



(11) *Número de Publicação:* PT 671934 E

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
A61K038/19 A

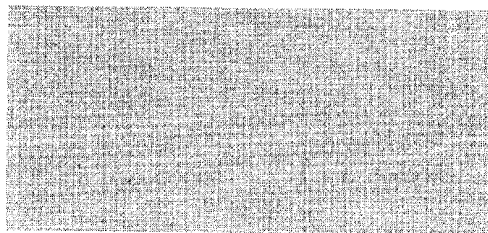
(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1993.09.01	(73) <i>Titular(es):</i> GENETICS INSTITUTE, LLC 87 CAMBRIDGE PARK DRIVE CAMBRIDGE, MA 02140 US
(30) <i>Prioridade:</i> 1992.09.02 US 941372	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1995.09.20	(72) <i>Inventor(es):</i> DAVID A. WILLIAMS STEVEN C. CLARK US US
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 2000.12.20	(74) <i>Mandatário(s):</i> JOÃO MANUEL MAY PEREIRA DA CRUZ RUA DE VÍTOR CORDON 10-A 3/AND. 1200 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* MÉTEDO PARA O TRATAMENTO DE LESÕES OU DE DIMINUIÇÕES CELULARES

(57) *Resumo:*

MÉTEDO PARA O TRATAMENTO DE LESÕES OU DE DIMINUIÇÕES
CELULARES



Campo das Cebolas - 1100 LISBOA

Telefs.: 01 888 51 51 / 2 / 3

Linha azul: 01 888 10 78 • Fax: 01 887 53 08 - 886 00 66

E mail: inpi @ mail. telepac. pt

REF.: 100.053/EXT



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA

FOLHA DO RESUMO

PAT. INV. ☒	MOD. UTI. ☐	MOD. IND. ☐	DES. IND. ☐	TOP. SEMIC. ☐	CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL (51)
N.º 671.934 (11)				DATA DO PEDIDO ____/____/____ (22)	
REQUERENTE (71) GENETICS INSTITUTE, INC., norte-americana, industrial, com sede em (NOME E MORADA) 87 Cambridge Park Drive, Cambridge, Massachusetts 02140, Estados Unidos da América CÓDIGO POSTAL _____					
INVENTOR(ES) / AUTOR(ES) (72) WILLIAMS, DAVID, A. e CLARK, STEVEN, C.					
REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE(S) (30)					FIGURA (para interpretação do resumo)
DATA DO PEDIDO	PAÍS DE ORIGEM	N.º DO PEDIDO			
EPIGRAFE (54) "MÉTODO PARA O TRATAMENTO DE LESÕES OU DE DIMINUIÇÕES CELULARES"					
RESUMO (max. 150 palavras) (57) A invenção descreve um método para restabelecer populações de células onde ocorreram lesões ou diminuições, tratando os pacientes com citoquinas, em particular a IL-11 e a IL-6.					

NÃO ESCREVER NAS ZONAS SOMBREADAS

641934

1

258

Descrição

“Método para o tratamento de lesões ou de diminuições celulares”

O presente trabalho recebeu subsídios dos Institutos Nacionais de Saúde, a que correspondem os n^{os} 1 PO1 HL45168-01A1 e 1R01 HL46528-01. O governo tem alguns direitos nesta invenção.

Campo da invenção

A presente invenção proporciona um método para tratar pacientes que padeçam de doenças caracterizadas por lesões ou destruições celulares e mais especificamente diz respeito a um método de utilização de uma citoquina para regenerar populações de determinadas células, em particular as células do intestino.

Antecedentes da invenção

Determinadas células dos mamíferos, no seu estado normal, caracterizam-se por uma divisão e uma proliferação rápidas no corpo, v.g., as células epiteliais do intestino delgado, as células do esperma, as células do cabelo e da pele e ainda os hepatócitos ou células do fígado. As lesões ou as diminuições destas células podem ter origem em determinadas doenças, infecções, exposição a agentes terapêuticos e tratamentos, exposição a outros agentes químicos ou biológicos e ferimentos ou traumas.

Por exemplo, o recurso à quimioterapia e à radioterapia para o tratamento de cancro e para a preparação de pacientes para a transplantação de medula óssea constitui um procedimento

258

tóxico para as células epiteliais do intestino delgado. Com efeito, o intestino delgado é um dos órgãos mais danificados por esta terapia. Igualmente danificadas por esta terapia são as células da pele, as células do cabelo e as células do esperma. Esta danificação celular, em particular no que diz respeito às células do intestino, é a causa de taxas significativas de mortalidade e de morbilidade em pacientes com cancro sujeitos a terapia. Anteriormente essa toxicidade era evitada limitando a intensidade da quimioterapia ou da radiação administrada a um paciente. Por exemplo, a toxicidade sobre as células do intestino por efeito da radioterapia tem sido atenuada quer diminuindo a quantidade de radiação quer administrando a dose total subdividida em várias fracções (processo designado por terapia de 'fraccionamento'). No entanto, a redução da intensidade da terapia também tem um efeito adverso sobre a disseminação e o crescimento do cancro contra o qual é dirigida.

Sabe-se que determinadas doenças de natureza autoimunitária do intestino, tal como a doença de Crohn e a colite ulcerativa, também danificam as células do intestino delgado que estão a revesti-lo, originando maiores taxas de morbilidade e mortalidade nos pacientes assim afectados. O tratamento de doenças de natureza autoimunitária do intestino compreende a quimioterapia e a supressão imunitária, tendo qualquer destes processos graves efeitos secundários, salientando-se entre eles uma maior danificação e uma divisão rápida das células do intestino.

As populações de células da pele e do cabelo também podem ser danificadas por doenças de natureza autoimunitária, queimaduras e alopecia. As populações de células do esperma são danificadas por oligospermia. Os hepatócitos também são danificados por radiação, quimioterapia e traumas físicos.

Os danos provocados às células do intestino e a outras células de crescimento rápido num mamífero normal saudável também podem ser consequência de traumas ou de lesões

258
3

nessas zonas ou por efeito de choque. A exposição a determinados agentes químicos industriais e domésticos, entre outros, também pode danificar gravemente as populações normais saudáveis destas células. (Ver o documento WO-A-91/15227; Cancer Res. 50:2885-2890 (1990); US-A-5 082 658).

Neste domínio continua a ser necessário que haja métodos para tratar as lesões celulares, em particular os danos causados às células do intestino por doenças ou efeitos adversos da quimioterapia e da radioterapia ou por exposição a outros agentes lesionantes ou provocados por traumas nos mamíferos, em particular nos seres humanos.

Descrição abreviada da invenção

De acordo com um dos seus aspectos a presente invenção proporciona um método para tratar pacientes que possuam populações de células lesionadas ou diminuídas, seleccionadas entre o conjunto constituído pelas células epiteliais do intestino delgado, células epiteliais de revestimento do intestino grosso e do estômago, células da pele, células do cabelo, células do esperma e células epiteliais do fígado (hepatócitos). Este método consiste em administrar a um paciente uma quantidade eficaz de uma citoquina ou de um factor de crescimento hematopoiético seleccionado.

De acordo com outro dos seus aspectos, a presente invenção proporciona um método para tratar um paciente que esteja sujeito a quimioterapia ou a radioterapia, o qual consiste em administrar-lhe uma citoquina seleccionada em simultaneidade com o início do tratamento quimioterapêutico ou radioterapêutico, ou então subsequentemente. O tratamento com a citoquina irá prosseguir até ser restabelecida uma população de células saudáveis escolhidas entre o conjunto constituído por células epiteliais do intestino delgado, células epiteliais de

revestimento do intestino grosso e do estômago, células da pele, células do cabelo, células do esperma e hepatócitos.

De acordo com um outro dos seus aspectos, a presente invenção proporciona um método para restabelecer populações de células saudáveis escolhidas entre o conjunto constituído por células epiteliais do intestino delgado, células epiteliais de revestimento do intestino grosso e do estômago, células da pele, células do cabelo, células do esperma e células epiteliais do fígado em pacientes que padeçam de doenças de natureza autoimunitária, administrando-se a esses pacientes quantidades eficazes de uma citoquina escolhida, em particular a IL-11. Desde já se afirma que estes tratamentos com citoquinas podem ser feitos em combinação com as terapias imunossupressivas actualmente conhecidas e utilizadas.

A citoquina eventualmente única ou as várias citoquinas, por si sós ou em combinação, úteis nestes métodos podem ser seleccionadas entre interleucina 11, interleucina 6, factor inibitório da leucemia (FIL, o mesmo que LIF), oncostatina M e factor neurotrófico ciliar (FNTC, o mesmo que CNTF). Entre outras citoquinas que é possível utilizar neste método refere-se as seleccionadas entre interleucina 1, interleucina 3, interleucina 12 (também conhecida por factor estimulador das células aniquiladoras naturais) e o FEC-MG (o mesmo que GM-CSF).

Outros aspectos e vantagens da presente invenção estão melhor descritos na memória descritiva minuciosa subsequente que diz respeito aos seus casos preferenciais.

Descrição abreviada dos desenhos

A figura 1 é um gráfico que ilustra a sobrevivência de murganhos de contraprova e de murganhos tratados com a IL-11 a seguir a um tratamento combinado por quimioterapia e por radiação, conforme descrito no exemplo 5.

A figura 2 é um gráfico de barras que ilustra o efeito da IL-11 sobre a proliferação de células IEC-6, conforme adiante descrito no exemplo 9.

Descrição minuciosa da invenção

A invenção proporciona um método para a utilização de uma citocina seleccionada para o tratamento de lesões ou diminuições de populações de células, em particular nos casos de populações de células que normalmente se dividem rapidamente. Entre estas populações estão incluídas, mas sem que isso constitua qualquer limitação, as células epiteliais do intestino delgado, as células epiteliais de revestimento do intestino grosso e do estômago, as células epiteliais do fígado (hepatócitos), as células da pele, as células do cabelo e as células do esperma.

Os métodos da presente invenção, os quais implicam a administração de uma ou várias citocinas escolhidas, são úteis para restabelecer as populações de tais células, independentemente da fonte ou da origem da lesão ou da diminuição da população de células. As citocinas são proteínas reguladoras que transportam sinais entre células do sistema imunitário e que possuem efeitos reguladores sobre as células dos sistemas hematopoiético e imunitário. Uma citocina preferida para utilização no tratamento de populações de células lesionadas é a IL-11 que é uma citocina de mamíferos sobre a qual se sabe que é útil para o tratamento de determinadas doenças da medula óssea e para estimular directa ou indirectamente a produção ou a actividade das células B. A IL-11 está descrita minuciosamente no pedido de patente de invenção internacional PCT/US90/06803 publicado a 30 de Maio de 1991 como sendo o documento WO-A-91/07495.

A sequência da IL-11 humana clonada, ilustrada no quadro I [SEQ ID NO:1 e 2], foi depositada na instituição ATCC 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, em 30 de

258

Março de 1990 sob a referência ATCC nº 68284. Além disso, conforme descrito nos exemplos subsequentes, também é possível produzir a IL-11 por via recombinante como uma proteína de fusão com outra proteína. O quadro II [SEQ ID NO:3 e 4] apresenta tal sequência de fusão com a tioredoxina de *E. coli*. Estas sequências facilitam a produção de IL-11 num conjunto vasto de células hospedeiras por recurso às técnicas convencionais da engenharia genética.

A IL-11 também pode ser obtida a partir de determinadas linhagens celulares. Foram já identificadas linhagens celulares humanas como fontes pelo menos de uma espécie de IL-11, por exemplo, a linhagem celular dos fibroblastos dos pulmões dos seres humanos, designadamente a linhagem MRC-5 (Acesso ao ATCC com o nº CCL 171) e a linhagem celular trofoblástica humana designada por TPA30-1 (Acesso ao ATCC com o nº CRL 1583). Há ainda outras fontes humanas de IL-11. Como informação complementar respeitante à produção de IL-11 recombinante e respeitante também ao isolamento da IL-11 obtida a partir de fontes celulares refere-se o texto do pedido de patente de invenção internacional com o nº PCT/US90/06803.

Não é só a IL-11 que é útil nos métodos para tratar e restabelecer as populações de células anteriormente referidas, havendo também outras citocinas que são úteis nos mesmos métodos. Desde já se afirma que há determinadas citocinas, caracterizadas pelo facto de possuírem circuitos de transdução do sinal comuns com os da IL-11 (isto é, efectuem a transdução através da gp130) que são úteis para tratar pacientes em que haja lesões celulares nas populações de células seleccionadas, da mesma forma que é utilizada a IL-11, e/ou em combinação com a IL-11. Ver, N.Y. Ip *et al.*, Cell, 69:1121-1132 (1992).

Outra citocina preferida, utilizável na presente invenção e que partilha actividades biológicas comuns com a IL-11, é a interleucina 6 (IL-6) que está descrita minuciosamente no pedido de patente de invenção PCT com o nº WO88/00206 publicado a 14 de Janeiro de 1988.

258

Há ainda uma outra citoquina, que partilha o circuito de transdução do sinal com a IL-11, que é o Factor Inibitório da Leucemia (FIL), também designado por Factor Colinérgico de Diferenciação (FCD, o mesmo que CDF), conforme descrito minuciosamente no pedido de patente de invenção PCT com o nº WO90/02183 publicado a 8 de Março de 1990. Uma outra citoquina igualmente caracterizada é a oncostatina M (OSM), minuciosamente descrita no pedido de patente de invenção europeia nº 290 949, publicado a 12 de Novembro de 1988. Além disso, o Factor Neurotrófico Ciliar (FNTC) partilha este circuito de transdução do sinal e desde já se afirma que é útil nos métodos para restabelecer estas populações de células. O FNTC está descrito minuciosamente no pedido de patente de invenção PCT com o nº WO9104316, publicado a 4 de Abril de 1991.

Cabe agora salientar que é provável que haja outras citoquinas que também são úteis nos métodos da presente invenção, quer quando utilizadas em vez da IL-11, da IL-6 e/ou de uma ou várias das outras citoquinas anteriormente descritas quer em combinação com tais substâncias. Uma outra citoquina útil no método terapêutico ou em combinação com uma preparação farmacêutica de acordo com a presente invenção é a interleucina 1 (IL-1). A IL-1 está descrita minuciosamente no pedido de patente de invenção europeia nº 456 332, publicado a 13 de Novembro de 1991. Outra citoquina útil é o Factor Estimulador das Células Aniquiladoras Naturais (FECAN, o mesmo que NKSF), também designado por interleucina 12 (IL-12). Esta citoquina está descrita minuciosamente no pedido de patente de invenção PCT com o nº WO9205256, publicado a 2 de Abril de 1992.

Outras citoquinas que podem úteis nestes métodos para restabelecer populações de células seleccionadas entre as células epiteliais do intestino delgado, as células epiteliais que revestem o intestino grosso e o estômago, as células epiteliais do figado, as células da pele, as

células do cabelo e as células do esperma, são a interleucina 3 (IL-3) e o Factor Estimulador das Colónias de Macrófagos Granulócitos (FEC-MG). O FEC-MG está descrito minuciosamente no pedido de patente de invenção PCT com o nº WO8600639, publicado a 30 de Janeiro de 1986 [ver também o pedido de patente de invenção europeia nº 281 069, publicado a 7 de Setembro de 1988]. A IL-3 está descrita minuciosamente na patente de invenção norte-americana nº 4 959 455 concedida a 25 de Setembro de 1990.

Para mais informação geral sobre estas citoquinas veja-se também as obras de F. Takatsuki *et al.*, Cancer Res., 50:2885-2890 (1990); D. P. Gearing *et al.*, Science, 255:1434-1437 (1992) e G. Damia *et al.*, Cancer Res., 52:4082-4089 (1992).

Para utilização nos métodos de tratamento divulgados na presente invenção, as citoquinas anteriormente descritas, ou os seus fragmentos biologicamente activos, podem ser preparadas por técnicas da engenharia genética, conforme divulgado nas obras anteriormente referidas. Além do mais, conjuntamente com as técnicas recombinantes, também é possível produzir os polipeptidos de citoquinas anteriormente descritos, recorrendo a técnicas convencionais de síntese química. Os métodos para construir os polipeptidos úteis na presente invenção por via sintética são conhecidos pelos especialistas na matéria. Convém afirmar desde já que as sequências polipeptídicas das citoquinas construídas por via sintética, devido ao facto de partilharem características estruturais primárias, secundárias ou terciárias e conformacionais com os polipeptidos de citoquinas naturais possuem actividades biológicas comuns às destes. Tais sequências polipeptídicas de citoquinas construídas por via sintética, ou os seus fragmentos que dupliquem total ou parcialmente a sua funcionalidade, também são utilizáveis como substitutos biologicamente activos ou imunológicos das citoquinas purificadas naturais, úteis na presente invenção.

As modificações existentes nas proteínas, nos péptidos ou nas sequências de ADN destas citoquinas ou dos seus fragmentos activos também podem produzir proteínas eventualmente utilizáveis nos métodos da presente invenção. Tais citoquinas modificadas podem ser produzidas por um especialista na matéria, recorrendo a técnicas conhecidas. As modificações relevantes nas sequências das citoquinas, v.g., na sequência da IL-11, podem ser a substituição, a inserção ou a supressão de um ou vários resíduos aminoácidos nas sequências codificadoras. As técnicas mutagénicas para tais substituições, inserções ou supressões são bem conhecidas pelos especialistas na matéria. [Ver, v.g., a patente de invenção norte-americana nº 4 518 584].

Outras mutações específicas das sequências dos polipeptidos de citoquinas que podem ser terapeuticamente úteis, conforme aqui descrito, podem ser, v.g., a inserção de um ou vários locais de glicosilação. Um local de reconhecimento de glicosilação ligado ao resíduo asparagina pode ser inserido na sequência por supressão, substituição ou adição de aminoácidos na sequência peptídica ou de nucleótidos na sequência de ADN. Tais modificações podem ser realizadas em qualquer local da molécula que seja modificado por adição de hidratos de carbono ligados ao átomo de oxigénio. A expressão de tais sequências peptídicas ou nucleotídicas modificadas produz variantes que podem ser glicosiladas nesses locais.

Um especialista na matéria também pode produzir facilmente outros análogos e derivados da sequência da citoquina seleccionada que presumivelmente pudessem conservar ou prolongar a sua actividade total ou parcialmente, o que se admite que venha a ser útil no método da presente invenção. Uma tal modificação pode ser o acoplamento de polietileno-glicol (PEG) aos resíduos lisina existentes na sequência da citoquina ou a inserção de um ou vários resíduos lisina ou de outros resíduos aminoácidos, que possam reagir com o PEG ou com derivados de PEG, dentro da sequência por meio de técnicas convencionais para facilitar

o acoplamento de radicais PEG.

Outros análogos destas citoquinas seleccionadas também podem ser caracterizados por variações alélicas nas sequências de ADN que os codificam ou por variações induzidas nas sequências de ADN que os codificam. Desde já se afirma que na presente invenção serão igualmente úteis todos os análogos divulgados nas obras anteriormente referidas, incluindo aqueles que se caracterizam por sequências de ADN capazes de hibridarem com as sequências das citoquinas descritas, em condições de hibridação rigorosas ou em condições de hibridação não rigorosas [Sambrook *et al.*, Molecular Cloning. A Laboratory Manual., 2ª edição, Cold Spring Harbor Laboratory, Nova Iorque (1989)].

Nestes métodos também se consideram úteis as moléculas de fusão, preparadas fundindo a sequência, ou um fragmento biologicamente activo da sequência de uma citoquina, com outra citoquina ou com um agente terapêutico proteínico, *v.g.*, a IL-11 fundida com a IL-6 [ver, *v.g.*, os métodos para a fusão descritos no pedido de patente de invenção PCT com o nº WO92/04455, publicado a 19 de Março de 1992]. Em alternativa, é possível administrar combinações das citoquinas conjuntamente, em conformidade com o método.

Sendo assim, nos locais de descrição dos métodos da presente invenção em que uma citoquina particular seja mencionada pelo seu nome, os especialistas na matéria devem subentender que a citoquina mencionada abrange a proteína produzida pelas sequências presentemente conhecidas na especialidade, *v.g.*, as sequências para a IL-11, pelas sequências do quadro I e do quadro II, e também as proteínas caracterizadas pelas modificações anteriormente descritas e que conservem uma actividade praticamente idêntica em termos de restabelecimento das células de uma ou várias populações de células aqui identificadas.

Assim, a presente invenção diz respeito ao tratamento de pacientes que tenham lesões

ou diminuições de populações de células seleccionadas entre as células epiteliais do intestino delgado, as células epiteliais de revestimento do intestino grosso e do estômago, as células epiteliais do fígado, as células da pele, as células do cabelo e as células do esperma. O tratamento consiste em administrar uma quantidade eficaz de uma citocina seleccionada num veículo farmacêutico. Este tratamento facilita o restabelecimento ou a regeneração da população de células onde houve lesões ou diminuições, principalmente pela estimulação, directa ou indirecta, de todas as células progenitoras não danificadas. As células progenitoras são estimuladas de modo a diferenciarem-se dentro da população de células que tenha sido lesionada ou diminuída.

Os agentes citotóxicos utilizados nas transplantações de medula óssea e na terapia do cancro afectam rapidamente as células proliferativas, tanto da medula óssea como do intestino delgado, dando origem a toxicidades graves e frequentemente limitativas das doses. A presente invenção vem resolver este problema, tal como adiante exemplificado a propósito do tratamento de células epiteliais do intestino delgado (células de revestimento), danificadas por quimioterapia ou por radioterapia, sendo utilizada como citocina seleccionada a IL-11 e/ou a IL-6. Nos exemplos 4 a 9, a análise da mucosa do intestino delgado demonstrou uma recuperação rápida do comprimento das vilosidades e uma maior actividade proliferativa dentro das células foliculares de murganhos tratados com a IL-11 ou de murganhos tratados com a IL-6, comparativamente com murganhos de contraprova. Por exemplo, nesses exemplos, no caso dos murganhos, a IL-11 e/ou a IL-6 tiveram um efeito positivo sobre a sobrevivência dos murganhos após a exposição ao agente 5-fluór-uracilo e irradiação, sem nenhum efeito sobre o número de neutrófilos periféricos (glóbulos brancos ou leucócitos). Além disso, estes estudos permitiram tirar conclusões sobre a rápida recuperação da mucosa do intestino delgado. Assim sendo, a IL-11 e a IL-6 têm efeitos positivos sobre a recuperação de diversos tecidos onde haja toxicidades limitativas das doses a seguir a terapias citoablativas.

288

No caso de haver lesões ou diminuições das células do intestino delgado ou de outras populações de células, provocadas por terapias, o tratamento da presente invenção pode ter lugar simultaneamente com a terapia, v.g., quimioterapia ou radioterapia, ou a seguir a tal terapia. Por exemplo, é possível administrar num veículo farmacêutico adequado quantidades eficazes de IL-11 por si só, IL-6 por si só, outra citocina por si só ou então uma combinação de citocinas.

De preferência, o tratamento começa em simultaneidade ou quase logo a seguir ao início do tratamento por quimioterapia ou por radioterapia e prossegue até ao momento em que o nível das células do intestino ou de outras células retome valores aceitáveis. No entanto, a citocina escolhida, v.g., a IL-11, a IL-6 ou uma combinação de citocinas, pode ser administrada durante um intervalo de tempo adequado, antes do início do tratamento por quimioterapia ou por radioterapia, para melhorar a eficácia com que a citocina, v.g., a IL-11 ou a IL-6, estimula as células progenitoras que vão diferenciar-se em células perfeitamente desenvolvidas no intestino.

A invenção também proporciona métodos para tratar pacientes atingidos por lesões ou diminuições de populações de células seleccionadas entre as células epiteliais do intestino delgado, as células epiteliais de revestimento do intestino grosso e do estômago, as células epiteliais do fígado, as células da pele, as células do cabelo e as células do esperma, sendo essas lesões ou diminuições provocadas por doenças de natureza autoimunitária. Por exemplo, a doença de Crohn destrói e faz diminuir a população de células do intestino que normalmente se dividem com rapidez. Há outras doenças de natureza autoimunitária que também podem afectar de forma idêntica as células do intestino grosso ou do estômago, do fígado, da pele, do cabelo e do esperma. A presente invenção compreende também o tratamento de tais doenças mediante a administração de doses eficazes de uma citocina seleccionada, v.g., a IL-11, a IL-6 ou uma combinação de citocinas.

De igual modo, as infecções, traumas ou choques também podem danificar ou originar uma diminuição das populações normais de células do intestino e também de outras células aqui referidas, o que requer a administração de quantidades eficazes de uma ou várias citocinas, em particular a IL-11 ou a IL-6.

De acordo com uma variante da presente invenção, utiliza-se uma citocina seleccionada, tal como a IL-11 ou a IL-6, obtida por expressão recombinante ou preparada por via sintética e purificada até se conseguir homogeneidade, que é combinada com um veículo farmacêutico adequado para administração interna. Realiza-se a purificação recorrendo a técnicas convencionais (ver, v.g., o documento PCT/US90/06803 e os exemplos seguintes).

Os veículos adequados farmacêuticamente aceitáveis facilitam a administração da citocina, v.g., a IL-11 ou a IL-6, e são bem conhecidos na especialidade. Como exemplos de veículos refere-se as substâncias estéreis seleccionadas entre solutos salinos, lactose, sacarose, fosfato de cálcio, gelatina, dextrina, gelose, pectina, óleo de amendoim, azeite, óleo de sésamo e água. Além disso, o veículo ou diluente contém um material retardador, tal como o monoestearato de glicerilo ou o diestearato de glicerilo, cada um deles utilizado por si só ou em conjunto com uma cera. Também é possível utilizar formulações poliméricas de libertação lenta. As matrizes adequadas de libertação prolongada contêm o ingrediente activo misturado com uma ou várias das substâncias seguintes: bentonite sódica, etil-celulose, ácido esteárico, estearato de cálcio, ácido adípico, ácido fumárico, polietileno-glicol, quitina desacetilada e acetato de celulose. É possível incorporar nessas matrizes agentes adequados conservantes e/ou estabilizadores.

Em alternativa, a citocina seleccionada, v.g., a IL-11 ou a IL-6, pode ser combinada com quaisquer outros agentes convencionais que sejam úteis para mitigar os sintomas

associados à quimioterapia, tais como agentes antieméticos, antioxidantes e outros factores de crescimento hematopoiéticos.

O método terapêutico da presente invenção também pode compreender a co-administração ou a combinação de uma citocina seleccionada com outros factores humanos conhecidos pelos especialistas na matéria. Como exemplos de citocinas ou de hematopoeitinas para tais fins refere-se as citocinas especificamente referenciadas antes. Os factores de crescimento, tais como o factor de crescimento das células B, o factor de diferenciação das células B ou os factores de diferenciação dos eosinófilos, também podem ser úteis quando co-administrados com estas citocinas. Como exemplos de outros agentes para co-administração é possível referir outros fármacos e agentes químicos farmacologicamente eficazes, v.g., os agentes para combater as infecções. O regime de dosagem adiante enunciado pode ser ajustado para compensar a quantidade desses componentes aditivos na composição terapêutica. A evolução do paciente tratado pode ser verificada por métodos convencionais.

Os agentes citotóxicos utilizados na transplantação da medula óssea e na terapia do cancro afectam as células rapidamente proliferantes, quer na medula óssea quer no intestino delgado, dando origem a toxicidades graves e frequentemente limitadoras das doses. Nos exemplos 4 a 9, as análises às mucosas do intestino delgado demonstraram uma recuperação rápida do comprimento das vilosidades e um aumento da actividade proliferativa das células foliculares de murganhos tratados com a IL-11 ou com a IL-6, comparativamente com os murganhos de contraprova. Assim sendo, a IL-11 e a IL-6 têm efeitos positivos sobre a recuperação de diversos tecidos em que houve toxicidades limitadoras das doses a seguir a terapias citoablativas.

Sem se pretender estabelecer nenhum paralelismo com qualquer teoria, os inventores

admitem que o tratamento de lesões ou de diminuições de células epiteliais do intestino, que normalmente se dividem de uma forma rápida, tratamento esse efectuado com a IL-11 ou a IL-6 ou outra citocina, proporciona duas vantagens importantes aos métodos actuais de tratar o problema da toxicidade ao nível do intestino. Em primeiro lugar, a citocina, v.g., a IL-11 ou a IL-6, melhora a integridade do intestino ao estimular as células progenitoras no sentido de ser restabelecida uma população de células saudáveis, evitando consequentemente a admissão de bactérias e de fungos no sangue do paciente tratado. O tratamento de pacientes com a IL-11 ou com a IL-6 pode reduzir assim as taxas de morbilidade e de mortalidade associadas às lesões intestinais induzidas por quimioterapia e por radioterapia. Além disso, a IL-11 ou a IL-6 ou outras citocinas aqui identificadas também podem permitir a aplicação de regimes mais intensos de quimioterapia e de radioterapia nos tratamentos dos cancros, o que constitui um efeito altamente desejável, uma vez que isto pode aumentar as taxas de sobrevivência de pacientes com determinados cancros que normalmente são fatais.

De igual modo, no tratamento de doenças de natureza autoimunitária do intestino delgado, presume-se que uma citocina, tal como a IL-11 ou a IL-6, restabeleça a população de células, melhorando assim as taxas de cura e reduzindo as taxas de morbilidade e de mortalidade sem os efeitos secundários deletérios das terapias conhecidas.

Admite-se desde já que o tratamento de um paciente com uma citocina seleccionada, tal como a IL-11 ou a IL-6 ou uma combinação de citocinas, tem os mesmos efeitos sobre outras populações de células, v.g., sobre as células da pele, do cabelo, do esperma, dos revestimentos do estômago e do intestino grosso e sobre as células epiteliais do fígado, nas quais há lugar a lesões ou diminuições do seu número devido a doenças, infecções, choques ou traumas. Em termos teóricos, a citocina restabelece as populações saudáveis, estimulando

as células progenitoras e levando-as a diferenciarem-se em populações de células perfeitamente desenvolvidas.

No tratamento de quaisquer doenças que tenham como consequência lesões ou diminuições das populações de células, a citocina, v.g. a IL-11 ou a IL-6, pode ser administrada por qualquer via adequada, mas é administrada preferencialmente de forma sistêmica, isto é, por via parentérica. Entre as vias parentéricas são preferíveis as vias subcutânea e intraperitoneal. Havendo quimioterapia, pode eventualmente ser desejável a administração intravenosa.

O médico assistente pode determinar um regime de tratamento adequado para os pacientes sujeitos a quimioterapia ou a radioterapia ou para os pacientes que tenham já lesões ou diminuições celulares devidas a traumas ou doenças, dependendo desse regime de tratamento de factores tais como a idade, o sexo, o peso corporal e o estado geral de saúde do paciente. Em geral, uma dose adequada de uma citocina, v.g., a IL-11, irá estar compreendida entre cerca de 1 µg/kg de peso corporal e cerca de 100 µg/kg de peso corporal. Se desejado, estas doses podem ser transformadas em unidades. Uma unidade representa convenientemente a concentração do polipeptido que proporciona metade do valor máximo da estimulação numa experiência conveniente, v.g., no caso da IL-11, a experiência T1165 descrita no documento PCT/US90/06803. Uma outra dose conveniente de citocina, v.g. a IL-11, pode estar compreendida no intervalo entre cerca de 10 µg/kg e cerca de 1000 µg/kg e mais preferencialmente entre cerca de 100 µg/kg e cerca de 500 µg/kg de peso corporal. Tais doses podem ser administradas diariamente durante um período compreendido entre 1 dia e 6 meses, ou durante período mais longos, conforme venha a ser necessário, dependendo isso da natureza das lesões ou das diminuições celulares.

Os regimes de dosagem para outras citocinas aqui descritas podem ser idênticos ou

258

ajustados sucessivamente, dependendo disso da toxicidade da citocina escolhida. Por exemplo, a IL-1 poderia ser administrada segundo um regime de dosagem compreendido entre cerca de 10 ng/kg de peso corporal e cerca de 1 µg/kg de peso corporal, devido à sua toxicidade. O ajustamento do regime de dosagem é uma questão da competência dos especialistas da matéria, tomando por base as toxicidades conhecidas das citocinas úteis na presente invenção.

Quando utilizadas para tratar doenças de natureza autoimunitária, a composição de citocinas, v.g., de IL-11, pode ser formulada de modo a conter outros agentes úteis para mitigar os sintomas de tais doenças, incluindo, v.g., as substâncias prednisona, ciclosporina, ciclofosfamida e azatioprina e ainda outros agentes conhecidos.

Além disso, se o tratamento tiver por objectivo as células da pele e do cabelo, é possível preparar uma composição farmacêutica utilizando agentes de tipo convencional para a administração tópica de substâncias terapêuticas à pele e ao cabelo, v.g., para administração sistémica ou local ou tópica. Os veículos farmacêuticos adequados para uma composição tópica da presente invenção podem incorporar diversos ingredientes convencionais para a produção de cremes, loções, geles ou unguentos. Tais ingredientes convencionais são incluídos nos cremes ou nos óleos para a pele para administração tópica para o tratamento de diversas doenças da pele. Essas composições podem ser utilizadas como sistemas de administração de fármacos para se transmitir a IL-11 através da pele ou para facilitar a absorção da IL-11 pela pele, ou aplicadas sobre uma escoriação ou sobre qualquer outra erupção de pele. [Ver, v.g., as patentes de invenção norte-americanas n^{os} 3 981 996; 4 731 241; 4 164 563; 3 924 004; 3 888 995; 3 592 930 e 4 753 958].

Os exemplos seguintes ilustram a produção de IL-11 e das suas proteínas de fusão (exemplos 1 a 3) e esclarecem os métodos da presente invenção em que a citocina seleccionada

é a IL-11 ou a IL-6, sendo os modelos de populações de células de crescimento rápido (exemplos 4 a 9) os casos em que houve lesões e diminuições das populações de células do intestino. No entanto, estes exemplos não limitam o âmbito da presente invenção.

EXEMPLO 1 - IL-11 HUMANA

O isolamento e a clonagem da IL-11 humana vêm descritos minuciosamente no pedido de patente de invenção PCT publicado com o nº US90/06803, agora conhecido na especialidade. No quadro I subsequente está indicada a sequência completa da IL-11 humana já determinada. Esta proteína caracteriza-se pela sequência do quadro I [SEQ ID NO:1 e 2].

Quadro I

5' AGCTGGGAAGGGTTAAAGGCCCGGCTCCCTGCCCCCTGCCCTGG

GGAACCCCT GGCCCTGCGGGGAC						(1)						
						ATG	AAC	TGT	GTT	TGC	CGC	
						M	N	C	V	C	R	
CTG	GTC	CTG	GTC	GTG	CTG	AGC	CTG	TGG	CCA	GAT	ACA	
L	V	L	V	V	L	S	L	W	P	D	T	
GCT	GTC	GCC	CCT	GGG	CCA	CCA	CCT	GGC	CCC	CCT	CGA	
A	V	A	P	G	P	P	P	G	P	P	R	
GTT	TCC	CCA	GAC	CCT	CGG	GCC	GAG	CTG	GAC	AGC	ACC	
V	S	P	D	P	R	A	E	L	D	S	T	
GTG	CTC	CTG	ACC	CGC	TCT	CTC	CTG	GCG	GAC	ACG	CGG	
V	L	L	T	R	S	L	L	A	D	T	R	
CAG	CTG	GCT	GCA	CAG	CTG	AGG	GAC	AAA	TTC	CCA	GCT	
Q	L	A	A	Q	L	R	D	K	F	P	A	
GAC	GGG	GAC	CAC	AAC	CTG	GAT	TCC	CTG	CCC	ACC	CTG	
D	G	D	H	N	L	D	S	L	P	T	L	
GCC	ATG	AGT	GCG	GGG	GCA	CTG	GGA	GCT	CTA	CAG	CTC	
A	M	S	A	G	A	L	G	A	L	Q	L	
CCA	GGT	GTG	CTG	ACA	AGG	CTG	CGA	GCG	GAC	CTA	CTG	
P	G	V	L	T	R	L	R	A	D	L	L	

258

TCC	TAC	CTG	CGG	CAC	GTG	CAG	TGG	CTG	CGC	CGG	GCA
S	Y	L	R	H	V	Q	W	L	R	R	A
GGT	GGC	TCT	TCC	CTG	AAG	ACC	CTG	GAG	CCC	GAG	CTG
G	G	S	S	L	K	T	L	E	P	E	L
GGC	ACC	CTG	CAG	GCC	CGA	CTG	GAC	CGG	CTG	CTG	CGC
G	T	L	Q	A	R	L	D	R	L	L	R
CGG	CTG	CAG	CTC	CTG	ATG	TCC	CGC	CTG	GCC	CTG	CCC
R	L	Q	L	L	M	S	R	L	A	L	P
CAG	CCA	CCC	CCG	GAC	CCG	CCG	GCG	CCC	CCG	CTG	GCG
Q	P	P	P	D	P	P	A	P	P	L	A
CCC	CCC	TCC	TCA	GCC	TGG	GGG	GGC	ATC	AGG	GCC	GCC
P	P	S	S	A	W	G	G	I	R	A	A
CAC	GCC	ATC	CTG	GGG	GGG	CTG	CAC	CTG	ACA	CTT	GAC
H	A	I	L	G	G	L	II	L	T	L	D
TGG	GCC	GTG	AGG	GGA	CTG	CTG	CTG	CTG	AAG	ACT	CGG
W	A	V	R	G	L	L	L	L	K	T	R

CTG TGA CCCGAGGCCAGAGCCACCACCGTCCTTCCAAAGCCACA
L

TCTTATTTATTTATTTATTTTCGGTACTGGGGGCGAAACAGCCAGGTG
ATCCCCCTGCCTTTAGCTCCCCCTAGTTAGAGACAGTCCTTCCGTGA
GGCTGGGGGGCATCTGTGCCTTATTTATACTTATTTATTTTCAGGAGC
GGGGGTGGGCTCCTGGGTCCCCGAGGAGGAGGGAGCTGGGGTCCCGG
ATTCTTGTGTCCACAGACTTCTGCCCTGGCTCCTCCCCCTCGAGGCC
TGGGCAGGAATACATACTATTTATTTAAGAGCTC

EXEMPLO 2 - MOLÉCULA DE FUSÃO DE TIORREDOXINA-IL-11

Preparou-se a IL-11 também numa molécula de fusão para utilização no método da presente invenção. A molécula de fusão continha tiorredoxina de *E. coli* e a IL-11 recombinante, obtida conforme descrito no pedido de patente de invenção PCT com o nº US90/06803 [ver também a obra de Paul *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87:7512-7516 (1990) e a publicação da patente de invenção PCT com o nº WO91/07495 de 30 de Maio de 1991].

Efectuou-se a clonagem do gene da tiorredoxina de *E. coli* (trxA), tomando por base a sua sequência já publicada [Lim *et al.*, *J. Bacteriol.*, 163:311-316 (1985)] e utilizou-se para a construção de diversos plasmídeos de expressão de *E. coli* congêneres, tendo para tal sido utilizadas técnicas convencionais de manipulação do ADN, exaustivamente descritas por Sambrook, Fritsch e Maniatis na obra Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2ª edição, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989). (Os nucleótidos 2242-2568 do quadro II codificam a proteína tiorredoxina de *E. Coli*).

Construiu-se um plasmídeo de expressão pALtrxA-781 contendo o gene trxA de *E. coli* sem fusão com outra sequência. Este plasmídeo, que comanda a acumulação de mais de 10% da proteína celular total sob a forma de tiorredoxina numa estirpe hospedeira GI724 de *E. coli*, foi ainda manipulado para permitir a construção de uma sequência de fusão trxA/IL-11, daí resultando o vector de expressão pALtrxA/EK/IL-11ΔPro-581.

A sequência completa do vector plasmídico de expressão, o pALtrxA/EK/IL-11ΔPro-581 [SEQ ID NO:3 e SEQ ID NO:4] está ilustrada no quadro II e contém as particularidades a seguir indicadas.

Os nucleótidos 1-2060 contêm as sequências de ADN com origem no plasmídeo pUC-18 [Norrander *et al.*, *Gene*, 26:101-106 (1983)] que inclui as sequências que contêm o gene da β-lactamase que confere resistência ao antibiótico ampicilina nas estirpes hospedeiras de *E. Coli*, e uma origem de replicação proveniente de colE1. Os nucleótidos 2061-2221 contêm sequências de ADN para o promotor principal à esquerda (pL) do bacteriófago λ [Sanger *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 162:729-773 (1982)], incluindo três sequências do operador, O_L1, O_L2 e O_L3. Os operadores são os locais de ligação para a proteína repressora λcl, cujos níveis celulares controlam

a quantidade de início de transcrição a partir do pL. Os nucleótidos 2222-2241 contêm uma sequência de forte ligação ribossômica obtida a partir da sequência do gene 10 do bacteriófago T7 [Dunn e Studier, J. Mol. Biol., 166:477-535 (1983)].

Os nucleótidos 2242-2568 contêm uma sequência de ADN que codifica a proteína tiorredoxina de *E. coli* [Lim *et al.*, J. Bacteriol., 163:311-316 (1985)]. Não há codão de terminação da tradução na extremidade da sequência de codificação da tiorredoxina neste plasmídeo.

Os nucleótidos 2569-2583 contêm uma sequência de ADN que codifica a sequência de aminoácidos para um péptido separador que é curto, hidrofílico e flexível, designado por "--GSGSG--". Os nucleótidos 2584-2598 proporcionam a sequência de ADN que codifica a sequência de aminoácidos para o local de reconhecimento de clivagem da enterocinase (EC 3.4.4.8), designada por "--DDDDK--" [Maroux *et al.*, J. Biol. Chem., 246:5031-5039 (1971)].

Os nucleótidos 2599-3132 contêm uma sequência de ADN que codifica a sequência de aminoácidos de uma forma modificada da IL-11 humana perfeitamente desenvolvida [Paul *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87:7512-7516 (1990)]; o resíduo prolino do terminal N normalmente existente na proteína natural foi suprimido. Assim, estes nucleótidos codificam a IL-11 a começar no aminoácido nº 2 da sequência natural perfeitamente desenvolvida. A sequência inclui um codão de terminação da tradução na extremidade 3' da sequência da IL-11.

Os nucleótidos 3133-3159 proporcionam uma sequência de ADN "ligadora" que contém os locais de restrição das endonucleases. Os nucleótidos 3160-3232 proporcionam uma sequência de terminação da transcrição com base na sequência do gene *aspA* de *E. coli* [Takagi *et al.*, Nucl. Acids Res., 13:2063-2074 (1985)]. Os nucleótidos 3233-3632 são sequências de ADN obtidas a partir do pUC-18.

Quadro II

pALtrxA/EK/IL-11ΔPro-581

SEQ ID NO:3 e SEQ ID NO:4

GACGAAAGGG	CCTCGTGATA	CGCCTATTTT	TATAGGTAA	40
TGTCATGATA	ATAATGGTTT	CTTAGACGTC	AGGTGGCACT	80
TTTCGGGGAA	ATGTGCGCGG	AACCCCTATT	TGTTTATTTT	120
TCTAAATACA	TTCAAATATG	TATCCGCTCA	TGAGACAATA	160
ACCCTGATAA	ATGCTTCAAT	AATATTGAAA	AAGGAAGAGT	200
ATGAGTATTC	AACATTTCCG	TGTCGCCCTT	ATTCCTTTT	240
TTGCGGCATT	TTGCCTTCCT	GTTTTTGCTC	ACCCAGAAAC	280
GCTGGTGAAA	GTAAAAGATG	CTGAAGATCA	GTTGGGTGCA	320
CGAGTGGGTT	ACATCGAACT	GGATCTCAAC	AGCGGTAAAG	360
TCCTTGAGAG	TTTTCGCCCC	GAAGAACGTT	TTCCAATGAT	400
GAGCACTTTT	AAAGTTCTGC	TATGTGGCGC	GGTATTATCC	440
CGTATTGACG	CCGGGCAAGA	GCAACTCGGT	CGCCGCATAC	480
ACTATTCTCA	GAATGACTTG	GTTGAGTACT	CACCAGTCAC	520
AGAAAAGCAT	CTTACGGATG	GCATGACAGT	AAGAGAATTA	560
TGCAGTGCTG	CCATAACCAT	GAGTGATAAC	ACTGCGGCCA	600
ACTTACTTCT	GACAACGATC	GGAGGACCGA	AGGAGCTAAC	640
CGCTTTTTTG	CACAACATGG	GGGATCATGT	AACTCGCCTT	680
GATCGTTGGG	AACCGGAGCT	GAATGAAGCC	ATACCAAACG	720
ACGAGCGTGA	CACCACGATG	CCTGTAGCAA	TGGCAACAAC	760
GTTGCGCAAA	CTATTAACTG	GCGAACTACT	TACTCTAGCT	800
TCCCGGCAAC	AATTAATAGA	CTGGATGGAG	GCGGATAAAG	840
TTGCAGGACC	ACTTCTGCGC	TCGGCCCTTC	CGGCTGGCTG	880
GTTTATTGCT	GATAAATCTG	GAGCCGGTGA	GCGTGGGTCT	920
CGCGGTATCA	TTGCAGCACT	GGGGCCAGAT	GGTAAGCCCT	960
CCCGTATCGT	AGTTATCTAC	ACGACGGGGA	GTCAGGCAAC	1000
TATGGATGAA	CGAAATAGAC	AGATCGCTGA	GATAGGTGCC	1040
TCACTGATTA	AGCATTGGTA	ACTGTCAGAC	CAAGTTTACT	1080

258

CATATATACT	TTAGATTGAT	TTAAAACTTC	ATTTTTAATT	1120								
TAAAAGGATC	TAGGTGAAGA	TCCTTTTTTGA	TAATCTCATG	1160								
ACCAAAATCC	CTTAACGTGA	GTTTTCGTTC	CACTGAGCGT	1200								
CAGACCCCGT	AGAAAAGATC	AAAGGATCTT	CTTGAGATCC	1240								
TTTTTTTCTG	CGCGTAATCT	GCTGCTTGCA	AACAAAAAAA	1280								
CCACCGCTAC	CAGCGGTGGT	TTGTTTGCCG	GATCAAGAGC	1320								
TACCAACTCT	TTTTCCGAAG	GTAAGTGGCT	TCAGCAGAGC	1360								
GCAGATACCA	AATACTGTCC	TTCTAGTGTA	GCCGTAGTTA	1400								
GGCCACCACT	TCAAGAACTC	TGTAGCACCG	CCTACATACC	1440								
TCGCTCTGCT	AATCCTGTTA	CCAGTGGCTG	CTGCCAGTGG	1480								
CGATAAGTCG	TGTCTTACCG	GGTTGGACTC	AAGACGATAG	1520								
TTACCGGATA	AGGCGCAGCG	GTCGGGCTGA	ACGGGGGGTT	1560								
CGTGCACACA	GCCCAGCTTG	GAGCGAACGA	CCTACACCGA	1600								
ACTGAGATAC	CTACAGCGTG	AGCATTGAGA	AAGCGCCACG	1640								
CTTCCCGAAG	GGAGAAAGGC	GGACAGGTAT	CCGTAAGCG	1680								
GCAGGGTCGG	AACAGGAGAG	CGCACGAGGG	AGCTTCCAGG	1720								
GGGAAACGCC	TGGTATCTTT	ATAGTCCTGT	CGGGTTTCGC	1760								
CACCTCTGAC	TTGAGCGTCG	ATTTTGTGA	TGCTCGTCAG	1800								
GGGGGCGGAG	CCTATGGA	AACGCCAGCA	ACGCGGCCTT	1840								
TTTACGGTTC	CTGGCCTTTT	GCTGGCCTTT	TGCTCACATG	1880								
TTCTTTCCTG	CGTTATCCCC	TGATTCTGTG	GATAACCGTA	1920								
TTACCGCCTT	TGAGTGAGCT	GATACCGCTC	GCCGCAGCCG	1960								
AACGACCGAG	CGCAGCGAGT	CAGTGAGCGA	GGAAGCGGAA	2000								
GAGCGCCCAA	TACGCAAACC	GCCTCTCCCC	GCGCGTTGGC	2040								
CGATTCATTA	ATGCAGAATT	GATCTCTCAC	CTACCAAACA	2080								
ATGCCCCCCT	GCAAAAAATA	AATTCATATA	AAAAACATAC	2120								
AGATAACCAT	CTGCGGTGAT	AAATTATCTC	TGGCGGTGTT	2160								
GACATAAATA	CCACTGGCGG	TGATACTGAG	CACATCAGCA	2200								
GGACGCACTG	ACCACCATGA	ATTCAAGAAG	GAGATATACA	2240								
T	ATG	AGC	GAT	AAA	ATT	ATT	CAC	CTG	ACT	GAC	GAC	2274
	Met	Ser	Asp	Lis	Ile	Ile	His	Leu	Thr	Asp	Asp	
	1				5					10		

AGT Ser	TTT Phe	GAC Asp	ACG Thr 15	GAT Asp	GTA Val	CTC Leu	AAA Lis	GCG Ala 20	GAC Asp	GGG Gli	2307
GCG Ala	ATC Ile	CTC Leu 25	GTC Val	GAT Asp	TTC Phe	TGG Trp	GCA Ala 30	GAG Glu	TGG Trp	TGC Cis	2340
GGT Gli	CCG Pro 35	TGC Cis	AAA Lis	ATG Met	ATC Ile	GCC Ala 40	CCG Pro	ATT Ile	CTG Leu	GAT Asp	2373
GAA Glu 45	ATC Ile	GCT Ala	GAC Asp	GAA Glu	TAT Tir 50	CAG Gln	GGC Gli	AAA Lis	CTG Leu	ACC Thr 55	2406
GTT Val	GCA Ala	AAA Lis	CTG Leu	AAC Asn 60	ATC Ile	GAT Asp	CAA Gln	AAC Asn	CCT Pro 65	GGC Gli	2439
ACT Thr	GCG Ala	CCG Pro	AAA Lis 70	TAT Tir	GGC Gli	ATC Ile	CGT Arg	GGT Gli 75	ATC Ile	CCG Pro	2472
ACT Thr	CTG Leu	CTG Leu 80	CTG Leu	TTC Phe	AAA Lis	AAC Asn	GGT Gli 85	GAA Glu	GTG Val	GCG Ala	2505
GCA Ala	ACC Thr 90	AAA Lis	GTG Val	GGT Gli	GCA Ala	CTG Leu 95	TCT Ser	AAA Lis	GGT Gli	CAG Gln	2538
TTG Leu 100	AAA Lis	GAG Glu	TTC Phe	CTC Leu	GAC Asp 105	GCT Ala	AAC Asn	CTG Leu	GCC Ala	GGT Gli 110	2571
TCT Ser	GGT Gli	TCT Ser	GGT Gli	GAT Asp 115	GAC Asp	GAT Asp	GAC Asp	AAA Lis	GGT Gli 120	CCA Pro	2604
CCA Pro	CCA Pro	GGT Gli	CCA Pro 125	CCT Pro	CGA Arg	GTT Val	TCC Ser	CCA Pro 130	GAC Asp	CCT Pro	2637
CGG Arg	GCC Ala	GAG Glu 135	CTG Leu	GAC Asp	AGC Ser	ACC Thr	GTG Val 140	CTC Leu	CTG Leu	ACC Thr	2670
CGC Arg	TCT Ser 145	CTC Leu	CTG Leu	GCG Ala	GAC Asp	ACG Thr 150	CGG Arg	CAG Gln	CTG Leu	GCT Ala	2703

GCA Ala 155	CAG Gln	CTG Leu	AGG Arg	GAC Asp	AAA Lis 160	TTC Phe	CCA Pro	GCT Ala	GAC Asp	GGG Gli 165	2736
GAC Asp	CAC His	AAC Asn	CTG Leu	GAT Asp 170	TCC Ser	CTG Leu	CCC Pro	ACC Thr	CTG Leu 175	GCC Ala	2769
ATG Met	AGT Ser	GCG Ala	GGG Gli 180	GCA Ala	CTG Leu	GGA Gli	GCT Ala	CTA Leu 185	CAG Gln	CTC Leu	2802
CCA Pro	GGT Gli	GTG Val 190	CTG Leu	ACA Thr	AGG Arg	CTG Leu	CGA Arg 195	GCG Ala	GAC Asp	CTA Leu	2835
CTG Leu	TCC Ser 200	TAC Tir	CTG Leu	CGG Arg	CAC His	GTG Val 205	CAG Gln	TGG Trp	CTG Leu	CGC Arg	2868
CGG Arg 210	GCA Ala	GGT Gli	GGC Gli	TCT Ser	TCC Ser 215	CTG Leu	AAG Lis	ACC Thr	CTG Leu	GAG Glu 220	2901
CCC Pro	GAG Glu	CTG Leu	GGC Gli	ACC Thr 225	CTG Leu	CAG Gln	GCC Ala	CGA Arg	CTG Leu 230	GAC Asp	2934
CGG Arg	CTG Leu	CTG Leu	CGC Arg 235	CGG Arg	CTG Leu	CAG Gln	CTC Leu	CTG Leu 240	ATG Met	TCC Ser	2967
CGC Arg	CTG Leu	GCC Ala 245	CTG Leu	CCC Pro	CAG Gln	CCA Pro	CCC Pro 250	CCG Pro	GAC Asp	CCG Pro	3000
CCG Pro	GCG Ala 255	CCC Pro	CCG Pro	CTG Leu	GCG Ala	CCC Pro 260	CCC Pro	TCC Ser	TCA Ser	GCC Ala	3033
TGG Trp 265	GGG Gli	GGC Gli	ATC Ile	AGG Arg	GCC Ala 270	GCC Ala	CAC His	GCC Ala	ATC Ile	CTG Leu 275	3066
GGG Gli	GGG Gli	CTG Leu	CAC His	CTG Leu 280	ACA Thr	CTT Leu	GAC Asp	TGG Trp	GCC Ala 285	GTG Val	3099
AGG Arg	GGA Gli	CTG Leu	CTG Leu 290	CTG Leu	CTG Leu	AAG Lis	ACT Thr	CGG Arg 295	CTG Leu	TGA	3132

AAGCTTATCG	ATACCGTCGA	CCTGCAGTAA	TCGTACAGGG	3172
TAGTACAAAT	AAAAAAGGCA	CGTCAGATGA	CGTGCCTTTT	3212
TTCTTGTGAG	CAGTAAGCTT	GGCACTGGCC	GTCGTTTTAC	3252
AACGTCGTGA	CTGGGAAAAC	CCTGGCGTTA	CCCAACTTAA	3292
TCGCCTTGCA	GCACATCCCC	CTTTCGCCAG	CTGGCGTAAT	3332
AGCGAAGAGG	CCCGCACCGA	TCGCCCTTCC	CAACAGTTGC	3372
GCAGCCTGAA	TGGCGAATGG	CGCCTGATGC	GGTATTTTCT	3412
CCTTACGCAT	CTGTGCGGTA	TTTCACACCG	CATATATGGT	3452
GCACTCTCAG	TACAATCTGC	TCTGATGCCG	CATAGTTAAG	3492
CCAGCCCCGA	CACCCGCCAA	CACCCGCTGA	CGCGCCCTGA	3532
CGGGCTTGTC	TGCTCCCGGC	ATCCGCTTAC	AGACAAGCTG	3572
TGACCGTCTC	CGGGAGCTGC	ATGTGTCAGA	GGTTTTACC	3612
GTCATCACCG	AAACGCGCGA			

Conforme se descreve no exemplo 3 subsequente, se a criação for realizada em cultura em condições adequadas numa estirpe hospedeira de *E. coli* conveniente, é possível comandar a produção de níveis elevados (aproximadamente 10% do valor total das proteínas celulares) de uma proteína de fusão tiorredoxina-IL-11. Pelo contrário, se não for fundida com a tiorredoxina, a IL-11 acumula-se apenas até 0,2% do valor total das proteínas celulares, quando expressa num sistema análogo hospedeiro/vector.

EXEMPLO 3 - EXPRESSÃO DE UMA PROTEÍNA DE FUSÃO

Produziu-se uma proteína de fusão tiorredoxina-IL-11 em conformidade com o protocolo a seguir descrito, tendo para tal sido utilizado o plasmídeo construído conforme descrito no exemplo 2. Transformou-se o pALtrxA/EK/IL-11ΔPro-581 (SEQ DID NO:3) dentro da estirpe hospedeira GI724 de *E. coli* (F⁻, *lacI*^a, *lacP*^{L8}, *ampC::λcl*^r) em conformidade com o procedimento

de Dagert e Ehrlich, Gene, 6:23 (1979). A estirpe hospedeira GI724 de *E. coli*, não transformada, foi depositada na Colecção Americana de Culturas Tipo, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, a 31 de Janeiro de 1991, com a referência ATCC nº 55151 para efeitos de patentes de invenção, ao abrigo das leis e dos regulamentos aplicáveis. Os transformantes foram seleccionados sobre placas de gelose a 1,5% p/v que continham o meio IMC que é constituído por meio M9 [Miller, "Experiments in Molecular Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory, Nova Iorque (1972)] enriquecido com glicose na proporção de 0,5% p/v, casaminoácidos na proporção de 0,2% p/v e ampicilina na concentração de 100 µg/mL.

A estirpe GI724 contém uma cópia do gene repressor λ cI de tipo natural estavelmente integrado no cromossoma no local *ampC*, onde foi colocado sob o controlo transcricional das sequências do operador/promotor *trp* de *Salmonella typhimurium*. Na GI724, a proteína λ cI é produzida apenas durante o crescimento em meios isentos de triptofano, tais como os meios mínimos ou um meio mínimo enriquecido com casaminoácidos, por exemplo, o IMC descrito *supra*. A adição de triptofano a uma cultura de GI724 vai reprimir o promotor *trp* e impedir a síntese do λ cI, provocando gradualmente a indução da transcrição a partir dos promotores pL se estiverem presentes na célula.

A GI724 transformada com pALtrxA/EK/IL-11ΔPro-581 [SEQ DID NO:3 e SEQ ID NO:4] cresceu a 37°C até se obter um valor A_{550} igual a 0,5 em meio IMC. Acrescentou-se o triptofano até se obter uma concentração final de 100 µg/mL e manteve-se a cultura a incubar durante mais 4 horas. Durante este período a proteína de fusão tiorredoxina-IL-11 acumulou-se até perfazer aproximadamente 10% do valor total das proteínas celulares.

Comprovou-se que toda a proteína de fusão estava na fracção celular solúvel, tendo sido purificada conforme adiante se descreve. Efectuou-se o desmembramento celular numa

prensa continental a trabalhar a $1,38 \times 10^8$ Pa (20 000 psi) em HEPES 50 mM a pH 8,0 contendo fluoreto de fenil-metil-sulfonilo 1 mM. Limpou-se o lisado por centrifugação a $15000 \times g$ durante 30 minutos e aplicou-se uma carga de sobrenadante numa coluna de tipo 'QAE-Toyopearl®'. Deitou-se fora as fracções de efluente e realizou-se a eluição da proteína de fusão com HEPES 50 mM a pH 8 contendo NaCl 100 mM. Ajustou-se o produto de eluição até à concentração de NaCl 2 M e com esse produto carregou-se uma coluna de 'phenyl-Toyopearl®'. Mais uma vez se deitou fora as fracções de efluente e realizou-se a eluição da proteína de fusão com HEPES 50 mM a pH 8,0 contendo NaCl 0,5 M.

A seguir realizou-se a diálise da proteína de fusão em presença de HEPES 25 mM a pH 8,0, tendo-se verificado que a sua pureza nesta fase era superior a 80%. Recorrendo ao bioensaio T1165 [Paul *et al.*, citado *supra*], a proteína purificada tiorredoxina-IL-11 revelou uma actividade de 8×10^5 unidades/mg. Este valor adere bastante bem, numa base molar, à actividade de 2×10^6 unidades/mg que foi o valor encontrado na mesma experiência para a IL-11 obtida a partir de células COS. Efectuou-se a clivagem de 1 mg da proteína de fusão a 37°C durante 20 horas com 1000 unidades de enterocinase de bovino [Leipnieks e Light, *J. Biol. Chem.*, 254:1677-1683 (1979)] em 1 mL de Tris-Cl 10 mM (pH 8,0)/CaCl₂ 10 mM. Teria sido possível recuperar a IL-11 a partir dos produtos de reacção fazendo-os passar pela coluna 'QAE-Toyopearl' em HEPES 25 mM a pH 8,0, onde foi observada a existência de IL-11 nas fracções de efluente. A proteína de fusão não clivada, a tiorredoxina e a enterocinase ficaram ligadas à coluna.

EXEMPLO 4 - TRATAMENTO DE MURGANHOS IRRADIADOS

A IL-11 utilizada nos testes a seguir indicados foi obtida no 'Genetics Institute, Inc., Cambridge, MA' e foi preparada em *E. coli* essencialmente conforme descrito nos exemplos

anteriores. Depois misturou-se a IL-11 (140 µg/mL) com tampão Tris 10 mM até se obter um valor de pH aproximadamente igual a 8,0. O nível de endotoxina nesta formulação de qualidade aplicável *in vivo* é de cerca de 1,4 unidades de proteína por miligrama (1,4 U/mg). A preparação também contém hidroxilmato a cerca de 10% molar e tiorredoxina à razão aproximada de 3 ng/mL (0,002%). Foram utilizados murganhos da estirpe C3H/HeJ [Jackson Labs] com idades entre 8 e 10 semanas aos quais se administrou por via intraperitoneal (i.p.) a substância 5-flúor-uracilo (5-FU) à razão de 150 mg/kg, diluída em Solução Salina de Hanks Equilibrada (SSHE, o mesmo que HBSS) contendo tampão HEPES 0,024 M [sendo as duas substâncias da Gibco], três dias antes da irradiação subletal. A irradiação corporal total (ICT, o mesmo que TBI) foi de 6,0 grays (Gy) a partir de uma máquina de radioterapia da Siemens para raios X a 250 Kvp, filtrada com uma chapa de Cu de 1,0 mm de espessura correspondente à semi-espessura de uma chapa de Cu de 2,1 mm à DSS (o mesmo que SSD) de 50 cm e com uma actividade de 78,13 cGy/minuto. No mesmo dia em que foi administrada a dose de irradiação administrou-se aos murganhos a IL-11 humana recombinante descrita *supra*, de qualidade aplicável *in vivo* [Genetics Institute] segundo uma dose dividida (duas vezes por dia) à razão de 250 µg/kg/dia. Estas doses divididas foram administradas por via subcutânea em volumes de 0,2 mL em SSHE com Hepes e 0,1% de albumina do soro de bovino (ASB) [Boehringer-Mannheim]. Os animais de contraprova receberam o mesmo volume de SSHE e de ASB sem a IL-11. O tratamento prosseguiu durante 9 a 18 dias pós-irradiação ou até os animais morrerem.

Efectuou-se uma análise hematológica para contagem do número de leucócitos e do número de plaquetas no sangue retirado das veias caudais, tendo sido utilizado para tal um Contador Coulter de modelo ZM [Coulter Electronics], a trabalhar com uma abertura de 100 µm

para as determinações leucocitárias e com uma abertura de 50 μm para as determinações plaquetárias. Os eritrócitos foram desmembrados utilizando um aparelho 'Zapglobin' [Coulter], em conformidade com as recomendações do fabricante. Os esfregaços de sangue foram contrastados com 'Wright-Giemsa', tendo sido utilizados métodos convencionais, e foram examinados por análise diferencial com uma amplificação de 100X. Calculou-se os números absolutos de neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos no sangue periférico multiplicando o número total de leucócitos pela percentagem de leucócitos determinada na análise diferencial. Foram obtidos os hematócritos do sangue periférico por centrifugação de tubos capilares durante 5 minutos numa centrífugadora de hematócritos de modelo 'Clay-Adams'.

Os murganhos mortos e intactos (que morreram durante a experiência ou que foram sacrificados) foram estabilizados de um dia para o outro em formalina tamponada a 10%. De cada murganho estabilizou-se um fémur em solução de Bouin. Os tecidos retirados de cada órgão (fígado, baço, rim, mesentério do intestino delgado, parede abdominal, pulmão, coração, testículos e fémur) foram mergulhados em cera de parafina, utilizando técnicas convencionais, e deles foram cortadas secções de 4 μm que foram contrastadas com hematoxilina e eosina. Para análise dos folículos do intestino delgado foram realizadas 10 medições independentes da altura das vilosidades, da profundidade dos folículos e das metafases/folículo em cada secção de intestino delgado, utilizando um micrómetro montado na objectiva.

Os resultados estão agrupados no quadro III seguinte sob a forma de média $\pm$ D.P., salvo quando especificado de outro modo. Determinou-se a probabilidade de haver diferenças significativas na comparação de dois grupos congéneres, recorrendo-se para tal ao teste t de Student dos restos duplos. Determinou-se a probabilidade de haver diferenças significativas ao examinar tratamentos múltiplos, por análise da variância seguida pelos testes dos intervalos

múltiplos de Student-Newman-Keuls, para se definir os subconjuntos singulares contidos no estudo.

Quadro III

Efeito da IL-11 no modelo de modalidade combinada de infecção endógena

Exame microscópico ⁴ ao murganho n°	Dia do exame pós-irradiação ¹	Diarreia ²	Exame macroscópico ³	Focos bacterianos hepáticos
ASB				
1	5	+	0	+++
2	8	-	19	++
3	5	+	21	+++
4	6	-	79	+++
5	9	-	119	+++
IL-11				
1	9	+	0	+
2	4	+	0	-
3	9	-	14	++
4	9	-	3	+
5	9	-	0	-

¹ Todos os animais foram sacrificados ao 9º dia; os outros dias são os de morte natural

² + = existente no dia da morte natural

- = ausência de diarreia

³ Havia focos superficiais no fígado estabilizado

⁴ Havia focos microscópicos patentes no exame de secções histológicas escolhidas aleatoriamente; + <10 focos/secção; ++ 10-50; +++ >50.

Em três experiências separadas, todos os murganhos de contraprova morreram entre o 3º dia e o 10º dia após a irradiação, ao passo que apenas 3/13 (23%) dos murganhos tratados com a IL-11 morreram (nos 4º, 9º e 10º dias pós-irradiação). Na experiência 1 todos os animais de contraprova morreram por volta do 9º dia. Os animais foram autopsiados no dia da sua morte ou então, no caso do grupo tratado, ao 9º dia, tendo para tal os animais restantes sido sacrificados

(dia do exame indicado no quadro III). Na autópsia verificou-se que 4/5 murganhos do grupo de contraprova revelavam focos infecciosos macroscópicos no fígado comparativamente com 2/5 nos murganhos tratados com a IL-11. Além disso, os focos existentes nos murganhos tratados com a IL-11 estavam patentes em menor número e eram mais pequenos (quadro III). Demonstrou-se posteriormente que estes focos continham bactérias *E. coli*, tendo esta identificação sido feita por análise microbiológica. O exame microscópico permitiu observar muitos focos (12-129/secção escolhida aleatoriamente) no fígado dos murganhos de contraprova, tendo sido observados menos (6-21/secção) nos murganhos tratados com a IL-11 (quadro III). Também foram observados focos bacterianos idênticos no mesentério e no baço dos animais.

De forma surpreendente, estas diferenças de mortalidade e a presença de focos bacterianos nos órgãos dos murganhos não estavam associadas às diferenças existentes no número de leucócitos do sangue periférico ou aos números absolutos de neutrófilos, conforme comprovado pelos dados agrupados no quadro IV.

Quadro IV

Efeito da ILhr-11 sobre o número de corpúsculos do sangue periférico no modelo de
murganho de modalidade combinada

Dia ¹	Tratamento	Nº de leucócitos x 10 ³ /mm ³	Nº de plaquetas x 10 ³ /mm ³
1º dia	ASB	5,56 ± 1,80(5)	894,7 ± 168,3 (5)
	IL-11	4,89 ± 0,16(5)	770,3 ± 192,6 (5)
3º dia	ASB	0,49 ± 0,16(10)	294,8 ± 43,1 (10)
	IL-11	0,64 ± 0,31(10)	454,1 ± 115,5 (10)
4º dia	ASB	0,43 ± 0,04(10)	237,4 ± 109,6 (10)
	IL-11	0,49 ± 0,14(10)	337,3 ± 143,2 (10)
5º dia	ASB	0,30 ± 0,06(9)	126,6 ± 55,1 (10)
	IL-11	0,31 ± 0,07(11)	171,9 ± 76,9 (11)
6º dia	ASB	0,40 ± 0,24(9)	134,4 ± 80,7 (9)
	IL-11	0,47 ± 0,22(12)	257,9 ± 195,2 (12)
8º dia	ASB	1,19 ± 0,13(2)	236,1 ± 18,2 (2)
	IL-11	0,72 ± 0,23(7)	365,6 ± 256,1 (7)
9º dia	ASB	1,39 ± 0,32(2)	269,0 ± 100,8 (2)
	IL-11	1,06 ± 0,45(9)	248,8 ± 92,4 (9)

¹ Pós-irradiação

() nº de animais

* p < 0,001 comparativamente com o grupo da ASB

Uma vez que a bactéria *E. coli* é um organismo conhecido residente no intestino delgado, o aumento da infecção bacteriana e de mortalidade no grupo de animais de contraprova reflecte provavelmente a toxicidade intestinal resultante da irradiação e da quimioterapia. A secção histológica do intestino delgado e a quantificação morfométrica do comprimento das vilosidades do intestino delgado confirmaram lesões muito disseminadas nos murganhos de

contraprova, conforme se conclui pelos dados agrupados nos quadros VA e VB. Pelo contrário, o tratamento com a IL-11 revelou uma conservação quase completa do comprimento das vilosidades (quadro VA). Além disso, os murganhos tratados com a IL-11 revelaram números próximos dos valores normais de células foliculares mitóticas, o que constitui uma outra indicação de estimulação da proliferação das células foliculares originais ou progenitoras.

Quadro VA

Efeito da IL-11 sobre o epitélio do intestino dos murinos no modelo de modalidade combinada

	C	V	C
	Profundidade folicular ¹	Comprimento das vilosidades	C + V x 100%
Normal (2)	84,1 ± 21,1	477,7 ± 99,8	15,4 ± 5,9
5º dia			
ASB (5)	122,8 ± 29,5	253,7 ± 79,7	33,5 ± 8,2
IL-11 (5)	117,1 ± 14,5	512,8 ± 6,7**	19,5 ± 6,7**
9º dia			
ASB (2)	124,6 ± 40,7	330,1 ± 92,1	27,3 ± 1,0
IL-11 (2)	98,5 ± 7,0	405,9 ± 84,3	19,9 ± 4,4

() nº de animais

¹ = em µm

* = p < 0,01 comparativamente com o grupo da ASB

** = p < 0,02 comparativamente com o grupo da ASB

Quadro VB

Efeito da IL-11 sobre o epitélio do intestino dos murinos no modelo de modalidade combinada

	Cir. folicular	Mitoses/Folículos	Mitoses/folículos de 100 µm
Normal (2)	162,3 ± 11,6	1,8 ± 0,4	1,07 ± 0,14
5º dia			
ASB (5)	853,4 ± 62,2	0,9 ± 0,4	0,10 ± 0,04
IL-11 (5)	928,2 ± 104,4	2,0 ± 0,5*	0,22 ± 0,06*
9º dia			
ASB (2)	830,0 ± 28,2	1,1 ± 0	0,13 ± 0
IL-11 (2)	957,5 ± 10,4	2,2 ± 0,6	0,23 ± 0,06

() nº de animais

¹ = em µm

* = p < 0,01 comparativamente com o grupo da ASB

** = p < 0,02 comparativamente com o grupo da ASB

Estes dados comprovam que a administração da IL-11 *in vivo* tem efeitos positivos relevantes sobre a recuperação das células epiteliais dos folículos do intestino delgado perante os efeitos citotóxicos combinados de radiação e quimioterapia.

EXEMPLO 5 - SOBREVIVÊNCIA DE MURGANHOS A SEGUIR A UMA ACÇÃO COMBINADA QUIMIOTERAPÊUTICA/RADIOTERAPÊUTICA

Foram utilizados murganhos da estirpe C3H/HeJ com 8 a 10 semanas de idade [Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME] aos quais se administrou 5-flúor-uracilo (5-FU) (diluído em Solução Salina de Hanks Equilibrada (SSHE) contendo Hepes 0,025 M) [G. R. Siber *et al.*, Cancer Res., 40, 3430-3436 (1980)], à razão de 150 mg/kg de peso corporal por via I.P., três dias antes da irradiação até ao nível subletal (uma irradiação corporal total de 6,0 Gy, administrada

por uma máquina de terapia por raios X da Siemens de 250 KVp, filtrada com uma chapa de Cu com a espessura de 1,0 mm, o que corresponde a uma semi-espessura de uma chapa de Cu de 2,1 mm à DSS de 50 cm, e com uma actividade de 78,13 cGy/minuto). Não foram aplicadas infusões de medula óssea a estes animais.

A IL-11 humana recombinante (ILhr-11) [fornecida por 'Genetics Institute', Cambridge, MA, e preparada em *E. coli*, essencialmente conforme descrito nos exemplos anteriores], foi diluída em SSHE [o mesmo que HBSS da Gibco] contendo 0,1% de ASB [peso/volume, Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN] e Hepes 0,025 M [Gibco]. Injectou-se a ILhr-11 (250 µg/kg de peso corporal) por via subcutânea em volumes de 0,2 mL duas vezes por dia, começando no mesmo dia da irradiação. Os murganhos de contraprova receberam o mesmo volume de SSHE/0,1% de ASB (injecções de veículo).

Os resultados destes estudos estão indicados na figura 1 subsequente. Conforme se pode concluir da figura, a seguir ao tratamento com 5-FU e após a administração de doses subletais de raios X (modalidade combinada, MC, terapia), as lesões provocadas nos intestinos delgados dos murganhos C3H/HeJ foram intensas e disseminadas e a maior parte dos animais morreu em menos de 10 dias (figura 1). Os animais moribundos revelaram fraqueza e diarreia e também cambaleavam, o que indica uma infecção do sistema nervoso central. O tratamento dos murganhos com interleucina 11 humana recombinante (ILhr-11) à razão de 250 µg/kg/dia permitiu um aumento significativo do número de animais sobreviventes a seguir a esta terapia citoablativa, apesar de não haver aumento nenhum do número de neutrófilos do sangue periférico ou das células progenitoras mielóides da medula óssea (figura 1).

Outros tratamentos em que foram administradas doses cada vez maiores de irradiação

proveniente de uma fonte alternativa (^{137}Cs) confirmaram o aumento do número de murganhos sobreviventes que haviam sido tratados com a IL-11 em intervalos de doseamento variáveis. As doses de radiação testadas nas experiências foram de 6,0, 7,0, 7,5 e 8,0 Gy (utilizando a fonte ^{137}Cs a emitir a 95,83 cGy/minuto), conforme se disse antes (todas as doses administradas a seguir ao tratamento com 5-FU à razão de 150 mg/kg), tendo sido abrangida a totalidade de 135 murganhos. A taxa de sobrevivência no grupo de contraprova em todas as experiências foi de 27% comparativamente com a taxa de 62% no grupo dos murganhos tratados com a IL-11 ($p < 0,0001$). O tratamento com a IL-11 permitiu uma redução nítida do número de focos bacterianos em múltiplos órgãos, não havendo nenhum foco detectável em muitos murganhos após o seu sacrifício. A análise microbiológica de focos de secções histológicas retiradas dos figados dos murganhos de contraprova demonstrou de modo uniforme que o organismo causativo era a *E. coli*, que é um organismo entérico vulgar nos murganhos.

EXEMPLO 6- SECÇÕES HISTOLÓGICAS DE INTESTINO DELGADO

Para se determinar a fonte potencial de organismos *E. coli* observados nos murganhos após o tratamento de MC, efectuou-se o exame de secções histológicas do intestino delgado de murganhos de contraprova e de murganhos tratados com a IL-11, sacrificados diariamente após a irradiação.

Os murganhos que morreram de morte natural ou que foram sacrificados a seguir à terapêutica combinada por radiação/quimioterapia (conforme descrito no exemplo 5 anterior) foram autopsiados e os seus tecidos foram estabilizados em formalina tamponada a 10%, de um dia para o outro, nas 12 horas imediatas a seguir a cada óbito. Os tecidos retirados de cada órgão (figado, baço, rim, intestino delgado e mesentério, parede abdominal, pulmão, coração

e fémur) foram embebidos em cera parafínica, utilizando técnicas convencionais. Foram cortadas secções de 4 μ m que foram contrastadas com hematoxilina/eosina (H e E). Foram efectuadas 10 medições independentes do peso das vilosidades, da profundidade dos folículos e das metafases/folículo para cada amostra de intestino delgado obtida a partir de murganhos sacrificados diariamente, tendo sido utilizado para tal um micrómetro montado na objectiva com uma amplificação de 200X. Efectuou-se a contagem dos focos bacterianos hepáticos quer por via macroscópica, enquanto colónias superficiais, quer por via microscópica em secções histológicas de figados escolhidos aleatoriamente.

A mucosa do intestino delgado dos murganhos de contraprova mostrou uma destruição nítida da estrutura das vilosidades com encurtamento do comprimento das vilosidades, vacuolização e estruturas nucleares picnóticas. Pelo contrário, nos murganhos tratados com a IL-11 foram observadas alterações ligeiras da morfologia das vilosidades do intestino delgado. A análise morfométrica dos folículos e do comprimento das vilosidades demonstrou a existência de um aumento significativo na razão entre profundidade folicular/comprimento das vilosidades nos murganhos tratados com a IL-11, comparativamente com os murganhos de contraprova (quadro VI subsequente). O encurtamento das vilosidades foi muito mais importante 24 horas após a irradiação nos dois grupos de murganhos, tendo permanecido anormal nos murganhos de contraprova sobreviventes até ao 9º dia.

Quadro VI

Efeito da IL-11 sobre a recuperação das células foliculares do intestino delgado após o tratamento com 5-FU e irradiação

	PROFUNDIDADE DOS FOLÍCULOS		COMPRIMENTO DAS VILOSIDADES	
	ASB	IL-11	ASB	IL-11
1º dia	76,8 ± 9,2	71,1 ± 4,7	398,6 ± 45,5	479,0 ± 31,8
2º dia	123,4 ± 14,3	129,0 ± 7,8	491,9 ± 23,2	603,4 ± 41,9 ²
3º dia	154,5 ± 10,2	141,8 ± 19,9	468,7 ± 47,4	533,9 ± 24,2
4º dia	141,5 ± 11,9	118,5 ± 14,0	500,2 ± 51,3	635,0 ± 26,9 ²
5º dia	120,6 ± 11,7	117,8 ± 7,7	523,2 ± 17,4	661,5 ± 20,1 ¹

	ASB	IL-11
1º dia	0,20 ± 0,01	0,15 ± 0,00 ¹
2º dia	0,25 ± 0,01	0,22 ± 0,00 ²
3º dia	0,33 ± 0,01	0,27 ± 0,01 ¹
4º dia	0,29 ± 0,00	0,19 ± 0,00 ¹
5º dia	0,23 ± 0,00	0,18 ± 0,01 ¹

¹ p < 0,01 no grupo da ASB

² p < 0,05 no grupo da ASB

cada número representa dados obtidos a partir de 3 animais
10 foliculos/animal; 10 vilosidades/animal.

EXEMPLO 7 - UTILIZAÇÃO DA IL-11 OU DA IL-6 NA TERAPIA CITOABLATIVA

Numa outra experiência diluiu-se a IL-6 humana recombinante [Preprotech, Rocky Hill, New Jersey] em SSHE [o mesmo que HBSS da Gibco] contendo 0,1% de ASB (p/v) e Hepes 0,025 M. A seguir injectou-se cada um de 10 murganhos C3H/HeJ por via subcutânea com a

IL-6 humana recombinante (250 µg/kg de peso corporal) em volumes de 0,2 mL, duas vezes por dia, começando no mesmo dia da irradiação. Dez (10) murganhos foram injectados com IL-11 à razão de 250 µg/kg de peso corporal, conforme descrito no exemplo 5 anterior. Os murganhos de contraprova (55) receberam o mesmo volume de SSHE/0,1% de ASB. Os resultados deste estudo constam do quadro VII seguinte.

Quadro VII

	<u>Percentagem de sobreviventes</u>										
<u>Dia</u>	<u>2</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>9</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>12</u>	<u>13</u>
ASB:	100	98	95	76	55	47	42	34	32	32	31
IL-11:	90	90	90	90	80	80	80	80	80	70	70
IL-6:	100	100	100	100	100	80	80	80	80	80	80

O tratamento dos murganhos com a interleucina 6 humana recombinante à razão de 500 µg/kg/dia teve como resultado um aumento significativo do número de sobreviventes a seguir a esta terapia citoablativa.

EXEMPLO 8- CONTRASTAÇÃO DOS FOLÍCULOS DO INTESTINO DELGADO COM ANCP

Uma vez que o comprimento das vilosidades depende da proliferação e da diferenciação das células foliculares originais e progenitoras [Chwalinski *et al.*, Am. J. Anat., 186, 397-406 (1989); Ijiri *et al.*, Br. J. Cancer, 47, 175-185 (1983); Al-Dewachi *et al.*, Cell Tissue Kinet., 10, 203-213 (1977)], determinou-se o índice mitótico das células foliculares nos murganhos de contraprova e nos murganhos tratados com a IL-11, sacrificados diariamente após a irradiação.

A contração imunoquímica do antígeno nuclear das células proliferativas (ANCP, o mesmo que PCNA) foi efectuada sobre secções de jejuno de 2 cm retiradas de murganhos do MC sacrificados diariamente entre 0 1º e o 5º dias pós-irradiação (dias 4 a 8 após o tratamento com 5-FU). Os tecidos foram estabilizados em solução de formalina a 10%, durante 6 a 12 horas e depois de mergulhados em parafina efectuou-se a secagem das secções histológicas sobre lamelas de vidro tratadas com polilisina. As lamelas foram depois desparafinizadas e novamente hidratadas. Extinguiu-se a actividade da peroxidase endógena por incubação durante 5 minutos em peróxido de hidrogénio a 3%. Recobriu-se as lamelas com soro normal de caprinos, durante 20 minutos, efectuou-se a incubação de um dia para o outro a 4°C com o anticorpo PC-10 contra o ANCP [1:80 Dako, Santa Barbara, CA] e depois contrastou-se, durante 30 minutos, com o anti-anticorpo de murganho conjugado na cabra com biotina [Gaithersburg, MD] e a seguir com estreptavidina conjugada com peroxidase [qualquer destas substâncias fornecida por Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD] durante 30 minutos. Revelou-se a enzima com 3,3'-diaminobenzidina [DAB Sigma, St. Louis, MO]. Os núcleos positivos ao ANCP ficaram contrastados de castanho. Mediu-se a percentagem de células foliculares positivas ao ANCP e o número absoluto de células positivas ao ANCP em cada folículo, por contagem de uma selecção aleatória de folículos/secções histológicas/murganho.

Quadro VIII

Efeito da IL-11 sobre a proliferação das células foliculares do intestino delgado com quantificação efectuada por contrastação do ANCP

	ASB		IL-11	
	núcleos (%)	+núcleos/folículos (%)	+ núcleos (%)	+núcleos/folículos (%)
1º dia	17,0 ± 6,8	3,1 ± 1,4	18,4 ± 9,2	5,0 ± 1,2
2º dia	1,9 ± 1,3	0,4 ± 0,3	10,5 ± 1,0 ¹	2,6 ± 0,3 ¹
3º dia	2,4 ± 1,7	0,8 ± 0,5	7,6 ± 1,9 ²	2,1 ± 0,5 ²
4º dia	1,3 ± 0,4	0,4 ± 0,2	4,2 ± 1,5 ²	1,3 ± 0,4 ²
5º dia	1,7 ± 0,4	0,6 ± 0,1	10,5 ± 11,3	3,3 ± 3,4

¹ p < 0,01 para o grupo da ASB

² p < 0,05 para o grupo da ASB

cada número representa os dados obtidos a partir de 3 animais, à razão de 20 folículos/animal, para 400-600 núcleos.

Foram observados aumentos significativos do número de mitoses/folículo ($2,0 \pm 0,5$ contra $0,9 \pm 0,4$, IL-11 vs contraprova, $p < 0,001$) e também do número de mitoses/100 μ m de membrana do pavimento epitelial ($0,22 \pm 0,06$ contra $0,10 \pm 0,04$, $p < 0,01$) no 5º dia após a irradiação, nos murganhos tratados com a IL-11. Os murganhos de contraprova que sobreviveram até ao 9º dia pós-irradiação revelaram números ligeiramente maiores de células foliculares mitóticas, mas o número dessas células era ainda bastante reduzido quando comparado com os murganhos normais ou com os murganhos tratados com a IL-11.

O aumento da actividade do ciclo celular a seguir ao tratamento de MC e após a administração de IL-11 foi também caracterizado por contratação com o PC-10 [Hall *et al.*, *J. Pathol.*, **162**, 285-294 (1990); Zeymer *et al.*, *Am. J. Pathol.*, **141**, 685-690 (1992); Garcia *et al.*, *Am. J. Pathol.*, **134**, 733-739 (1989)]. O PC-10 é um anticorpo monoclonal dirigido contra o

antígeno nuclear das células proliferativas (ANCP) e é um membro da família de ciclinas das proteínas nucleares (quadro VIII). A administração da IL-11 revelou um aumento de 2 a 5 vezes no número de núcleos de células foliculares que ficam contrastados com o PC-10 entre os dias 2 e 4 a seguir à irradiação. Tomados em conjunto, estes dados demonstram que a administração da IL-11 aos murganhos a seguir a uma lesão grave das células foliculares do intestino delgado acelera a recuperação da estrutura das vilosidades devido presumivelmente a uma maior proliferação das células progenitoras foliculares.

EXEMPLO 9 - EFEITO DA IL-11 SOBRE A PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS IEC-6

Num esforço para se determinar se o efeito da IL-11 sobre a recuperação das vilosidades do intestino delgado, observada *in vivo*, era um efeito directo da IL-11 sobre as células progenitoras foliculares, efectuou-se a incubação de células IEC-6 [Barnard *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 1578-1582 (1989)], que são células de uma linhagem celular não transformada do foliculo do jejuno do rato, com concentrações cada vez maiores de IL-11 (figura 2).

As células IEC-6 obtidas na Colecção Americana de Culturas Tipo [Rockville, MD; CRL 1592] cresceram em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco [Gibco] com 10% de soro fetal de vitelo dializado. As células foram estudadas entre a passagem 20 e 35 mediante a incubação de 5×10^4 células/cavidade em placas de 96 cavidades em meios contendo ou não (contraprova) a IL-11 na concentração de 5-400 ng/mL. Ao fim de 72 horas de incubação mediu-se a absorvência do formazano reduzido, a 490 nm, utilizando um leitor de placas para o protocolo de EISLE (o mesmo que ELISA), num ensaio não radioactivo de proliferação celular (Cell Titer 96AQ), em conformidade com as instruções do fabricante. As amostras

foram preparadas em quadruplicado e foram comparadas entre si por meio do teste t de Student (ver a figura 2 seguinte). Os resultados apresentados são as médias $\pm$ D.P. * $p < 0,05$.

Foi detectada uma resposta à dose quando as células IEC-6 subconfluentes foram incubadas com a IL-11, tendo a actividade óptima ocorrido para a dose de 50 ng/mL. A actividade óptima com a IL-11 foi idêntica à actividade proliferativa induzida pelo factor de crescimento epidermal (FCE), que é um factor de crescimento sobre o qual se sabe que estimula as células IEC-6 [Baliga *et al.*, Biochem. Int'l, 20, 161-168 (1990)]. Não foi observada nenhuma actividade proliferativa quando a IL-11 foi acrescentada às células IEC-6 depois destas terem chegado à confluência, sugerindo tal facto que houve especificidade do ciclo para o efeito das IL-11 estimulador do crescimento. Assim, a IL-11 tem efeitos proliferativos sobre as células IEC-6.

Há inúmeras modificações e variantes da presente invenção que estão contidas na memória descritiva anterior, esperando-se que sejam evidentes para um especialista na matéria. Pressupõe-se que tais modificações e alterações respeitantes a composições e a processos da presente invenção estão abrangidas no âmbito das reivindicações anexas.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

(i) REQUERENTE: Genetics Institute, Inc.,
87 CambridgePark Drive,
Cambridge, MA 02140, E.U.A.

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: "Método para o tratamento de lesões ou de diminuições
celulares"

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 4

(iv) ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

(A) ENDEREÇO: Howson and Howson

(B) RUA: Spring House Corporate Cntr,
P.O. Box 457

(C) CIDADE: Spring House

(D) ESTADO: Pennsylvania

(E) PAÍS: E.U.A.

(F) CÓDIGO POSTAL: 19477

(v) FORMA LEGÍVEL POR COMPUTADOR:

(A) SUPORTE: disquete

(B) COMPUTADOR: CP compatível com IBM

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) PROGRAMA INFORMÁTICO: PatentIn Release #1.0, Versão #1.25

(vi) DADOS ACTUAIS DO PEDIDO:

(A) NÚMERO DO PEDIDO:

(B) DATA DE DEPÓSITO:

(C) CLASSIFICAÇÃO:

(vii) DADOS ANTERIORES DO PEDIDO:

(A) NÚMERO DO PEDIDO: US 07/941 372

(B) DATA DE DEPÓSITO: 02-SET-1992

(viii) INFORMAÇÃO SOBRE O REPRESENTANTE/AGENTE:

(A) NOME: Bak, Mary E.

(B) NÚMERO DO PEDIDO: 31 215

(C) REFERÊNCIA/NÚMERO DO PROCESSO: IND1Apct

(ix) INFORMAÇÃO PARA TELECOMUNICAÇÕES:

(A) TELEFONE: (215) 540-9206

(B) TELEFAX: (215) 540-5818

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 977 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CORDÃO: simples

(D) TOPOLOGIA: desconhecida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) PARTICULARIDADE:

(A) NOME/CÓDIGO: CDS

(B) LOCALIZAÇÃO: 70...666

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

AGCTGGGAAG	GGTTAAAGGC	CCCCGGCTCC	CTGCCCCCTG	CCCTGGGGAA	50									
CCCTGGCCCC	TGCGGGGAC	ATG	AAC	TGT	GIT	TGC	CGC	CTG	GTC	CTG	96			
		Met	Asn	Cis	Val	Cis	Arg	Leu	Val	Leu				
		1				5								
GTC	GIG	CTG	AGC	CTG	TGG	CCA	GAT	ACA	GCT	GTC	GCC	CCT	GGG	138
Val	Val	Leu	Ser	Leu	Trp	Pro	Asp	Thr	Ala	Val	Ala	Pro	Gli	
10					15					20				

CCA Pro	CCA Pro 25	CCT Pro	GGC Gln	CCC Pro	CCT Pro	CGA Arg 30	GTT Val	TCC Ser	CCA Pro	GAC Asp	CCT Pro 30	CGG Arg	GCC Ala	180	
GAG Glu	CTG Leu	GAC Asp 40	AGC Ser	ACC Thr	GTC Val	CTC Leu	CTG Leu 45	ACC Thr	CGC Arg	TCT Ser	CTC Leu	CTG Leu 50	GCG Ala	222	
GAC Asp	ACG Thr	CGG Arg	CAG Gln 55	CTG Leu	GCT Ala	GCA Ala	CAG Gln	CTG Leu 60	AGG Arg	GAC Asp	AAA Lis	TTC Phe	CCA Pro 65	264	
GCT Ala	GAC Asp	GGG Gln	GAC Asp	CAC His 70	AAC Asn	CTG Leu	GAT Asp	TCC Ser	CTG Leu 75	CCC Pro	ACC Thr	CTG Leu	GCC Ala	306	
ATG Met 80	AGT Ser	GCG Ala	GGG Gln	GCA Ala	CTG Leu 85	GGA Gln	GCT Ala	CTA Leu	CAG Gln	CTC Leu 90	CCA Pro	GGT Gln	GTC Val	348	
CTG Leu	ACA Thr 95	AGG Arg	CTG Leu	CGA Arg	GCG Ala	GAC Asp 100	CTA Leu	CTG Leu	TCC Ser	TAC Thr	CTG Leu 105	CGG Arg	CAC His	390	
GTC Val	CAG Gln	TGG Trp 110	CTG Leu	CGC Arg	CGG Arg	GCA Ala	GGT Gln 115	GGC Gln	TCT Ser	TCC Ser	CTG Leu	AAG Lis 120	ACC Thr	432	
CTG Leu	GAG Glu	CCC Pro	GAG Glu 125	CTG Leu	GGC Gln	ACC Thr	CTG Leu	CAG Gln 130	GCC Ala	CGA Arg	CTG Leu	GAC Asp	CGG Arg 135	474	
CTG Leu	CTG Leu	CGC Arg	CGG Arg	CTG Leu 140	CAG Gln	CTC Leu	CTG Leu	ATG Met	TCC Ser 145	CGC Arg	CTG Leu	GCC Ala	CTG Leu	516	
CCC Pro 150	CAG Gln	CCA Pro	CCC Pro	CCG Pro	GAC Asp 155	CGG Pro	CCG Pro	GCG Ala	CCC Pro	CCG Pro 160	CTG Leu	GCG Ala	CCC Pro	558	
CCC Pro	TCC Ser 165	TCA Ser	GCC Ala	TGG Trp	GGG Gln	GGC Gln 170	ATC Ile	AGG Arg	GCC Ala	GCC Ala	CAC His 175	GCC Ala	ATC Ile	600	
CTG Leu	GGG Gln	GGG Gln 180	CTG Leu	CAC His	CTG Leu	ACA Thr	CTT Leu 185	GAC Asp	TGG Trp	GCC Ala	GTC Val	AGG Arg 190	GGA Gln	642	
CTG Leu	CTG Leu	CTG Leu	CTG Leu 195	AAG Lis	ACT Thr	CGG Arg	CTG Leu	TGACCCGAGG			CCCAGAGCCA			686	
CCACCGTCCT			TCCAAAGCCA			CATCTTATTT			ATTTATTTAT			TTCGGTACTG			736
GGGGCGAAAC			AGCCAGGTGA			TCCCCCTGCC			TTTAGCTCCC			CCTAGTTAGA			786

GACAGTCCTT CCGTGAGGCT GGGGGGCATC TGTGCCTTAT TTATACTTAT 836
 TTATTTTCAGG AGCGGGGGTG GGCTCCTGGG TCCCCGAGGA GGAGGGAGCT 886
 GGGGTCCCGG ATTCTTGTGT CCACAGACTT CTGCCCTGGC TCCTCCCCCT 936
 CGAGGCCTGG GCAGGAATAC ATACTATTTA TTTAGAGCT C 977

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 199 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

Met	Asn	Cis	Val	Cis	Arg	Leu	Val	Leu	Val	Val	Leu	Ser	Leu	Trp
1				5					10					15
Pro	Asp	Thr	Ala	Val	Ala	Pro	Gli	Pro	Pro	Pro	Gli	Pro	Pro	Arg
				20					25					30
Val	Ser	Pro	Asp	Pro	Arg	Ala	Glu	Leu	Asp	Ser	Thr	Val	Leu	Leu
				30					40					45
Thr	Arg	Ser	Leu	Leu	Ala	Asp	Thr	Arg	Gln	Leu	Ala	Ala	Gln	Leu
				50					55					60
Arg	Asp	Lis	Phe	Pro	Ala	Asp	Gli	Asp	His	Asn	Leu	Asp	Ser	Leu
				65					70					75
Pro	Thr	Leu	Ala	Met	Ser	Ala	Gli	Ala	Leu	Gli	Ala	Leu	Gln	Leu
				80					85					90
Pro	Gli	Val	Leu	Thr	Arg	Leu	Arg	Ala	Asp	Leu	Leu	Ser	Tir	Leu
				95					100					105
Arg	His	Val	Gln	Trp	Leu	Arg	Arg	Ala	Gli	Gli	Ser	Ser	Leu	Lis
				110					115					120
Thr	Leu	Glu	Pro	Glu	Leu	Gli	Thr	Leu	Gln	Ala	Arg	Leu	Asp	Arg
				125					130					135
Leu	Leu	Arg	Arg	Leu	Gln	Leu	Leu	Met	Ser	Arg	Leu	Ala	Leu	Pro
				140					145					150
Gln	Pro	Pro	Pro	Asp	Pro	Pro	Ala	Pro	Pro	Leu	Ala	Pro	Pro	Ser
				155					160					165

Ser	Ala	Trp	Gli	Gli	Ile	Arg	Ala	Ala	His	Ala	Ile	Leu	Gli	Gli
				170					175					180
Leu	His	Leu	Thr	Leu	Asp	Trp	Ala	Val	Arg	Gli	Leu	Leu	Leu	Leu
				185					190					195
Lis	Thr	Arg	Leu											

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 3632 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CORDÃO: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) PARTICULARIDADE:

- (A) NOME/CÓDIGO: CDS
- (B) LOCALIZAÇÃO: 2242...3132

(ix) PARTICULARIDADE:

- (A) NOME/CÓDIGO: particularidade_misc
- (B) LOCALIZAÇÃO: 2242...2568
- (D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /produto= "proteína tiorredoxina de *E. coli*"
/nota= "Lim *et al.*, J. Bacteriol., 163:311-316 (1985)"

(ix) PARTICULARIDADE:

- (A) NOME/CÓDIGO: RBS
- (B) LOCALIZAÇÃO: 2222...2241
- (D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /nome_padrao= "sequência de ligação robossômica"
/nota= "Dunn e Studier, J. Mol. Biol., 166:477-535 (1983)"

(ix) PARTICULARIDADE:

(A) NOME/CÓDIGO: particularidade_misc

(B) LOCALIZAÇÃO: 2061...2221

(D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /função= "promotor **leftward** do bacteriófago lambda"/nota= "Sanger *et al.*, J. Mol. Biol., 162:729-773 (1982)"

(ix) PARTICULARIDADE:

(A) NOME/CÓDIGO: particularidade_misc

(B) LOCALIZAÇÃO: 1...2060

(D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /função= "derivado do plasmídeo pUC-18"

/nota= "Norrande *et al.*, Gene, 26:101-106 (1983)"

(ix) PARTICULARIDADE:

(A) NOME/CÓDIGO: particularidade_misc

(B) LOCALIZAÇÃO: 2569...2583

(D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /função= "péptido **spacer** hidrofílico flexível e curto"

(ix) PARTICULARIDADE:

(A) NOME/CÓDIGO: particularidade_misc

(B) LOCALIZAÇÃO: 2584...2598

(D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /função= "local de reconhecimento da clivagem da enterocinase"

/nota= "Maroux *et al.*, J. Biol. Chem., 246:5031-5039 (1971)"

(ix) PARTICULARIDADE:

(A) NOME/CÓDIGO: particularidade_misc

(B) LOCALIZAÇÃO: 2599...3132

(D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /produto= "forma modificada da IL11 humana madura"

/nota= "Paul *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:7512-7516 (1990)"

(ix) PARTICULARIDADE:

(A) NOME/CÓDIGO: particularidade_misc

(B) LOCALIZAÇÃO: 3133...3159

(D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /função= "sequência ligadora contendo locais de restrição da endonuclease"

/nota= "Takagi *et al.*, Nucl. Acids Res., 13:2063-2074 (1985)"

(ix) PARTICULARIDADE:

(A) NOME/CÓDIGO: particularidade_misc

(B) LOCALIZAÇÃO: 3233...3632

(D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /função= "sequências de ADN derivadas de pUC-18"

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

GACGAAAGGG	CCTCGTGATA	CGCCTATTTT	TATAGGTAA	TGTCATGATA	50
ATAATGGTTT	CTTAGACGTC	AGGTGGCACT	TTTCGGGGAA	ATGTGCGCGG	100
AACCCCTATT	TGTTTATTTT	TCTAAATACA	TTCAAATATG	TATCCGCTCA	150
TGAGACAATA	ACCCTGATAA	ATGCTTCAAT	AATATTGAAA	AAGGAAGAGT	200
ATGAGTATTC	AACATTTCCG	TGTCGCCCTT	ATTCCCTTTT	TTGCGGCATT	250
TTGCCTTCCT	GTTTTTGCTC	ACCCAGAAAC	GCTGGTGAAA	GTAAAAGATG	300
CTGAAGATCA	GTTGGGTGCA	CGAGTGGGTT	ACATCGAACT	GGATCTCAAC	350
AGCGGTAAGA	TCCTTGAGAG	TTTTCGCCCC	GAAGAACGTT	TTCCAATGAT	400
GAGCACTTTT	AAAGTTCTGC	TATGTGGCGC	GGTATTATCC	CGTATTGACG	450
CCGGGCAAGA	GCAACTCGGT	CGCCGCATAC	ACTATTCTCA	GAATGACTTG	500
GTTGAGTACT	CACCAGTCAC	AGAAAAGCAT	CTTACGGATG	GCATGACAGT	550
AAGAGAATTA	TGCAGTGCTG	CCATAACCAT	GAGTGATAAC	ACTGCGGCCA	600
ACTTACTTCT	GACAACGATC	GGAGGACCGA	AGGAGCTAAC	CGCTTTTTTG	650
CACAACATGG	GGGATCATGT	AACCTCGCCTT	GATCGTTGGG	AACCGGAGCT	700
GAATGAAGCC	ATACCAAACG	ACGAGCGTGA	CACCACGATG	CCTGTAGCAA	750
TGGCAACAAC	GTTGCGCAAA	CTATTAAGTG	GCGAACTACT	TACTCTAGCT	800
TCCCGGCAAC	AATTAATAGA	CTGGATGGAG	GCGGATAAAG	TTGCAGGACC	850
ACTTCTGCGC	TCGGCCCTTC	CGGCTGGCTG	GTTTATTGCT	GATAAATCTG	900

GAGCCGGTGA	GCGTGGGTCT	CGCGGTATCA	TTGCAGCACT	GGGGCCAGAT	950
GGTAAGCCCT	CCCGTATCGT	AGTATCTAC	ACGACGGGGA	GTCAGGCAAC	1000
TATGGATGAA	CGAAATAGAC	AGATCGCTGA	GATAGGTGCC	TCACTGATTA	1050
AGCATIGGTA	ACTGTCAGAC	CAAGTTTACT	CATATATACT	TTAGATTGAT	1100
TTAAAACTTC	ATTTTAAATT	TAAAAGGATC	TAGGTGAAGA	TCCTTTTGA	1150
TAATCTCATG	ACCAAAATCC	CTTAACGTGA	GTTTTCGTTT	CACTGAGCGT	1200
CAGACCCCGT	AGAAAAGATC	AAAGGATCTT	CTTGAGATCC	TTTTTTTCTG	150
CGCGTAATCT	GCTGCTTGCA	AACAAAAAAA	CCACCGCTAC	CAGCGGTGGT	1300
TTGTTTGCCG	GATCAAGAGC	TACCAACTCT	TTTTCCGAAG	GTAAGTGGCT	1350
TCAGCAGAGC	GCAGATACCA	AATACTGTCC	TTCTAGTGTA	GCCGTAGTTA	1400
GGCCACCACT	TCAAGAACTC	TGTAGCACCG	CCTACATACC	TCGCTCTGCT	1450
AATCCTGTTA	CCAGTGGCTG	CTGCCAGTGG	CGATAAGTCG	TGTCTTACCG	1500
GGTTGGACTC	AAGACGATAG	TTACCGGATA	AGGCGCAGCG	GTCGGGCTGA	1550
ACGGGGGGT	CGTGCACACA	GCCCAGCTTG	GAGCGAACGA	CCTACACCGA	1600
ACTGAGATAC	CTACAGCGTG	AGCATTGAGA	AAGCGCCACG	CTTCCCGAAG	1650
GGAGAAAGGC	GGACAGGTAT	CCGGTAAGCG	GCAGGGTCGG	AACAGGAGAG	1700
CGCACGAGGG	AGCTTCCAGG	GGGAAACGCC	TGGTATCTTT	ATAGTCCTGT	1750
CGGGTTTCGC	CACCTCTGAC	TTGAGCGTCG	ATTTTGTGA	TGCTCGTCAG	1800
GGGGGCGGAG	CCTATGAAAA	AACGCCAGCA	ACGCGGCCTT	TTTACGGTTC	1850
CTGGCCTTTT	GCTGGCCTTT	TGCTCACATG	TTCTTTCCTG	CGTTATCCCC	1900
TGATTCTGTG	GATAACCGTA	TTACCGCCTT	TGAGTGAGCT	GATACCGCTC	1950
GCCGCAGCCG	AACGACCGAG	CGCAGCGAGT	CAGTGAGCGA	GGAAGCGGAA	2000
GAGCGCCCAA	TACGCAAACC	GCCTCTCCCC	GCGCGTTGGC	CGATTCAATTA	2050
ATGCAGAATT	GATCTCTCAC	CTACCAAACA	ATGCCCCCCT	GCAAAAAATA	2100
AATTCATATA	AAAAACATAC	AGATAACCAT	CTGCGGTGAT	AAATTATCTC	2150
TGGCGGTGTT	GACATAAATA	CCACTGGCGG	TGATACTGAG	CACATCAGCA	2200
GGACGCACTG	ACCACCATGA	ATTCAAGAAG	GAGATATACA	T ATG AGC	2247
				Met Ser	
				1	

GAT	AAA	ATT	ATT	CAC	CTG	ACT	GAC	GAC	AGT	TTT	GAC	ACG	GAT	2289
Asp	Lis	Ile	Ile	His	Leu	Thr	Asp	Asp	Ser	Phe	Asp	Thr	Asp	
		5					10					15		
GTA	CTC	AAA	GCG	GAC	GGG	GCG	ATC	CTC	GTC	GAT	TTC	TGG	GCA	2331
Val	Leu	Lis	Ala	Asp	Gli	Ala	Ile	Leu	Val	Asp	Phe	Trp	Ala	
			20					25					30	

GAG Glu	TGG Trp	TGC Cis	GGT Gli	CCG Pro 35	TGC Cis	AAA Lis	ATG Met	ATC Ile	GCC Ala 40	CCG Pro	ATT Ile	CTG Leu	GAT Asp	2373
GAA Glu 45	ATC Ile	GCT Ala	GAC Asp	GAA Glu	TAT Tir 50	CAG Gln	GGC Gli	AAA Lis	CTG Leu	ACC Thr 55	GTT Val	GCA Ala	AAA Lis	2415
CTG Leu	AAC Asn 60	ATC Ile	GAT Asp	CAA Gln	AAC Asn	OCT Pro 65	GGC Gli	ACT Thr	GCG Ala	CCG Pro	AAA Lis 70	TAT Tir	GGC Gli	2457
ATC Ile	CGT Arg	GGT Gli 75	ATC Ile	CCG Pro	ACT Thr	CTG Leu	CTG Leu 80	CTG Leu	TTC Phe	AAA Lis	AAC Asn	GGT Gli 85	GAA Glu	2499
GTG Val	GCG Ala	GCA Ala	ACC Thr 90	AAA Lis	GTG Val	GGT Gli	GCA Ala	CTG Leu 95	TCT Ser	AAA Lis	GGT Gli	CAG Gln	TTG Leu 100	2541
AAA Lis	GAG Glu	TTC Phe	CTC Leu	GAC Asp 105	GCT Ala	AAC Asn	CTG Leu	GCC Ala	GGT Gli 110	TCT Ser	GGT Gli	TCT Ser	GGT Gli	2583
GAT Asp 115	GAC Asp	GAT Asp	GAC Asp	AAA Lis	GGT Gli 120	CCA Pro	CCA Pro	CCA Pro	GGT Gli	CCA Pro 125	OCT Pro	CGA Arg	GTT Val	2625
TCC Ser	CCA Pro 130	GAC Asp	OCT Pro	CGG Arg	GCC Ala	GAG Glu 135	CTG Leu	GAC Asp	AGC Ser	ACC Thr	GTT Val 140	CTC Leu	CTG Leu	2667
ACC Thr	CGC Arg	TCT Ser 145	CTC Leu	CTG Leu	GCG Ala	GAC Asp	ACG Thr 150	CGG Arg	CAG Gln	CTG Leu	GCT Ala	GCA Ala 155	CAG Gln	2709
CTG Leu	AGG Arg	GAC Asp	AAA Lis 160	TTC Phe	CCA Pro	GCT Ala	GAC Asp	GGG Gli 165	GAC Asp	CAC His	AAC Asn	CTG Leu	GAT Asp 170	2751
TCC Ser	CTG Leu	CCC Pro	ACC Thr	CTG Leu 175	GCC Ala	ATG Met	AGT Ser	GCG Ala	GGG Gli 180	GCA Ala	CTG Leu	GGA Gli	GCT Ala	2793
CTA Leu 185	CAG Gln	CTC Leu	CCA Pro	GGT Gli	GTG Val 190	CTG Leu	ACA Thr	AGG Arg	CTG Leu	CGA Arg 195	GCG Ala	GAC Asp	CTA Leu	2835
CTG Leu	TCC Ser 200	TAC Tir	CTG Leu	CGG Arg	CAC His	GTG Val 205	CAG Gln	TGG Trp	CTG Leu	CGC Arg	CGG Arg 210	GCA Ala	GGT Gli	2877
GGC Gli	TCT Ser	TCC Ser 215	CTG Leu	AAG Lis	ACC Thr	CTG Leu	GAG Glu 220	CCC Pro	GAG Glu	CTG Leu	GGC Gli	ACC Thr 225	CTG Leu	2919

CAG Gln	GCC Ala	CGA Arg	CTG Leu 230	GAC Asp	CGG Arg	CTG Leu	CTG Leu	CGC Arg 235	CGG Arg	CTG Leu	CAG Gln	CTC Leu	CTG Leu 240	2961
ATG Met	TCC Ser	CGC Arg	CTG Leu	GCC Ala 245	CTG Leu	CCC Pro	CAG Gln	CCA Pro	CCC Pro 250	CCG Pro	GAC Asp	CCG Pro	CCG Pro	3003
GCG Ala 255	CCC Pro	CCG Pro	CTG Leu	GCG Ala	CCC Pro 260	CCC Pro	TCC Ser	TCA Ser	GCC Ala	TGG Trp 265	GGG Gli	GGC Gli	ATC Ile	3045
AGG Arg	GCC Ala 270	GCC Ala	CAC His	GCC Ala	ATC Ile	CTG Leu 275	GGG Gli	GGG Gli	CTG Leu	CAC His	CTG Leu 280	ACA Thr	CTT Leu	3087
GAC Asp	TGG Trp	GCC Ala 285	GTG Val	AGG Arg	GGA Gli	CTG Leu	CTG Leu 290	CTG Leu	CTG Leu	AAG Lis	ACT Thr	CGG Arg 295	CTG Leu	3129
TGAAAGCTTA			TCGATACCGT		CGACCTGCAG		TAATCGTACA		GGGTAGTACA		3179			
AATAAAAAAG			GCACGTCAGA		TGACGTGCCT		TTTTTCTTGT		GAGCAGTAAG		3229			
CTTGGCACTG			GCCGTCGTTT		TACAACGTCG		TGACTGGGAA		AACCCTGGCG		3279			
TTACCCAACT			TAATCGCCTT		GCAGCACATC		CCCCTTTCGC		CAGCTGGCGT		3329			
AATAGCGAAG			AGGCCCCGCAC		CGATCGCCCT		TCCCAACAGT		TGCGCAGCCT		3379			
GAATGGCGAA			TGGCGCCTGA		TGCGGTATTT		TCTCCTTACG		CATCTGTGCG		3429			
GTATTTTACA			CCGCATATAT		GGTGCACTCT		CAGTACAATC		TGCTCTGATG		3479			
CCGCATAGTT			AAGCCAGCCC		CGACACCCGC		CAACACCCGC		TGACGCGCCC		3529			
TGACGGGCTT			GTCTGCTCCC		GGCATCCGCT		TACAGACAAG		CTGTGACCGT		3579			
CTCCGGGAGC			TGCATGTGTC		AGAGGTTTTTC		ACCGTCATCA		CCGAAACGCG		3629			
CGA			3632											

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:4

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 296 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

Met 1	Ser	Asp	Lis	Ile 5	Ile	His	Leu	Thr	Asp 10	Asp	Ser	Phe	Asp	Thr 15
Asp	Val	Leu	Lis	Ala 20	Asp	Gli	Ala	Ile	Leu 25	Val	Asp	Phe	Trp	Ala 30
Glu	Trp	Cis	Gli	Pro 35	Cis	Lis	Met	Ile	Ala 40	Pro	Ile	Leu	Asp	Glu 45
Ile	Ala	Asp	Glu	Trp 50	Gln	Gli	Lis	Leu	Thr 55	Val	Ala	Lis	Leu	Asn 60
Ile	Asp	Gln	Asn	Pro 65	Gli	Thr	Ala	Pro	Lis 70	Trp	Gli	Ile	Arg	Gli 75
Ile	Pro	Thr	Leu	Leu 80	Leu	Phe	Lis	Asn	Gli 85	Glu	Val	Ala	Ala	Thr 90
Lis	Val	Gli	Ala	Leu 95	Ser	Lis	Gli	Gln	Leu 100	Lis	Glu	Phe	Leu	Asp 105
Ala	Asn	Leu	Ala	Gli 110	Ser	Gli	Ser	Gli	Asp 115	Asp	Asp	Asp	Lis	Gli 120
Pro	Pro	Pro	Gli	Pro 125	Pro	Arg	Val	Ser	Pro 130	Asp	Pro	Arg	Ala	Glu 135
Leu	Asp	Ser	Thr	Val 140	Leu	Leu	Thr	Arg	Ser 145	Leu	Leu	Ala	Asp	Thr 150
Arg	Gln	Leu	Ala	Ala 155	Gln	Leu	Arg	Asp	Lis 160	Phe	Pro	Ala	Asp	Gli 165
Asp	His	Asn	Leu	Asp 170	Ser	Leu	Pro	Thr	Leu 175	Ala	Met	Ser	Ala	Gli 180
Ala	Leu	Gli	Ala	Leu 185	Gln	Leu	Pro	Gli	Val 190	Leu	Thr	Arg	Leu	Arg 195
Ala	Asp	Leu	Leu	Ser 200	Trp	Leu	Arg	His	Val 205	Gln	Trp	Leu	Arg	Arg 210
Ala	Gli	Gli	Ser	Ser 215	Leu	Lis	Thr	Leu	Glu 220	Pro	Glu	Leu	Gli	Thr 225
Leu	Gln	Ala	Arg	Leu 230	Asp	Arg	Leu	Leu	Arg 235	Arg	Leu	Gln	Leu	Leu 240
Met	Ser	Arg	Leu	Ala 245	Leu	Pro	Gln	Pro	Pro 250	Pro	Asp	Pro	Pro	Ala 255
Pro	Pro	Leu	Ala	Pro 260	Pro	Ser	Ser	Ala	Trp 265	Gli	Gli	Ile	Arg	Ala 270
Ala	His	Ala	Ile	Leu 275	Gli	Gli	Leu	His	Leu 280	Thr	Leu	Asp	Trp	Ala 285
Val	Arg	Gli	Leu	Leu 290	Leu	Leu	Lis	Thr	Arg 295	Leu				

Lisboa, 5 de Março de 2001

O Agente Oficial da Propriedade Industrial


JOSÉ DE SAMPAIO
A.G.P.I.Rua do Sadino, 125, 1.º e 2.º
1259 LISBOA

Reivindicações

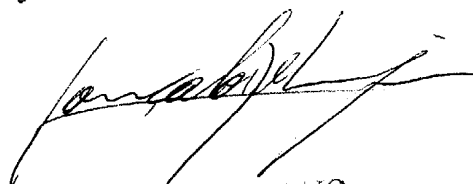
1. Utilização de uma citoquina seleccionada entre o conjunto constituído por interleucina 11, interleucina 6, factor inibidor da leucemia, oncostatina M e factor neurotrófico ciliar, para a preparação de uma composição farmacêutica para reforçar o crescimento de uma população de células do epitélio intestinal.
2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a referida população de células é seleccionada entre o conjunto constituído por células epiteliais do intestino delgado e células epiteliais de revestimento do intestino grosso e do estômago.
3. Utilização de uma citoquina seleccionada entre o conjunto constituído por interleucina 11, interleucina 6, factor inibidor da leucemia, oncostatina M e factor neurotrófico ciliar, para a preparação de uma composição farmacêutica para estimular o crescimento das células do epitélio intestinal num paciente onde tenham ocorrido lesões ou diminuições das populações de células do epitélio intestinal.
4. Utilização de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 3, em que a referida composição farmacêutica incorpora também pelo menos mais uma citoquina.
5. Utilização de uma citoquina seleccionada entre o conjunto constituído por interleucina 11, interleucina 6, factor inibidor da leucemia, oncostatina M e factor neurotrófico ciliar, para a preparação de uma composição farmacêutica que permite manter uma população de

células de epitélio intestinal exposta a um agente citotóxico, em que o referido agente citotóxico é preferencialmente o resultado de quimioterapia, radioterapia ou uma doença.

6. Utilização de acordo com uma qualquer das reivindicações 3 ou 4, em que as referidas lesões ou diminuições são provocadas por um agente seleccionado entre o conjunto constituído por doenças, infecções, traumas, choques, quimioterapia e radioterapia.
7. Utilização de acordo com uma qualquer das reivindicações 3 a 6, em que as referidas populações em que ocorreram lesões ou diminuições são seleccionadas entre o conjunto constituído por células do epitélio intestinal, de preferência as células epiteliais do intestino delgado, e células epiteliais de revestimento do intestino grosso e do estômago.
8. Utilização de acordo com a reivindicação 7, em que a referida citoquina é a interleucina 11.
9. Utilização de acordo com a reivindicação 7, em que a referida citoquina é a IL-6.
10. Utilização de acordo com a reivindicação 7, em que a referida população de células é constituída pelas células epiteliais do intestino delgado.

Lisboa, 5 de Março de 2001

10 O Agente Oficial da Propriedade Industrial



JOSE DE SAMPAIO
A.O.P.I.
Rua do Salitre, 194, 1.º Edif.
1250 LISBOA

Resumo

“Método para o tratamento de lesões ou de diminuições celulares”

A invenção descreve um método para restabelecer populações de células onde ocorreram lesões ou diminuições, tratando os pacientes com citocinas, em particular a IL-11 e a IL-6.

Lisboa, 5 de Março de 2001



O Agente Oficial da Propriedade Industrial



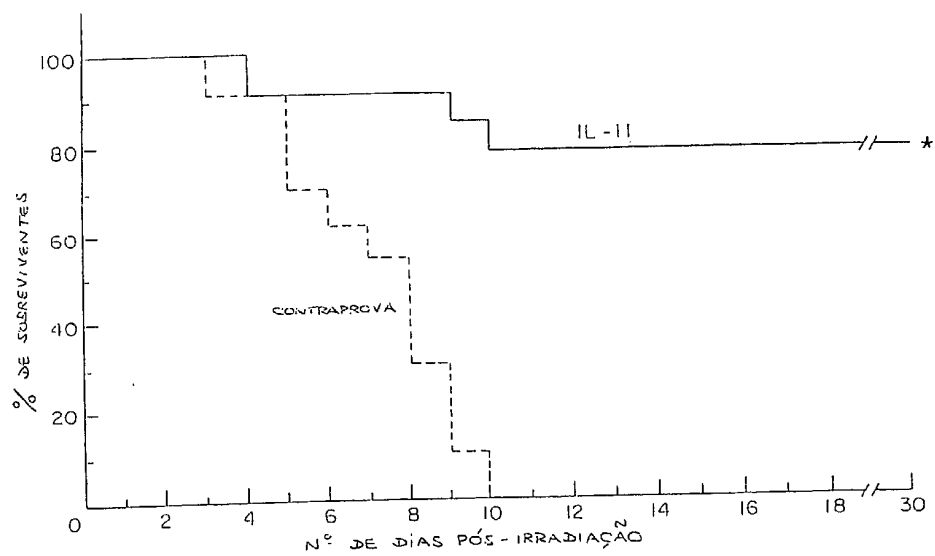
JOSÉ DE SAMPAIO

A.O.P.I.

Rua do Salitre, 175, 4º e-Drto.
1200 LISBOA

758

1 / 2



* $p < 0,01$, TESTE T DE STUDENT

FIG. 1

238

2 / 2.

FIG. 2

