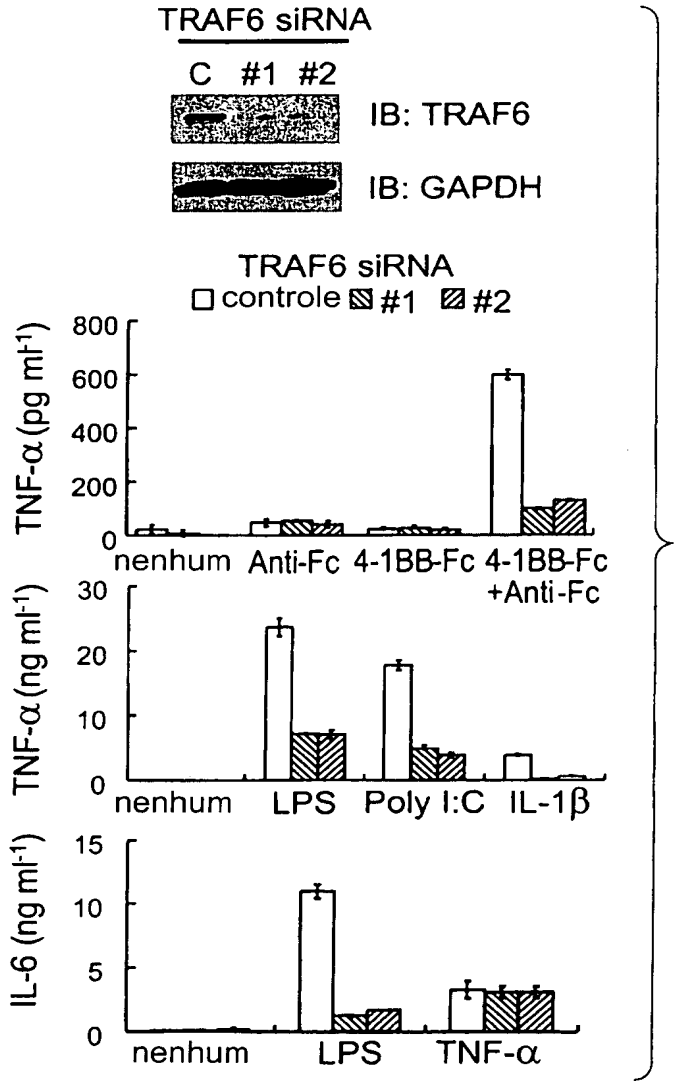


Fig. 10D

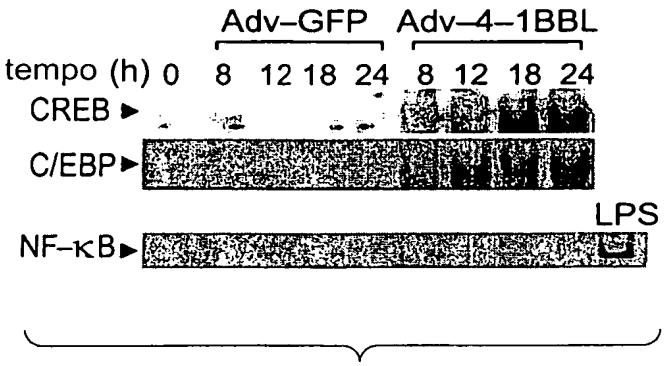


Fig. 10E

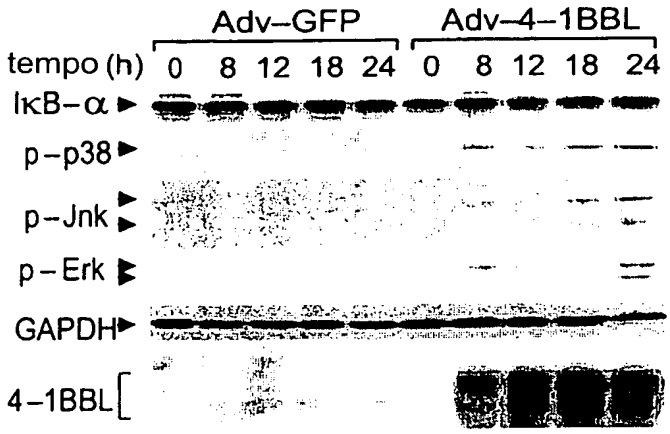


Fig. 10F

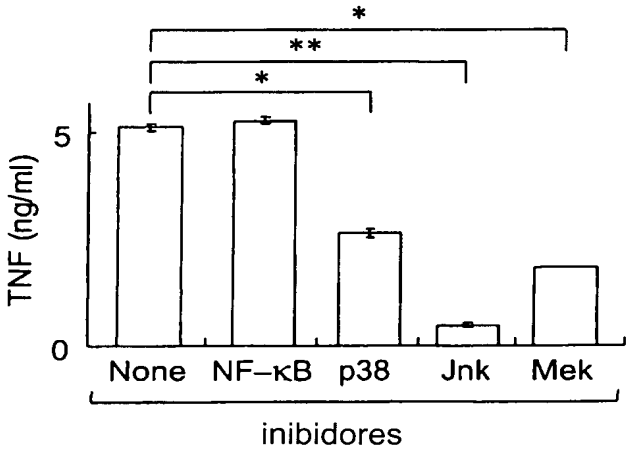


Fig. 10C

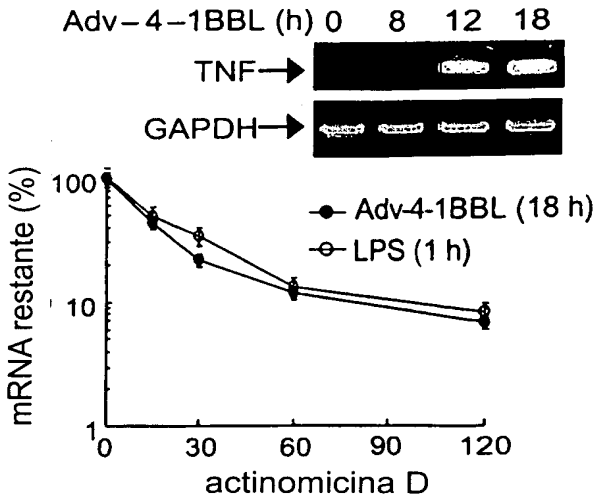


Fig. 10H

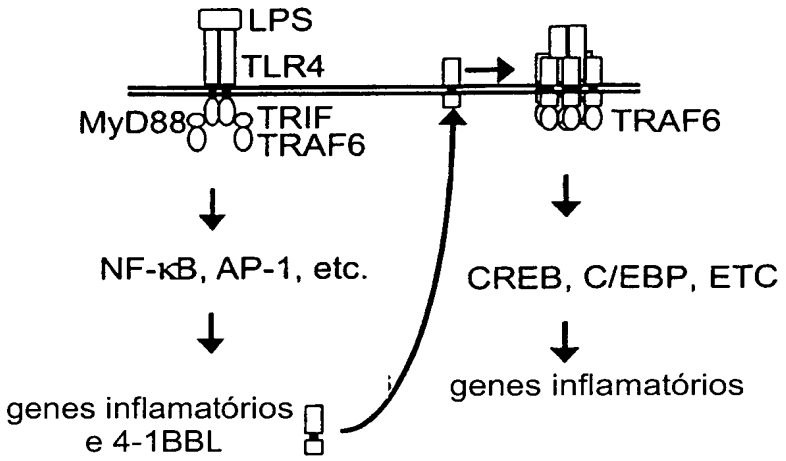


Fig. 10I

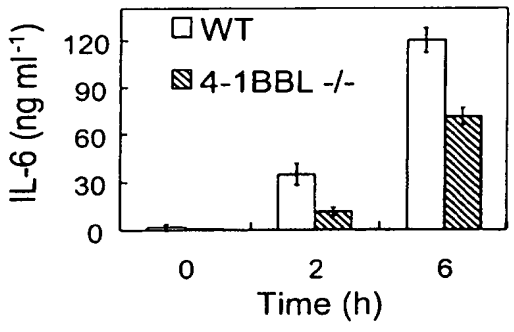


Fig. 11A

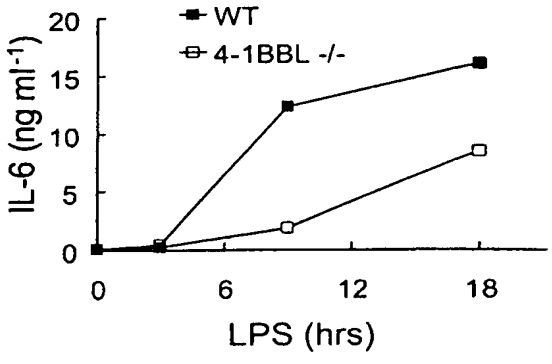


Fig. 11B

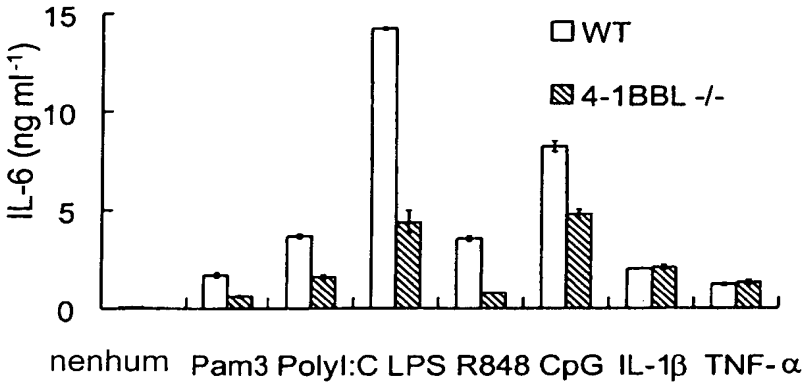


Fig. 11C

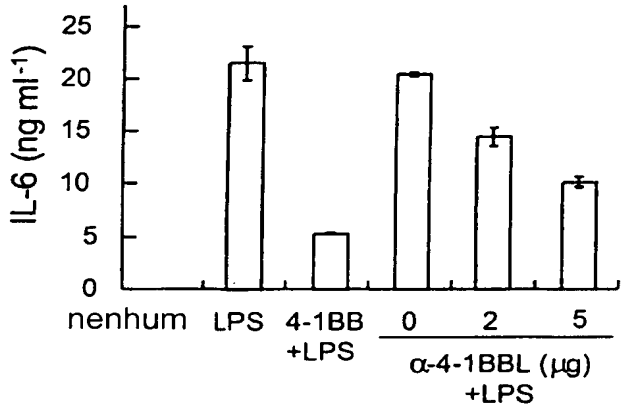


Fig. 11D

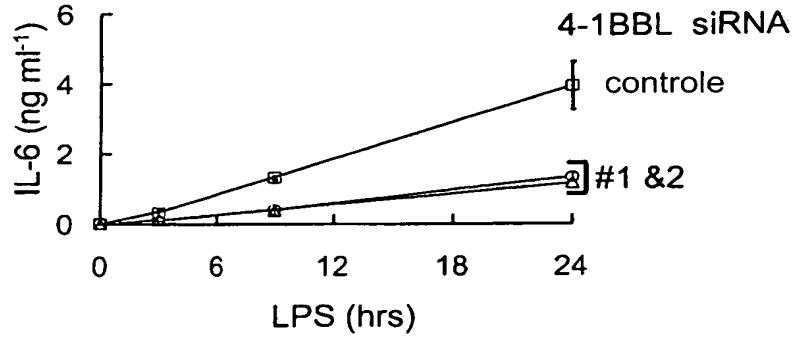


Fig. 11E

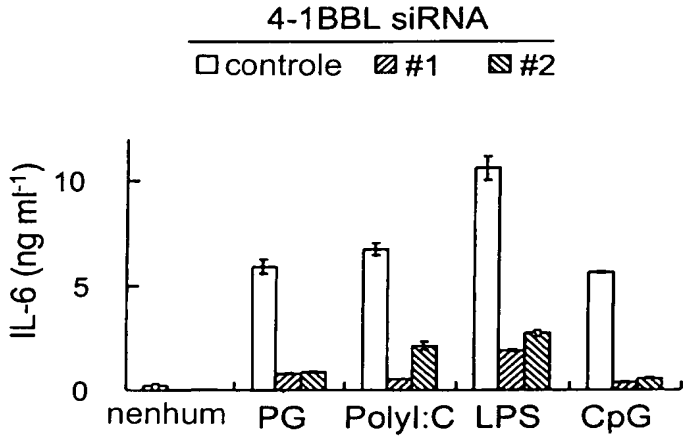


Fig. 11F

ligante de 4-1BB de camundongo

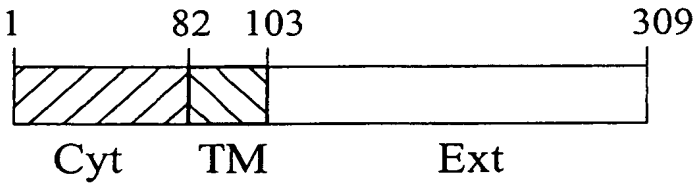


Fig. 12A

ligante de 4-1BB de ser humano

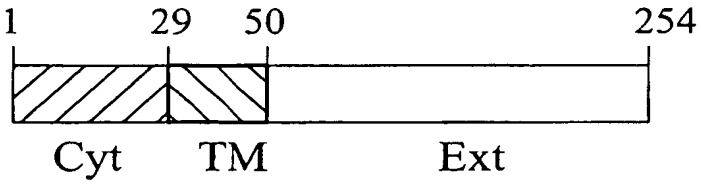


Fig. 12B

4-1BB de camundongo

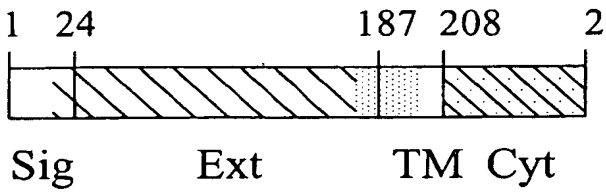


Fig. 13A

4-1BB de ser humano

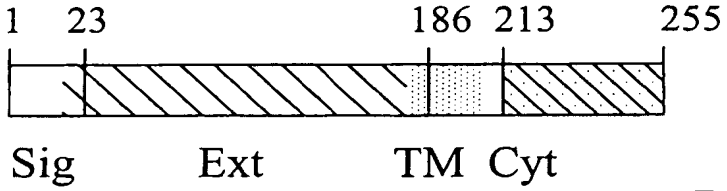


Fig. 13B

4 1BB/Fc de camundongo

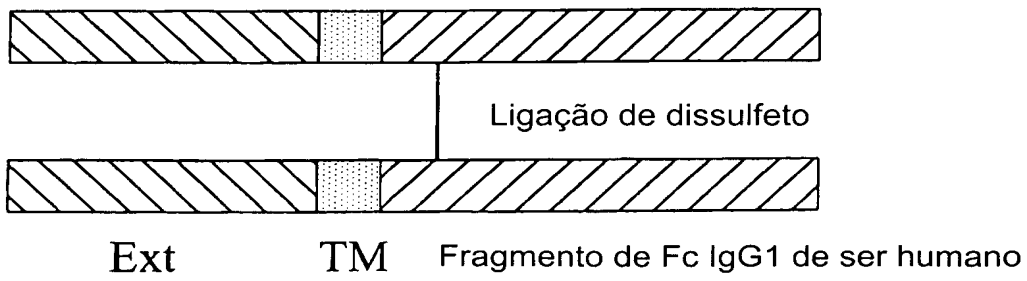


Fig. 13C

RESUMO

Patente da Invenção: **"LIGANTE DE 4-1BB EM DOENÇAS INFLAMATÓRIAS".**

A presente invenção refere-se a agentes de bloqueamento de 4-1BBL bem como artigos de fabricação e composições farmacêuticas compreendendo tais agentes de bloqueamento como novas intervenções terapêuticas para a inflamação sustentada. Assim, a invenção também provê métodos para a redução de produção sustentada de fator de necrose de tumor.