

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 407 465**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/09	(2006.01)	A61P 13/12	(2006.01)	A61P 35/00	(2006.01)
A61K 31/7088	(2006.01)	A61P 17/00	(2006.01)		
A61K 35/12	(2006.01)	A61P 17/04	(2006.01)		
A61K 35/74	(2006.01)	A61P 19/02	(2006.01)		
A61K 35/76	(2006.01)	A61P 19/04	(2006.01)		
A61K 38/00	(2006.01)	A61P 21/00	(2006.01)		
A61K 48/00	(2006.01)	A61P 21/02	(2006.01)		
A61P 3/10	(2006.01)	A61P 21/04	(2006.01)		
A61P 7/06	(2006.01)	A61P 25/00	(2006.01)		
A61P 11/06	(2006.01)	A61P 29/00	(2006.01)		

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2005 E 05721719 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2013 EP 1736541**

(54) Título: **Nueva proteína galectina 9 modificada y uso de la misma**

(30) Prioridad:

**29.03.2004 JP 2004094401
30.09.2004 JP 2004287005
18.02.2005 JP 2005043156**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.06.2013

(73) Titular/es:

**GALPHARMA CO., LTD. (100.0%)
884-3-302, Fuseishi-cho
Takamatsu-shi, Kagawa 761-8071, JP**

(72) Inventor/es:

**NISHI, NOZOMU;
HIRASHIMA, MITSUOMI;
YAMAUCHI, AKIRA y
ITO, AIKO**

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 407 465 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nueva proteína galectina 9 modificada y uso de la misma

Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevas proteínas galectina 9 modificadas (mutantes de galectina 9) y aplicaciones de las mismas. Particularmente, la presente invención se refiere a proteínas galectina 9 mutantes funcionales en las que dicha proteína galectina 9 mutante funcional tiene una región peptídica de enlace modificada, y a sus aplicaciones prácticas en bioquímica, diagnósticos médicos, terapia y farmacología.

Antecedentes de la invención

Se han encontrado pruebas que indican el siguiente hecho: las cadenas de sacáridos específicas y proteínas que se unen a las mismas desempeñan muchos papeles y funciones diversos en fenómenos fisiológicos, acontecimientos asociados con el desarrollo/crecimiento y una diversidad de enfermedades en los cuerpos vivos de mamíferos. Se ha descubierto que hay lectinas animales, en cuerpos vivos, que reconocen específicamente cadenas de sacáridos con estructura de β galactósido. Hasta ahora se han identificado al menos 14 tipos de genes para galectinas que pertenecen al grupo de tales lectinas. Aunque la familia de galectina está clasificada, basándose en su estructura, en tres subgrupos, es decir, grupos prototipo, quimera y de repeticiones en tandem, las funciones *in vivo* apenas se han desvelado. Particularmente, el estudio de las galectinas de tipo repetición en tandem que conservan dos dominios de reconocimiento de carbohidratos tiene solamente un historial corto. Puesto que aún no se han revelado cadenas de sacáridos *in vivo* (receptores) para marcarse como objetivos, las funciones aún no se han aclarado. A partir de detalles incluyendo cómo se encontraron galectinas cuando se realizó una búsqueda de proteínas que reconocieran cadenas de azúcares complicadas en la superficie de las células, se ha predicho que estas tienen funciones tales como la implicación en adhesión celular, comunicación de célula a célula, activación celular.

Por lo tanto, las galectinas han atraído atención. Además, se están obteniendo resultados de investigación que anticipan lo siguiente: las galectinas conservan, además de tales funciones, una diversidad de otras funciones importantes. La galectina 9, una de las galectinas de tipo repetición en tandem, se identificó en primer lugar como un autoantígeno en paciente con enfermedad de Hodgkin (Documentos No de Patente 1 y 2), y se ha conjecturado que desempeñan un papel importante en interacciones de célula a célula entre células inmunitarias. Se clonó galectina 9 de ratón de la biblioteca de ADN de riñón de ratón por PCR 5'-RACE con cebadores degenerados que se diseñaron basándose en secuencias que se consideraba que eran altamente conservativas entre los dominios de reconocimiento de carbohidratos de galectinas (Documento No de Patente 3). Se ha descubierto que los linfocitos T estimulados con antígenos producen *in vivo* e *in vitro* un quimioatraventante de eosinófilos, es decir, ecalectina.

Además, aunque la ecalectina es estructuralmente diferente de otros quimioatraventantes de eosinófilos conocidos hasta la fecha, tiene afinidad de unión a azúcares por las cadenas de sacáridos de β galactósico, por lo que puede clasificarse en la familia de galectinas. La clonación de ecalectina ha sido un éxito a partir de ARNm obtenido de líneas celulares de leucemia derivadas de linfocitos T humanas. Como resultado, se ha verificado que la ecalectina es una de las variantes de galectina 9, y la galectina 9 y ecalectina son sustancias idénticas (Documento No de Patente 4).

Se ha indicado en la actualidad que la galectina 9 natural incluye galectina 9 de tipo L (isoforma larga de galectina 9 o galectina 9 de tipo largo: Gal-9L), galectina 9 de tipo M (isoforma media de galectina 9 o galectina 9 de tipo medio: Gal-9M) y galectina 9 de tipo S (isoforma corta de galectina 9 o galectina 9 de tipo corto: Gal-9S). Cualquiera de los miembros de galectina 9 es una molécula que consiste en dos dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRD) y un péptido de engarce que es una región de enlace entre dos CRD. La galectina 9 de tipo L es una molécula con la región peptídica de enlace más larga en la que el dominio N terminal (NCRD) está ligado al dominio C terminal (CCRD) con la ayuda de dicha región peptídica de enlace mientras que la galectina 9 de tipo S es una molécula con la región peptídica de enlace más corta. La galectina 9 tipo M es una molécula con una región peptídica de enlace de longitud media en comparación con ambas, y se sabe que en general Gal-9M existe predominantemente en tejido y células corporales a diferencia de las dos anteriores. Además, puede percibirse que hay algunas pruebas que indican la presencia de polimorfismo genético entre los genes de galectina 9 clonados a partir de células y tejido humanos.

La galectina 9 natural consiste en dos dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRD) y una región de enlace que es un enlace entre dichos CRD. Se ha sugerido que la galectina 9 recombinante, producida en *E. coli* huésped, induce la inhibición de metástasis de cáncer y regresión de cánceres por acciones directas sobre las células tumorales (actividad de inducción de la adhesión intercelular y apoptosis de células tumorales) y acciones mediante el sistema inmunitario. Se ha revelado que la galectina 9 no actúa en linfocitos no activados mientras que induce apoptosis de linfocitos activados, entre otros linfocitos T positivos para CD4 que provocarán reacción hiperinmune. También se ha desvelado que la galectina 9 tiene una propiedad inductora de apoptosis potente de actuación sobre las células sinoviales implicadas en una deformidad de las articulaciones u otros síntomas de reumatismo.

[Documento No de Patente 1] Sahin, U. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 11810-11813 (1995)

[Documento No de Patente 2] Türeci, O. y col., J. Biol. Chem., 272(10), 6416-6422 (1997)

[Documento No de Patente 3] Wada, J. y col., J. Biol. Chem., 272(9), 6078-6086 (1997)
 [Documento No de Patente 4] Matsumoto, R. y col., J. Biol. Chem., 273(27), 16976-16984 (1998)

Sumario de la invención

- 5 Se espera que la utilización de tales propiedades versátiles poseídas por galectina 9 augure técnicas terapéuticas para cánceres, enfermedades autoinmunes refractarias (incluyendo reumatismo) y trastornos alérgicos. Sin embargo, la galectina 9 recombinante (rGal9) tiene un área de enlace susceptible a proteasa conectando dicha área de enlace dos CRD, y es por lo tanto fácilmente digerible con enzimas proteolíticas. La escisión proteolítica de rGal 9 dará como resultado pérdida de la actividad anteriormente mencionada.
- 10 Los presentes inventores han realizado una búsqueda exhaustiva en diversas moléculas para resolver los problemas anteriores. Como resultado, los presentes inventores han tenido éxito en la producción de nuevas moléculas que tienen una estructura molecular más estable frente a la acción de proteasa mientras que la actividad de reconocimiento de carbohidratos de galectina 9 natural se conserva. Los presentes inventores han tenido éxito en la construcción de moléculas modificadas altamente estabilizadas sin afectar de forma adversa a la actividad anteriormente mencionada teniendo dicha molécula un área de enlace de Gal 9 alterada que enlaza dos CRD de Gal 9. Por lo tanto, se ha conseguido la presente invención.

La presente invención proporciona lo siguiente:

- (1) Una proteína, o una sal de la misma, que comprende una proteína galectina 9 mutante que tiene actividad de unión a β galactósido y que tiene la estructura (N-CRD)-Engarce-(C-CRD), en la que N-CRD es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID Nº: 3, una variante de la misma que difiere de la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 3 por una delección, sustitución o adición de 1 a 8 restos de aminoácidos y que tiene la actividad sustancialmente equivalente a la del polipéptido de SEC ID Nº: 3, o una variante de la misma que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 70% homóloga de SEC ID Nº: 3 y que tiene actividad sustancialmente equivalente a la del polipéptido de SEC ID Nº: 3;
- 20 C-CRD es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 4, una variante de la misma que difiere de la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 4 por una delección, sustitución o adición de 1 a 21 restos de aminoácidos y que tiene actividad sustancialmente equivalente a la del polipéptido de SEC ID Nº: 4, o una variante de la misma que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 70% homóloga de SEC ID Nº: 4 y que tiene actividad sustancialmente equivalente a la del polipéptido de SEC ID Nº: 4; y el engarce es una secuencia de aminoácidos que consiste en 2 restos de aminoácidos arbitrarios, o que tiene la secuencia Arg Ile Pro.
- 25 (2) La proteína, o una sal de la misma, de acuerdo con la (1), en la que el engarce es un polipéptido que tiene la secuencia His Met o Arg Ile Pro.
- 30 (3) La proteína, o una sal de la misma, de acuerdo con la (1) anterior que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID Nº: 2.
- 35 (4) Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de acuerdo con cualquiera de las (1) a (3) anteriores.
- 40 (5) La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la (4) anterior, en la que dicha molécula es un polinucleótido.
- 45 (6) La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la (4) o (5) anterior, en la que dicha molécula es ADN o ARN.
- 50 (7) Un vector recombinante que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las (4) a (6) anteriores.
- (8) El vector recombinante de acuerdo con la (7) anterior comprendiendo dicho vector una secuencia de nucleótidos que codifica un marcador proteico y/o un marcador peptídico en combinación con la molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.
- (9) Una célula transformada o transfectada que porta la molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las (4) a (6) anteriores o el vector recombinante de acuerdo con la (7) u (8) anterior.
- 55 (10) La célula transformada o transfectada de acuerdo con la (9) anterior, siendo dicha célula huésped procariota o eucariota.
- (11) Un fármaco que comprende una cantidad eficaz de al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en la proteína de acuerdo con cualquiera de las (1) a (3) anteriores, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las (4) a (6) anteriores, el vector recombinante de acuerdo con las (7) u (8) anteriores, y la célula transformada o transfectada de acuerdo con las (9) o (10) anteriores.
- 60 (12) El fármaco de acuerdo con la (11) anterior que es un inmunoregulador o inmunomodulador.
- (13) El fármaco de acuerdo con la (11) anterior que es un agente antineoplásico o antitumoral.
- (14) El fármaco de acuerdo con la (13) anterior que es un agente antineoplásico o antitumoral para prevenir y/o tratar al menos un tumor seleccionado del grupo que consiste en sarcomas o cánceres, incluyendo tumores cerebrales (glioblastoma multiforme), tumores medulares, carcinoma del seno maxilar, adenocarcinoma ductal pancreático, cánceres gingivales, cánceres de la lengua, cánceres de los labios, cánceres naseofaríngeos, cánceres orofaríngeos, cánceres hipofaríngeos, cánceres laringeos, cánceres tiroideos, cánceres paratiroideos, cánceres de pulmón, tumores pleurales, peritonitis carcinomatosa, pleuresía carcinomatosa, cánceres esofágicos, cánceres de estómago, cánceres de colon, cánceres de conductos biliares, cánceres de vesícula biliar, cánceres pancreáticos, cánceres de hígado, cánceres renales, cánceres de la vejiga urinaria, cánceres prostáticos, cánceres del pene, tumores testiculares, cánceres adrenales, cánceres cervicales, cánceres endometriales, cánceres vaginales, cánceres vulvares, cánceres ováricos, corioepiteloma, tumores malignos

del hueso, sarcoma de partes blandas, cánceres de mama, cánceres de piel, melanoma maligno, tumores de células basales, leucemia, mielofibrosis asociada con metaplasia mieloide agnogénica, linfoma maligno, enfermedad de Hodgkin, plasmacitoma y glioma.

5 (15) El fármaco de acuerdo con la (11) anterior que es para prevenir y/o tratar al menos un trastorno, enfermedad o afección patológica seleccionada del grupo que consiste en:

- (A) un miembro seleccionado del grupo que consiste en enfermedades y trastornos inflamatorios: una diversidad de inflamaciones agudas o crónicas que se producen en diversos órganos, inflamaciones alérgicas o autoinmunes, y enfermedades infecciosas;
- (B) un miembro seleccionado del grupo que consiste en enfermedades y trastornos agudos y crónicos: enfermedades o trastornos de pulmón incluyendo bronquitis, bronconeumonía, neumonía intersticial, neumonitis, bronquiolitis y mediastinitis aguda; enfermedades o trastornos de diversos órganos distintos de pulmón, incluyendo pericarditis, endocarditis, miocarditis, estomatitis, estomatitis angular, tonsilitis, faringitis, laringitis, esofagitis, peritonitis, gastritis aguda, gastritis crónica, enteritis aguda, apendicitis, colitis isquémica, colitis inducida por fármacos y proctitis; y enfermedades y trastornos inflamatorios incluyendo hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis fulminante, hepatitis aguda o crónica y cirrosis, coleocistitis, pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, nefritis aguda o crónica, glomerulonefritis membranosa, glomerulonefritis, nefritis de IgA, una diversidad de cistitis, encefalomielitis, mastitis, dermatitis, queratitis superficial, queratoconjuntivitis xerótica, otitis media y rinitis, sinusitis paranasal y pólico nasal, gingivitis, periodontitis y otros trastornos inflamatorios del periodonto;
- (C) un miembro seleccionado del grupo que consiste en inflamaciones neurogénicas, tales como gastritis neurogénica y cistitis neurogénica, y dolor asociado con cáncer e inflamación;
- (D) un miembro seleccionado del grupo que consiste en enfermedades inflamatorias asociadas con alergia incluyendo anafilaxis sistémica o generalizada, asma bronquial, neumonitis hipersensible, polenosis, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, enfermedades alérgicas inducidas por complejo inmune y edema angioneurótico;
- (E) un miembro seleccionado del grupo que consiste en enfermedades inflamatorias relacionadas con autoinmunidad (enfermedades autoinmunes): enfermedades sistémicas (artritis reumatoide crónica, lupus eritematoso sistémico, poliarteritis nodosa, esclerodermia, polimiositis/dermatomiositis, síndrome de Sjögren y enfermedad de Behcet), enfermedades del sistema nervioso (esclerosis múltiple, miastenia grave, HAM (mielosis por HTLV-1) y esclerosis lateral amiotrófica, enfermedades endocrinas (enfermedad de Basedow, tiroiditis de Hashimoto y diabetes de tipo 1), enfermedades de la sangre (púrpura trombitopénica idiopática, anemia hemolítica autoinmune y anemia aplásica), enfermedades respiratorias (sarcoidosis y fibrosis pulmonar idiopática), enfermedades gastrointestinales (colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), enfermedades hepáticas (hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria y colangitis autoinmune), y enfermedades sistémicas del tracto urinario/renal (nefritis asociada con anticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos, angitis, síndrome de Goodpasture y enfermedad de anticuerpos anti membrana basal glomerular);
- (F) un miembro seleccionado del grupo que consiste en enfermedades infecciosas: enfermedades y afecciones anómalas que se producen cuando los patógenos provocan daño y/o lesión a las células, tejidos y órganos dentro del cuerpo, o enfermedades resultantes de la presencia o actividad del patógeno que provoca infección en ser humano, seleccionándose dicho patógeno del grupo que consiste en 1) bacterias (incluyendo espiroqueta, clamidia y Rickettsia), 2) virus, 3) hongos, 4) plantas (algas), 5) protozoos, 6) parásitos (Digeneos (distomas o tremátodos), céstodos (tenias), nemátodos) y 7) artrópodos; incluyendo bacteriosis (cólera, peste, infección por *Escherichia coli*), espiroquetosis (leptospirosis), clamidiosis (psitacosis), infecciones por rickettsia (*Rickettsia prowazekii*, tétanos), infecciones virales (herpes zóster, fiebre hemorrágica viral y rabia), micosis (candidiasis, criptococosis y aspergilosis), enfermedades protozoarias (disentería amebica, malaria y toxoplasmosis), parasitosis (distomiasis y nematodiasis), así como infecciones por micoplasmas (neumonía por micoplasma), micobacteriosis (tuberculosis y micobacteriosis atípica);
- (G) un miembro seleccionado del grupo que consiste en enfermedades cutáneas y afecciones cutáneas anómalas: i) infecciones cutáneas, inflamaciones cutáneas incluyendo inflamaciones alérgicas e inflamaciones autoinmunes, y enfermedades cutáneas con características inflamatorias, tales como psoriasis, hidroa, pustulosis, queratinización, y queratosis, y ii) daños cutáneos, y afecciones cutáneas relacionadas con la edad o de desfiguración cosmética, incluyendo enfermedades dermatológicas y afecciones cosméticamente desagradables (incluyendo envejecimiento) asociadas con a) control del metabolismo de melanina (blanqueamiento de la piel), b) control del crecimiento capilar (tricógeno) y c) control de la producción de colágeno;
- (H) un miembro seleccionado del grupo que consiste en enfermedades relacionadas con el estilo de vida incluyendo hipercolesterolemia, arteriosclerosis, hipertensión y diabetes.
- (I) afecciones anómalas con respecto al mantenimiento de una flora bacteriana normal;
- (J) un miembro seleccionado del grupo que consiste en las que incluyen amiloidosis, enfermedad de Alzheimer, osteoporosis y fractura ósea;
- (K) respuestas inflamatorias en cerebro y áreas nerviosas: por ejemplo, inflamaciones que se producen en respuesta al desarrollo de lesiones isquémicas, tales como infarto cerebral, infarto de miocardio, y esquizofrenia;

- (L)gota;
- (M)osteoporosis; y
- (N)neumonitis intersticial.

5 (16) Un reactivo de ensayo o prueba que comprende una cantidad eficaz de al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en la proteína de acuerdo con cualquiera de las (1) a (3) anteriores, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las (4) a (6) anteriores, el vector recombinante de acuerdo con la (7) u (8) anterior, y la célula transformada o transfectada de acuerdo con la (9) o (10) anterior.

Perfiles ventajosos de la invención

10 Las moléculas de galectina 9 modificadas, que se diseñan basándose en galectina 9, están más estabilizadas contra proteasas en comparación con galectina 9 natural. Por lo tanto, puede esperarse que las moléculas de Gal 9 modificadas sean útiles al inducir y revelar las funciones *in vivo* de Gal 9.

15 Dichas moléculas de Gal 9 modificadas también son aplicables a estudios sobre las funciones y acciones de galectina 9 que pueden contribuir a la regulación y control de diversas bioreacciones incluyendo la regulación de células tumorizadas, inmunorregulación y el control de la alergia y la inflamación. Además, dichas moléculas de Gal 9 modificadas y sustancias relacionadas con las mismas tienen perspectivas prometedoras para reactivos y agentes en aplicaciones clínicas, de biología molecular, bioquímicas y médicas.

20 Los objetos anteriores y otros objetos, características, ventajas y aspectos de la presente invención son fácilmente evidentes para los expertos en la materia a partir de la siguiente divulgación. Debería entenderse, sin embargo, que las divulgaciones de la memoria descriptiva que incluyen los siguientes mejores modos de llevar a cabo la invención, ejemplos y otros, ilustran realizaciones preferidas de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

25 La FIGURA 1 es un esquema que ilustra etapas para la construcción de vector de expresión de muteína de galectina 9 modificada (G9NC(nula)).

La FIGURA 2 es una fotografía que muestra patrones electrofotéricos para un producto de muteína de galectina 9 modificada (G9NC(nula)) expresada y un producto de G9NC(nula) expresada purificada.

30 La FIGURA 3 es una fotografía que muestra patrones electrofotéricos resultantes de la comparación con respecto a resistencia frente a proteasas entre galectina natural 9 (G9(M)) y muteína de galectina 9 modificada (G9NC(nula)). Se ensayaron muestras purificadas con respecto a resistencia frente a proteasas de *E. coli* contaminadas.

35 La FIGURA 4 es una fotografía que muestra patrones electrofotéricos resultantes de la comparación con respecto a resistencia frente a proteasas entre galectina 9 natural (G9(S)) y muteína de galectina 9 modificada (G9NC(nula)).

Las muestras purificadas se ensayaron con respecto a resistencia frente a metaloproteinasa de matriz 3 (MMP-3).

40 La FIGURA 5 es una fotografía que muestra patrones electrofotéricos resultantes de comparación con respecto a resistencia frente a proteasas entre galectina 9 natural (G9(S)) y muteína de galectina 9 modificada (G9NC(nula)). Se ensayaron muestras purificadas con respecto a resistencia contra elastasa.

45 La FIGURA 6 es una fotografía que muestra patrones electrofotéricos resultantes de la comparación con respecto a bioactividad entre galectina 9 natural (G9(S)) y muteína de galectina 9 modificada (G9NC(nula)). Se ensayó la actividad de inducción de apoptosis de células MOLT-4 (escalonamiento de ADN).

50 La FIGURA 7 es una gráfica que muestra resultados de comparación con respecto a bioactividad entre galectina 9 natural (G9(S)) y muteína de galectina 9 modificada (G9NC(nula)). Se ensayó la actividad ECA en eosinófilos de sangre periférica.

55 La FIGURA 8 es una lista de aminoácidos en varias posiciones en EST de galectina 9. Estos clones de EST de galectina 9 potenciales se identificaron por búsqueda de secuencia de BLAST usando la secuencia de nucleótidos de egalectina como interrogante. La identidad de secuencia (homología) de esos clones con la egalectina es habitualmente del 97 al 99%. Los clones de EST de diferentes fuentes se demuestran sin aminoácidos en las posiciones 5, 88, 135, 238 y 281, respectivamente.

50 La FIGURA 9 es una gráfica que muestra que el zimosan induce pleuresía mientras que la muteína de galectina 9 modificada (h-gal9NC(nula)) por sí sola no.

La FIGURA 10 es una gráfica que muestra resultados de ensayo con respecto a la eficacia de muteína de galectina 9 (h-gal9NC(nula)) en el modelo de pleuresía inducida por zimosan.

55 La FIGURA 11 es una gráfica que muestra resultados de ensayo con respecto a la eficacia de muteína de galectina 9 (Gal-9= G9NC(nula)) en el modelo de dermatitis inducida por PMA (modelo susceptible a esteroides).

La FIGURA 12 es una gráfica que muestra resultados de ensayo con respecto a la eficacia de muteína de galectina 9 (Gal-9= G9NC(nula)) en el modelo de dermatitis inducida por AA (modelo no susceptible a esteroides).

60 La FIGURA 13 es una gráfica que muestra resultados de ensayo con respecto a la eficacia de muteína de galectina 9 (Gal-9= G9NC(nula)) en el modelo de dermatitis inducida por capsaicina.

- La FIGURA 14 es una gráfica que muestra resultados de ensayo con respecto a la eficacia de muteína de galectina 9 (Gal-9= G9NC(nula)) en el modelo de dermatitis de contacto inducida por DNFB.
- 5 La FIGURA 15 es una gráfica que muestra resultados de ensayo con respecto a la eficacia de muteína de galectina 9 (Gal-9= G9NC(nula)) en el modelo de dermatitis de contacto inducida por DNFB.
- La FIGURA 16 es una gráfica que muestra resultados de ensayo con respecto a la eficacia de muteína de galectina 9 (Gal-9= G9NC(nula)) en el modelo de dermatitis atópica inducida por FITC.
- 10 La FIGURA 17 es una gráfica que muestra resultados de ensayo con respecto a la eficacia de muteína de galectina 9 (Gal-9= G9NC(nula)) en el modelo de urticaria
- La FIGURA 18 es una gráfica que muestra resultados de ensayo con respecto a la eficacia de muteína de galectina 9 (Gal-9= G9NC(nula)) en el modelo de urticaria
- 15 La FIGURA 19 es una gráfica que muestra resultados de ensayo con respecto a la eficacia de muteína de galectina 9 (Gal-9= G9NC(nula)) en el modelo de artritis.
- La FIGURA 20 muestra los resultados de ensayo de exámenes de la eficacia de la muteína de galectina 9 modificada para inhibir el crecimiento de células tumorales, es decir, actividad antitumoral (antineoplásica) en el modelo de tumor trasplantado de forma subcutánea. Superior: grupo de control. Inferior: grupo al que se administró muteína de Gal-9 modificada (no se observó tumor durante 5 semanas hasta la fecha).
- 20 La FIGURA 21 muestra fotografías de tejidos histopatológicos de ensayos con respecto a la eficacia de la muteína de galectina 9 modificada para inhibir el crecimiento de células tumorales, es decir, actividad antitumoral (antineoplásica) en el modelo de tumor trasplantado de forma subcutánea, en las que se muestran los estados de la piel de 5 semanas cuando se administraron LLC + Muteína de Gal-9 Modificada (Gal9) (fotografías inferiores): tono macroscópicamente blanco.
- La FIGURA 22 muestra los resultados de ensayo para inducción de apoptosis mediada por muteína de galectina 9 modificada (citotoxicidad) en células tumorales cultivadas (células Meth A, 24 h).
- 25 La FIGURA 23 muestra los resultados de ensayo para inducción de apoptosis mediada por muteína de galectina 9 modificada (citotoxicidad) en células tumorales cultivadas (células B16/F10, 24 h).
- La FIGURA 24 es una gráfica de curvas de supervivencia animal que muestra que la muteína de galectina 9 modificada tiene eficacia antitumoral en el modelo de peritonitis cancerosa, inducida por células Meth A.
- 30 La FIGURA 25 muestra fotografías que muestran estados animales en el modelo de peritonitis cancerosa, inducida por células Meth A, para grupos a los que no se administró (superior) y se administró (inferior) muteína de galectina 9 modificada (Gal9).
- La FIGURA 26 es una gráfica de curvas de supervivencia de animales que muestra que la muteína de galectina 9 modificada tiene eficacia antitumoral en el modelo de peritonitis cancerosa, inducida por células B16/F10.
- 35 La FIGURA 27 muestra fotografías de tejidos de órganos internos (Día 14) en las que se comparan los estados de los animales de grupos a los que se administró muteína de galectina 9 modificada (Gal-9) con los de grupos no administrados en el modelo de peritonitis cancerosa, inducida por células B16/F10 (melanoma).
- La FIGURA 28 muestra resultados de análisis de células B16/F10 intraabdominales infiltradas de exámenes de acciones mediadas por muteína de galectina 9 modificada (Gal-9) en células inmunitarias.
- 40 La FIGURA 29 muestra resultados de ensayos con respecto a inhibición de la adhesión celular mediada por muteína de galectina 9 modificada (Gal-9) (células B16/F10, 1 h). En el dibujo, Colágeno I indica colágeno de tipo I; Colágeno IV, colágeno de tipo IV; Laminina, laminina; Fibronectina, fibronectina; y Vitronectina, vitronectina.
- La FIGURA 30 muestra gráficas de resultados de ensayo con respecto a acciones de muteína de galectina 9 modificada (Gal-9) y dexametasona (Dex.) en el modelo de asma inducido por antígenos de ácaros.
- 45 La FIGURA 31 muestra gráficas de números de células en BALF, resultados de ensayo con respecto a acciones de muteína de galectina 9 modificada (Gal-9) y dexametasona (Dex.) en el modelo de asma inducido por antígenos de ácaros.
- La FIGURA 32 muestra fotografías de tejido circundante del tubo bronquial de resultados de ensayo con respecto a acciones de muteína de galectina 9 modificada (Gal-9) en el modelo de asma inducido por antígenos de ácaros.
- 50 La FIGURA 33 muestra gráficas de resultados de ensayo con respecto a acciones de muteína de galectina 9 modificada (Gal-9) y dexametasona (Dex.) en el modelo (ratón) de asma inducido por OVA.
- La FIGURA 34 muestra gráficas de números de células en BALF, resultados de ensayo con respecto a acciones de muteína de galectina 9 modificada (Gal-9) y dexametasona (Dex.) en el modelo (ratón) de asma inducido por OVA.
- 55 La FIGURA 35 es una gráfica que muestra acciones de muteína de galectina 9 modificada (Gal-9) en IAR/LAR en el modelo (ratón) de asma inducido por OVA.
- La FIGURA 36 es una gráfica que muestra números de células en BALF, resultados de ensayo con respecto a acciones de muteína de galectina 9 modificada (Gal-9) en el modelo (ratón) de asma inducido por OVA.
- 60 La FIGURA 37 muestra gráficas de valores de hematocrito (%), como resultados de ensayo con respecto a acciones de muteína de galectina 9 modificada (Gal-9) en el modelo (ratón) de anemia hemolítica autoinmune.
- La FIGURA 38 muestra gráficas de los resultados de ensayo con respecto a acciones de muteína de galectina 9 modificada (Gal-9) y dexametasona (Dex.) en el modelo (ratón) de reacción de Arthus (angitis).
- 65 La FIGURA 39 muestra gráficas de resultados de ensayo con respecto a acciones de muteína de galectina 9 modificada (Gal-9) y dexametasona (Dex.) en el modelo (ratón) de SDRA.
- La FIGURA 40 muestra gráficas de números de células en BALF, resultados de ensayo con respecto a acciones de muteína de galectina 9 modificada (Gal-9) y dexametasona (Dex.) en el modelo (ratón) de SDRA.

- 5 La FIGURA 41 es una gráfica que muestra resultados de ensayo con respecto a acciones de muteína de galectina 9 modificada (Gal-9, i.v.) en el modelo (ratón) de inflamación inducida por capsaicina.
- 10 La FIGURA 42 es una gráfica que muestra resultados de ensayo con respecto a la eficacia de muteína de galectina 9 modificada (Gal-9) en formación de osteoclastos. Resulta evidente que Gal-9 ejerce eficacia inhibidora.
- 15 La FIGURA 43 muestra resultados de ensayo con respecto a inducción de apoptosis (en presencia de CSF) de células mononucleares por estimulación con muteína de galectina 9 modificada (Gal-9).
- 20 La FIGURA 44 es una gráfica que muestra resultados de ensayo con respecto a la eficacia de muteína de galectina 9 modificada (Gal-9) en la proliferación de osteoblastos.
- 25 La FIGURA 45 muestra gráficas de resultados de ensayo con respecto a la eficacia de la estimulación con muteína de galectina 9 modificada (Galectina-9) (8 h) en la expresión de marcadores de proliferación de osteoblastos humanos.
- 30 La FIGURA 46 es una gráfica que muestra proporciones de supervivencia. Se ensayaron las acciones de la muteína de galectina 9 modificada en el modelo de neumonía intersticial.
- 35 La FIGURA 47 muestra fotografías que muestran los resultados de ensayo con respecto a la acción de muteína de galectina 9 modificada en el modelo de neumonía intersticial. Las fotografías muestran imágenes de tejido de pulmón de animales que sobrevivieron el Día 14 (teñidos con HE).
- 40 La FIGURA 48 es una gráfica que muestra curvas de supervivencia de animales.
- 45 Se revela que las muteínas de galectina 9 modificada tienen eficacia antitumoral en el modelo de peritonitis cancerosa, inducida por células LLC (apoptosis (+)).
- 50 La FIGURA 49 muestra fotografías que muestran resultados de ensayo con respecto a la acción de muteína de galectina 9 modificada en el modelo de cáncer metastásico, inducido por células B16/F10. Las fotografías muestran imágenes de pulmón (vistas exteriores) de animales modelo.
- 55 La FIGURA 50 muestra resultados de ensayo con respecto a la acción de muteína de galectina 9 modificada (G9NC(nula)) en el modelo de cáncer metastásico, inducido por células B16/F10. Se contó el número de colonias en cada pulmón.
- 60 La FIGURA 51 es una gráfica que muestra resultados de ensayo con respecto a la eficacia de muteína de galectina 9 modificada (gal-9) (administración i.v.) en el modelo de enfermedad inflamatoria inducida por carragenina.
- 65 La FIGURA 52 es una gráfica que muestra resultados de ensayo con respecto a la eficacia de control positivo, dexametasona (Dex.), en el modelo de enfermedad inflamatoria inducida por carragenina, para comparación.
- 70 La FIGURA 53 muestra resultados de tinción inmunohistológica con respecto a expresión de galectina 9 en sinovio de artritis reumatoide (AR).
- 75 La FIGURA 54 muestra fotografías microscópicas de células sinoviales de AR. Se observó la actividad mediada por galectina 9 de inducción de apoptosis de las células sinoviales de AR.
- 80 La FIGURA 55 es una gráfica que muestra resultados de ensayo de PI con respecto a actividad mediada por galectina 9 de inducción de apoptosis de células sinoviales de AR.
- 85 La FIGURA 56 es una gráfica que muestra resultados de ensayo con respecto a actividad mediada por galectina de inducción de apoptosis de células sinoviales de AR.
- 90 La FIGURA 57 es una gráfica que muestra resultados de ensayo con respecto a actividad mediada por galectina de inhibición del crecimiento de células sinoviales de AR.
- 95 La FIGURA 58 muestra gráficas de resultados de ensayo con respecto a la acción de la muteína de galectina 9 modificada en el modelo de artritis adyuvante (supresión de dolor desencadenado por estimulación mecánica).
- 100 La FIGURA 59 muestra gráficas de resultados de ensayo con respecto a la acción de indometacina, de control positivo, en el modelo de artritis adyuvante (supresión de dolor desencadenado por estimulación mecánica), para comparación.
- 105 La FIGURA 60 muestra gráficas de resultados de ensayo con respecto a la acción de la muteína de galectina 9 modificada en el modelo de enfermedad inflamatoria aguda inducida por carragenina (supresión de dolor desencadenado por estimulación mecánica).
- 110 La FIGURA 61 muestra gráficas de resultados de ensayo con respecto a la acción de dexametasona, de control positivo, en el modelo de enfermedad inflamatoria aguda inducida por carragenina (supresión de dolor desencadenado por estimulación mecánica), para comparación.
- 115 La FIGURA 62 muestra resultados de SDS-PAGE del examen de la estabilidad de la muteína de galectina 9 modificada en fluido sinovial humano.
- 120 La FIGURA 63 es una gráfica que muestra resultados de ensayo con respecto a la eficacia de muteína de galectina 9 modificada (galectina 9 estabilizada) (administración i.v.) en el modelo de artritis (artritis inducida por cóctel de Ab).
- 125 La FIGURA 64 es una gráfica que muestra resultados de ensayo con respecto a la eficacia de muteína de galectina 9 modificada (galectina 9 estabilizada) (administración i.v.) en el modelo de artritis (artritis inducida por colágeno).
- 130 La FIGURA 65 es una gráfica que muestra resultados de ensayo con respecto a la eficacia de muteína de galectina 9 modificada (galectina 9 estabilizada) (administración i.v.) en el modelo de artritis (artritis inducida por colágeno).
- 135 La FIGURA 66 muestra gráficas de resultados de ensayo con respecto a la eficacia de muteína de galectina 9 modificada (administración i.v.) en el modelo de artritis adyuvante.
- 140 La FIGURA 67 muestra gráficas de resultados de ensayo con respecto a la eficacia de indometacina, de control

positivo, en el modelo de artritis adyuvante, para comparación.

La FIGURA 68 es una gráfica que muestra resultados de ensayo con respecto a la eficacia de muteína de galectina 9 modificada (administración i.v.) en el modelo de rata de artritis inducida por colágeno (CIA).

Mejores modos para llevar a cabo la invención

5 La invención descrita en el presente documento se basa en trabajos previamente publicados y solicitudes de patente pendientes. Todos estos trabajos publicados y solicitudes de patente pendientes se incorporan por la presente por referencia en su totalidad. La "muteína de galectina 9 modificada", "variante de galectina 9 modificada", "galectina 9 modificada" o "proteína galectina 9 modificada" se refiere a una sustancia que posee una actividad para unirse específicamente a una cadena de sacáridos específica conservándose dicha actividad por el dominio de
10 reconocimiento de carbohidratos de galectina 9, o su actividad análoga (incluyendo cualitativa y/o cuantitativa). Se observa que la galectina 9 tiene una actividad para inducir apoptosis de una célula específica. La muteína de galectina 9 modificada puede ser una sustancia que tenga una actividad inductora de apoptosis, poseída por galectina 9 natural, o una actividad análoga a la misma, y una sustancia en la que la bioactividad conservada por galectina 9 natural está alterada o modificada, lo que es preferible en algunos casos. La muteína de galectina 9 modificada particularmente preferida en el presente documento es una molécula que conserva una propiedad más deseable para actuar como un reactivo biológicamente activo en aplicaciones de diagnóstico, analíticas, médicas o farmacéuticas que galectina 9 natural.

20 A este respecto, se presentó en J. Biol. Chem., 272 (10): pág. 6416-6422 (1997) que se había descubierto una nueva galectina en ADNc derivado del bazo de un paciente con enfermedad de Hodgkin y se nombró "galectina 9", su secuencia se volvió a confirmar con ADNc a partir de sangre periférica normal para excluir mutaciones del transcríto de galectina 9 humano derivado de tumor de enfermedad de Hodgkin y finalmente se determinó la secuencia de galectina 9 como se muestra en la FIGURA 1 en la página 6418 de dicho documento. Para galectina 9, se presentó además en J. Biol. Chem., 273 (27): pág. 16976-16984 (1998) que se había aislado un nuevo quimioatrayente de eosinófilos "ecalectina" a partir de ADNc preparado de la línea de linfocitos T productores de quimioatrayentes de eosinófilos STO-2, y su secuencia de aminoácidos era aparentemente diferente en los restos de aminoácidos 5, 88, 135, 238 y 281 de la secuencia de aminoácidos de la galectina 9 anteriormente descrita, previamente presentada aunque era altamente homóloga de la galectina 9 anteriormente descrita. La secuencia de dicha ecalectina se muestra en la FIGURA 8 en la página 16983 de este documento en el que se supone que ecalectina es una forma variante de galectina 9.

25 30 Además, en J. Biol. Chem., 275 (12): pág. 8355-8360 (2000), la galectina 9 se aisló de ADNc preparado a partir de la línea de linfocitos T Jurkat y se produjeron proteínas de galectina 9 recombinantes. Puesto que esta galectina 9 recombinante mostraba actividad quimioatrayante de eosinófilos, Hirashima y col. decidieron usar galectina 9 con la secuencia derivada de células de línea de linfocitos T Jurkat para su estudio en lo sucesivo, teniendo la secuencia de aminoácidos de galectina 9 derivada de células Jurkat Gly, Lys, Ser, Pro y Glu en las posiciones 5, 88, 135, 238 y 281, respectivamente, aunque era diferente en el resto de aminoácido 5 de la secuencia de ecalectina presentada en Matsumoto y col. (J. Biol. Chem., 273 (27): pág. 16976-16984 (1998)) anteriormente mencionado, es decir, Gly en la posición 5 de galectina 9 derivada de células Jurkat se reemplazó con Ser en la secuencia de aminoácidos de ecalectina. Se desveló que la sustitución de Ser a Gly en la posición 5 no afectaba a la actividad quimioatrayente de eosinófilos, y se consideró natural a la vista de 17 clones de ETS de galectina 9 potenciales (incluyendo secuencias parciales) identificados por búsqueda de secuencia usando la secuencia de galectina 9 como interrogante en la base de datos de EST que Gly, Lys, Ser, Pro y Glu se establecieron como los aminoácidos para las posiciones 5, 88, 135, 238 y 281, respectivamente. También se desvelan mutaciones de aminoácidos en la secuencia de galectina 9 en la Tabla II en la página 8359 de dicho documento (véase FIGURA 8). En la FIGURA 8, Gly (G), Lys (K), Ser (S), Pro (P) y Glu (E) están en las posiciones 5, 88, 135, 238 y 281, respectivamente.

35 40 45 50 En J. Biol. Chem., 272 (9): pág. 6078-6086 (1997: Documento No de Patente 3), se determinaron las regiones para dos dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRD) y un enganche, 26 aminoácidos (para galectina 9M), entre los dos CRD (véase FIGURA 1 en este documento). En otras palabras, cuando se prestó atención a la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 5, se definió que el dominio de reconocimiento de carbohidratos C terminal (CCRD) comenzaba desde Met¹⁷⁵. Basándose en eso, se han registrado las regiones de CRD y enlace de galectina 9 humana como Número de Referencia NP_033665 en la base de datos de NCBI.

55 A este respecto, se presentaron las galectinas 4 y 6 en J. Biol. Chem., 273 (5): pág. 2954-2960 (1998), en la que se proporcionaron definiciones para el CRD y regiones de enlace del mismo basándose en sus secuencias de aminoácidos y secuencias génicas, como se muestra en la FIGURA 2 en la página 2956 de este documento. Cuando la configuración de galectina 9 refleja las definiciones anteriormente mencionadas, es diferente en la región de enlace y CRD C terminal de la configuración anterior (J. Biol. Chem., 272 (9): pág. 6079-6086 (1997)), es decir, cuando la secuencia de aminoácidos se basa en SEC ID N°: 5, se define que el CCRD comienza desde Phe¹⁹⁵.

60 El presente grupo inventor tiene en consideración lo siguiente: existen límites para el corte y empalme de exones en posiciones 3 aminoácidos más cercanas al extremo C terminal que en la configuración expuesta en el Documento No de Patente 3, tal como entre Gln⁴⁹-Pro⁴⁹, entre Ile¹⁶⁰-Thr¹⁶¹, y entre Ser¹⁷⁷-Thr¹¹⁹. Además, a partir de exámenes con respecto a la propiedad de unión a carbohidratos del CRD C terminal, es decir, basándose en la secuencia de

aminoácidos de SEC ID Nº: 5, la expresión de CCRD de longitud completa iniciada a partir de Thr¹⁷⁸ dio como resultado aparición de su propiedad de unión a lactosa, y además la delección de 22 aminoácidos (fragmento de CCRD iniciado a partir de Leu²⁰⁰) dio como resultado la ausencia de expresión en *E. coli* mientras que tanto la delección de 6 aminoácidos (fragmento de CCRD iniciado a partir de Met¹⁸⁴) como la delección de 12 aminoácidos (fragmento de CCRD iniciado a partir de Ala¹⁹⁰) no provocaron una pérdida de actividad de unión a lactosa, el presente grupo inventor toma en consideración que puede verse que la configuración de CCRD iniciado a partir de Phe¹⁹⁵ es imparcial. Por lo tanto, la región, Thr¹⁷⁸ a Thr³²³, en la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 5 se define en el presente documento como el CRD C terminal. El CRD N terminal (NCRD) de galectina 9 se examina basándose en la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 5 como sigue: cuando se expresó NCRD de longitud completa terminado en Gln¹⁴⁸, el producto resultante tenía una propiedad de unión a lactosa. Cuando se retiraron 9 aminoácidos (fragmento de NCRD de la secuencia, Met¹ a Ser¹³⁹), sin embargo, la expresión de proteínas tuvo lugar pero no se observó propiedad de unión a lactosa. Por lo tanto, Met¹ a Gln¹⁴⁸ en la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 5 se define en el presente documento como el CRD N terminal.

De acuerdo con la invención, la muteína de galectina 9 modificada incluye, por ejemplo, moléculas en las que

- 15 (1) N-CRD es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 3, una variante del mismo que difiere de la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 3 en una delección, sustitución o adición de 1 a 8 restos de aminoácidos y que tiene actividad polipeptídica de SEC ID Nº: 3 sustancialmente equivalente, o una variante de la misma que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 70% homóloga de SEC ID Nº: 3 y que tiene actividad sustancialmente equivalente a la del polipéptido SEC ID Nº: 3;
- 20 (2) C-CRD es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 4, una variante de la misma que difiere de la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 4 en una delección, sustitución o adición de 1 a 21 restos de aminoácidos y que tiene actividad sustancialmente equivalente a la del polipéptido de SEC ID Nº: 4, o una variante de la misma que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 70% homóloga de SEC ID Nº: 4, y que tiene actividad sustancialmente equivalente a la del polipéptido SEC ID Nº: 4; y
- 25 (3) El engarce es una secuencia de aminoácidos que consiste en 2 restos de aminoácidos arbitrarios, o que tiene la secuencia Arg Ile Pro.

Dicho engarce, preferentemente la proteína o sal del mismo de la reivindicación 1, siendo el engarce un polipéptido tiene la secuencia His Met o Arg Ile Pro.

El “polipéptido de galectina 9 modificada”, “polipéptido variante de Gal-9 modificada” o “polipéptido de muteína de Gal-9 modificada” incorpora variantes modificadas, derivados, análogos, fragmentos, quimeras y mutantes de la secuencia nativa de galectina 9 natural como se ha definido anteriormente. Los polipéptidos se codifican por secuencias polinucleotídicas producidas de forma recombinante diseñadas para codificar el polipéptido de galectina 9 modificada específico pretendido para expresión en una célula huésped. El “agente terapéutico variante de galectina 9 modificada” incluye moléculas derivadas de polinucleótido que codifica una variante de Gal-9 modificada (polinucleótido de muteína de galectina 9 modificada) o secuencia polipeptídica de Gal-9 modificada, y variantes, mutantes, análogos, quimeras y fragmentos de dicho polinucleótido o polipéptido de Gal-9 modificada. Los agentes terapéuticos de muteína de galectina 9 modificada en su polinucleótido son generalmente secuencias que codifican un polipéptido de galectina 9 modificada que puede expresarse de forma recombinante en una célula huésped. Adicionalmente, un agente terapéutico de muteína de galectina 9 modificada puede ser una molécula pequeña agonista de la actividad de galectina 9. Otros agentes terapéuticos de muteína de Gal-9 modificada pueden incluir sustancias que proporcionan una muteína de Gal 9, y moduladores de la actividad de galectina 9 que tienen actividad de muteína de galectina 9 modificada y provocan un efecto profiláctico y/o terapéutico en trastornos, enfermedades y afecciones anómalas asociados con la insuficiencia o ausencia de actividad de galectina 9. Un modulador de la actividad de galectina 9 puede ser, por ejemplo, un polinucleótido, un polipéptido o una molécula pequeña. La expresión “agente de diagnóstico” como se usa en el presente documento se refiere a cualquier agente que contribuya a una o más acciones de diagnóstico usadas en las aplicaciones de diagnóstico de la invención.

Estas aplicaciones de diagnóstico incluyen procedimientos para determinar la presencia de células productoras de galectina 9 o procedimientos para determinar la presencia de células presentadoras de sustancia que se une a galectina 9. Los agentes de diagnóstico incluyen los siguientes: ADN que codifica una muteína de galectina 9 modificada, una variante de galectina 9 estabilizada, y células u homogeneizados celulares que tengan la muteína de galectina 9 estabilizada.

La expresión “agente terapéutico”, como se usa en el presente documento puede ser cualquier agente que consiga o contribuya a la consecución de una o más acciones terapéuticas o elementos usados en aplicaciones terapéuticas de la invención. Por ejemplo, cuando el agente terapéutico es un polinucleótido diseñado para expresar un polipéptido de muteína de galectina 9 modificada, ese agente es un polinucleótido que puede administrarse a y expresarse en una célula en el mamífero. Por lo tanto, la forma activa del agente será inicialmente el polipéptido expresado. El agente terapéutico de variante de galectina 9 modificada es un agente terapéutico con la bioactividad de galectina 9, o un agente terapéutico derivado de galectina 9 modificada, tal como un polipéptido capaz de unirse en una cierta cadena de sacárido más larga que la galectina 9 nativa o un polinucleótido que codifique un polipéptido de muteína de galectina 9 modificada que esté más estabilizado contra enzimas proteolíticas tales como metaloproteinasa que la galectina 9 nativa. El agente terapéutico consigue un objetivo terapéutico, solo o en

combinación con otros agentes (por ejemplo, un agente usado en otros tratamientos conocidos para un tumor o autoinmunidad particular junto con administración de mutéína de galectina 9 modificada, o un vehículo de suministro genético capaz de facilitar la expresión de mutéína de galectina 9 modificada en el mamífero). Los agentes terapéuticos pueden incluir por ejemplo fármacos que contienen variantes de galectina 9 modificada desarrollados para otros fines, agonistas de galectina 9 y fármacos adicionales que modulan o regulan la actividad de galectina 9.

El agente terapéutico puede ser, por ejemplo, una molécula orgánica pequeña, un péptido, un peptoide o compuesto peptídico, un polinucleótido que codifique un polipéptido de mutéína de galectina 9 modificada, un polipéptido de variante de galectina 9 modificada o una célula transformada o transfectada que exprese una quimera o un mutante de la mutéína de galectina 9 modificada que esté estabilizada para proteasa más que la galectina 9 nativa (galectina 9 natural).

El “agente terapéutico de combinación” es una composición terapéutica que tiene varios componentes o agentes que producen sus efectos separados cuando se administran juntos, y pueden producir un efecto sinérgico cuando se administran juntos para tratar una enfermedad. Preferentemente, los efectos preparados del agente terapéutico de combinación se combinan para dar como resultado un efecto terapéutico mayor, por ejemplo eliminación o reducción de tumores, normalización de células o tejidos tumorales, recuperación de una enfermedad autoinmune y supervivencia a largo plazo. Un ejemplo de efectos separados que resultan de la administración de un agente terapéutico de combinación es la combinación de efectos tales como remisión a corto plazo o largo plazo, o reducción de una respuesta autoinmune a un tipo particular de células en el paciente. Un ejemplo del agente terapéutico de combinación de acuerdo con la presente invención sería la administración de un vehículo de suministro genético incluyendo un polinucleótido que codifique una mutéína de galectina 9 modificada en combinación con un polinucleótido que codifique al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en IFN, IL-2 y otras citocinas. Como alternativa, pueden usarse dos vectores de suministro genético, uno que exprese mutéína de galectina 9 modificada y uno que codifique al menos una de las citocinas. Además pueden administrarse IFN e IL-2, o un vehículo de suministro genético que exprese al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en IFN, tales como IFN- γ , IL-2 y otras citocinas, para regular positivamente la expresión de mutéína de galectina 9 modificada en anticipación de una administración de mutéína de galectina 9 modificada para inducir apoptosis en células diana. Los diversos agentes terapéuticos pueden administrarse en el mismo vehículo farmacéuticamente aceptable a la vez, seguido, por ejemplo, de administración repetida de uno o todos los agentes individuales según sea necesario para hacer la terapia eficaz.

La expresión “vehículo de suministro genético” se refiere a un componente que facilita el suministro a una célula de una secuencia codificante para la expresión de un polipéptido en la célula. La célula puede estar dentro del mamífero, como en terapia génica *in vivo*, o puede retirarse del mamífero para transfección o transformación y devolverse al mamífero para expresión del polipéptido como en terapia génica *ex vivo*. El vehículo de suministro genético puede ser cualquier componente o vehículo capaz de conseguir el suministro de un gen en una célula, por ejemplo, un liposoma, una partícula o un vector. El vehículo de suministro genético incluye un vehículo recombinante, tal como un vector viral recombinante, un vector de ácido nucleico (tal como plásmido), una molécula de ácido nucleico desnuda tal como genes, una molécula de ácido nucleico en complejo con una molécula poliacidónica capaz de neutralizar la carga negativa en la molécula de ácido nucleico y condensar la molécula de ácido nucleico en una molécula compacta, un ácido nucleico asociado con un liposoma (Patente de Estados Unidos Nº 5.166.320; 5.547.932; Wang y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 7851, 1987). Dichos vehículos de suministro genético incluyen ciertas células eucariotas (por ejemplo, una célula productora), que son capaces de suministrar una molécula de ácido nucleico que tiene biológicamente una o más propiedades deseables a células huésped. Como se analiza adicionalmente posteriormente, las propiedades deseables incluyen la capacidad para expresar una sustancia deseada, tal como, por ejemplo, una proteína, enzima o anticuerpo y/o la capacidad para proporcionar una actividad biológica, que es en la que la molécula de ácido nucleico portada por el vehículo de suministro genético es en sí misma el agente activo sin requerir la expresión de una sustancia deseada. Un ejemplo de dicha actividad biológica se encuentra en la terapia génica en la que la molécula de ácido nucleico suministrada se incorpora en un gen específico para inactivar el gen y “desactivar” la formación de producto dirigida por el gen, permitiendo de este modo la expresión específica de dicha molécula de ácido nucleico suministrada. El vehículo de suministro genético se refiere a un ensamblaje que es capaz de dirigir la expresión de una o múltiples secuencias o genes de interés. El vehículo de suministro genético generalmente incluye elementos promotores y puede incluir una señal que dirige la poliadenilación. Además, el vehículo de suministro genético incluye una secuencia que, cuando se transcribe, está unida operativamente a una o múltiples secuencias o genes de interés y actúa como una secuencia de inicio de la traducción. El vehículo de suministro genético también puede incluir un marcador seleccionable tal como Neo, SV²Neo, TK, higromicina, bleomicina (fleomicina), puromicina, histidinol o DHFR, así como uno o más sitios de restricción y una secuencia de terminación de la traducción. Los vehículos de suministro genético como se usan dentro de la presente invención se refieren a vehículos recombinantes, tales como vectores virales (Jolly, Cancer Gen. Therapy, 1: 51-64, 1994), vectores de ácido nucleico, ADN desnudo, ADN liposomal, cósmidos, bacterias y ciertas células eucariotas (incluyendo células productoras: véase Patente de Estados Unidos Nº 6.333.195).

La expresión “Biológicamente activo” se refiere a una molécula que conserva una actividad específica. Un polipéptido de galectina 9 modificada biológicamente activo (mutéína de galectina 9 o variante de Gal-9 modificada), por ejemplo, conserva no solamente la capacidad para unirse específicamente a cierta cadena de sacárido en el dominio de reconocimiento de carbohidratos, como la que posee el CRD de galectina 9, o una propiedad

sustancialmente equivalente a la misma, sino también cualitativa o cuantitativamente la propiedad más estable frente a digestión con enzimas proteolíticas tales como metaloproteinasa de matriz, en comparación con galectina 9 nativa (galectina 9 natural). Por ejemplo, dicho polipéptido de galectina 9 modificada biológicamente activo tiene actividad antitumoral o la capacidad para activar la ruta apoptótica que conduce a apoptosis, como la que posee la galectina 9

5 nativa. La "molécula de ácido nucleico" o "polinucleótido", como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas de ARN o ADN, o híbridos ADN:ARN que codifican una secuencia de aminoácidos específica o su hebra complementaria. La "secuencia codificante" como se usa en el presente documento se refiere a cualquiera de ARN, ADN e híbridos de ADN:ARN que codifican una secuencia de aminoácidos específica o su hebra complementaria. El polinucleótido puede incluir, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido, o una ribozima, y también puede incluir tales 10 artículos como una región no traducida 3' o 5' de un gen, o un intrón de un gen, u otra región de un gen que no compone la región codificante del gen. El ADN o ARN puede ser monocatenario o bicatenario. Los ácidos nucleicos sintéticos o polinucleótidos sintéticos pueden ser secuencias de ácido nucleico sintetizadas químicamente y también 15 pueden modificarse con restos químicos para hacer a la molécula resistente a degradación. El polinucleótido puede generarse, por ejemplo, por amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o expresión recombinante de ADN o ARN complementario, o por síntesis química.

La expresión "secuencia de control de la expresión" o "secuencia reguladora" se refiere a una secuencia que se usa convencionalmente para efectuar expresión de un gen que codifique un polipéptido e incluye uno o más componentes, elementos o factores que afectan a la expresión, incluyendo señales de transcripción y traducción. La secuencia de control de la expresión que es apropiada para expresión de los presentes polipéptidos difiere dependiendo del sistema del huésped en el que el polipéptido deba expresarse.

20 El "polipéptido" de la invención es uno cualquiera que comprenda cualquier parte de la mutéína de galectina 9 modificada incluyendo la proteína madura, siempre que incluya un polipéptido variante de galectina 9 modificada o un fragmento del mismo, y puede incluir además truncamientos, variantes, alelos, análogos y derivados de los mismos. Las variantes pueden ser variantes de corte y empalme expresadas a partir del mismo gen que la proteína 25 relacionada. A no ser que se mencione específicamente de otro modo, dicho polipéptido posee una o más de las bioactividades de la proteína galectina 9, incluyendo por ejemplo la afinidad de unión específica por una cadena de sacárido específica o actividad de unión con un compañero específico. Este término "polipéptido" no se limita a una longitud específica del producto del gen. Por lo tanto, los polipéptidos que son idénticos o contienen al menos 70%, preferentemente 80%, más preferentemente 90% y más preferentemente 95% de homología con la proteína diana o 30 la proteína madura con respecto al dominio de reconocimiento de carbohidratos N-terminal (NCRD) y dominio de reconocimiento de carbohidratos C-terminal (CCDR) de galectina 9, independientemente de donde se derive, de fuentes humanas o no humanas se incluyen dentro de esta definición del polipéptido. También se incluyen, por lo tanto, alelos y variantes del producto del gen que contienen sustituciones, delecciones o inserciones de aminoácidos. 35 Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservativas o sustituciones para eliminar restos de aminoácidos no esenciales, tal como para alterar un sitio de glicosilación, un sitio de fosforilación, un sitio de acetilación o para alterar el patrón de plegamiento alterando la posición del resto de cisteína que no es necesario para su función. Son sustituciones de aminoácidos conservativas las que conservan la carga general, hidrofobicidad/hidrofilia y/o tamaño estérico (volumen) del aminoácido sustituido, por ejemplo, las sustituciones entre 40 los miembros de los siguientes grupos son sustituciones conservativas: Gly/Ala, Val/Ile/Leu, Asp/Glu, Lys/Arg, Asn/Gln, Ser/Cys/Thr y Phe/Trp/Tyr. Los análogos incluyen péptidos que tienen uno o más miméticos peptídicos, también conocidos como peptoides, que poseen la actividad de tipo proteína diana. Se incluyen dentro de la 45 definición como se expone en el presente documento, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales), polipéptidos con enlaces sustituidos, así como otras mutaciones/modificaciones conocidas en la técnica, tanto de origen natural como de origen no natural. El término "polipéptido" tampoco excluye modificaciones postraduccionales del polipéptido, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones, miristoilaciones.

50 La expresión "ADN desnudo" como se usa en el presente documento se refiere a ADN de polinucleótido para administración a un mamífero para expresión en el mamífero. El polinucleótido puede ser, por ejemplo, una secuencia codificante, y el ADN del polinucleótido puede estar directa o indirectamente conectado con una secuencia de control de la expresión que puede facilitar la expresión de la secuencia codificante una vez que el ADN está dentro de una célula. La conexión indirecta es equivalente desde la perspectiva de facilitar la expresión del ADN en las células de mamífero, y permite únicamente la posibilidad de la inclusión de otras secuencias entre la región reguladora y la secuencia codificante que puede facilitar la expresión adicionalmente, o puede actuar únicamente como un engarce o espaciador para facilitar la conexión de las dos regiones polinucleotídicas entre sí.

55 El "vector" usado en el presente documento se refiere a un ensamblaje que es capaz de dirigir la expresión de una o más secuencias de interés, o uno o más genes de interés. El vector debe incluir promotor/potenciador transcripcional o uno o más elementos definitorios de locus, u otros elementos que controlen la expresión génica por otros medios, tal como corte y empalme alternativo, exportación de ARN nuclear, modificación postraduccional del mensajero o 60 modificación postranscripcional de la proteína. Además, el vector debe incluir una secuencia que, cuando se transcribe, se une operativamente a una o más secuencias o genes de interés, y actúa como una secuencia de inicio de la traducción. Opcionalmente, el vector también puede incluir una señal que dirige la poliadenilación, un marcador seleccionable tal como Neo, TK, higromicina, bleomicina (fleomicina), histidinol o DHFR, así como uno o más sitios de restricción y una secuencia de terminación de la traducción. Además, si el vector se sitúa en un retrovirus, el

vector debe incluir una señal de empaquetamiento, repeticiones terminales largas (LTR) y sitios de unión a cebador de hebra positiva y negativa apropiados para el retrovirus usado (si estas no están ya presentes).

El "promotor específico de tejido" se refiere a promotor/potenciador transcripcional o elementos definitorios de locus, u otros elementos que controlan la expresión génica como se ha analizado anteriormente, que están activos preferentemente en un número limitado de tipos tisulares o tipos celulares. Los ejemplos representativos de tales promotores específicos de tejido incluyen el promotor PEPCK, promotor HER2/neu, promotor de caseína, promotor de IgG, promotor de antígeno embrionario coriónico, promotor de elastasa, promotor de porfobilinógeno desaminasa, promotor de insulina, promotor del factor de la hormona del crecimiento, promotor de tirosina hidroxilasa, promotor de albúmina, promotor de α -fetoproteína, promotor del receptor de acetil-colina, promotor de alcohol deshidrogenasa, promotores de α o β -globina, promotor del receptor de linfocitos T o promotor de osteocalcina.

El "promotor específico de acontecimiento" se refiere a promotor/potenciador transcripcional o elementos definitorios de locus, u otros elementos que controlan la expresión génica como se ha analizado anteriormente, cuya actividad transcripcional se altera tras su respuesta a estímulos celulares. Los ejemplos representativos de tales promotores específicos de acontecimientos incluyen promotores de timidina quinasa o timidilato sintasa, promotores de interferón α o β y promotores que responden a la presencia de hormonas (naturales, sintéticas o de otros organismos no huésped, por ejemplo, hormonas de insectos). La expresión "proteína de fusión" o "polipéptido de fusión" se refiere a proteínas o polipéptidos que pueden obtenerse por la expresión recombinante de más de una secuencia codificante heteróloga en un vector o conexión contigua de modo que la expresión del polipéptido en el vector dé como resultado la expresión de un polipéptido que incluya más de una proteína o parte de más de una proteína. De forma más óptima, la proteína de fusión conserva la actividad biológica de al menos una de las unidades polipeptídicas a partir de la que construye. Preferentemente, la proteína de fusión genera una bioactividad mejorada sinérgica combinando la parte de las proteínas separadas para formar un polipéptido único. La proteína de fusión producida también puede crearse con un polipéptido que tenga función y un péptido o polipéptido que no tenga función cuando se exprese, pero que cumpla un propósito para la expresión del polipéptido con actividad. Los ejemplos de proteínas de fusión útiles para la invención incluyen cualquier polipéptido de fusión de muteína de galectina 9 modificada obtenido por ingeniería genética para conseguir alguna ventaja para la terapia, detección o ensayo, y análisis adicional o aislamiento/purificación.

La expresión "quimera" o "proteína químérica" significa un equivalente a proteína de fusión o polipéptido de fusión. La "molécula químérica" puede ser un polipéptido de fusión, o una molécula de fusión polinucleotídica que codifique un polipéptido de fusión. La quimera puede construirse a partir de secuencias codificantes de ADN ligado y expresarse en un sistema celular, o administrarse en un vector para expresión *in vivo* en un animal. Por ejemplo, una quimera o proteína de fusión que incluya una muteína de galectina 9 modificada puede administrarse en un protocolo de terapia genética *in vivo* o *ex vivo*.

El "paciente" puede ser cualquier organismo vivo o tratable, incluyendo pero sin limitación un eucariota o procariota. El paciente eucariota puede ser, por ejemplo, un vertebrado o un invertebrado. Por lo tanto, por ejemplo, el paciente puede ser un pez, un ave, un gusano, un insecto, un mamífero, un reptil, un anfibio, un hongo o una planta, preferentemente un mamífero. El mamífero puede ser, por ejemplo, un ser humano.

Se describen posteriormente procedimientos generales para realizar y usar agentes terapéuticos y/o agentes de diagnóstico de muteína de galectina 9 modificada. En un aspecto, la presente invención proporciona una técnica para tratar un trastorno, enfermedad o afección anómala producida debido a la deficiencia o ausencia de actividad fisiológica o biológica conservada por galectina 9. Dicha técnica de tratamiento incluye por ejemplo, una etapa de proporcionar un agente terapéutico de muteína de galectina 9 y/o una etapa de administrar una cantidad eficaz del agente terapéutico de muteína de galectina 9 modificada a un mamífero que padece dicho trastorno. Las muteínas de galectina 9 modificadas son citotóxicas en células tumorales malignas, activas en inducción de apoptosis en células malignas, antitumorales (anticancerosas o antineoplásicas) en células tumorales malignas, activas en inducción de apoptosis en linfocitos T activados (entre otros, linfocitos T positivos para CD4), inmunomoduladoras (inmunorreguladoras), antiinflamatorias y antialérgicas. Por lo tanto, pueden esperarse que las muteínas de galectina 9 modificada actúen como agentes antitumorales (agentes antineoplásicos), agentes antialérgicos, inmunorreguladores (inmunomoduladores), agentes terapéuticos para enfermedades autoinmunes, agentes antiinflamatorios y alternativas a hormonas esteroideas adrenocorticales. Dicha técnica de tratamiento incluye un procedimiento para tratar una enfermedad autoinmune que manifiesta linfocitos T activos. La "enfermedad autoinmune", "autoinmune" y "autoinmunidad" se refieren todas a un trastorno caracterizado por autoinmunidad en el mamífero que es la respuesta de un sistema inmunitario contra componentes propios. Una respuesta autoinmune puede convertirse en una afección que manifieste síntomas clínicos. Aunque estrictamente hablando el rechazo de trasplante no es una reacción autoinmune, cuando la afección del paciente requiere cirugía para reemplazar o injertar células, tejido o un órgano, el cuerpo que recibe el aloinjerto puede reaccionar inmunológicamente contra el injerto ajeno. Se produce "rechazo de trasplante" cuando durante un aloinjerto de células, tejido o un órgano de un miembro de una especie a otro, se da como resultado una respuesta inmune en el receptor, suficiente para rechazar las células, tejido u órgano transplantados.

Los procedimientos y agentes terapéuticos de la invención (fármacos) pueden aplicarse a "tumores". Los ejemplos de tales tumores pueden incluir tumores malignos. Por ejemplo, un tumor que puede metastatizar a varios sitios es

una neoplasia maligna, y se puede hacer referencia a la expresión "neoplasia maligna" como epitelial o no epitelial y puede distinguirse como cáncer, sarcoma o leucemia. Entre el público en general, cuando la neoplasia o tumor se llama simplemente "cáncer" se refiere a una neoplasia maligna o tumor. Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" se emplea en el sentido más amplio y no debería interpretarse como solamente una neoplasia maligna epitelial. El término "cáncer" usado en el presente documento puede abarcar tumores malignos epiteliales y tumores malignos no epiteliales (incluyendo los que son tumorigénicos y no tumorigénicos) tales como cánceres cutáneos (que pueden incluir melanomas), cánceres de mama, cánceres de ovario, cánceres uterinos, tumores testiculares malignos, cánceres prostáticos, cánceres de vejiga urinaria, cánceres renales, cánceres de tiroides, cánceres faríngeos/laringeos, cánceres de lengua, cánceres maxilares, cánceres esofágicos, cánceres de estómago, cánceres de colon/rectales, cánceres de pulmón/bronquiales, cánceres de hígado (incluyendo cánceres de células hepáticas y cánceres del conducto biliar intrahepático), cánceres de la vesícula biliar/ducto biliar extrahepático, cánceres pancreáticos, leucemia, linfoma maligno, plasmacitoma, osteosarcoma, condrosarcoma, leiomirosarcoma, rabdomiosarcoma, liposarcoma, fibrosarcoma, hemangioma maligno, hemangioendotelioma maligno, tumores cerebrales (incluyendo meningioma, glioma, astrocitoma), pero no se restringe a estos. Debería entenderse que pueden abarcar aquellos en los que la aplicación de la variante de Gal-9 modificada de la invención proporcionaría perspectivas positivas, y además en los que tendrá lugar algún tipo de respuesta fisiológica o biológica en asociación con dicha variante de Gal-9 modificada.

Los ejemplos de "enfermedades autoinmunes" que pueden tratarse por el procedimiento y agente terapéutico de la invención incluyen esclerosis múltiple, tiroiditis de Hashimoto, lupus eritematoso sistémico (SLE), síndrome de Goodpasture, pénfigo, autoinmunidad del receptor, anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica autoinmune, osteoartritis, artritis reumatoide crónica, esclerodermia con anticuerpos anticolágeno, enfermedad del tejido conectivo mixta, poliomiositis, anemia perniciosa, enfermedad de Addison idiopática, infertilidad espontánea, glomerulonefritis, penfigoide ampolloso, resistencia a fármacos adrenérgicos, hepatitis activa crónica, cirrosis biliar primaria, insuficiencia de glándulas endocrinas basada en autoinmunidad, vitílico, vasculitis, infarto posmiocardio, síndrome de cardiotomía, urticaria, dermatitis atópica, asma basada en autoinmunidad, reacciones inflamatorias basadas en autoinmunidad, trastornos granulomatosos, espondilitis alquilante, glomerulonefritis post-estreptocócica, anemia hemolítica autoinmune, encefalitis, reacción autoinmune secundaria a linfoma, trastornos degenerativos y trastornos atróficos. Las enfermedades autoinmunes que manifiestan autoinmunidad del receptor incluyen, por ejemplo, enfermedad de Graves, miastenia grave y resistencia a insulina. Las enfermedades autoinmunes de resistencia a fármacos adrenérgicos incluyen, por ejemplo, asma y fibrosis quística.

Otras enfermedades autoinmunes apropiadas para la invención incluyen, por ejemplo para las que existe un modelo animal, incluyendo por ejemplo, síndrome de Sjögren (dacroadenitis autoinmune o sialadenitis mediada por inmunidad), miocarditis autoinmune, cirrosis biliar primaria (PBC), enfermedad cardiaca inflamatoria, autoinmunidad renal inducida por mercurio, diabetes mellitus insulinodependiente (diabetes de tipo I o IDD), autoinmunidad pos-timectomía, un trastorno de desmielinización del sistema nervioso central (SNC), lupus del SNC, narcolepsia, un trastorno del SNP mediado por inmunidad, osteoartritis, artritis reumatoide, uveítis, fibrosis quística medular, enfermedad hemolítica inmune, vasculitis autoinmune, enfermedad ovárica autoinmune y esclerodermia humana. Una enfermedad autoinmune caracterizada por un trastorno de desmielinización del sistema nervioso central (SNC) puede ser, por ejemplo, esclerosis múltiple (EM). Una enfermedad autoinmune del sistema nervioso periférico (SNP) puede ser, por ejemplo, síndrome de Guillain-Barre (GBS).

El agente terapéutico de mutéína de galectina 9 modificada puede incluir un polipéptido, un polinucleótido, un compuesto orgánico pequeño, un péptido, un compuesto peptoide, una sustancia peptídica, u otros. El agente terapéutico de mutéína de galectina 9 modificada puede ser un polipéptido de mutéína de galectina 9 modificada, un polinucleótido que codifique un polipéptido de mutéína de galectina 9 modificada, un polipéptido de fusión que comprende una parte del polipéptido de mutéína de galectina 9 modificada de la invención, un polinucleótido que codifique un polipéptido de fusión que comprenda una parte de dicho polipéptido de mutéína de galectina 9 modificada, un péptido biológicamente activo derivado de polipéptido de mutéína de galectina 9 modificada, un compuesto peptoide biológicamente activo o sustancia peptídica derivada de polipéptido de mutéína de galectina 9 modificada, o un mimético de mutéína de galectina 9 modificada orgánico pequeño (incluyendo un agonista) de la actividad de mutéína de galectina 9 modificada. El polipéptido de mutéína de galectina 9 modificada puede ser un polipéptido de mutéína de galectina 9 modificada biológicamente activo, tal como una variante polipeptídica de mutéína de galectina 9 modificada, un derivado polipeptídico de mutéína de galectina 9 modificada, un polipéptido mutante derivado del polipéptido de mutéína de galectina 9 modificada o un polipéptido de mutéína de galectina 9 modificada truncado. El polinucleótido que codifica un polipéptido de mutéína de galectina 9 modificada puede ser una secuencia polinucleotídica que codifique polipéptido de mutéína de galectina 9 modificada tanto con CRD N-terminal de longitud completa como con CRD C-terminal de longitud completa de galectina 9 natural, una secuencia que codifique una parte biológicamente activa de polipéptido de mutéína de galectina 9 modificada, una secuencia que codifique un péptido biológicamente activo derivado de polipéptido de mutéína de galectina 9 modificada, una secuencia que codifique un polipéptido de mutéína de galectina 9 modificada soluble. Otra realización de la invención es una composición que tiene un vehículo de suministro génico capaz de expresar una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido de mutéína de galectina 9 modificada.

En la presente invención, la utilización de "técnicas de recombinación génica" permiten no solamente la construcción, adquisición, aislamiento y secuenciación de moléculas de ácido nucleico diana (polinucleótidos),

proteínas (péptidos y fragmentos de los mismos), sino también creación y producción de construcciones recombinantes de los mismos. Las técnicas de recombinación génica (incluyendo técnicas de ADN recombinante) como pueden usarse en el presente documento incluyen las conocidas en este campo, y pueden llevarse a cabo por los procedimientos descritos en, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2^a edición)", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989); D. M. Glover y col. ed., "DNA Cloning", 2^a ed., Vol. 1 a 4, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995); The Japanese Biochemical Society (JBS) ed., "Zoku-Seikagaku Jikken Koza 1, Idenshi Kenkyu-Hou II", Tokyo Kagaku Dozin Co. Ltd., Japón, (1986); JBS ed., "Shin-Seikagaku Jikken Koza 2, Kakusan III (Recombinant DNA technique)", Tokyo Kagaku Dozin Co. Ltd., Japón, (1992); M. J. Gait (Ed), Oligonucleotide Synthesis, IRL Press (1984); B. D. Hames y S. J. Higgins (Ed), Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press Ltd., Oxford, Reino Unido (1985); B. D. Hames y S. J. Higgins (Ed), Transcription and Translation: A Practical Approach (Practical Approach Series), IRL Press Ltd., Oxford, Reino Unido (1984); B. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (2^a Edición), John Wiley & Sons, Nueva York (1988); J. H. Miller y M. P. Calos (Ed), Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York (1987); R. J. Mayer y J. H. Walker (Ed), Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology, Academic Press, (1987); R. K. Scopes y col. (Ed), Protein Purification: Principles and Practice (2^a Edición, 1987 y 3^a Edición, 1993), Springer-Verlag, N.Y.; D. M. Weir y C. C. Blackwell (Ed), Handbook of Experimental Immunology, Vol. 1, 2, 3 y 4, Blackwell Scientific Publications, Oxford, (1986); L. A. Herzenberg y col. (Ed), Weir's Handbook of Experimental Immunology, Vol. 1, 2, 3 y 4, Blackwell Science Ltd. (1997); R. W. Ellis (Ed), Vaccines new approaches to immunological problems, Butterworth-Heinemann, Londres (1992); R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 68 (Recombinant DNA), Academic Press, Nueva York (1980); R. Wu y col. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100 (Recombinant DNA, Part B) y 101 (Recombinant DNA, Part C), Academic Press, Nueva York (1983); R. Wu y col. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 153 (Recombinant DNA, Part D), 154 (Recombinant DNA, Part E) y 155 (Recombinant DNA, Part F), Academic Press, Nueva York (1987); J. H. Miller ed., "Methods in Enzymology", Vol. 204, Academic Press, Nueva York (1991); R. Wu y col. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 218, Academic Press, Nueva York (1993); S. Weissman (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 303, Academic Press, Nueva York (1999); J. C. Glorioso y col. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 306, Academic Press, Nueva York (1999), o por procedimientos descritos en las referencias citadas en los mismos o procedimientos sustancialmente equivalentes a los mismos o procedimientos modificados de los mismos, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia (en lo sucesivo en el presente documento, todas dichas técnicas o procedimientos se denominarán "técnicas de recombinación génica").

Como se usa en el presente documento, el término "homología" u "homólogo" significa la cantidad (o número), con respecto a identidad, que puede obtenerse determinando que los restos de aminoácidos correspondientes o bases de nucleótidos correspondientes coinciden entre sí entre las dos cadenas en secuencias polipeptídicas (o secuencias de aminoácidos) o secuencias polinucleotídicas (o secuencias de nucleótidos) cuando se comparan restos de aminoácidos o bases de nucleótidos que constituyen la cadena entre sí entre las dos cadenas y también significa el nivel de correlación de secuencia con respecto a similitud entre dos secuencias polipeptídicas o dos secuencias polinucleotídicas. La homología puede calcularse fácilmente. Se conocen diversos procedimientos para medir la homología entre dos secuencias polinucleotídicas o secuencias polipeptídicas y el término "homología" (en ocasiones llamado "identidad") se conoce bien por los expertos en la material (por ejemplo, Lesk, A. M. (Ed.), Computational Molecular Biology, Oxford University Press, Nueva York, (1988); Smith, D. W. (Ed.), Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Academic Press, Nueva York, (1993); Griffin, A. M. y Griffin, H. G. (Ed.), Computer Analysis of Sequence Data: Part I, Human Press, Nueva Jersey, (1994); von Heinje, G., Sequence Analysis in Molecular Biology, Academic Press, Nueva York, (1987); Gribskov, M. y Devereux, J. (Ed.), Sequence Analysis Primer, M-Stockton Press, Nueva York, (1991)). Las técnicas genéricas para determinar la homología entre dos cadenas incluyen las desveladas en Martin, J. Bishop (Ed.), Guide to Huge Computers, Academic Press, San Diego, (1994); Carillo, H. y Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988). Los procedimientos preferidos para medir la homología incluyen los que se diseñan para obtener la parte de la mayor relación de ajuste entre las dos secuencias ensayadas. Un ejemplo de tales procedimientos es una técnica que se construye como un programa informático. Los procedimientos de programación informática preferidos incluyen un paquete de programas GCG (Devereux, J. y col., Nucleic Acids Research, 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA, (Atschul, S. F. y col., J. Mol. Biol., 215: 403 (1990)), pero sin limitación. Para tales procedimientos, se pueden emplear los conocidos en la técnica.

La expresión "reacción en cadena de polimerasa" o "PCR" usada en el presente documento se refiere habitualmente a técnicas descritas en la Patente de Estados Unidos 4.683.195 y otros documentos. Por ejemplo, la PCR es un procedimiento *in vitro* para la amplificación enzimática de secuencias de nucleótidos específicas deseadas. En general, la PCR incluye series repetitivas de ciclos en los que se construye una síntesis de elongación de cebadores usados dos cebadores oligonucleotídicos capaces de hibridar preferentemente con un ácido nucleico molde. Típicamente, los cebadores usados en PCR pueden incluir los que son complementarios de la secuencia de nucleótidos interna de interés en el molde. Por ejemplo, los pares de cebadores preferibles como se usan en el presente documento pueden ser los que son complementarios de ambos extremos de dicha secuencia de nucleótidos para amplificar, o regiones flanqueantes adyacentes a dichas secuencias de nucleótidos. Es preferible seleccionar un cebador terminal 5' de modo que esté contenido un codón de inicio o pueda realizarse la amplificación incluyendo el codón de inicio, y seleccionar un cebador 3' terminal de modo que esté contenido al menos un codón de parada o puede realizarse la amplificación incluyendo el codón de parada. Los cebadores incluyen oligonucleótidos compuestos preferentemente de 5 o más bases de nucleótidos, más preferentemente 10 o

más bases de nucleótidos, y aun preferentemente 18 a 25 bases de nucleótidos.

Las reacciones de PCR pueden llevarse a cabo por procedimientos conocidos en la técnica o procedimientos sustancialmente equivalentes a los mismos y procedimientos modificados de los mismos. Por ejemplo, la PCR puede realizarse de acuerdo con procedimientos descritos en R. Saiki, y col., *Science*, 230: 1350, 1985; R. Saiki, y col., *Science*, 239: 487, 1988 ; H. A. Erlich ed., *PCR Technology*, Stockton Press, 1989; D. M. Glover y col. ed., "DNA Cloning", 2^a ed., Vol. 1, (*The Practical Approach Series*), IRL Press, Oxford University Press (1995); M. A. Innis y col. ed., "PCR Protocols: a guide to methods and applications", Academic Press, Nueva York (1990)); M. J. MPherson, P. Quirke y G. R. Taylor (Ed.), *PCR: a practical approach*, IRL Press, Oxford (1991); M. A. Frohman y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 8998-9002 (1988) y otros documentos, y procedimientos modificados o variantes de los mismos. Los procedimientos de PCR también pueden realizarse usando kits disponibles en el mercado adecuados para ello, y también pueden llevarse a cabo de acuerdo con protocolos desvelados por fabricantes o distribuidores de los kits.

En un caso representativo, la PCR se realiza, por ejemplo, usando un molde (por ejemplo, ADN sintetizado usando ARNm como un molde; ADN de 1^a cadena) y cebadores sintetizados de acuerdo con diseños en dicho gen, en mezcla con un tampón de reacción 10 (contenido en un kit de Taq ADN polimerasa), dNTP (desoxirribonucleósido trifosfatos; mezcla de dATP, dGTP, dCTP y dTTP), Taq ADN polimerasa y agua destilada desionizada. La mezcla se somete a 25 a 60 ciclos de amplificación usando un termociclador automático tal como sistema de PCR Geneamp® 2400 (Perkin-Elmer/Cetus) en condiciones de ciclos de PCR generales. El número de ciclos de amplificación puede ajustarse de forma adecuada a un valor apropiado dependiendo de los fines. El ciclo de PCR incluye, por ejemplo, desnaturización de 90 a 95 °C durante 5 a 100 s, hibridación de 40 a 60 °C durante 5 a 150 s y extensión de 65 a 75 °C durante 30 a 300 s, y preferentemente desnaturización a 94 °C durante 15 s, hibridación a 58 °C durante 15 s y extensión a 72 °C durante 45 s. Para la temperatura de hibridación y tiempo de reacción, se selecciona de forma adecuada un valor apropiado por experimentación. Para el tiempo de desnaturización y extensión, un valor apropiado varía de forma adecuada de acuerdo con la longitud de cadena de los productos de PCR esperados. En general, el tiempo de reacción de hibridación preferentemente varía dependiendo del valor de Tm de los híbridos de ADN molde-cebador. El periodo de tiempo de extensión se establece habitualmente con el objetivo de conseguir aproximadamente 1 min por cada 1000 pb de longitud de cadena, pero es posible seleccionar un periodo de tiempo más corto en algunos casos.

El término "oligonucleótido" u "oligonucleótidos" usado en el presente documento se refiere a un polinucleótido monocatenario relativamente corto o polinucleótidos bicatenarios, o preferentemente polidesoxinucleótido o polidesoxinucleótidos. Pueden sintetizarse químicamente por procedimientos conocidos como se describe en *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, Vol. 28, pág. 716-734 (1989), incluyendo procedimientos de fosfotriéster, fosfodiéster, fosfita, fosforamidita y fosfonato.

Se conoce típicamente que la síntesis puede llevarse a cabo convenientemente en soportes sólidos modificados. Por ejemplo, la síntesis puede llevarse a cabo usando un sintetizador automático y dicho sintetizador está disponible en el mercado. El oligonucleótido puede contener una o más bases de nucleótidos modificadas. Por ejemplo, puede contener una base de nucleótido que no aparezca de forma natural, tal como inosina, o una base de nucleótido tritilada. En algunos casos, pueden contener una o más bases de nucleótidos marcadas con un marcador.

Las moléculas de ácido nucleico diana (polinucleótidos) pueden identificarse por adaptaciones de técnicas de hibridación. La hibridación puede llevarse a cabo de acuerdo con procedimientos como se describen en documentos que desvelan las "técnicas de recombinación génica" anteriormente mencionadas, o procedimientos sustancialmente equivalentes y modificaciones de los mismos. Por ejemplo, la hibridación se consigue transfiriendo una muestra que contiene un ácido nucleico tal como ADN a un vehículo que incluye una membrana tal como un filtro de nailon, según se requiera, seguido opcionalmente de desnaturización, fijación y lavado, y haciendo reaccionar después las transferencias en el vehículo (por ejemplo, membrana), con fragmentos de sonda de ADN marcados que, según se requiera, se desnaturizan opcionalmente en un tampón de hibridación.

Las operaciones de hibridación pueden realizarse habitualmente de aproximadamente 35 a aproximadamente 80 °C, más preferentemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 65 °C, durante aproximadamente 15 a aproximadamente 36 horas, más preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 24 horas, pero pueden seleccionarse de forma adecuada condiciones de hibridación óptimas. Por ejemplo, la hibridación se lleva a cabo a aproximadamente 55 °C durante aproximadamente 18 horas. Los tampones de hibridación pueden seleccionarse de los usados habitualmente en la técnica. Es un ejemplo de los tampones de hibridación el tampón de hibridación Rápida (Amersham). La desnaturización de los vehículos (por ejemplo, membranas) con transferencias incluyen técnicas que usan una solución de desnaturización alcalina. Es preferible tratar el vehículo con una solución neutralizadora y una solución de tampón después de la desnaturización. La fijación del vehículo (por ejemplo, fijación de membrana) se consiguió habitualmente cociendo de aproximadamente 40 a aproximadamente 100 °C, más preferentemente de aproximadamente 70 a aproximadamente 90 °C, durante aproximadamente 15 min a aproximadamente 24 horas, más preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 horas, pero las condiciones de fijación deseadas pueden seleccionarse de forma adecuada. Por ejemplo, la fijación se llevó a cabo cociendo a aproximadamente 80 °C durante aproximadamente 2 horas. El lavado de vehículos (por ejemplo, membranas) con transferencias puede realizarse lavando soluciones usadas

habitualmente en la técnica, tal como tampón de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, que contiene NaCl 1 M, EDTA 1 mM y dodecil sulfato sódico 0,1% (SDS). Los vehículos que incluyen membranas pueden seleccionarse de los usados habitualmente en la técnica. Los ejemplos de tales vehículos incluyen filtros de nailon.

- 5 La solución de desnaturalización alcalina, solución de neutralización y solución de tampón pueden seleccionarse de las usadas convencionalmente en la técnica. La solución de desnaturalización alcalina puede incluir, por ejemplo, soluciones que contienen NaOH 0,5 M y NaCl 1,5 M. La solución de neutralización puede incluir, por ejemplo, tampones de Tris-HCl 0,5 M, pH 8,0, que contiene NaCl 1,5 M. La solución de tampón puede incluir, por ejemplo, 2 SSPE (NaCl 0,36 M, NaH₂PO₄ 20 mM y EDTA 2 mM). Según se requiera, antes de la hibridación, es deseable que los vehículos (por ejemplo, membranas) con transferencias se prehibriden opcionalmente para la prevención de hibridación no específica. Para la prehibridación, la muestra se sumerge, por ejemplo, en una solución para prehibridación [formamida 50%, solución de Denhardt 5 (albúmina de suero bovino 0,2% y polivinilpirrolidona 0,2%), 5 SSPE, SDS 0,1% y ADN de esperma de salmón desnaturizado por calor 100 µg/ml] y se hace reaccionar de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 50 °C, preferentemente aproximadamente 42 °C, durante aproximadamente 4 a aproximadamente 24 horas, preferentemente de aproximadamente 6 a aproximadamente 8 horas. Estas condiciones pueden determinarse por los expertos en la materia con experimentos repetidos de forma adecuada y se seleccionarían condiciones más preferidas. Los fragmentos de ADN de sonda marcada usados en hibridación pueden desnaturizarse, por ejemplo, en condiciones de calentamiento de aproximadamente 70 a 100 °C, preferentemente aproximadamente 100 °C, durante aproximadamente 1 a 60 minutos, preferentemente aproximadamente 5 minutos. La hibridación se lleva a cabo por técnicas bien conocidas *por sí mismas* en este campo o de acuerdo con procedimientos análogos a las mismas. Como se usan en el presente documento, las condiciones rigurosas se refieren a, por ejemplo, las equivalentes a hibridación en aproximadamente 15 a 50 mM, preferentemente aproximadamente 19 a 140 mM, y más preferentemente de aproximadamente 19 a 20 mM, con respecto a concentración de iones de Na, a aproximadamente 35 a 85 °C, preferentemente de aproximadamente 50 a 70 °C y más preferentemente de aproximadamente 60 a 65 °C con respecto a temperatura.
- 10 25 Después de que se complete la hibridación, los vehículos (tales como filtros) se lavan exhaustivamente para retirar sondas marcadas distintas de los fragmentos de ADN de sonda marcada que hibridan específicamente. A continuación se realizan detecciones. El procedimiento de lavado de vehículo (filtro) puede realizarse por un método seleccionado de forma adecuada de técnicas usadas en este campo. Por ejemplo, el lavado se lleva a cabo en solución de SSC 0,5 (SSC = NaCl 0,15 M, ácido cítrico 15 mM) que contiene SDS 0,1%. Los ácidos nucleicos hibridados pueden detectarse de forma representativa por autorradiografía, pero la detección puede realizarse por un procedimiento seleccionado de forma adecuada de técnicas usadas en este campo. Una banda de ácido nucleico correspondiente a la señal detectada se suspende en una solución de tampón adecuada tal como solución de SM (tampón de Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, que contiene NaCl 100 mM y MgSO₄ 10 mM). Después de que la suspensión de ácido nucleico se diluya a un nivel adecuado, los ácidos nucleicos diana pueden aislarse y purificarse. Además, los ácidos nucleicos pueden someterse a amplificación.
- 15 30 35

La expresión "alta homología" como se usa en el presente documento puede referirse, aunque depende de la longitud de secuencia de las dianas, por ejemplo, a 50% o mayor, adicionalmente 60% o mayor, preferentemente 70% o mayor, más preferentemente 80% o mayor, en un caso particular 95% o mayor y más preferentemente 97% o mayor homología. La "secuencia de nucleótidos con la misma eficacia" o "secuencia de nucleótidos eficaz de forma equivalente" incluye, por ejemplo, las que hibridan con cualquiera de las que contienen la secuencia de interés en condiciones rigurosas. Son ejemplos de tales secuencias de nucleótidos las que no solamente hibridan con una secuencia de nucleótidos con 5 o más nucleótidos contiguos, preferentemente 10 o más nucleótidos contiguos, más preferentemente 15 o más nucleótidos contiguos, o más preferentemente 20 o más nucleótidos contiguos, seleccionados de dicha secuencia de nucleótidos, sino que también codifican una secuencia de aminoácidos sustancialmente equivalente a dicho polipéptido. Las moléculas de ácido nucleico también pueden sintetizarse químicamente. En tales casos, pueden sintetizarse químicamente fragmentos y acoplarse junto con enzimas.

- 40 45 50 55 60
- Los tratamientos de exploración pueden repetirse múltiples veces con técnicas de hibridación para moléculas de ácido nucleico diana a partir de muestras de ácido nucleico que incluyen genotecas génicas y genotecas de ADNc. Las genotecas de ADNc utilizables son derivadas de ser humano clonadas que incluyen, por ejemplo, genotecas de ADNc de diversos tejidos derivados de seres humanos, células humanas cultivadas o líneas celulares humanas (en particular, partes de cuerpos humanos, tejidos y células humanas tales como riñón, cerebro, glándula pineal, glándula hipófisis posterior, células nerviosas, retina, células de vasos sanguíneos retinales, células nerviosas retinales, timo, vaso sanguíneo, células endoteliales, células de músculo liso vascular, células sanguíneas, macrófagos, linfocitos, testículo, ovario, útero, intestino, corazón, hígado, páncreas, intestino delgado, intestino grueso (incluyendo colon y recto), células relacionadas con la encía, células relacionadas con la piel, células glomerulares, células tubulares renales, y células de tejido conectivo; diversos tejidos tumorales y células cancerosas; y otras fuentes). Además, la genoteca de ADNc usada como un molde puede seleccionarse directamente de genotecas de ADNc disponibles en el mercado derivadas de una diversidad de tejidos. Son ejemplos de las genotecas de ADNc disponibles en el mercado las que se distribuyen comercialmente o suministradas por Stratagene (Estados Unidos), Invitrogen (Estados Unidos), Clontech (Estados Unidos), y otros distribuidores. En realizaciones típicas, los productos utilizables incluyen genotecas génicas generadas a partir de tejidos y células humanos, tales como genotecas genómicas de cromosoma artificial P1 humano (Human Genome

Mapping Resource Center, Estados Unidos), y genotecas de ADNc tisular humano (por ejemplo, disponible de Clontech, Estados Unidos). La exploración con sondas puede realizarse usando genotecas de ADN genómico humano o genotecas de ADNc derivado de seres humanos construidas a partir de diversas líneas celulares de cultivo o tejidos humanos y otros recursos. La sonda puede marcarse, con un isótopo radioactivo, usando un kit de

5 marcaje disponible en el mercado, tal como el Kit de Marcaje de ADN de Cebador Aleatorio (Boehringer Mannheim). Por ejemplo, puede usarse un kit de cebador aleatorio (Pharmacia LKB, Uppsala) para marcar el ADN de sonda con [α -³²P] dCTP (Amersham), y proporcionar de este modo una sonda con radiactividad.

Las partículas de fago, plásmidos recombinantes y vectores recombinantes, que contienen las moléculas de ácido nucleico diana, pueden aislarse y purificarse por técnicas habituales usadas en este campo. Por ejemplo, se obtienen por ultracentrifugación con gradiente de glicerol (Molecular Cloning, a laboratory manual, ed. T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory, 2^a ed. 78, 1989), electroforesis y otras técnicas de aislamiento/purificación. Puede aislarse y purificarse ADN a partir de partículas de fago por un miembro seleccionado de técnicas habituales usadas en este campo. Por ejemplo, los fagos resultantes se suspenden en solución de TM (tampón de Tris-HCl 50 mM, pH 7,8, que contiene MgSO₄ 10 mM), y se tratan con DNasa I y RNasa A, seguido de adición de una solución de mezcla 10 de Proteinasa K (EDTA 20 mM, Proteinasa K 50 µg/ml y SDS 0,5%). La mezcla resultante se incuba a aproximadamente 65 °C durante 1 h, se somete a extracción con fenol y después a extracción con dietil éter, seguido de precipitación con etanol para formar sedimentos de ADN. A continuación, el ADN resultante se lava con etanol al 70%, se seca y se disuelve en solución de TE (tampón de Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, que contiene EDTA 10 mM). Puede obtenerse una gran cantidad de ADN diana por subclonación. Por ejemplo, la subclonación puede 15 realizarse con vectores plasmídicos, en *E. coli* huésped. El ADN subclonado de este modo también puede aislarse y purificarse por técnicas que incluyen extracción y precipitación con etanol, de la misma manera que se ha mencionado anteriormente.

20 Las moléculas de ácido nucleico resultantes (incluyendo ADN) tales como productos de PCR se someten típicamente en el presente documento a electroforesis en geles de agarosa 1 a 2%. Se cortan bandas específicas del gel, y se extrae ADN con un kit disponible en el mercado, por ejemplo, kit Gene clean (Bio 101). El ADN extraído 25 se escinde con enzimas de restricción apropiadas y se purifica si es necesario.

Además, el extremo 5', si es necesario, se fosforila con polinucleótido quinasa T4, y posteriormente el ADN se liga a 30 un vector plasmídico apropiado que incluye un sistema de vector pUC tal como pUC18, y se transforma en células competentes adecuadas. Los productos de PCR clonado se secuencian y se analizan. Son útiles para la clonación 35 de los productos de PCR vectores plasmídicos disponibles en el mercado tales como p-Direct (Clontech), pCR-Script® SK(+) (Stratagene), pGEM-T (Promega), y pAmp® (Gibco-BRL). Puede llevarse a cabo transformación (transfección) de células huésped por procedimientos conocidos en este campo tales como el procedimiento de calcio, el procedimiento de rubidio/calcio, el procedimiento de calcio/manganese, el procedimiento de alta eficacia de TFB, el procedimiento de células competentes congeladas FSB, el procedimiento de colonias rápidas, electroporación y un miembro seleccionado de procedimientos conocidos en la técnica y equivalentes sustanciales 40 de los mismos (D. Hanahan, J. Mol. Biol., 166: 557, 1983). Puede aplicarse PCR de transcripción inversa (reacción en cadena de la polimerasa acoplada con transcripción inversa; RT-PCR) y RACE (amplificación rápida de extremos de ADNc) para aislar el ADN diana. Puede llevarse a cabo RACE de acuerdo con los procedimientos, por ejemplo, descritos en M. A. Innis y col. ed., "PCR Protocols" (M. A. Frohman, "a guide to methods and applications"), pág. 28-38, Academic Press, Nueva York (1990).

Puede clonarse ADN de interés dependiendo de la necesidad. Los vectores adecuados para clonar ADN incluyen 45 plásmidos, fagos λ , cósmidos, fago P1, elemento F y YAC, y son preferentemente vectores derivados de fagos λ tales como Charon 4A, Charon 21A, λ gt10, λ gt11, λ DASHII, λ FIXII, λ EMBL3 y λ ZAPII® (Stratagene). El ADN resultante puede incorporarse en un vector apropiado tal como plásmido pEX, pMAMneo y pKG5 como se describe 50 en detalle posteriormente, y puede expresarse en células huésped apropiadas, por ejemplo, *E. coli*, levadura, células CHO y células COS como se describe en detalle posteriormente. Los fragmentos de ADN pueden introducirse en células animales como moléculas intactas o fragmentos de ADN con secuencia de control añadida apropiados o incorporarse después en un vector apropiado. De este modo, pueden producirse animales transgénicos que expresan el gen dado. Los animales incluyen animales mamíferos e incluyen, por ejemplo, ratones, ratas, conejos, cobayas y vacas. Preferentemente, el animal transgénico puede producirse introduciendo los fragmentos de ADN en huevos fertilizados de un animal tal como un ratón. Los productos génicos diana se verifican usando células animales adecuadas, tales como células 293T y células COS-1, transfectadas con dicho gen ajeno.

Los procedimientos para transferir genes ajenos a células animales de mamífero pueden ser los practicables 55 conocidos en este campo o técnicas sustancialmente similares a los mismos. El procedimiento puede incluir, por ejemplo, el procedimiento de fosfato cálcico (por ejemplo, F. L. Graham y col., Virology, 52: 456, 1973), el procedimiento de DEAE-dextrano (por ejemplo, D. Warden y col., J. Gen. Virol., 3: 371, 1968), electroporación (por ejemplo, E. Neumann y col., EMBO J, 1: 841, 1982), microinyección, el procedimiento de liposoma, infección por virus y el procedimiento de partícula de fago. Los productos génicos producidos en las células animales transfectadas con el gen dado de tales formas también pueden analizarse. Puede usarse cualquier plásmido en el 60 que se incorpore el gen diana y otros (ADN que puede obtenerse en la presente invención) siempre que dicho ADN pueda expresarse en células huésped convencionalmente usadas en técnicas de ingeniería genética (tales como

células huésped procariotas incluyendo *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* y células huésped eucariotas incluyendo células de levadura, células CHO, células COS y células huésped de insectos tales como Sf21. No es necesario decir que es posible usar las seleccionadas de los adjuntos y reactivos en kits disponibles en el mercado. En tales secuencias plasmídicas, es posible, por ejemplo, contener codones modificados adecuados para expresar el ADN clonado en células huésped seleccionadas o para construir sitios de enzimas de restricción. También es posible contener secuencias de control, secuencias potenciadoras y otras secuencias para facilitar la expresión del gen diana; engarces y adaptadores, útiles para ligar el gen diana; secuencias eficaces útiles para controlar la resistencia a antibióticos o para controlar metabolismo o en selección (incluyendo los que codifican proteínas híbridas y proteínas de fusión). Preferentemente, pueden usarse promotores adecuados. Por ejemplo, tales promotores pueden incluir promotor de triptófano (trp), promotor de lactosa (lac), promotor de triptófano-lactosa (tac), promotor de lipoproteína (lpp), promotor de P_L de fago λ , en el caso de plásmidos en los que los huéspedes son *E. coli*; promotor tardío de SV40, promotor LTR de MMTV, promotor LTR de RSV, promotor de CMV, promotor de SR α , en el caso de plásmidos en los que los huéspedes son células animales; y promotores GAL1, GAL10, en el caso de plásmidos en los que los huéspedes son células de levadura. También es posible usar sistemas de regulación tales como CYC1, HIS3, ADH1, PGK, PHO5 GAPDH, ADC1, TRP1, URA3, LEU2, EN0, TP1 y AOX1.

Puede insertarse un potenciador en el vector para facilitar la transcripción de ADN que codifique el polipéptido deseado. Tales potenciadores incluyen elementos de aproximadamente 10 a 100 pb, que actúan en el promotor para facilitar la transcripción y que tienen típicamente una acción en cis. Se conoce un gran número de potenciadores en genes de mamífero tales como genes de globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina. Son representantes preferentemente útiles de los potenciadores los obtenidos de virus infecciosos eucariotas, incluyendo, por ejemplo, un potenciador de SV40 (100-270 pb) localizado en la región tardía del origen de replicación, un potenciador de citomegalovirus para el promotor temprano, un potenciador de poliomielitis localizado en la región tardía del origen de replicación y un potenciador de adenovirus. Puede añadirse si es necesario una secuencia señal adecuada para el huésped. Tales secuencias señal que pueden usarse en el presente documento se conocen bien por los expertos en la materia. Los plásmidos para huéspedes de *E. coli* incluyen, por ejemplo, pBR322, pUC18, pUC19, pUC118, pUC119, pSP64, pSP65, pTZ-18R/-18U, pTZ-19R/-19U, pGEM-3, pGEM-4, pGEM-3Z, pGEM-4Z, pGEM-5Zf(-) y pBluescript KS® (empresa Stratagene 社). Los vectores plasmídicos adecuados para la expresión en *E. coli* también incluyen, por ejemplo, pAS, pKK223 (Pharmacia), pMC1403, pMC931, pKC30 y pRSET-B (Invitrogen). Los plásmidos para células huésped animales incluyen el vector de SV40, vector de poliomielitis viral, vector de virus vaccinia, vector retroviral. Son ejemplos de tales plásmidos pcD, pcD-SR α , CDM8, pCEV4, pME18S, pBC12BI y pSG5 (Stratagene). Los plásmidos para células huésped de levadura incluyen vectores de tipo YIp, YEp, YRp y YCp. Son ejemplos de tales plásmidos pGPD-2. Las células huésped de *E. coli* incluyen las derivadas de la cepa K12 de *E. coli* o la cepa B834 de *E. coli*. Son ejemplos de las células huésped de *E. coli* NM533, XL1-Blue, C600, DH1, DH5, DH11S, DH12S, DH5 α , DH10B, HB101, MC1061, JM109 y STBL2 para la cepa K12 de *E. coli* y BL21(DE3)/pLYsS, para la cepa B834 de *E. coli*. Pueden verse ejemplos de sistemas de expresión bacteriana en los siguientes documentos: Chang y col., Nature (1978) 275: 615; Goeddel y col., Nature (1979) 281: 544; Goeddel y col., Nucleic Acid Res., (1980) 8: 4057; documento EP 36.776, Patente de Estados Unidos Nº 4.551.433; deBoer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80: 21-25; Siebenlist y col., Cell (1980) 20: 269. Las células huésped de levadura incluyen, por ejemplo, células de *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Trichoderma reesiae* y las otras células de levadura. Pueden verse ejemplos de sistemas de expresión de levadura en los siguientes documentos: Hinnen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75: 1929; Ito y col., J. Bacteriol. (1983) 153: 163; Kurtz y col., Mol. Cell. Biol. (1986) 6: 142; Kunze y col., J. Basic Microbiol. (1985) 25: 141; Gleeson y col., J. Gen. Microbiol. (1986) 132: 3459; Roggenkamp y col., Mol. Gen. Genet. (1986) 202: 302; Das y col., J. Bacteriol. (1984) 158: 1165; De Louvencourt y col., J. Bacteriol. (1983) 154: 737; Van den Berg y col., Bio/Technology (1990) 8: 135; Kunze y col., J. Basic Microbiol. (1985) 25: 141; Cregg y col., Mol. Cell. Biol. (1985) 5: 3376; Patentes de Estados Unidos Nº 4.837.148 y 4.929.555; Beach y Nurse, Nature (1981) 300: 706; Davidow y col., Curr. Genet. (1985) 10: 380; Gaillardin y col., Curr. Genet. (1985) 10: 49; Ballance y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. (1983) 112: 284-289; Tilburn y col., Gene (1983) 26: 205-221; Yalton y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81: 1470-1474; Kelly y Hynes, EMBO J., (1985) 4: 475479; documento EP 244.234; documento WO 91/00357.

Las células huésped que son células animales incluyen, por ejemplo, células COS-7 derivadas de fibroblastos de cercopiteco verde, células COS-1, células CV-1, células 293 derivadas de células renales humanas, células A431 derivadas de células epidérmicas humanas, células 205 derivadas de células de colon humano, células COP derivadas de fibroblastos murinos, células MOP, células WOP, células CHO derivadas de células de hámster chino, células CHO DHFR-, células HeLa humanas, células C127 derivadas de células murinas, células NIH 3T3 derivadas de células murinas, células murinas L, células 9BHK, HL60, U937, HaK, Jurkat, otras líneas células transformadas, células diploides normales, líneas celulares inducidas de tejido cultivado primario *in vitro*. Pueden verse técnicas para expresar ADN exógeno en células huésped de mamífero en los siguientes documentos: Dijkema y col., EMBO J. (1985) 4: 761; Gorman y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982b) 79: 6777; Boshart y col., Cell (1985) 41: 521; Patente de Estados Unidos Nº 4.399.216; Ham y Wallace, Methods in Enzymology (1979) 58: 44; Barnes y Sato, Anal. Biochem. (1980) 102: 255; Patentes de Estados Unidos Nº 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; documento WO 90/103430; documento WO 87/00195; Patente de Estados Unidos Nº RE 30.985. Las células de insecto usadas incluyen *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), larva de gusano de seda o células cultivadas (por ejemplo, células

BMN), en combinación con vectores, virus de la polihedrosis nuclear del gusano de seda (*Bombyx mori*), los derivados de los mismos u otros adecuados (por ejemplo, Luckow y col., Bio/Technology, 6, 47-55 (1988); Setlow, J. K. y col. (eds.), Genetic Engineering, Vol. 8, pág. 277-279, Plenum Publishing, 1986; Maeda y col., Nature, 315, pág. 592-594 (1985)). Pueden verse procedimientos para expresar ADN exógeno en insectos en los siguientes documentos: Patente de Estados Unidos Nº 4.745.051; Friesen y col. (1986), "The Regulation of Baculovirus Gene Expression", The Molecular Biology of Baculoviruses (W. Doerfler (Ed)); documento EP 127.839; documento EP 155.476; Vlak y col., J. Gen. Virol., (1988) 69: 765-776; Miller y col., Ann. Rev. Microbiol. (1988) 42: 177; Carbonell y col., Gene (1988) 73: 409; Maeda y col., Nature, (1985) 315: 592-594; Lebacq-Verheyden y col., Mol. Cell. Biol. (1988) 8: 3129; Smith y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1985) 82: 8404; Miyajima y col., Gene (1987) 58: 273; Martin y col., DNA (1988) 7: 99. Se describen numerosas cepas de baculovirus y variantes y células huésped de insecto permisivas correspondientes de huéspedes en Luckow y col., Bio/Technology (1988) 6: 47-55; Miller y col., Genetic Engineering (Setlow, J. K. y col. (Ed)) Vol. 8 (Plenum Publishing, 1986) pág. 277-279; Maeda y col., Nature (1985) 315: 592-594.

Utilizando *Agrobacterium tumefaciens*, es posible usar células vegetales como las células huésped, que se conocen ampliamente junto con vectores adecuados para ellas en la técnica. En las técnicas de ingeniería genética de la presente invención, es posible usar enzimas de restricción, transcriptasas inversas conocidas y ampliamente usadas en este campo, enzimas modificadoras de ADN, DNasa, ADN polimerasas, nucleotidiltransferasas terminales, ADN ligasas para modificar o convertir ADN en una estructura adecuada para clonar el fragmento de ADN. Por ejemplo, las enzimas de restricción incluyen las descritas en, por ejemplo, R. J. Roberts, Nucleic Acids Res., 13: r165, 1985; S. Linn y col. ed. Nucleases, pág. 109, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, Nueva York, 1982; R. J. Roberts, D. Macelis, Nucleic Acids Res., 19: Supl. 2077, 1991.

De acuerdo con la presente invención, si es necesario, se usan marcadores de selección apropiados para seleccionar células huésped transformadas o transfectadas con el vector de expresión que contiene el polinucleótido que codifica el polipéptido (proteína) diana. La clonación puede repetirse para obtener clones de células estables con altos niveles de expresión. Por ejemplo, cuando se utiliza un gen dhfr como un marcador de selección en las células huésped animales transformadas o transfectadas (transformantes o transfectantes), pueden obtenerse clones celulares con niveles de expresión mayores cultivando con un aumento gradual de la concentración de metotrexato (MTX) para amplificar el ADN codificante del polipéptido diana y seleccionar células resistentes. Los transformantes o transfectantes pueden cultivarse, en condiciones en las que pueden expresarse las moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido diana, para producir y acumular productos diana. Los transformantes (transfectantes) pueden cultivarse en un miembro seleccionado de medios convencionalmente usados en la técnica. Por ejemplo, el transformante (transfectante) en el que el huésped es una célula procariota tal como *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, levadura o similares puede cultivarse de forma adecuada en un medio de cultivo líquido. El medio de cultivo puede contener fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y minerales, necesarios para cultivar el transformante. La fuente de carbono puede incluir glucosa, dextrina, almidón soluble, sacarosa. La fuente de nitrógeno puede incluir sustancias orgánicas o inorgánicas tales como sales de amonio, nitratos, agua de macerado de maíz, peptona, caseína, extractos de carne, extractos de malta, tortas de judía, extractos de patata. Los ejemplos de los minerales pueden incluir cloruro cálcico, dihidrógeno fosfato sódico, cloruro magnésico, carbonato cálcico. También puede complementarse con extractos de levadura, vitaminas, casamino ácidos, factores promotores del crecimiento. Dependiendo de la necesidad, el medio puede complementarse con fármacos tales como ácido 3β-indolil acrílico para mejorar la eficacia del promotor. Es deseable que el pH para medio de cultivo sea de aproximadamente 5 a aproximadamente 8.

En el caso de los huéspedes de *Escherichia* por ejemplo, el cultivo se lleva a cabo habitualmente a aproximadamente 15 a 45 °C durante aproximadamente 3 a 75 horas. Según se requiera, puede aplicarse aireación y agitación. En el caso de los transformantes en los que los huéspedes son células animales, el medio de cultivo usado puede incluir medio MEM, medio RPMI 1640 y medio DMEM, que contienen, por ejemplo, suero de ternero fetal a aproximadamente 5 al 20%. Es preferible que el pH sea de aproximadamente 6 a aproximadamente 8. El cultivo se lleva a cabo habitualmente de aproximadamente 30 a 40 °C durante aproximadamente 15 a 72 horas. Según se requiera, puede aplicarse opcionalmente aireación y agitación. Aunque pueden usarse transformantes que expresan el producto génico diana sin ningún aislamiento/purificación, estos pueden utilizarse en forma de homogeneizados celulares. Los productos génicos diana pueden aislarse para su uso. Para extraer los productos de los microorganismos o células cultivados, los microorganismos o células se recogen por procedimientos conocidos después del cultivo, a continuación se suspenden en una solución de tampón adecuada, se rompen por sonicación, digestión con lisozimas y/o congelación-descongelación, y otros tratamientos, seguido de centrifugación o filtración. Por lo tanto, se obtienen extractos en bruto. Pueden aplicarse otros procedimientos de extracción o aislamiento convencionales. La solución de tampón puede contener un agente desnaturalizante de proteínas tal como urea o clorhidrato de guanidina o un detergente tal como Triton X-100 (nombre comercial) y Tween-80 (nombre comercial). En el caso en el que los productos diana se secretan al medio de cultivo, se separan sobrenadantes de los microorganismos o células con procedimientos ampliamente conocidos después de que se termine el cultivo y se recogen los sobrenadantes resultantes.

Los sobrenadantes de cultivo obtenidos de este modo y productos diana contenidos en extractos pueden purificarse por combinaciones adecuadas de técnicas para separación, aislamiento y purificación ampliamente conocidas por sí

mismas. Tales técnicas ampliamente conocidas son, por ejemplo, precipitación de proteínas por adición de sal, tal como precipitación con sulfato de amonio; filtración en gel en Sephadex®; cromatografía de intercambio iónico usando vehículos que tienen, por ejemplo, un grupo de dietilaminoetilo o carboximetilo; cromatografía hidrófoba usando vehículos que tienen, por ejemplo, un grupo hidrófobo tal como butilo, octilo o fenilo; cromatografía en gel ligado a colorante (o ligado a cromóforo); electroforesis, diáisisis; ultrafiltración; cromatografía de afinidad; cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Preferentemente, los productos diana pueden aislar, separarse y purificarse por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), cromatografía de afinidad en la que se inmovilizan ligandos. Dicho ligando puede comprender anticuerpos que incluyen anticuerpos monoclonales, o fragmentos de los mismos, capaces de reconocer dianas específicas, lectinas, sacáridos y un miembro de un par de unión. Los ejemplos de tales técnicas también incluyen cromatografía de inmunoafinidad, cromatografía de afinidad de gelatina-agarosa, cromatografía de heparina-agarosa.

En los polipéptidos (proteínas) de la presente invención, los restos de aminoácidos contenidos en los mismos pueden modificarse por técnicas químicas. Además, se pueden modificar y degradar parcialmente para realizar derivados de los mismos usando enzimas tales como peptidasa, por ejemplo, pepsina, quimiotripsina, papaína, bromelaína, endopeptidasa, exopeptidasa. En los polipéptidos de la presente invención, el extremo C-terminal es típicamente un grupo carboxilo (-COOH) o un carboxilato (-COO-), pero el extremo C-terminal puede ser una forma de amida (-CONH₂) o una forma de éster (-COOR). Para dicho éster, R incluye grupos alquilo de C₁ a C₆ tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo y n-butilo, grupos cicloalquilo C₃ a C₈ tales como ciclopentilo y ciclohexilo, grupos arilo C₆ a C₁₂ tales como fenilo y α-naftilo, grupos alquilo fenil-C₁ a C₂ tales como bencilo y fenetilo, grupos aralquilo C₇ a C₁₄ incluyendo grupos alquilo α-naftilo-C₁ a C₂ tales como α-naftilmetilo, así como un grupo pivaloiloximetilo ampliamente usado como un éster oral. Cuando las proteínas de la presente invención tienen un grupo carboxilo (o carboxilato) en un sitio distinto del extremo C terminal, se incluyen grupos carboxilo amidados o esterificados en las proteínas de la presente invención. Como el éster en este caso, por ejemplo, se usa el éster C-terminal descrito anteriormente.

Los polipéptidos (proteínas) de la presente invención pueden ser los que tienen un resto de metionina N-terminal en las proteínas anteriores, e incluyen adicionalmente en los que un grupo amino del resto de metionina está protegido con un grupo protector (por ejemplo, grupos de acilo C₁ a C₆ incluyendo grupos alquilo-carbonilo C₁ a C₅ tales como formilo y acetilo), en los que el extremo N-terminal está escindido *in vivo* y el grupo de glutamilo resultante está piroglutamilado, en los que los sustituyentes (por ejemplo, grupos -OH, -COOH, amino, imidazol, indol, guanidino) en las cadenas laterales de los aminoácidos intramoleculares están protegidos con grupos protectores apropiados (por ejemplo, grupos acilo C₁ a C₆ tales como grupo formilo y acetilo) o proteínas conjugadas (tales como las llamadas glicoproteínas) en las que están unidas cadenas de sacáridos.

Además, basándose en las secuencias de nucleótidos génicas asociadas con la presente invención, pueden producirse polipéptidos equivalentes o derivados de los mismos en los que cada secuencia de aminoácidos de los polipéptidos diana está alterada con técnicas de ingeniería genética convencionales.

Tales alteraciones incluyen sustitución (reemplazo), delección, inserción, transferencia o adición de uno o más restos de aminoácidos. Por ejemplo, tales mutaciones, conversiones y modificaciones son las descritas en The Japanese Biochemical Society (JBS) ed., "Zoku-Seikagaku Jikken Koza 1, Idenshi Kenkyu-Hou II", pág. 105 (Susumu Hirose), Tokyo Kagaku Dozin Co. Ltd., Japón, (1986); JBS ed., "Shin-Seikagaku Jikken Koza 2, Kakusan III (Recombinant DNA technique)", pág. 233 (Susumu Hirose), Tokyo Kagaku Dozin Co. Ltd., Japón, (1992); R. Wu, L. Grossman, ed., "Methods in Enzymology", Vol. 154, pág. 350 y pág. 367, Academic Press, Nueva York (1987); R. Wu, L. Grossman, ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100, pág. 457 y pág. 468, Academic Press, Nueva York (1983); J. A. Wells y col., Gene, 34: 315, 1985; T. Grundstroem y col., Nucleic Acids Res., 13: 3305, 1985; J. Taylor y col., Nucleic Acids Res., 13: 8765, 1985; R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 155, pág. 568, Academic Press, Nueva York (1987); A. R. Oliphant y col., Gene, 44: 177, 1986. Por ejemplo, se incluyen procedimientos tales como la mutagénesis dirigida (mutagénesis específica de sitio) utilizando oligonucleótidos sintéticos u otros (Zoller y col., Nucl. Acids Res., 10: 6487, 1987; Carter y col., Nucl. Acids Res., 13: 4331, 1986), la mutagénesis de casete (Wells y col., Gene, 34: 315, 1985), mutagénesis de selección de restricción (Wells y col., Philos. Trans. R. Soc. London Ser A, 317: 415, 1986), la exploración de alanina (Cunningham y Wells, Science, 244: 1081-1085, 1989), mutagénesis por PCR, procedimiento de Kunkel, procedimiento de dNTP[αS] (Eckstein), la mutagénesis dirigida a región usando ácido sulfuroso y ácido nitroso y otras técnicas.

Los polipéptidos (proteínas) pueden expresarse como polipéptidos de fusión (proteínas de fusión) cuando se producen por técnicas de recombinación génica, y pueden convertirse o procesarse en los que tienen actividad biológica sustancialmente equivalente en comparación con los que aparecen de forma natural *in vivo* o *in vitro*. Puede aplicarse sistema de expresión de polipéptido de fusión habitualmente usado en la ingeniería genética. Tales polipéptidos de fusión pueden purificarse por una cromatografía de afinidad, aprovechando sus restos de fusión. Tales polipéptidos de fusión incluyen los fusionados con un marcador de histidina, o los fusionados con la secuencia de aminoácidos de β-galactosidasa (β-gal), proteína de unión a maltosa (MBP), glutatión S-transferasa (GST), tiorredoxina (TRX) o Cre Recombinasa. De forma similar, el polipéptido puede añadirse con un marcador de epítopo heterogéneo, y puede aislarse/purificarse por una cromatografía de inmunoafinidad usando un anticuerpo que se une específicamente al epítopo. En realizaciones más adecuadas, los representantes incluyen marcadores de poli

histidina (poli-His) o polihistidina-glicina (poli-His-Gly) y marcadores epítópicos tales como AU5, c-Myc, CruzTag 09, CruzTag 22, CruzTag 41, Glu-Glu, HA, Ha.11, KT3, FLAG (marca registrada, Sigma-Aldrich), Omni-probe, S-probe, T7, Lex A, V5, VP16, GAL4 y VSV-G (Field y col., Molecular and Cellular Biology, 8: pág. 2159-2165 (1988); Evan y col., Molecular and Cellular Biology, 5: pág. 3610-3616 (1985); Paborsky y col., Protein Engineering, 3(6): pág. 547-553 (1990); Hopp y col., BioTechnology, 6: pág. 1204-1210 (1988); Martin y col., Science, 255: pág. 192-194 (1992); Skinner y col., J. Biol. Chem., 266: pág. 15163-15166 (1991); Lutz-Freyermuth y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: pág. 6393-6397 (1990)). También pueden utilizarse sistemas de dos híbridos de levadura.

Además, los polipéptidos de fusión pueden ser los marcados con un marcador de modo que se vuelvan proteínas detectables. En más realizaciones adecuadas, los marcadores detectables pueden ser Marcador de Biotina-Avi que es un sistema de biotina/estreptavidina, y sustancias fluorescentes. Las sustancias fluorescentes incluyen proteínas verdes fluorescentes (GFP) derivadas de medusa luminiscente tal como *Aequorea victorea*, variantes modificadas de las mismas (variantes de GFP) tales como EGFP (GFP humanizada potenciada) y rsGFP (GFP desplazada al rojo), proteínas amarillas fluorescentes (YFP), proteínas verdes fluorescentes (GFP), proteínas cian fluorescentes (CFP), proteínas azules fluorescentes (BFP), GFP derivada de *Renilla reniformes* (Atsushi Miyawaki ed., Jikken Igaku (Medicina Experimental), Besatsu (supl.), Postgenome Jidai no Jikken Kouza 3 (GFP y Bioimaging), Yodosha Co., Ltd., 2000).

La detección puede llevarse a cabo usando anticuerpos (incluyendo anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos) que reconocen específicamente el marcador de fusión anterior. La expresión y purificación de tales polipéptidos de fusión puede realizarse usando kits disponibles en el mercado adecuados para estas técnicas, y también puede llevarse a cabo de acuerdo con protocolos como se instruyó por fabricantes o distribuidores de los kits. Las proteínas resultantes (que pueden incluir péptidos y polipéptidos) pueden acoplarse con fases sólidas o vehículos adecuados por técnicas que se sabe que en el inmunoensayo enzimático forman productos de fase sólida. Las proteínas de fase sólida y péptidos de fase sólida son convenientemente útiles en ensayos de unión y exploraciones con respecto a sustancias. Pueden realizarse modificaciones y alteraciones del polipéptido o estructuras proteicas en referencia, por ejemplo, a The Japanese Biochemical Society (JBS) ed., "Shin-Seikagaku Jikken Koza 1, Protein VII, Protein Engineering" Tokyo Kagaku Dozin Co. Ltd., Japón, 1993) usando los procedimientos descritos en dicho documento o los procedimientos descritos en las referencias citadas en dicho documento y, además, procedimientos sustancialmente equivalentes a los mismos. Su actividad biológica como se describe posteriormente en el presente documento puede incluir actividad inmunológica, por ejemplo, antigenicidad.

La modificación y alteración puede ser desaminación, hidroxilación, carboxilación, fosforilación, sulfatación, alquilación tal como metilación, acilación tal como acetilación, esterificación, amidación, apertura de anillo, ciclación, glicosilación, alteración de cadenas de sacáridos contenidas para diferentes tipos, aumentar o reducir el número de cadenas de sacáridos contenidas, unión a lípido, sustitución por restos de D-aminoácidos. Esos procedimientos se conocen en la técnica (por ejemplo, T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, pág. 79-86 W.H. Freeman y Co., San Francisco, Estados Unidos (1983)). Cuando se utilizan proteínas de galectina 9 modificada (variantes de Gal-9 modificada) de acuerdo con la presente invención, puede realizarse exploración con respecto a compuestos, o sales de los mismos, que promueven (agonistas) o inhiben (antagonistas) las funciones de interés mediadas por Gal-9 tales como acciones biológicas (por ejemplo, acciones citotóxicas, acciones inducibles por apoptosis, acciones de tipo glucocorticoide, acciones de inhibición de metástasis de células malignas). Esto significa que se contemplan en el presente documento kits y reactivos de exploración. Por lo tanto, la presente invención proporciona procedimientos para explorar (1) un compuesto promotor (agonista), o una sal del mismo, que promueve las funciones predeterminadas ejercidas por cualquiera de las proteínas de galectina 9 (incluyendo galectina 9 humana), fragmentos peptídicos de las mismas, y sales de las mismas, pudiendo incluir la función acciones biológicas mediadas por Gal-9 como se identifican o desvelan en el presente documento, o (2) un compuesto inhibidor (antagonista), o una sal del mismo, que inhibe la misma función, que comprende usar una acción desvelada o identificada o actividad mediada o poseída por un miembro seleccionado del grupo que consiste en dichas proteínas de galectina 9 (incluyendo galectina 9 humana), fragmentos peptídicos del mismo, y sales del mismo, en relación con una diversidad de sustancias. Por ejemplo, la exploración comprende

(i) poner en contacto una proteína galectina 9 modificada (o variante de Gal-9 modificada), un fragmento peptídico de la misma, una sal de la misma, o un equivalente de la misma (incluyendo un transformante o transfectante que exprese dicha proteína; tiene en lo sucesivo en el presente documento el mismo significado) con una muestra de ensayo adecuada, obteniendo de este modo un primer ensayo;

(ii) incubar la proteína de la presente invención, un fragmento peptídico de la misma, una sal de la misma, o un equivalente de la misma, sin la muestra de ensayo de interés, obteniendo de este modo un segundo ensayo; y

(iii) comparar dicho primer ensayo y dicho segundo ensayo.

En una realización de la exploración, dichas actividades biológicas (por ejemplo, actividades asociadas con interacciones entre cada proteína galectina 9 y componentes biológicos), se miden y comparan.

Los sistemas de exploración pueden contener sustratos detectables adecuados para la conveniencia de los ensayos. Los sustratos pueden ser cualquiera siempre que puedan utilizarse de forma eficaz en ensayos. Por ejemplo, pueden seleccionarse de los que se sabe que son sustratos convencionales y preferentemente incluyen compuestos sintetizados y otros materiales. El sustrato puede emplearse sin ninguna modificación o preferentemente después de marcar con fluorocromos tales como fluoresceína, enzimas o sustancias radiactivas.

Las muestras de ensayo incluyen, por ejemplo, proteínas, péptidos, compuestos no peptídicos, compuestos sintéticos, productos fermentados, extractos vegetales, extractos tisulares tales como extractos de tejido animal, extractos celulares. Los ejemplos de compuestos de ensayo como se usan para las muestras de ensayo pueden incluir preferentemente anticuerpos anti-galectina, inhibidores de enzimas, citocinas, una diversidad de compuestos que tienen actividad inhibidora, entre otros compuestos sintéticos. Estos compuestos pueden ser nuevos o conocidos por el público. La exploración se realiza de acuerdo con técnicas convencionales para medir actividades de unión o actividades enzimáticas, por ejemplo, haciendo referencia a procedimientos conocidos en la técnica. También puede realizarse usando diversos marcadores, tampones y otros reactivos adecuados, y de acuerdo con las operaciones, como se describen en el presente documento para los ensayos. En la exploración, es posible tratar los péptidos usados con activadores, y convertir sus precursores o formas latentes en formas activas de los mismos antes del ensayo. El ensayo puede realizarse habitualmente en tampón sin ningún efecto adverso en la reacción, incluyendo tampón Tris-HCl, tampón fosfato, por ejemplo, a pH de aproximadamente 4 a 10, preferentemente a pH de aproximadamente 6 a 8. Para cada una de estas exploraciones, aportando consideraciones técnicas habitualmente poseídas por los expertos en la materia a condiciones y operaciones habituales para cada procedimiento, pueden construirse sistemas de ensayo adecuados en relación con cada una de las proteínas de galectina 9 y polipéptidos o péptidos que tienen actividad sustancialmente equivalente a las mismas, de acuerdo con la presente invención. Puede hacerse referencia a una diversidad de revisiones, libros de referencia, con detalles de estas técnicas convencionales (por ejemplo, Methods in Enzymology, Academic Press, Nueva York, Estados Unidos). Para ensayos de apoptosis, es posible hacer referencia a Sei-ichi Tamuma (Ed.), "Saiboukagaku Bessatsu: Jikken Protocol Series, Apoptosis Jikken Protocol" (1^a Edición, 2^a Reimpresión) y Shujunsha Co., Ltd., 20 de enero de 1995, y usar kits de ensayo disponibles en el mercado.

Los compuestos o sales de los mismos identificados u obtenidos por el procedimiento o kit de exploración de acuerdo con la presente invención son los seleccionados de los compuestos de ensayo anteriormente mencionados, incluyendo péptidos, proteínas, compuestos no peptídicos, compuestos sintéticos, productos fermentados, extractos celulares, extractos vegetales, extractos tisulares animales. Tales compuestos son los que potencian (o promueven) o inhiben (o suprimen) las funciones de las proteínas y otras especies de acuerdo con la presente invención. Son sales de dichos compuestos, por ejemplo, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Son ejemplos de tales sales, las de bases inorgánicas, bases orgánicas, ácidos inorgánicos, ácidos orgánicos, aminoácidos básicos o ácidos. Son ejemplos preferidos de las sales de base inorgánica, sales de metales alcalinos tales como sales de sodio y sales de potasio; sales de metales alcalinotérreos tales como sales de calcio y sales de magnesio; sales de aluminio, sales de amonio. Son ejemplos preferidos de las sales de base orgánica las sales con trimetilamina, trietilamina, piridina, picolina, 2,6-lutidina, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, ciclohexilamina, diciclohexilamina y N,N-dibenciletilen-diamina. Son ejemplos preferidos de las sales de ácidos inorgánicos las sales con ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico. Son ejemplos preferidos de las sales de ácidos orgánicos sales con ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido málico, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico y ácido benzoico. Son ejemplos preferidos de las sales de aminoácidos básicos las de arginina, lisina y ornitina. Son ejemplos preferidos de las sales de aminoácidos ácidos las de ácido aspártico, ácido glutámico.

Los componentes activos de la presente invención [por ejemplo, (a) los polipéptidos de Gal-9 modificada (variantes de Gal-9 modificada), fragmentos peptídicos de los mismos, sales de los mismos, sus péptidos relacionados; (b) las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de Gal-9 modificada o que codifican su péptido relacionado (incluyendo ADN); (c) los compuestos, o sales de los mismos, que controlan o regulan dichas actividades de interés (o funciones) ejercidas por Gal-9 (los compuestos que promueven o suprimen/inhiben las actividades biológicas de Gal-9, incluyendo fenómenos que promueven o suprimen/inhiben acciones citotóxicas dependientes de proteína Gal-9, acciones inductoras de apoptosis, capacidades de Gal-9 para ejercer eficacias deseables sin ningún efecto adverso en células normales y degeneración, sobreproducción o degradación de tejidos o proteínas); compuestos, o sus sales, que controlan o regulan dicha producción proteica; (d) los compuestos identificados o caracterizados por medio de la presente invención] pueden emplearse como agentes farmacéuticos. Los componentes activos pueden administrarse solos o en forma de una composición o preparación farmacéutica en mezcla con cualquiera de diversos adyuvantes farmacéuticamente aceptables. Preferentemente puede administrarse en forma de una composición o formulación farmacéutica conveniente adecuada para aplicación oral, tópica, parenteral o similares. Puede seleccionarse cualquiera de las formas de dosificación (incluyendo las de administración por inhalación y rectal) dependiendo del fin.

Los componentes activos de la presente invención pueden usarse en combinación con cualquiera de diversos fármacos, incluyendo fármacos antitumorales (fármacos antineoplásicos), inhibidores de metástasis tumoral, inhibidores para trombogénesis, fármacos terapéuticos para destrucción conjunta, analgésicos, fármacos antiinflamatorios, inmunorreguladores (o inmunomoduladores) y/o inmunsupresores, que pueden emplearse de forma no restringida a especies particulares siempre que actúan eficaz o provechosamente. Por ejemplo, pueden seleccionarse opcionalmente de los conocidos en la técnica.

La administración parenteral incluye vía tópica, percutánea, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intracutánea e intraperitoneal. También es posible aplicar el fármaco directamente a sitios afectados y, en cierto caso, es adecuada la aplicación directa. Preferentemente los animales mamíferos incluyendo seres humanos pueden recibir el fármaco por vía oral o vía parenteral (por ejemplo, por vía intracelular, vía intratissular, vía intravenosa, vía intramuscular, vía

subcutánea, vía intracutánea, vía intraperitoneal, vía intrapleural, vía intraespinal, por instilación, por vía enteral, por el recto, por instilación, al oído, ojo o nariz, por embadurnado o aplicación en los dientes, piel o mucosa). Las formas de dosificación específicas de las preparaciones y formulaciones farmacéuticas incluyen soluciones farmacéuticas, dispersiones farmacéuticas, preparaciones semisólidas, preparaciones en partículas, preparaciones moldeadas y extractos. Son ejemplos de las formas de dosificación, comprimidos, comprimidos revestidos, comprimidos revestidos de azúcar, píldoras, trociscos, cápsulas duras, cápsulas blandas, microcápsulas, implantes, polvos, pulvis, gránulos, gránulos finos, inyecciones, líquidos y soluciones, elixires, emulsiones, irrigaciones, jarabes, mezclas, suspensiones, linimentos, lociones, aerosoles, pulverizaciones, inhalaciones, nebulizaciones, pomadas, esparadrapos, parches, pastas, cataplasmas, cremas, oleatos, supositorios (por ejemplo, supositorios rectales), tinturas, aguas dermatológicas, soluciones oftálmicas, gotas nasales, gotas óticas, pinturas, transfusiones, polvos para soluciones de inyección, preparaciones liofilizadas y geles acondicionados. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de acuerdo con técnicas convencionales. Por ejemplo, la composición o formulación farmacéutica puede comprender al menos uno de dichos compuestos (componentes activos incluyendo proteínas) de la presente invención o una sal por sí solo o en mezcla con transportadores fisiológicamente admisibles, transportadores, adyuvantes, vehículos, excipientes y diluyentes farmacéuticamente aceptables. El compuesto (componente activo o proteína) de la presente invención o una sal del mismo está habitualmente mezclado con un miembro único seleccionado del grupo que consiste en transportadores fisiológicamente admisibles, transportadores farmacéuticamente aceptables, adyuvantes, vehículos, excipientes, diluyentes, agentes saporíferos, agentes perfumantes, agentes edulcorantes, extensores, antisépticos, estabilizadores, aglutinantes, reguladores de pH, agentes tamponantes, detergentes (tensioactivos), bases, disolventes, cargas, agentes de masificación, adyuvantes de solución, solubilizadores, agentes de tonicidad, emulsionantes, agentes de suspensión, dispersantes, agentes que aumentan la viscosidad, agentes espesantes, agentes gelificantes, agentes de rigidez, absorbentes, adhesivos, elastómeros, plastificantes, disgragantes, propulsores de aerosoles, conservantes, antioxidantes, agentes opacificantes, humectantes, emolientes, protectores de carga y lenitivos, o de forma adecuada en una combinación de los mismos, dependiendo de la necesidad, para proporcionar una forma de dosis unitaria que se requiere para prácticas farmacéuticas generalmente aprobadas.

Las formulaciones adecuadas para vías parenterales incluyen soluciones o suspensiones asépticas que contienen al menos un componente activo en mezcla con agua u otro medio farmacéuticamente aceptable. Son ejemplos de tales formulaciones parenterales las inyecciones. Los vehículos líquidos preferidos para inyección generalmente incluyen agua, solución salina, solución de dextrosa, otras soluciones de sacáridos relacionadas, etanol, glicoles tales como propilenglicol y polietilenglicol. Para la preparación de inyecciones, el componente activo se mezcla habitualmente con cualquiera de los vehículos tales como agua destilada, solución de Ringer, solución salina fisiológica, agentes de dispersión adecuados, agentes humectantes, agentes de suspensión y otros materiales para formar formulaciones inyectables incluyendo soluciones, suspensiones y emulsiones por técnicas conocidas en este campo. Son ejemplos de líquidos acuosos para la inyección una solución salina fisiológica y soluciones isotónicas que contienen glucosa y otros adyuvantes (por ejemplo, D-sorbitol, D-manitol y cloruro sódico) cuando pueden usarse en combinación con un solubilizador auxiliar farmacéuticamente aceptable adecuado tal como alcohol (por ejemplo, etanol), polialcohol (por ejemplo, propilenglicol y polietilenglicol), agente tensioactivo no iónico (por ejemplo, Polisorbato 80™ y HCO-50). Los líquidos oleosos inyectables pueden incluir aceite de sésamo o aceite de soja cuando pueden usarse en combinación con benzil benzoato, alcohol bencílico, y otros materiales como solubilizadores auxiliares. Además, pueden mezclarse también con ellos tampones (por ejemplo, tampón fosfato, tampón de acetato sódico) o agentes para osmorregulación, agentes analgésicos (por ejemplo, cloruro de benzalconio, clorhidrato de procaina), estabilizadores (por ejemplo, albúmina de suero humano, polietilenglicol), conservantes (por ejemplo alcohol bencílico, fenol), antioxidantes tales como ácido ascórbico, absorbefacientes. La solución de inyección preparada habitualmente se carga en ampollas adecuadas. Para administración parenteral, se preparan formas farmacéuticas unitarias en solución o suspensión en fluidos estériles farmacéuticamente aceptables tales como agua, etanol y aceites, en mezcla con o sin detergente y otros adyuvantes farmacéuticamente aceptables. El vehículo oleoso y disolvente usados en la formulación parenteral pueden incluir mono-, di- o triglicéridos naturales, sintéticos o semisintéticos; grasas y aceites naturales, semisintéticos o sintéticos; y ácidos grasos. Son ejemplos de tales vehículos y disolventes oleosos aceites vegetales tales como aceite de cacahuate, aceite de maíz, aceite de soja y aceite de sésamo. Por ejemplo, esta inyección puede prepararse habitualmente para formar dosis unitarias que contienen cada una aproximadamente de 0,1 a 10 partes del compuesto de la presente invención por cada 100 partes en peso de la composición de dosis.

La formulación adecuada para uso tópico, tal como aplicación bucal o rectal, incluye colutorios y gargarismos, dentífricos, pulverizaciones para la cavidad bucal, inhalantes, pomadas (ungüentos), rellenos dentales, agentes de revestimiento dental, pastas dentales y supositorios. Los colutorios y otros agentes dentales se preparan por técnicas convencionales, usando vehículos farmacéuticamente aceptables. Para las pulverizaciones para la cavidad bucal e inhalantes, el compuesto de la presente invención puede aplicarse a los dientes u otros sitios después de disolverse solo o junto con vehículos inertes farmacéuticamente aceptables, en un aerosol o solución para nebulizadores, o en forma de polvos para inhalación. Las pomadas (ungüentos) se preparan por técnicas convencionales, en mezcla con bases farmacéuticas convencionalmente empleadas tales como bases de pomada (vaselina blanca, parafina, aceite de oliva, macrogol 400, pomada de macrogol).

Los fármacos para aplicación tópica (incluyendo pintura) a los dientes y la piel pueden prepararse en forma de una solución o suspensión que utilice agua esterilizada de forma adecuada o vehículos no acuosos. Los aditivos usados incluyen agentes tamponantes tales como bisulfito sódico y edetato disódico; conservantes incluyendo agentes antisépticos, antimicrobianos y antifúngicos tales como ácido acético, nitrato fenilmercúrico, cloruro de benzalconio y clorhexidina; y espesantes tales como hipromelosa.

5 Los supositorios pueden prepararse por técnicas convencionales utilizando vehículos bien conocidos en la técnica, preferentemente excipientes no irritantes. Son ejemplos de los excipientes los que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a temperatura rectal en los que tales sustancias se funden en el recto para suministrar un fármaco, tal como polientilenglicoles, lanolina, manteca de cacao y triglicéridos de ácidos grasos. En los supositorios, los compuestos de la presente invención se aplican en forma de composiciones que contienen aproximadamente de 0,1 a 95 por ciento (peso por volumen). El compuesto, dependiendo del vehículo y concentración usados, puede estar suspendido o disuelto en el vehículo. Pueden estar disueltos en el vehículo adyuvantes tales como anestésico local, conservante y agente tamponante. Las formulaciones adecuadas para aplicación oral incluyen composiciones sólidas tales como comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, gránulos y trociscos; composiciones fluidas tales como soluciones, jarabes y suspensiones. En la preparación de formulaciones orales, se emplean adyuvantes farmacéuticos conocidos en la técnica. Los comprimidos y píldoras pueden prepararse además por revestimiento entérico. Cuando la forma farmacéutica unitaria es una cápsula, pueden contenerse vehículos fluidos tales como grasas y aceites además de los materiales anteriormente mencionados.

10 Cuando los componentes activos son proteínas o polipéptidos, la conjugación con polietilenglicol (PEG) es particularmente útil, debido a que su toxicidad es extremadamente baja en mamíferos. Además, la conjugación con PEG puede en ocasiones reducir la inmunogenicidad y antigenicidad de un compuesto heterólogo de forma eficaz. El compuesto puede proporcionarse después de ponerse en un dispositivo de microcápsula. Puede unirse fácilmente un polímero tal como PEG a un grupo α -amino de aminoácidos amino-terminales, un grupo ϵ -amino de cadenas laterales de lisina, un grupo carboxilo de cadenas laterales de ácido aspártico o ácido glutámico, un grupo α -carboxilo de aminoácidos carboxilo terminales o un derivado activado de cadenas de glicosilo unidas a ciertos restos de asparagina, serina o treonina. Se conocen diversas formas activadas de PEG adecuadas para reacción directa con proteínas. Los reactivos de PEG útiles para reacción con grupos amino de una proteína incluyen ésteres activos de ácidos carboxílicos y derivados de carbonato, particularmente los que tienen N-hidroxisuccinimida, p-nitrofenol, imidazol o 1-hidroxi-2-nitrobenceno-4-sulfonato como un grupo saliente. De forma similar, los reactivos de PEG que tienen un grupo de aminohidrazina o hidrazida son útiles para reacción con aldehídos producidos por oxidación de perydato de proteínas.

15 La práctica de la invención puede comenzar diagnosticando al mamífero como es apropiado para el trastorno/enfermedad particular que puede mostrar tal como autoinmunidad, tumor incluyendo tumor maligno tal como cáncer, enfermedad alérgica e inflamación. El diagnóstico también puede continuar durante el tratamiento, como un procedimiento terapéutico, para supervisar el progreso del tratamiento, y para dirigir la modificación de tales parámetros como la dosificación o frecuencia en tratamientos continuados, por ejemplo. El diagnóstico adicional que podría ayudar a determinar la adecuación para la administración de un agente terapéutico de muteína de galectina 9 modificada incluye un análisis de los niveles de expresión de galectina 9 en el mamífero, y una comparación de estos niveles entre células tales como linfocitos distantes del sitio de autoinmunidad, y los próximos al sitio de autoinmunidad. El trastorno/enfermedad tal como autoinmunidad, tumor incluyendo tumor maligno tal como cáncer, enfermedad alérgica y enfermedad autoinmune de inflamación en el mamífero que se trata puede supervisarse detectando el antígeno de galectina 9 en una superficie celular. Esta supervisión puede incluir poner en contacto una muestra derivada del mamífero con un anticuerpo específico para galectina-9, y detectar la unión del anticuerpo con la muestra.

20 25 30 35 40 45 50 55 Los vehículos de terapia génica incluyen los que son para suministro de construcciones incluyendo una secuencia codificante de un compuesto terapéutico de la invención, para suministrar al mamífero para expresión en el mamífero, por ejemplo, una secuencia codificante de muteína de galectina 9 modificada, o incluyendo también una secuencia de ácido nucleico de toda o una parte de muteína de Gal-9 modificada para suministro, que puede administrarse de forma local o sistemática. Estas construcciones pueden utilizar enfoques de vector viral o no viral en modalidad *in vivo* o *ex vivo*. Puede inducirse expresión de dicha secuencia codificante usando promotores de mamífero endógenos o heterólogos. La expresión de la secuencia codificante *in vivo* puede ser constitutiva o estar regulada. Cuando la muteína de Gal-9 modificada se expresa en el mamífero, ésta puede expresarse como muteína de Gal-9 modificada soluble, o como una forma precursora de muteína de Gal-9 modificada, incluyendo uno o ambos, por ejemplo, toda la muteína de Gal-9 modificada, o una parte, variante, derivado o fusión biológicamente activo de muteína de Gal-9 modificada.

60 La invención incluye vehículos de suministro génicos capaces de expresar la secuencia de ácido nucleico de muteína de Gal-9 modificada contempladas. El vehículo de suministro genético es preferentemente un vector viral. Un vehículo de suministro genético más preferible incluye vectores virales tales como vectores retrovirales, adenovirales, virales adeno-asociados (AAV), de virus del herpes, o de alfavirus. El vector viral puede ser un vector viral de astrovirus, coronavirus, ortomixovirus, papovavirus, paramixovirus, parvovirus, picornavirus, poxvirus, togavirus. Los vehículos de suministro genético se desvelan en general en D. Jolly, Cancer Gene Therapy, 1(1): 51-64 (1994); O. Kimura y col., Human Gene Therapy, 5: 845-852 (1994); S. Connelly y col., Human Gene Therapy, 6: 185-193

(1995); M.G. Kaplitt y col., *Nature Genetics*, 8: 148-153 (1994).

Se conocen bien en la técnica vectores retrovirales y pueden incluir cualquier vector de terapia génica retroviral empleable en la invención, tales como retrovirus de tipo B, C y D, y retrovirus xenotrópicos (por ejemplo, NZB-X1, NZB-X2, NZB9.1: véase, R. R. O'Neill, J. Virol., 53: 100-106 (1985)), retrovirus politrópicos (por ejemplo, MCF, MCF-MLV: véase, M. Kelly, J. Virol., 45: 291-298 (1983)), spumavirus y lentivirus y otros (véase, R. L. Weiss y col. (Eds.), *RNA Tumor Viruses*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1985).

Partes del vector de terapia génica retroviral pueden derivar de diferentes retrovirus. Por ejemplo, las LTR de retrovector pueden derivar de un virus de sarcoma murino, un sitio de unión a ARNT de un virus de sarcoma de Rous, una señal de empaquetamiento de un virus de leucemia murina y un origen de síntesis de segunda cadena de un virus de leucosis aviar. Estos vectores retrovirales recombinantes pueden usarse para generar partículas de vector retroviral competentes en transducción introduciéndolas en líneas celulares de empaquetamiento apropiadas (véase, Patente de Estados Unidos Nº 5.591.624). Pueden construirse vectores de retrovirus para integración específica de sitio en ADN de célula huésped por incorporación de integrasa químérica (una enzima que permite que el ADN diana se integre en el ADN de la célula huésped) en la partícula retroviral. Es preferible que el vector viral recombinante sea un virus recombinante defectuoso en replicación. Se conocen bien en la técnica líneas celulares de empaquetamiento adecuadas para su uso con los vectores de retrovirus anteriormente mencionados, y se preparan fácilmente (véase, Patente de Estados Unidos Nº 6.013.517, documento WO 92/05266). Pueden usarse dichas líneas celulares de empaquetamiento para crear líneas celulares productoras (líneas celulares de vector o "VCL") para la producción de partículas de vectores recombinantes. Preferentemente, las líneas celulares de empaquetamiento se realizan a partir de células parentales humanas (por ejemplo, células HT1080) o líneas celulares parentales de visón, que elimina la inactivación en suero humano.

Los retrovirus preferidos para la construcción de vectores de terapia génica retroviral incluyen virus de leucosis aviar, virus de leucemia bovina, virus de leucemia murina, virus inductor de focos en células de visón, virus de sarcoma murino, virus de reticuloendoteliosis y virus de sarcoma de Rous. Los virus de leucemia murina particularmente preferidos incluyen por ejemplo, 4070A y 1504A (Hartley y Rowe, J. Virol., 19: 19-25 (1976)), Abelson (ATCC Nº VR-999), Friend (ATCC No. VR-245), Graffi, Gross (ATCC Nº VR-590), Kirsten, virus del sarcoma de Harvey y Rauscher (ATCC Nº VR-998), y virus de leucemia murina de monoley (ATCC Nº VR-190). Tales retrovirus pueden obtenerse de almacenes o colecciones tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC") en Rockville, Maryland, Estados Unidos o aislarse de fuentes conocidas usando técnicas disponibles habitualmente.

Los vectores de terapia génica retrovirales conocidos ejemplares que se pueden emplear en la presente invención incluyen los descritos en los documentos GB 2200651, EP 0415731, EP 0345242, WO 89/02468, WO 89/05349, WO 89/09271, WO 90/02806, WO 90/07936, WO 94/03662, WO 93/25698, WO 93/25234, WO 93/11230, WO 93/10218, WO 93/10218, WO 91/02805, Patentes de Estados Unidos Nº 5.219.740, 4.405.712, 4.861.719, 4.980.289, 4.777.127, 5.591.624, Vile, *Cancer Res*, 53: 3860-3864 (1993), Vile, *Cancer Res*, 53: 962-967 (1993), Ra, *Cancer Res*, 53: 83-88 (1993), Takamiya, *J Neurosci Res*, 33: 493-503 (1992), Baba, *J Neurosurg*, 79: 729-735 (1993), Mann, *Cell* 33: 153 (1983), Cane, *Proc Natl Acad Sci USA*, 81: 6349 (1984), Miller, *Human Gene Therapy*, 1: 5-14 (1990).

También se conocen en la técnica vectores de terapia génica adenovirales humanos y pueden emplearse en la presente invención. Tales vectores se desvelan en, por ejemplo, Berkne, *Biotechniques*, 6: 616 (1988); Rosenfeld, *Science*, 252: 431 (1991); documentos WO 93/07283; WO 93/06223; WO 93/07282. Los vectores de terapia génica adenovirales conocidos ejemplares que pueden emplearse en la presente invención incluyen los descritos en los documentos referidos anteriormente y en los documentos WO 94/12649; WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984; WO 95/00655; WO 95/27071; WO 95/29993; WO 95/34671; WO 96/05320; WO 94/08026; WO 94/11506; WO 93/06223; WO 94/24299; WO 95/14102; WO 95/24297; WO 95/02697; WO 94/28152; WO 94/24299; WO 95/09241; WO 95/25807; WO 95/05835; WO 94/18922; WO 95/09654. Como alternativa, puede emplearse administración de ADN ligado a adenovirus muerto como se describe en Curiel, *Human Gene Therapy*, 3: 147-154 (1992).

Los vehículos de suministro genético de la invención también incluyen vectores de virus asociados a adenovirus (AAV). Son ejemplos principales y preferidos de tales vectores para su uso en la presente invención los vectores basados en AAV-2 desvelados en el documento WO 93/09239. La mayoría de los vectores AAV preferidos comprenden las dos repeticiones terminales invertidas de AAV en las que se modifican las secuencias D nativas por sustitución de nucleótidos, de modo que se conserven al menos 5 nucleótidos nativos y hasta 18 nucleótidos nativos, preferentemente al menos 10 nucleótidos nativos hasta 18 nucleótidos nativos, más preferentemente 10 nucleótidos nativos y los nucleótidos restantes de la secuencia D se suprimen o reemplazan con nucleótidos no nativos. Las secuencias D nativas de las repeticiones terminales invertidas de AAV son secuencias de 20 nucleótidos consecutivos en cada repetición terminal invertida de AAV (es decir, hay una secuencia en cada extremo) que no están implicados en formación de HP. El nucleótido de reemplazo no nativo puede ser cualquier nucleótido distinto del nucleótido hallado en la secuencia D nativa en la misma posición. Otros vectores de AAV ejemplares que pueden emplearse son pWP-19 y pWN-1, (Nahreini, *Gene*, 124: 257-262 (1993)). Otro ejemplo de dicho vector de AAV es psub201, (Samulski, J. Virol., 61: 3096 (1987)). Otro vector de AAV ejemplar es el vector de ITR Doble-D. Se desvelan procedimientos para construcción de ITR Doble D en la Patente de Estados Unidos Nº 5.478.745. Otros vectores más de AAV son los desvelados en las Patentes de Estados Unidos Nº 4.797.368,

5.139.941, 5.474.935, documento WO 94/288157. Un ejemplo más de un vector de AAV que puede emplearse en la presente invención es SSV9AFABTKneo, que contiene el potenciador de AFP y promotor de albúmina y dirige la expresión predominantemente en el hígado. Su estructura y construcción se desvelan en Su, Human Gene Therapy, 7: 463-470 (1996). Se describen vectores de terapia génica de AAV adicionales en las Patentes de Estados Unidos Nº 5.354.678, 5.173.414, 5.139.941 y 5.252.479.

5 Los vectores de terapia génica de la invención también incluyen vectores de herpes. Son ejemplos principales y preferidos los vectores de virus de herpes simple que contienen una secuencia codificante de un polipéptido de timidina quinasa tales como los desvelados en la Patente de Estados Unidos Nº 5.288.641 y documento EP 10 0176170. Los vectores de virus de herpes simple ejemplares adicionales incluyen HFEM/ICP6-LacZ desvelado en el documento WO 95/04139, pHSVlac descrito en Geller, Science, 241: 1667-1669 (1988), documento WO 90/09441, documento WO 92/07945, HSV Us3::pgC-lacZ descrito en Fink, Human Gene Therapy, 3: 11-19 (1992), HSV7134, 2RH 105 y GAL4 descrito en el documento EP 0453242 A, los depositados en la ATCC con los números de referencia ATCC VR-977 y ATCC VR-260.

15 Pueden emplearse vectores de terapia génica de virus alfa en la presente invención. Son vectores de virus alfa preferidos los vectores de virus Sindbis, togavirus, virus del Bosque de Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), virus Middleberg (ATCC VR-370), virus del Río Ross (ATCC VR-373; ATCC VR-1246), virus de la encefalitis equina venezolana (ATCC VR923; ATCC VR-1250; ATCC VR-1249; ATCC VR-532), los descritos en las Patentes de Estados Unidos Nº 5.091.309, 5.217.879 y documento WO 92/10578. Son vectores de virus alfa que pueden emplearse en el presente documento los desvelados en las Patentes de Estados Unidos Nº 5.091.309, 5.217.879, 20 5.843.723, 6.376.236, documentos WO 94/21792, WO 92/10578, WO 95/07994 y otros documentos. Pueden obtenerse tales virus alfa de depositarios o colecciones tales como la ATCC (Rockville, Maryland, Estados Unidos), o aislarse de fuentes conocidas usando técnicas disponibles habitualmente. Preferentemente, se usan vectores de alfavirus con citotoxicidad reducida (véase Patente de Estados Unidos Nº 6.391.632).

25 También son útiles sistemas de vectores de ADN tales como sistemas de expresión estratificados eucariotas para expresar los ácidos nucleicos de mutéína de galectina 9 modificada de la invención. Se desvelan detalles de los sistemas de expresión estratificados eucariotas en el documento WO 95/07994. Preferentemente, los sistemas de expresión estratificados eucariotas de la invención derivan de vectores de alfavirus y más preferentemente de vectores virales Sindbis. Otros vectores virales adecuados para su uso en la presente invención incluyen los derivados de poliovirus, por ejemplo ATCC VR-58 y los descritos en Evans, Nature, 339: 385 (1989), Sabin, J. Biol. 30 Standardization, 1: 115 (1973); rinovirus, por ejemplo ATCC VR-1110, y los descritos en Arnold, J. Cell Biochem, L401-405 (1990); virus de la viruela tales como virus de viruela de canarios o virus vaccinia, por ejemplo ATCC VR-111 y ATCC VR-2010 y los descritos en Fisher-Hoch, Proc Natl Acad Sci USA, 86: 317(1989), Flexner, Ann NY Acad Sci, 569: 86 (1989), Flexner, Vaccine, 8: 17 (1990), Patentes de Estados Unidos Nº 4.603.112 y 4.769.330 y documento WO 89/01973; virus SV40, por ejemplo ATCC VR-305 y los descritos en Mulligan, Nature, 277: 108 (1979) y Madzak, J. Gen. Vir, 73: 1533 (1992); virus de la gripe (por ejemplo ATCC VR-797) y virus de gripe recombinantes realizados empleando técnicas de genética inversa como se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 5.166.057, Enami, Proc Natl Acad Sci USA, 87: 3802-3805(1990), Enami y Palese, J Virol, 65: 2711-2713 (1991), Luytjes, Cell, 59: 110 (1989), McMicheal., N E J Med, 309: 13 (1983), Yap, Nature, 273: 238 (1978), Nature, 277: 108(1979), y otros documentos; virus de la inmunodeficiencia humana como se describe en el documento EP 40 0386882, Ruchschacher, J. Vir, 66: 2731 (1992); virus del sarampión (por ejemplo ATCC VR-67, VR-1247) y los descritos en el documento EP 0440219; virus Aura (por ejemplo ATCC VR-368); virus Bebaru (por ejemplo ATCC VR-600, ATCC VR-1240); virus Cabassou (por ejemplo ATCC VR-922); virus Chikungunya (por ejemplo ATCC VR-64, ATCC VR-1241); virus de Fort Morgan (por ejemplo ATCC VR-924); virus Getah (por ejemplo ATCC VR-369, ATCC VR-1243); virus Kyzylagach (por ejemplo, ATCC VR-927); virus Mayaro (por ejemplo ATCCVR-66); virus Mucambo (por ejemplo ATCC VR-580, ATCC VR-1244) ; virus Ndumu (por ejemplo ATCC VR-371); virus Pixuna (por ejemplo ATCC VR-372, ATCC VR-1245); virus Tonate (por ejemplo ATCCVR-925); virus Triniti (por ejemplo ATCC VR-469); virus Una (por ejemplo ATCC VR-374); virus Whataroa (por ejemplo ATCC VR-926); virus Y-62-33 (por ejemplo ATCC VR-375); virus O'Nyong, virus de la encefalitis oriental (por ejemplo ATCC VR-65, ATCC VR-1242); virus de la encefalitis occidental (por ejemplo ATCC VR-70, ATCC VR-125L, ATCC VR-622, ATCC VR-1252); 50 coronavirus (por ejemplo ATCC VR-740), y los descritos en Hamre, Proc Soc Exp Biol Med, 121: 190 (1966).

55 El suministro de las composiciones de la presente invención a las células no se limita a los vectores virales anteriormente mencionados. Pueden emplearse otros procedimientos y medios de suministro tales como, por ejemplo, vectores de expresión de ácido nucleico, ADN condensado poliactílico ligado o no ligado a adenovirus muerto solamente (por ejemplo véase Curiel, Hum Gene Ther, 3: 147-154 (1992)), ADN ligado a ligando (por ejemplo véase Wu, J Biol Chem, 64: 16985-16987 (1989)), células vehículo de suministro de células eucariotas (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos Nº 6.013.517, 6.015.686), deposición de materiales de hidrogel fotopolimerizados, pistola de partículas de transferencia génica portátil, como se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 5.149.655, radiación ionizante como se describe en el documento WO 92/11033, neutralización de carga nucleica o fusión con membranas celulares. Se describen enfoques adicionales en Philip, Mol Cell Biol, 14: 2411-2418 (1994), Woffendin, Proc Natl Acad Sci USA, 91: 1581-585 (1994).

60 Puede emplearse transferencia génica mediada por partículas. La secuencia puede insertarse en vectores convencionales que contienen secuencias de control convencionales para expresión de alto nivel, y pueden

incubarse después con moléculas de transferencia génica sintéticas (por ejemplo, cationes de unión a ADN polimérico como polilisina, protamina y albúmina, ligados a ligandos de dirección celular tales como asialoorosomucoide, como se describe en Wu y col., J. Biol. Chem., 262: 4429-4432 (1987), insulina como se describe en Hucked, Biochem Pharmacol, 40: 253-263 (1990), galactosa como se describe en Plank, Bioconjugate Chem, 3: 533-539 (1992), lactosa o transferrina).

También puede emplearse ADN desnudo. Se describen procedimiento de introducción de ADN desnudo ejemplares en el documento WO 90/11092 y Patente de Estados Unidos Nº 5.580.859. Puede mejorarse la eficacia de captación usando perlas de látex biodegradables. Las perlas de látex revestidas con ADN se transportan eficazmente a células después del inicio de la endocitosis por las perlas. El procedimiento puede mejorarse adicionalmente por el tratamiento de las perlas para aumentar la hidrofobicidad y facilitar de este modo la interrupción del endosoma y liberación del ADN al citoplasma.

Los liposomas que pueden actuar como vehículos de suministro génico se describen en la Patente de Estados Unidos Nº 5.422.120, documentos WO 95/13796, WO 94/23697, WO 91/144445 y EP 524.968. En el suministro no viral, las secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido de muteína de galectina 9 modificada pueden insertarse en vectores convencionales que contienen secuencias de control convencionales para expresión de alto nivel, y después incubarse con moléculas de transferencia génica sintéticas. La molécula de transferencia génica sintética incluye cationes de unión a ADN polimérico ligados a ligandos de dirección celular, tales como asialoorosomucoide, insulina, galactosa, lactosa o transferrina. El cation de unión a ADN polimérico incluye por ejemplo polilisina, protamina y albúmina. Otros sistemas de suministro incluyen el uso de liposomas para encapsular ADN que comprende el gen bajo el control de una diversidad de promotores específicos de tejido o activos de forma ubicua. El suministro no viral adicional adecuado para su uso incluye sistemas de suministro mecánico tales como el enfoque descrito en Woffendin y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91(24): 11581-11585 (1994).

Además, la secuencia codificante y el producto de expresión de la misma pueden suministrarse a través de deposición de materiales de hidrogel fotopolimerizado. Otros procedimientos convencionales para el suministro génico que pueden usarse para suministro de la secuencia codificante incluyen, por ejemplo, uso de pistola de partículas de transferencia génica portátil, como se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 5.149.655; uso de radiación ionizante para activar el gen transferido, como se describe en el documento WO 92/11033.

Son ejemplos de vehículos de suministro génico poliacríticos y de liposoma los descritos en las Patentes de Estados Unidos Nº 5.422.120 y 4.762.915, documentos WO 95/13796, WO 94/23697, WO 91/14445, EP 0524968, Stryer, Biochemistry, 236-240 (1975), W. H. Freeman y col., Biochem Biophys Acta, 600: 1 (1980), Bayer, Biochem Biophys Acta, 550: 464 (1979), Rivnay, Meth Enzymol, 149: 119 (1987), Wang, Proc Natl Acad Sci USA, 84: 7851 (1987), Plant, Anal Biochem, 176: 420 (1989).

La invención desvela un procedimiento para tratar mamíferos aquejados de un trastorno o enfermedad seleccionado del grupo que consiste en tumores que incluyen los malignos tales como cáncer, enfermedades alérgicas, inflamaciones, afecciones con anomalía inmunológica, y enfermedades autoinmunes que incluyen linfocitos activados (entre otros, linfocitos T activados; pueden incluir linfocitos B activados), por administración de una muteína de galectina 9 modificada o agente terapéutico derivado de muteína de galectina 9 modificada (por ejemplo, composición que comprende, como un agente terapéutico, un polipéptido de muteína de galectina 9 modificada o un polinucleótido que codifica un polipéptido de muteína de galectina 9 modificada para expresión en el mamífero). Las enfermedades autoinmunes que pueden tratarse por el procedimiento y composiciones de la invención incluyen cualquier enfermedad autoinmune, o rechazo de trasplantes, incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, las enfermedades autoinmunes enumeradas en el presente documento. La muteína de galectina 9 modificada puede administrarse, por ejemplo, como un polipéptido expresado de forma recombinante, o como una variante, derivado o proteína de fusión de polipéptido de muteína de galectina 9 modificada, suministrado por vía local o sistémica al mamífero. La molécula de ácido nucleico (por ejemplo, ADN, ARN) que codifica muteína de galectina 9 modificada, o un derivado o variante de muteína de galectina 9 modificada, o una fusión de muteína de galectina 9 modificada, puede administrarse en un protocolo de terapia génica, como ADN plasmídico desnudo que incluye regiones reguladoras para expresión en el mamífero, o en un vector viral para expresión en el mamífero. El suministro de polipéptido de muteína de galectina 9 modificada para expresión puede conseguirse con un vehículo farmacéuticamente aceptable capaz de facilitar el suministro. El tratamiento de un mamífero que tiene una enfermedad autoinmune con un agente terapéutico derivado de muteína de galectina 9 modificada puede dar como resultado alivio o remisión de la enfermedad autoinmune, o ausencia de síntomas clínicos atribuibles a la autoinmunidad.

Aunque la invención no se limita a teorías sobre cómo funciona la invención como se desvela en el presente documento, se postulará de acuerdo con linfocitos T activados que provocan el auto-reconocimiento y daño posterior en autoinmunidad. Expresando muteína de galectina 9 modificada o provocando que se exprese la muteína de galectina 9 modificada, o administrando un agente terapéutico derivado de muteína de galectina 9 modificada, los linfocitos activados de interés se marcan como objetivo preferentemente para apoptosis recibiendo una acción del resto de muteína de galectina 9 modificada que se pone a disposición. El polipéptido de muteína de galectina 9 modificada o el agente terapéutico derivado de muteína de galectina 9 modificada puede administrarse en la región que muestra la autoinmunidad (por ejemplo, en la región localizada que caracterizó la enfermedad autoinmune

particular que se trata). Esto optimiza el contacto entre la muteína de galectina 9 modificada administrada u otros agentes terapéuticos y los linfocitos T activados que expresan diana, u otras células que son específicas para las dianas expresadas en las células de esa región. Las células de la región también son buenos candidatos para expresar, mediante la ayuda de un vehículo de suministro génico, un polinucleótido que codifique un polipéptido de muteína de galectina 9 modificada administrado a la región. Por lo tanto, en diversas permutaciones y aplicaciones de la invención, la expresión del polipéptido de muteína de galectina 9 modificada puede modificarse por ingeniería genética de forma recombinante para facilitar la expresión en células que están bajo ataque por los linfocitos T activados y otras células. Se ha propuesto en el caso de rechazo de trasplantes una fusión de polipéptido de muteína de galectina 9 modificada con una parte de unión de una molécula capaz de unirse a una proteína que se expresa de forma ubicua en las superficies celulares de muchos tipos celulares. Esta parte de unión puede ser, por ejemplo, heparina, y la molécula de la superficie celular a la que se une puede ser un glicosaminoglicano. Como alternativa, la parte de unión puede ser un dominio de unión de anticuerpo de cadena sencilla, específico para cualquier antígeno de superficie celular seleccionado.

Cuando los agentes de la invención y técnicas terapéuticas se aplican para obtener acciones citotóxicas en células tumorales incluyendo células tumorales malignas tales como cánceres, acciones antialérgicas, acciones antiinflamatorias, normalización de anomalía inmunológica y acciones inductoras de apoptosis en linfocitos activados (pueden incluir entre otros linfocitos T activados), la invención debería interpretarse del mismo modo que en el caso autoinmune anteriormente mencionado.

El término "administración" o "administrar" como se usa en el presente documento se refiere al procedimiento de suministrar, a un mamífero, un agente terapéutico, o una combinación de agentes terapéuticos. El procedimiento de administración puede variar, dependiendo del agente o agentes terapéuticos y el efecto deseado. Puede conseguirse administración por cualquier medio apropiado para el agente terapéutico, por ejemplo, por suministro parenteral u oral. El suministro parenteral puede ser, por ejemplo, subcutáneo, intravenoso, intramuscular, intraarterial, inyección al tejido de un órgano, mucosa, pulmonar, tópico, o basado en catéter. El medio oral es por la boca, incluyendo píldoras u otro medio de suministro gastrointestino, incluyendo un líquido potable. El suministro de la mucosa puede incluir, por ejemplo, suministro intranasal. El suministro pulmonar puede incluir inhalación del agente. La administración generalmente también incluye suministro con un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, un tampón, un polipéptido, un péptido, un conjugado de polisacárido, un liposoma, un lípido). Se considera que un protocolo de terapia génica incluye una administración en la que el agente terapéutico es un polinucleótido capaz de conseguir un objetivo terapéutico cuando se expresa como un transcripto o un polipéptido en el mamífero, y puede aplicarse a medios de suministro tanto parenterales como orales. Tales medios de administración se seleccionan como apropiados para la enfermedad que se trate. Por ejemplo, cuando la enfermedad se basa en un órgano, el suministro puede ser local y, por ejemplo, cuando la enfermedad es sistémica, el suministro puede ser sistémico. La "co-administración" se refiere a administración de uno o más agentes terapéuticos en el transcurso de un tratamiento dado de un paciente. Los agentes pueden administrarse con el mismo vehículo farmacéutico, o vehículos diferentes. Pueden administrarse por el mismo o diferentes medios de administración. Los agentes pueden ser el mismo tipo de agente o diferentes tipos de agentes, por ejemplo, los diferentes tipos pueden incluir polinucleótidos, polipéptido o moléculas pequeñas. El tipo de administración puede ser exactamente el mismo tiempo, o un agente terapéutico puede administrarse antes o después de otro agente. Por lo tanto, la co-administración puede ser simultánea o consecutiva. El protocolo exacto para una combinación dada de agentes terapéuticos se determina considerando los agentes y la afección que se trate, entre otras consideraciones.

La expresión "administración *in vivo*" se refiere a administración a un paciente (por ejemplo un mamífero), de un polinucleótido que codifica un polipéptido para expresión en el mamífero. En particular, la administración *in vivo* directa implica transfectar una célula de mamífero con una secuencia codificante sin retirar la célula del mamífero. Por lo tanto, la administración *in vivo* directa puede incluir inyección directa del ADN que codifica el polipéptido de interés en la región aquejada de la enfermedad autoinmune, dando como resultado expresión en las células del paciente. La expresión "administración *ex vivo*" se refiere a transfectar una célula (por ejemplo, una célula de una población de células que están bajo ataque autoinmune) después de que la célula se retire del paciente (por ejemplo un mamífero). Después de la transfección, la célula se reemplaza en el mamífero. Puede conseguirse administración *ex vivo* retirando células de un mamífero, opcionalmente seleccionando células para transformar (es decir, células bajo ataque por un mecanismo autoinmune), haciendo a las células seleccionadas incapaces de replicación, transformando las células seleccionadas con un polinucleótido que codifica un gen para expresión (es decir, muteína de galectina 9 modificada), incluyendo también una región reguladora para facilitar la expresión y situando las células transformadas de nuevo en el paciente para expresión de la muteína de galectina 9 modificada. La "cantidad terapéuticamente eficaz" es la cantidad que genera el resultado terapéutico deseado. Por ejemplo, si el efecto terapéutico deseado es una remisión de autoinmunidad, la cantidad terapéuticamente eficaz es la cantidad que facilita la remisión. La cantidad terapéuticamente eficaz puede ser por ejemplo una cantidad administrada en un protocolo de dosificación que incluyen días o semanas de administración. Cuando el agente terapéutico es una reducción de los efectos de una respuesta autoinmune en el mamífero, por ejemplo, durante las manifestaciones de síntomas de una enfermedad autoinmune, la cantidad eficaz de un agente para conseguir esto en el mamífero es la cantidad que da como resultado reducción de los síntomas de autoinmunidad.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo para administración de un agente terapéutico (por ejemplo, un polipéptido, polinucleótido, molécula pequeña, peptoide, péptido). Se refiere a cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición y que pueda administrarse sin toxicidad indebida. Dentro de otro aspecto de la invención, se proporcionan composiciones farmacéuticas, que comprenden un vector viral recombinante como se ha descrito anteriormente, en combinación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones farmacéuticas pueden prepararse como una solución líquida, o como una forma sólida (por ejemplo, liofilizada) que se suspende en una solución antes de la administración. Además, la composición puede prepararse con vehículos o diluyentes adecuados para administración en superficie, inyección, administración oral o rectal. Los vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables no son tóxicos para receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Los ejemplos representativos de vehículos o diluyentes para soluciones inyectables incluyen agua, soluciones salinas isotónicas que se tamponan preferentemente a un pH fisiológico (tales como solución salina tamponada con fosfato o solución salina tamponada con Tris), manitol, dextrosa, glicerol y etanol, así como polipéptidos o proteínas tales como albúmina de suero humano. Una composición particularmente preferida comprende un vector o virus recombinante en manitol 10 mg/ml, HSA 1 mg/ml, Tris 20 mM, pH 7,2 y NaCl 150 mM. En este caso, puesto que el vector recombinante representa aproximadamente 1 mg de material, puede ser menos del 1% de material de alto peso molecular, y menos de 1/100.000 del material total (incluyendo agua). Esta composición es estable a 20 °C durante al menos seis meses.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden incluir adicionalmente factores que estimulan la división celular y de este modo, captación e incorporación de un vector retroviral recombinante. Se describe conservación de virus recombinantes en la Patente de Estados Unidos Nº 5.792.643.

Todos los agentes terapéuticos que componen la terapia propuesta de la invención pueden incorporarse en una composición farmacéutica apropiada que incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable para el agente. El vehículo farmacéutico para los agentes puede ser el mismo o diferente para cada agente. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes que se metabolicen lentamente tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y virus inactivados en partículas. Tales vehículos se conocen bien por los expertos habituales en la materia. Las sales farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en los mismos, incluyen por ejemplo sales de ácidos inorgánicos tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos. Está disponible un análisis exhaustivo de excipientes farmacéuticamente aceptables en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J., Estados Unidos, 1991). Los vehículos farmacéuticamente aceptables en composiciones terapéuticas pueden contener líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Las sustancias auxiliares pueden incluir agentes humectantes o emulsionantes. Adicionalmente, pueden estar presentes sustancias tamponantes de pH en tales vehículos. Típicamente, las composiciones terapéuticas se preparan como inyectables, bien como soluciones o bien como suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de su inyección. Se incluyen liposomas dentro de la definición de un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un retrovirus recombinante o virus que porte una de las construcciones de vector anteriormente descritas, en combinación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición puede prepararse como una solución líquida, o como una forma sólida (por ejemplo, liofilizada) que se suspende en una solución antes de su administración. Además, la composición puede prepararse con vehículos o diluyentes adecuados para administración en superficie, inyección, administración oral o rectal.

Los vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables no son tóxicos para receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Los ejemplos representativos de vehículos o diluyentes para soluciones inyectables incluyen agua, soluciones salinas isotónicas que están preferentemente tamponadas a un pH fisiológico (tales como solución salina tamponada con fosfatos o solución salina tamponada con Tris), manitol, dextrosa, glicerol y etanol, así como polipéptidos o proteínas tales como albúmina de suero humano. Puede suministrarse un vector o virus recombinante en una composición farmacéutica en manitol 10 mg/ml, HSA 1 mg/ml, Tris 20 mM, pH 7,2 y NaCl 150 mM. En este caso, puesto que el vector recombinante representa aproximadamente 1 g de material, este puede ser menos del 1% de material de alto peso molecular y menos de 1/100.000 del material total (incluyendo agua). Esta composición es estable a 20 °C durante al menos seis meses. El vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable puede combinarse con los vehículos de suministro génico para proporcionar una composición como una solución líquida, o como una forma sólida (por ejemplo, liofilizada) que puede resuspenderse en una solución antes de su administración. Los dos o más vehículos de suministro génico se administran típicamente mediante vías directas tradicionales, tales como bucal/sublingual, rectal, oral, nasal, tópica (tal como transdérmica y oftálmica), vaginal, pulmonar, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, intraocular, intranasal o intravenosa, o indirectamente.

El fármaco terapéutico de la presente invención puede incluir opcionalmente, por ejemplo, polinucleótidos para expresión en el mamífero. Dichos fármacos terapéuticos pueden formularse en un comprimido con revestimiento entérico o cápsula de gel de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. Estos se describen en los

siguientes documentos de patente: Patente de Estados Unidos Nº 4.853.230, documentos EP 225.189, AU 9.224.296, AU 9.230.801 y WO 92144.52. Dicha cápsula se administra por vía oral para dirigirse al intestino. De 1 a 4 días después de la administración oral, se mide la expresión del polipéptido, o inhibición de la expresión por, por ejemplo, una ribozima o un oligonucleótido antisentido, en el plasma y la sangre, por ejemplo mediante anticuerpos para las proteínas expresadas o no expresadas.

El vehículo de suministro génico puede introducirse en un mamífero, por ejemplo, por inyección, pistola de partículas, administración tópica, administración parenteral, inhalación o suministro por iontoporesis, como se describe en las Patentes de Estados Unidos Nº 4.411.648, 5.222.936, 5.286.254, documento WO 94/05369. La composición terapéutica o agente terapéutico puede administrarse con otros agentes terapéuticos capaces de combatir tumores incluyendo tumores malignos tales como cánceres, o aliviar alergia, inflamación, anomalía inmunológica o la enfermedad autoinmune, o capaces de potenciar los beneficios terapéuticos de la administración de un agente terapéutico de mutéína de galectina 9 modificada. Por ejemplo, la administración para tratamiento de una reacción alérgica puede ser por administración de aerosol de polinucleótido de mutéína de galectina 9 modificada para la expresión en las células presentes en tejido tal como tejido mucoso, nasal, bronquial o pulmonar, y pueden administrarse de forma más favorable en administraciones repetidas, por ejemplo por pulverización nasal o de aerosol varias veces diariamente durante un periodo de tiempo hasta que disminuya la reacción alérgica. El vehículo de suministro génico puede administrarse en un sitio único o múltiples sitios directamente a un mamífero, por ejemplo por inyección directa o, como alternativa, a través del uso de células dianas transducidas *ex vivo*. La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas (incluyendo, por ejemplo, diversos excipientes) adecuadas para administrar los vehículos de suministro génico.

Una construcción de vector que dirige la expresión de un polipéptido de mutéína de galectina 9 modificada, variante, derivado, análogo, mutante o químera del mismo puede administrarse directamente a un sitio del tumor que contiene tumor maligno tal como cáncer, o un sitio que muestre alergia, inflamación, anomalía inmunológica o autoinmunidad, por ejemplo el páncreas, riñón, hígado, articulaciones, cerebro, el líquido cefalorraquídeo, piel u otra región u órgano del cuerpo. Pueden usarse diversos procedimientos dentro del contexto de la presente invención para administrar directamente la construcción de vector. Por ejemplo, pueden identificarse arterias que actúan en la región, e inyectarse el vector en dicha arteria, para suministrar el vector directamente al sitio. De forma similar, la construcción de vector puede administrarse directamente a la superficie de la piel, por ejemplo, mediante aplicación de una composición farmacéutica tópica que contenga la construcción de vector.

En una administración directa, pueden administrarse juntos agentes terapéuticos de combinación incluyendo un agente terapéutico de mutéína de galectina 9 modificada y otros agentes anti-autoinmunes. La co-administración puede ser simultánea, conseguida por ejemplo situando polinucleótidos que codifican los agentes en el mismo vector, o poniendo los agentes, bien polinucleótido, polipéptido u otro fármaco, en la misma composición farmacéutica o administrando los agentes en diferentes composiciones farmacéuticas inyectadas aproximadamente al mismo tiempo, y quizás en la misma localización. Si la co-administración no es simultánea (por ejemplo, en el caso de administración del profármaco después de la administración del activador del profármaco), el segundo agente puede administrarse por inyección directa según sea apropiado para los objetivos de la terapia. Por lo tanto, por ejemplo, en el caso de una administración de un profármaco, el profármaco se administra en la misma localización que el activador de profármaco. El protocolo de co-administración puede incluir una combinación de administraciones para conseguir el objetivo de la terapia. Además, la co-administración puede incluir administraciones posteriores según sea necesario, por ejemplo, administraciones por inyección directa *in vivo* repetidas de una mutéína de galectina 9 modificada.

Dentro del contexto de la presente invención, debería entenderse que las células retiradas pueden devolverse al mismo animal o a otro animal o mamífero alogénico. En tal caso, es generalmente preferible tener animales con histocompatibilidad coincidente (aunque no siempre, véase, por ejemplo, Yamamoto y col., AIDS Research and Human Retroviruses, 7: 911-922 (1991); Yamamoto y col., Journal of Virology, 67: 601-605 (1993)).

Las células pueden retirarse de una diversidad de localizaciones en el paciente. Además, dentro de otras realizaciones de la invención, puede insertarse una construcción de vector en, por ejemplo, células de la piel (fibroblastos dérmicos) o de la sangre (por ejemplo, leucocitos de sangre periférica). Si se desea también pueden retirarse específicamente fracciones particulares de células tales como un subconjunto de linfocitos T o células madre de la sangre (véase, por ejemplo, documento WO 91/16116). Despues pueden ponerse en contacto construcciones de vector con las células retiradas utilizando cualquiera de las técnicas anteriormente descritas, seguido de la devolución de las células al animal de sangre caliente, preferentemente a o cerca de la región que muestra autoinmunidad.

Una vez que se ha diagnosticado al paciente, por ejemplo un mamífero, la práctica de la invención incluye proporcionar un agente terapéutico de mutéína de galectina 9 modificada, y administrarlo al mamífero de una manera y a una dosis apropiada para la enfermedad particular que se trata (por ejemplo, tumores, enfermedades alérgicas o autoinmunes), y supervisar el mamífero para determinar la necesidad de administraciones continuadas o modificadas del agente terapéutico. La práctica de la invención se consigue identificando la enfermedad para tratar, y determinando el tipo celular probable o región del cuerpo a la que pueda aplicarse una terapia génica diana. Se construye el polinucleótido de mutéína de galectina 9 modificada, incluyendo un plásmido con regiones reguladoras

para expresión en el mamífero, o un vector viral para la expresión. Algunas de las células de mamífero pueden retirarse, transfectarse con el polinucleótido que codifica muteína de galectina 9 modificada y reemplazarse en el mamífero para expresión de muteína de galectina 9 modificada. Como alternativa el polinucleótido puede administrarse a un mamífero, por ejemplo en la región en la que se manifiesta la enfermedad, para expresión en las células de un mamífero en esa región.

Por lo tanto, por ejemplo, en el caso de células de tumor maligno, las células tumorales en tejidos u órganos enfermos pueden transfectarse *in vivo* o *ex vivo* con muteína de galectina 9 modificada. Además, por ejemplo, en el caso de artritis reumatoide, las células sinoviales pueden transfectarse *ex vivo* con muteína de galectina 9 modificada.

10 Por ejemplo, en el tratamiento de esclerosis múltiple, puede inyectarse muteína de galectina 9 modificada en la región del cerebro que está afectada para facilitar la expresión de muteína de galectina 9 modificada en las células que están bajo ataque por los linfocitos T activados en un tipo de reacción autoinmune. Además, por ejemplo, en el caso de esclerosis múltiple, puede inyectarse localmente ADN de muteína de galectina 9 modificada en el cerebro del mamífero, o pueden retirarse células del líquido cefalorraquídeo, transfectarse con ADN de muteína de galectina 9 modificada y devolverse a la región de la médula espinal. Además, por ejemplo, para tratar a un mamífero que tenga síndrome de Sjögren, el órgano afectado por la enfermedad se selecciona para administración de polipéptido de muteína de galectina 9 modificada por inyección. Además, por ejemplo, para mamíferos que padecen síndrome de Sjögren, puede identificarse el órgano afectado, por ejemplo el riñón, y administrarse ADN de muteína de galectina 9 modificada directamente al órgano, o retirarse células del órgano, transfectarse y reemplazarse en el cuerpo para expresión de muteína de galectina 9 modificada en esas células en el mamífero.

20 Por ejemplo, en el caso de prevenir rechazo de trasplantes, el animal que va a recibir el trasplante puede recibir administración localizada o sistémica de un agente terapéutico de muteína de galectina 9 modificada para destruir cualquier célula del paciente activada que ataque a las células, tejido u órgano ajeno, o un polipéptido de muteína de galectina 9 modificada puede expresarse en células en la superficie externa del órgano justo antes del trasplante, para proteger el órgano una vez que esté dentro del cuerpo del paciente. La administración continuada del agente terapéutico de muteína de galectina 9 modificada puede ser necesaria mientras que el sistema inmunitario del receptor se ajusta a las células, tejido u órgano ajenos.

25 Se espera que el agente terapéutico de muteína de galectina 9 modificada actúe de forma análoga a la galectina 9 nativa (galectina 9 natural). En consecuencia, se usará para provocar una reacción apoptótica en las células. Por lo tanto, de forma estequiométrica, el especialista clínico será capaz de conocer la cantidad de muteína de galectina 9 modificada que necesita expresarse o administrarse de otro modo al mamífero para conseguir apoptosis. Dentro de otros aspectos de la presente invención, las construcciones de vector descritas en el presente documento también pueden dirigir la expresión de genes no derivados de vectores adicionales. Por ejemplo, un sistema de profármaco aplicado junto con administración de muteína de galectina 9 modificada puede actuar como un mecanismo de seguridad para la terapia génica, o puede actuar como un agente terapéutico de combinación.

30 Como un mecanismo de seguridad, el activador de profármacos se expresa en un vector junto con la muteína de galectina 9 modificada. Cuando se determina que el sistema debería detenerse, se administra el profármaco y se activa el activador del profármaco. Esto permite al especialista clínico una cantidad de control sobre la terapia génica. El sistema de profármaco/activador de profármaco puede ser útil para inactivar las células transfectadas en 35 un mamífero, cuando, por ejemplo, la autoinmunidad empeora por la expresión de muteína de galectina 9 modificada. El sistema de profármaco/activador de profármaco también puede administrarse como agente terapéutico de combinación, en un protocolo de terapia de combinación, para conseguir muerte celular usando la activación de profármaco proporcionada por el sistema de profármaco/activador de profármaco. La terapia que incluye administración de un polinucleótido que codifica un polipéptido de muteína de galectina 9 modificada, junto con un activador de profármaco y profármaco, también puede ser inmunomoduladora. La "inmunomoduladora" se refiere a uso de factores que, cuando se fabrican por una o más de las células implicadas en una respuesta inmune o que, cuando se añaden de forma exógena a las células, provoca que la respuesta inmune sea diferente en calidad o potencia de la que se habría producido en ausencia del factor. La calidad o potencia de una respuesta puede medirse por una diversidad de ensayos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo, por ejemplo, ensayos *in vitro*, que miden la proliferación celular (por ejemplo, captación de ^{3}H timidina), y ensayos citotóxicos *in vitro* (por ejemplo, que miden la liberación de ^{51}Cr) (véase, Warner y col., AIDS Res. and Human Retroviruses, 7: 645-655 (1991)). Los factores inmunomoduladores pueden estar activos tanto *in vivo* como *ex vivo*. Los ejemplos representativos de tales factores incluyen citocinas, tales como interleucinas 2, 4, 6, 12 y 15 (entre otras), α -interferones, β -interferones, γ -interferones, GM-CSF, G-CSF, y factores de necrosis tumoral (TNF). Otros factores inmunomoduladores incluyen, por ejemplo, CD3, ICAM-1, ICAM-2, LFA-1, LFA-3, moléculas de MHC de clase I, moléculas de MHC de clase II, β_2 -microglobulina, chaperonas o análogos de los mismos. Si el vehículo de suministro genético, sin embargo, no expresa un cofactor inmunomodulador que es una citocina, esta citocina puede incluirse en las composiciones anteriormente descritas, o puede administrarse por separado (simultánea o posteriormente) con las composiciones anteriormente descritas. Brevemente, dentro de dicha realización, el cofactor inmunomodulador se administra preferentemente de acuerdo con protocolos convencionales y dosificaciones conocidas en la técnica. Por ejemplo, puede administrarse interferón- α a una dosificación de 100 a 5.000.000 unidades/día durante 2 a 4

meses, e IL-2 a una dosificación de 10.000 a 100.000 unidades/kg de peso corporal, 1 a 3 veces/día durante 2 a 12 semanas. Puede administrarse Interferón γ a dosificaciones de 150.000 a 1.500.000 unidades 2 a 3 veces/semana durante 2 a 12 semanas por ejemplo, para regular positivamente la expresión de un gen implicado en linfocitos T activados para conseguir terapia más eficaz con la administración de muteína de galectina 9 modificada.

- 5 Como un agente terapéutico de combinación, el activador de profármaco puede expresarse a partir de su propio vector, o a partir del mismo vector que el polipéptido de muteína de galectina 9 modificada. Cada sistema de vector (un vector único, o dos vectores) puede administrarse por medios *in vivo* o *ex vivo*. En una terapia autoinmune, por ejemplo, la adición del activador de profármaco facilita un efecto inmunomodulador adicional que soporta el efecto conseguido por la muteína de galectina 9 modificada y, además, la adición del profármaco puede activar la destrucción de células transfectadas.

10 Puede administrarse una molécula de chaperona antes, de forma contemporánea con o después de la administración del compuesto terapéutico polinucleótido, y la molécula de chaperona puede ser, por ejemplo, una proteína de choque térmico, tal como, por ejemplo, hsp70. Además, el polinucleótido que se expresa en el mamífero puede ligarse a un promotor inducible, por ejemplo, un promotor específico de tejido, para el fin de, por ejemplo, asegurar la expresión del polinucleótido solamente en las células diana deseadas. Adicionalmente, para el fin de suministrar de forma eficaz el polinucleótido a un tejido, el polinucleótido puede flanquearse por secuencias de nucleótidos adecuadas para integración en genoma de las células de ese tejido.

15 Para este y muchos otros aspectos de la invención, la eficacia del tratamiento de seres humanos puede ensayarse en primer lugar en modelos animales para una enfermedad autoinmune dada. Dichos modelos animales existentes incluyen los de las siguientes enfermedades autoinmunes: por ejemplo, síndrome de Sjögren (dacroadenitis autoinmune o sialadenitis mediada por inmunidad), miocarditis autoinmune, cirrosis biliar primaria (PBC), enfermedad cardíaca inflamatoria, autoinmunidad renal inducida por mercurio, diabetes mellitus insulinodependiente (diabetes de tipo I o IDD), autoinmunidad pos-timectomía, un trastorno de desmielinización del sistema nervioso central (SNC), lupus de SNC, narcolepsia, miastenia grave (MG), enfermedad de Grave, un trastorno del SNP mediado por inmunidad, osteoartritis, artritis reumatoide, uveítis, fibrosis quística medular, enfermedad hemolítica autoinmune, vasculitis autoinmune, enfermedad autoinmune ovárica, esclerodermia humana y otras enfermedades relacionadas con autoinmunidad.

20 Los múltiples vehículos de suministro génico pueden administrarse a animales o plantas. En realizaciones preferidas, el animal es un animal de sangre caliente, más preferentemente seleccionado del grupo que consiste en ratones, pollos, vacas, cerdos, mascotas tales como gatos y perros, caballos y seres humanos. Para compuestos terapéuticos polipeptídicos, por ejemplo, muteína de galectina 9 modificada u otra citocina, la dosificación puede estar en el intervalo de aproximadamente 5 a 50 µg/kg de peso corporal de mamífero, también de aproximadamente 50 µg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, de aproximadamente 100 a 500 µg/kg de peso corporal del mamífero y de aproximadamente 200 a aproximadamente 250 µg/kg.

25 30 35 40 45 Para compuestos terapéuticos polinucleotídicos, por ejemplo un polinucleótido que codifique un polipéptido de muteína de galectina 9 modificada nativo o mutante, dependiendo de la expresión del polinucleótido en el paciente, por ejemplo, un mamífero, para administración dirigida a tejido, pueden administrarse vectores que contengan construcciones expresables de secuencias codificantes, o secuencias no codificantes, en un intervalo de: aproximadamente 100 ng a aproximadamente 200 mg de ADN para administración local en un protocolo de terapia génica, también de aproximadamente 500 ng a aproximadamente 50 mg, también de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2 mg de ADN, de aproximadamente 5 µg de ADN a aproximadamente 500 µg de ADN, y de aproximadamente 20 µg a aproximadamente 100 µg durante una administración local en un protocolo de terapia génica y, por ejemplo, una dosificación de aproximadamente 500 µg por inyección o administración. Cuando se desee mayor expresión, sobre una mayor área de tejido, pueden requerirse mayores cantidades de ADN o las mismas cantidades readministradas en un protocolo sucesivo de administraciones, o varias administraciones a diferentes partes de tejido adyacentes o cercanas de, por ejemplo, un sitio de tumor, para efectuar un resultado terapéutico positivo.

50 55 Para administración de moléculas pequeñas terapéuticas, dependiendo de la potencia de la molécula pequeña, la dosificación puede variar. Para un inhibidor muy potente, pueden ser suficiente niveles de dosis por kilogramo de mamífero, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 500 mg/kg de peso de mamífero y de aproximadamente 100 µg/kg a aproximadamente 5 mg/kg y de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 50 µg/kg y, por ejemplo, de aproximadamente 10 µg/kg. Para administración de péptidos y peptoides la potencia también afecta a la dosificación, y puede estar en el intervalo de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 500 mg/kg de peso de mamífero, y de aproximadamente 100 µg/kg a aproximadamente 5 mg/kg y de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 50 µg/kg y una dosis habitual podría ser de aproximadamente 10 µg/kg.

Los niveles de dosis de dichos componentes activos pueden variar dentro de un amplio intervalo. Se emplearán niveles de dosis y ciclos de administración específicos para cualquier paciente particular dependiendo de una diversidad de factores incluyendo la actividad de compuestos específicos empleados, el sexo, edad, peso corporal,

salud general, dieta, momento de administración, vía de administración, tasa de excreción, combinación farmacológica y la gravedad de la enfermedad particular que se somete a terapia.

Para la fabricación de composiciones y preparaciones farmacéuticas, los aditivos, otros materiales, procedimientos de preparación pueden seleccionarse de los desvelados en Nippon Yakkyokuho Kaisetsusho Henshu linkai (Ed.),

5 "14^a Edición Nippon Yakkyokuho Kaisetsusho (Comentarios sobre la Farmacopea Japonesa 14^a Edición (JPXIV))", 27 de junio de 2001, Hirokawa Pub. Co., Tokio, Japón; Hisashi Ichibagade y col. (Ed.), "Iyakuhin no Kaihatsu (Investigación y Desarrollo Farmacéutico, Ikuo Suzuki, editor en jefe), Volumen 12 (Seizai Sozai I (Necesidades farmacéuticas 1))", 15 de octubre de 1990, Hirokawa Pub. Co., Tokio, Japón; misma referencia, Volumen 12 (Seizai Sozai II (Necesidades farmacéuticas 2)), 28 de octubre de 1990, Hirokawa Pub. Co., Tokio, Japón, dependiendo de la necesidad, y pueden adaptarse consultando las divulgaciones de los mismos documentos. Las sustancias activas o componentes de acuerdo con la presente invención incluyen (a) variantes y polipéptidos de galectina 9 modificada que tienen actividad biológica sustancialmente equivalente a la de dicha variante de Gal-9 modificada, (b) polinucleótidos que codifican variantes o polipéptidos de Gal-9 modificada que tienen actividad biológica sustancialmente equivalente a la de la variante de Gal-9 modificada, (c) factores descubiertos por aplicaciones de

10 técnicas variantes de galectina 9 modificada, y (d) vehículos para transferencia de genes que codifican variantes o polipéptidos de Gal-9 modificada que tienen actividad biológica sustancialmente equivalente a la de la variante de Gal-9 modificada, como se describe en el presente documento. Estas sustancias y componentes son útiles para utilizar las siguientes propiedades de galectina-9 humana: ejercer citotoxicidad hacia células tumorales, pero no

15 hacia células normales; inducir apoptosis en células tumorales, pero no en células normales; inhibir metástasis de células malignas; e inducir apoptosis en células inmunitarias activadas, en particular, en linfocitos T positivos para CD4 activados, pero no en linfocitos T en reposo, en particular, en linfocitos T positivos para CD4 (linfocitos T auxiliares). Por lo tanto, las sustancias y componentes anteriormente mencionados son prometedores para actuar como fármacos que utilizan actividades similares a las de agentes antineoplásicos, agentes antialergia, inmunorreguladores (inmunomoduladores), agentes terapéuticos para enfermedades autoinmunes, agentes antiinflamatorios y hormonas esteroideas adrenocorticales.

20 A partir de la eficacia biológica que se ha afirmado por la aplicación de los componentes activos de la presente invención, incluyendo, por ejemplo, proteínas Gal-9 modificadas (entre otras G9NC(nula)), galectina 9 y proteínas de galectina 9 modificada (entre otras G9NC(nula)), se cree que son biológicamente activas y provechosamente útiles en prevención o tratamiento de al menos un trastorno, enfermedad o afección patológica como sigue: las enfermedades y trastornos inflamatorios incluyen una diversidad de inflamaciones agudas o crónicas que se producen en diversos órganos, inflamaciones alérgicas o autoinmunes y enfermedades infecciosas.

25 Las enfermedades y trastornos agudos y crónicos incluyen inflamaciones del pulmón, tales como bronquitis, bronconeumonía, neumonía intersticial, neumonitis, bronquiolitis y mediastinitis aguda; inflamaciones de otros órganos diversos, incluyendo, por ejemplo, pericarditis, endocarditis, miocarditis, estomatitis, estomatitis angular, 30 tonsilitis, faringitis, laringitis, esofagitis, peritonitis, gastritis aguda, gastritis crónica, enteritis aguda, apendicitis, colitis isquémica, colitis inducida por fármaco y proctitis; diversas inflamaciones agudas o crónicas del hígado, tales como hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis fulminante y hepatitis aguda; cirrosis; colecistitis; pancreatitis aguda, 35 pancreatitis crónica; nefritis aguda o crónica, glomerulonefritis membranosa, glomerulonefritis, nefritis de IgA; una diversidad de cistitis, encefalomielitis, mastitis, dermatitis, queratitis superficial, queratoconjuntivitis xerótica, una diversidad de otitis media y rinitis, sinusitis paranasal, pólipos nasales; gingivitis, periodontitis y otros trastornos inflamatorios del periodonto; otras inflamaciones diversas y variadas.

40 Se reconoce que son potentes y eficaces en la prevención o tratamiento de inflamaciones neurogénicas, tales como gastritis neurogénica y cistitis neurogénica. Por ejemplo, se ha verificado en el ejemplo 8 en el presente documento que la galectina 9 inhibe de forma potente respuestas inflamatorias en modelos de inflamación neurogénica de la piel inducida por capsaicina. La capsaicina es una sustancia que excita nerviosos aferentes, provocando inflamación neurogénica y dolor. La capsaicina estimula la liberación de sustancia P, un neuropéptido almacenado por los extremos de fibras sensoriales C. La sustancia P induce la liberación de histamina de mastocitos, dando como resultado de este modo dilatación de los vasos sanguíneos para formar edema. Los nervios sensoriales se estimulan por histamina liberada. Como resultado, se formará un ciclo de cascada en el que se libera sustancia P de extremos de fibras C y actúa en mastocitos circundantes, dando como resultado de este modo más liberación de histamina. 45 Las galectinas ejercen acciones inhibidoras en dicho proceso patogénico. Además, la capsaicina se une a un receptor de capsaicina (receptor vainilloide, un sensor del dolor en terminaciones nerviosas sensoriales), provocando dolor. El dolor está causado por la activación de terminaciones nerviosas sensoriales con estímulos químicos (ácido), estímulos térmicos (agua caliente) y estímulos mecánicos excesivos (por un golpe) en las terminales nerviosas sensoriales. El receptor de capsaicina está implicado en dolor que surge de tales estímulos. 50 Por lo tanto, se sugiere que Gal-9 inhibe la activación mediada por receptor de capsaicina de terminaciones nerviosas. Por lo tanto, son muy prometedores en aplicaciones analgésicas incluyendo alivio del dolor asociado con cáncer e inflamación.

55 Las enfermedades inflamatorias asociadas con alergia incluyen anafilaxis sistémica o generalizada, asma bronquial, neumonitis de hipersensibilidad, polenosis, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, enfermedades alérgicas inducidas por complejo inmune, edema angioneurótico. Las enfermedades inflamatorias relacionadas con autoinmunidad (enfermedades autoinmunes) incluyen enfermedades sistémicas (artritis reumatoide crónica, lupus eritematoso

- sistémico, poliarteritis nodosa, esclerodermia, polimiositis/dermatomiositis, síndrome de Sjögren y enfermedad de Behcet), enfermedades del sistema nervioso (esclerosis múltiple, miastenia grave, HAM (mielosis por HTLV-1) y esclerosis lateral amiotrófica), enfermedades endocrinas (enfermedad de Basedow, tiroiditis de Hashimoto y diabetes de tipo 1), enfermedades de la sangre (púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica autoinmune y anemia aplásica), enfermedades respiratorias (sarcoidosis y fibrosis pulmonar idiopática), enfermedades gastrointestinales (colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), enfermedades hepáticas (hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria y colangitis autoinmune) y enfermedades del sistema del tracto urinario/renal (nefritis asociada con anticuerpos citoplasmáticos anti-neutrófilos, angitis, síndrome de Goodpasture y enfermedad de anticuerpos de membrana basal anti-glomerulares).
- 10 La infección es un término general para el resultado de la invasión de las células, tejidos y órganos corporales por patógenos. Se desvelan enfermedades infecciosas en Supervisor: Rikuo MACHINAMI, Editor: Junichi HATA y Atsuhiko SAKAMOTO, "Hyoujun Byourigaku, 2^a Edición", Igaku-Shoin Ltd., Japón (15 de marzo de 2002; ISBN4-260-10359-8). El patógeno que provoca infección en seres humanos se selecciona del grupo que consiste en 1) bacterias (incluyendo espiroquetas, clamidias y Rickettsia), 2) virus, 3) hongos, 4) plantas (algas), 5) protozoos, 6) parásitos (Digenea (distomos o trematodos), céstodos (tenias), nematodos) y 7) artrópodos. Las enfermedades principales que resultan de la presencia o actividad del patógeno incluyen bacteriosis (cólera, peste, infección por *Escherichia coli*, espiroquetosis (leptospirosis), clamidiosis (psitacosis), infecciones por rickettsia (*Rickettsia prowazekii*, tétanos), infecciones virales (herpes zóster, fiebre hemorrágica viral, rabia), micosis (candidiasis, criptococcosis, aspergilosis), enfermedades protozoarias (disentería amébica, malaria, toxoplasmosis), parasitosis (distomiasis, nematodiasis), infecciones por micoplasma (neumonía de micoplasma), micobacteriosis (tuberculosis, micobacteriosis atípica) y otras infecciosas.
- 15 Los sarcomas y cánceres incluyen tumores cerebrales (glioblastoma multiforme), tumores medulares, carcinoma del seno maxilar, adenocarcinoma ductal pancreático, cánceres de la encía, cánceres de la lengua, cánceres del labio, cánceres nasofaríngeos, cánceres orofaríngeos, cánceres hipofaríngeos, cánceres laríngeos, cánceres de tiroides, cánceres de paratiroides, cánceres de pulmón, tumores pleurales, peritonitis carcinomatosa, pleuresía carcinomatosa, cánceres esofágicos, cánceres de estómago, cánceres de colon, cánceres de los conductos biliares, cánceres de la vesícula biliar, cánceres pancreáticos, cánceres de hígado, cánceres renales, cánceres de la vejiga urinaria, cánceres prostáticos, cánceres del pene, tumores testiculares, cánceres adrenales, cánceres cervicales, cánceres endometriales, cánceres vaginales, cánceres vulvares, cánceres ováricos, corioepiteloma, tumores de hueso malignos, sarcoma de partes blandas, cánceres de mama, cánceres de la piel, melanoma maligno, tumores de células basales, leucemia, mielofibrosis asociada con metaplasia mieloide agnogénica, linfoma maligno, enfermedad de Hodgkin, plasmacitoma y glioma.
- 20 Los componentes activos de la presente invención son útiles en aplicaciones dermatológicas.
- 25 Por ejemplo, 1) las enfermedades de la piel y afecciones cutáneas anómalas incluyen infecciones de la piel, inflamaciones de la piel incluyendo inflamaciones alérgicas e inflamaciones autoinmunes; y enfermedades de la piel con características inflamatorias, tales como psoriasis, hidroa, pustulosis, queratinización y queratosis. Además, las aplicaciones cosméticas y de cuidado de la piel incluyen:
- 30 a) control del metabolismo de melanina (blanqueamiento de la piel)
- 35 - - - las células de melanoma transferidas con el gen de galectina 9 que se vuelven blancas a partir de tonos negros. Las células positivas para galectina 9 están presentes en la capa de células basales de la piel.
- 40 b) control de crecimiento del cabello (tricógeno)
- 45 - - - la galectina 9 se expresa en el sitio de la raíz del cabello de una manera dependiente del tiempo. Los cabellos crecen extremadamente bien en un ratón al que se ha transferido gen de galectina 9 en comparación con un ratón al que se ha transferido gen de galectina 9 mutante.
- 50 c) control de la producción de colágeno
- 55 - - - los fibroblastos expresan galectina 9 en respuesta a una diversidad de estímulos. Están presentes partes positivas para galectina 9 en tejidos conectivos fibrosos.
- Las enfermedades relacionadas con el estilo de vida incluyen hipercolesterolemia, arteriosclerosis, hipertensión, diabetes. Se ha clarificado que están presentes células positivas para gal9 y negativas para gal9 en células espumosas, implicadas en la formación de arteriosclerosis, enfermedad relacionada con el estilo de vida. A partir de esto, se sugiere que gal9 participa en la afección patológica de la arteriosclerosis. Por lo tanto, no puede negarse que permita la prevención y terapia de la enfermedad mediante su control.
- Para hipertensión, cuando se produce la aparición de hipertensión en modelos animales experimentales, la expresión de galectina 9 se potenciará en los túbulos uriníferos y glomérulos. Por lo tanto, la regulación de la expresión de galectina 9 y administración de galectina 9 pueden permitir aciertos terapéuticos.

Los componentes activos de la presente invención también son aplicables al mantenimiento de una flora bacteriana normal. Por ejemplo, gal9 se expresa de forma intensa en epitelio intestinal incluso en condiciones normales. Cuando se administra mala flora bacteriana, la expresión de galectina 9 se potencia en el epitelio intestinal y células inflamatorias tales como macrófagos.

- 5 A partir de esto, se sugiere claramente que la galectina 9 participará en el mantenimiento de la flora bacteriana normal en los conductos digestivos. Los componentes activos de la presente invención pueden aplicarse a amiloidosis. Por ejemplo, hay macrófagos que expresan galectina 9 entre los que están en un sitio en el que puede percibirse amiloidosis. Por lo tanto, es posible controlar la deposición de amiloides con galectina 9. Los componentes activos de la presente invención son útiles en la prevención o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, osteoporosis, fractura de huesos. Por ejemplo, en el cerebro de un paciente con enfermedad de Alzheimer, las células nerviosas degenerativas aparecen como positivas para galectina 9. Por lo tanto, es posible usarla para terapia y diagnóstico. Para osteoporosis, puede verse que la galectina 9 puede prevenir la absorción de hueso y facilitar la formación de hueso. Se cree que tales acciones son adecuadas para fármacos óptimos en consideración del metabolismo óseo.
- 10 15 Los componentes activos de la presente invención son útiles en el cerebro y áreas nerviosas. Por ejemplo, el desarrollo de lesiones isquémicas, tales como infarto cerebral e infarto de miocardio, acompaña la infiltración de células inflamatorias, conduce a la aparición de producción de superóxido y lleva a un deterioro. Puede esperarse que la galectina 9 y muteína de galectina 9 modificada puedan regular dicha inflamación. La enfermedad desmielinizante que está provocada por inflamación y alteración del sistema inmunitario incluye, por ejemplo, 20 esclerosis múltiple. La enfermedad degenerativa también incluye esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson. Se ha dicho que la esquizofrenia puede estar causada por alteración inflamatoria. Es decir, se usa EPA (ácido eicosapentanoico) para controlar la reacción inflamatoria en el cerebro y formar membranas de células nerviosas. Hay ejemplos de estudios que revelan que el EPA y otros ácidos grasos esenciales en membranas celulares están agotados en pacientes con esquizofrenia. Se puede anticipar que la galectina 9 y muteína de 25 galectina 9 modificada pueden ser eficaces en la gata.

Puede esperarse que la galectina 9 y muteína de galectina 9 modificada puedan ser eficaces en el control de inflamación aguda con un dolor grave, debido a deposición tisular de cristales de ácido úrico.

El asma es una enfermedad del sistema respiratorio en el que se produce obstrucción de las vías respiratorias reversible (ataque asmático). El trastorno es una afección en el que las vías respiratorias desarrollan sensibilidad aumentada a estímulos específicos de antígeno o no específicos (alérgeno, infección, aire frío). En años recientes, se ha demostrado que hay inflamaciones en las que los eosinófilos, linfocitos T y mastocitos predominan incluso durante un estadio estable sin ataque de asma en las vías respiratorias. Se cree ahora que la parte principal del asma es bronquitis crónica. La mayoría de las enfermedades de asma pediátrica están cercanamente relacionadas con una causa de atopía (producción de IgE), por ejemplo, asma atópica, y se reconoce que los casos en los que la implicación de IgE en asma de adultos no es demostrable son aproximadamente la mitad (asma no atópica). Se han preparado directrices sobre la profilaxis y tratamiento del asma (1998 Ministerio de Salud y Bienestar (MHW), Comité de Investigación, Japón), en las que los tratamientos del asma se clasifican en dos técnicas, una para ataques agudos y la otra para enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias crónica. Los compuestos terapéuticos para ataques de asma incluyen broncodilatadores (agonistas de β_2 , aminofilina), que son fármacos de primera línea. Sin embargo, estos fármacos son insuficientes para medicar en ataques moderados o graves, para los que se aplican fármacos esteroideos de dosis alta por administración sistémica. Los fármacos esteroideos tienen efectos secundarios potentes, incluyendo úlcera péptica especialmente grave, hipertensión, hiperglicemia y síntomas psicogénicos. Cuando los esteroides se aplican durante mucho tiempo, las enfermedades infecciosas, actuación deprimida de la glándula adrenal, osteoporosis y otros síntomas se convertirán en problemas. Además, cuando el trastorno se asocia con complicaciones, el uso de esteroides está acompañado de riesgos. Se requiere desarrollar fármacos con eficacia equivalente al esteroide y reacción menos adversa. La esencia de las medicaciones a largo plazo para enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias es un fármaco antiinflamatorio. Se recomienda entre otros el uso de fármacos esteroideos inhalados. Cuando los fármacos esteroideos se aplican durante un periodo largo a niveles de dosis alta, no se puede negar que se pueden producir efectos secundarios perjudiciales tales como actuación deprimida de la glándula adrenal, osteoporosis e infección de las vías respiratorias. Además, los fármacos inhalados requieren técnicas de inhalación exactas y tienen malos resultados de conformidad en comparación con fármacos orales. Además de medicaciones con fármacos esteroideos inhalados, se recomienda tratar el asma moderado o grave con una combinación de agonistas de β_2 inhalados, modificadores de leucotrienos (antagonistas de leucotrienos) o fármacos de teofilina de liberación prolongada. Es inevitable la administración de esteroides sistémicos en pacientes con asma grave. Se requiere desarrollar fármacos alternativos para tales fármacos. Se sabe que la infiltración de linfocitos T y eosinófilos en tejido de pulmón y las vías respiratorias desempeñan un papel importante en la formación de enfermedad de asma. La galectina 9 actúa en la inducción de apoptosis de células, e induce apoptosis de linfocitos T activados y eosinófilos. A la vista de estudios en los que se emplean muteínas de galectina 9 modificada y otros materiales en la presente invención basándose en estos, se ha clarificado que la galectina 9 y muteína de galectina 9 modificada están activas en el alivio (inhibición) de síntomas inflamatorios de las vías respiratorias asociadas con asma.

Además, la galectina 9 y muteína de galectina 9 modificada tienen actividad de potenciación del crecimiento y diferenciación de osteoblastos e inhibición de la diferenciación de osteoclastos, y se cree que son útiles en tratamiento profiláctico y/o terapéutico de osteoporosis, e inhibición del crecimiento óseo, uno de los efectos secundarios que se convierten en problemas cuando se administran esteroides durante un periodo largo. La 5 galectina 9 y muteína de galectina 9 modificada actúan en inhibición específica de linfocitos activados, de forma diferente a los esteroides, con respecto a acciones en linfocitos, y puede esperarse que sean menos adversas, por ejemplo, menos inmunodepresivas, en comparación con esteroides. Además, tienen acciones inhibidoras en funciones de moléculas adhesivas e inflamación neurogénica mientras que los esteroides no, y son fármacos terapéuticos prometedores para asma, por ejemplo, fármacos terapéuticos para ataques de asma.

10 En opinión de los inventores, es posible aliviar la reacción secundaria esteroidea.

Ejemplos

Todos los ejemplos se llevarán a cabo o pueden llevarse a cabo, a no ser que se desvele de otro modo específicamente en el presente documento, por técnicas estándar que se conocen bien y son convencionales para los expertos en la materia.

15 Las operaciones de biología molecular específicas y condiciones de tratamiento en los ejemplos como se describe en el presente documento posteriormente se realizan o seleccionan de acuerdo con técnicas habituales desveladas en manuales experimentales convencionales: para clonación de ADN, J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, "Molecular Cloning", 2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989), y D. M. Glover y col. ed., "DNA Cloning", 2^a ed., Vol. 1 a 4, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995); 20 cuando se aplican técnicas de PCR, H. A. Erlich ed., PCR Technology, Stockton Press, 1989; D. M. Glover y col. ed., "DNA Cloning", 2^a ed., Vol. 1, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995) y M. A. Innis y col. ed., "PCR Protocols", Academic Press, Nueva York (1990) y otros. Cuando se usan reactivos y kits disponibles en el mercado, se emplean protocolos, agentes y fármacos unidos a los mismos en el presente documento.

25 Ejemplo 1

(A) Construcción de Vector de Expresión para Muteína de Galectina 9 Modificada

Los vectores de expresión se construyeron con lo siguiente:

- 30 (1) ADNc, preparado a partir de una fracción de ARN poli(A)⁺ de células Jurkat
- (2) vector pET-11a (STRATAGENE)
- (3) cebadores para PCR:

G9NCRD1: CGTCCTCATATGGCCTTCAGCGGTTCCAG SEC ID N°: 10
 G9NCRD6: CGACCGCATATGCTGGAAGCTGTAGGACAG SEC ID N°: 11
 G9CCRD5: CGTCCTCATATGACTCCGCCATCCCACCTATG SEC ID N°: 12
 G9CCRD6: CGACCGGGATCCCTATGTCTGCACATGGGTCAG SEC ID N°: 13

35 Las células Jurkat (línea celular derivada de linfocitos T) se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). La línea celular se mantuvo en RPMI-1640 con FCS (10%) añadido (Sigma, St. Louis, Estados Unidos) a 37 °C en CO₂/aire.

40 Se realizó extracción de ARN total a partir de células Jurkat como sigue: Brevemente, se cultivaron células Jurkat en RPMI-1640 que contenía FBS 10%, y después se recogió con una centrifuga. Las células resultantes se lavaron dos veces con 10 ml de PBS. A los sedimentos celulares lavados se añadió ISOGEN (Nombre Comercial: NIPPON GENE Co., Ltd. Japón) a 15 ml por 2 x 10⁸ células y se extrajo ARN total de acuerdo con el manual del kit (NIPPON GENE Co., Ltd. Japón). Se realizó purificación de ARN poli(A)⁺ a partir del ARN total y síntesis de ADNc como sigue: Brevemente, se disolvió ARN total derivado de células Jurkat en agua tratada con DEPC para hacer la concentración 1 mg/ml. La purificación de ARN poli(A)⁺ a partir de ARN total se llevó a cabo con el Sistema de Aislamiento de ARNm PolyATtract® (Nombre Comercial: Promega) de acuerdo con el manual del kit. El ARN poli(A)⁺ purificado se disolvió en agua tratada con DEPC para hacer la concentración 5 µg/20 µl. La síntesis de ADNc a partir de ARN poli(A)⁺ (5 µg) se realizó con Kit de Síntesis de ADNc de Primera Cadena (Nombre Comercial: Amersham Biosciences) de acuerdo con el manual del kit, en el que se usó Not I-d(T)₁₈ como un cebador.

50 A continuación, en el sitio NdeI-BamHI del vector pET-11a se insertó el dominio de reconocimiento de carbohidrato N-terminal (NCRD) y dominio de reconocimiento de carbohidrato C-terminal (CCRD) de galectina 9 de acuerdo con las etapas que se muestran en la FIG. 1 para generar un vector de expresión para galectina 9 modificada (G9NC (nula)) en el que faltaba el péptido de engarce. En primer lugar, se obtuvieron (1) ADNc correspondiente al CRD C-terminal de galectina 9 humana y (2) ADNc correspondiente al CRD N-terminal de galectina 9 humana, respectivamente, de ADNc de galectina 9. Brevemente, se amplificó el ADNc correspondiente al CRD C-terminal de galectina 9 humana (G9CCRD) a partir de ADNc de galectina 9 con cebadores de PCR: G9CCRD5 + G9CCRD6. G9CCRD se digirió con enzimas de restricción (NdeI + BamHI), y se insertó en el vector pET-11a tratado con las

mismas enzimas de restricción para crear pET-G9CCRD. La PCR se realizó con kit de ADN polimerasa KOD (TOYOB0 N° de Código KOD-101). Se hizo reaccionar una mezcla de Reacción de PCR (mezcla de dNTP, MgCl₂ 25 mM, Tampón 10, ADN polimerasa KOD (0,05 u), cebadores y ADNc molde) en las siguientes condiciones de ciclo de PCR: Después de tratamiento a 94 °C durante 2 min, se repitió un ciclo consistente en 98 °C durante 15 s, 5 después 65 °C durante 2 s, y a continuación 74 °C durante 30 tratamientos 25 veces, y finalmente la reacción se terminó a 4 °C. La inserción del fragmento amplificado por PCR en el vector se llevó a cabo con kit de Ligation high (TOYOB0 N° de Código LGK-101). Para la reacción, el fragmento amplificado por PCR se mezcló con el vector a una relación molar de inserto : vector = aproximadamente 5 : 1, y después se mezcló con el reactivo de "Ligation high" a una relación de reactivo total/solución de ADN total = 1/2 (volumen/volumen). La inserción se realizó por 10 reacción durante una noche a 16 °C durante 16 h.

En segundo lugar, se amplificó ADNc correspondiente al CRD N-terminal de galectina 9 humana (G9NCRD) a partir de ADNc de galectina 9 con cebadores de PCR: G9NCRD1 + G9NCRD6. Se dirigió G9NCRD con enzima de restricción Ndel y el fragmento resultante se insertó en un sitio derivado de pET-G9CCRD por digestión con la misma enzima de restricción (Ndel) seguido de desfosforilación para crear pET-G9NC(nula). La amplificación por 15 PCR e incorporación al vector se llevaron a cabo del mismo modo que se ha mencionado anteriormente. En pET-G9NC(nula) se codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos mutante que difiere de la secuencia de aminoácidos de galectina 9 de tipo M humana (hGal-9M) por el reemplazo de aminoácidos de una región que abarca de Pro¹⁴⁹ a Ser¹⁷⁷ (29 aminoácidos) con la secuencia: His-Met. Es decir, la construcción tiene una secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 1, que codifica un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2.

20 (B) Expresión y Purificación de Muteína de Galectina 9 Modificada Recombinante (Proteína Recombinante)

El vector plasmídico de expresión pET-G9NC(nula) obtenido en la etapa anteriormente mencionada (A) se introdujo en *E. coli* (BL21(DE3)). La introducción se realizó por electroporación (o electroporación). Brevemente, una mezcla de BL21(DE3) competente y una solución acuosa de vector plasmídico se sometió a electroporación a una tensión de 1,8 kV para transfección. La expresión de proteínas recombinantes se realizó como sigue: se cultivó *E. coli* en medio 2 YT que contenía glucosa 2% (p/v) y ampicilina 100 µg/ml, y se mezcló con isopropilo-β-D-thiogalactopiranósido 0,1 M para inducción de proteínas recombinantes en un punto en el que una densidad óptica a 600 nm alcanzó 0,7 (concentración final, 0,1 mM). Despues de cultivo a 20 °C durante 18 h, las células se recogieron con una centrífuga, y después se suspendieron en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), que contenía NaCl 0,5 M, DTT 1 mM, y PMSF 1 mM. La suspensión resultante se sonó durante 10 min, después se mezcló con Triton X-100 10% (p/v) (concentración final, 1%), y se agitó a 4 °C durante 30 min. La mezcla se centrifugó a 15.000 g durante 30 min y el sobrenadante resultante se sometió a cromatografía de afinidad en geles de agarosa de lactosa para aislar proteínas recombinantes purificadas.

Como resultado, se obtuvieron muestras proteicas recombinantes con alta pureza en rendimientos comparativamente buenos. Los patrones electroforéticos resultantes de productos proteicos recombinantes se muestran en la FIG. 2. Las condiciones de SDS-PAGE fueron como sigue: Gel, Acrilamida-BIS (gel 12%), tampón para electroforesis, Tris 25 mM-glicina 192 mM-SDS 0,1%, condiciones eléctricas, 180 V, 45 min; tinción, CBB, 60 °C/30 min. Las muestras para electroforesis se adsorberon en Resina Strata Clean™ (Stratagene), tratada con 1 25 tampón de muestra (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, SDS 2% (p/v), 2-ME 5%(p/v), Glicerol) para hacer la mezcla 0,2 mg/ml, se trató con calor a 98 °C/3 min, y después se sometió a electroforesis a aproximadamente 2 µg (proteína) 40 por carril. La muteína de galectina 9 modificada purificada, G9NC(nula) pudo conservarse de forma estable a 4 °C durante al menos 90 días mientras que la mayor parte de la galectina 9 natural (tipo M, G9(M)) se descompuso en un periodo de 2 semanas en las mismas condiciones de almacenamiento (véase FIG. 3). Se cree que esta descomposición está provocada por una acción de proteasas derivadas de *E. coli* contenidas en la muestra de galectina purificada.

45 Ejemplo 2

Se examinó la susceptibilidad a proteasas existentes en tejido humano entre galectina 9 natural (tipo S, G9(S)): isoforma con el péptido de enganche más corto) y G9NC(nula) para comparación. A las galectinas disueltas en PBS se añadió metaloproteinasa-3 de matriz (MMP-3) o elastasa a 1/100 (relación en peso), y la mezcla se incubó a 37 °C. La mayoría de la G9(S) se descompuso en un periodo de 1 a 2 h en uno de los casos mientras que G9NC(nula) 50 no se degradó en absoluto incluso después del paso de 2 h (véase FIG. 4 y 5).

Ejemplo 3

Para examinar cómo la incorporación de la mutación en galectina 9 natural afecta a la bioactividad de galectina 9, se realizaron ensayos con respecto a actividad de inducción de apoptosis de células MOLT-4 (línea celular derivada de leucemia de linfocitos T humana) y actividad quimioatraventante de eosinófilos (actividad de ECA) para eosinófilos de sangre periférica.

(a) Cultivo Celular

Se obtuvo MOLT-4 (linfocitos T) de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). La línea celular se mantuvo en un medio RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, Estados Unidos) complementado con FCS 10% en CO₂ 5% a 37 °C. Se

añadió lactosa (30 mM) al medio de cultivo para inhibir la actividad de Gal-9. Se usó la misma concentración de sacarosa como un control.

(b) Ensayo de apoptosis

(1) Análisis del ciclo celular (apoptosis) con PI (procedimiento de PI)

- 5 Se centrifugaron células que experimentaron inducción de apoptosis a 4 °C durante 5 min a 1.000 rpm y el sedimento celular se resuspendió en PBS (300 µl), y se ajustó a una concentración final del 70% añadiendo gradualmente etanol frío 100% (700 µl) a las células suspendidas con agitación en vórtex. Las células se fijaron por incubación a 4 °C durante 30 min. Después de la adición de PBS (1 ml), las células se centrifugaron a 4 °C durante 5 min a 1.000 rpm y el sedimento celular se resuspendió en PBS (440 µl). Las células se incubaron con ribonucleasa A 10 2,5 mg/ml (10 µl; la concentración final 50 µg/ml, Sigma, St. Louis, Misuri, Estados Unidos) a 37 °C durante 30 min y después con yoduro de propidio 2,5 mg/ml (PI, 4 µl; la concentración final 20 µg/ml; Sigma) a 4 °C durante 10 min en la oscuridad. Después de la retirada de células agregadas a través de una malla de nailon seguido de aumento del volumen celular con PBS, las células teñidas se analizaron por citometría de flujo (Sandstrom, K. y col., J Immunol Methods, 240: 55 (2000) y Zhang L. y col., Cancer Lett, 142: 129 (1999)).

- 15 (2) Ensayo de TUNEL (marcaje de extremo con muesca con marcador dUTP mediado por TdT)

Se detectó fragmentación de ADN dentro del núcleo celular, una característica distintiva de apoptosis, incorporando nucleótidos marcados (dUTP-biotina o FITC-dUTP) en los extremos generados por fragmentación de ADN con una enzima que añade nucleótidos en los extremos de ADN (TdT; desoxinucleotidil transferasa Terminal). Se usó Kit de Apoptosis Directo MEBSTAIN (MBL, Nagoya, Japón) en el experimento. Se llevaron a cabo experimentos de acuerdo con las instrucciones del fabricante como se describe posteriormente. Brevemente, se lavaron células que se sometieron a inducción de apoptosis (aprox. 2×10^5 células/muestra) con PBS que contenía FSA 0,2%. Despues de añadir paraformaldehído 4% (en NaH₂PO₄ 0,1 M, pH 7,4), las células se fijaron a 4 °C durante 30 min, y se lavaron con PBS que contenía FSA 0,2%. Despues de añadir etanol frío al 70% para aumentar la permeabilidad, el sedimento celular se incubó a -20 °C durante 30 min. Despues de lavar con PBS que contenía FSA 0,2%, se añadió mezcla de reacción de TdT (mezcla de TdT, FITC-dUTP y tampón de TdT) al sedimento celular lavado, la mezcla se agitó, y se incubó a 37 °C durante 1 h. Las células teñidas se lavaron con PBS que contenía FSA 0,2%, despues se resuspendieron en PBS que contenía FSA 0,2% y se analizaron por citometría de flujo.

(c) Análisis de Linfocitos T

Para preparar una placa de pocillos revestida con Ab anti-CD3, se incubó una placa de 24 pocillos con solución de TBS (pH 8,0) que contenía Ab anti-CD3 3 µg/ml (Immunotech, Marsella, Francia) por pocillo a 4 °C durante una noche, y cada pocillo se lavó con PBS después de retirar la solución de Ab anti-CD3. Se aislaron fracciones de leucocitos mononucleares de sangre heparinizada usando HISTOPAQUE (Marca registrada, SIGMA). A continuación se usó Kit de Aislamiento Positivo para CD4 (DYNAL, Oslo, Noruega) para aislamiento de linfocitos T CD4⁺ y Dynabeads M-450 CD8 (Marca registrada, DYNAL, Oslo, Noruega) para aislamiento de linfocitos T CD8⁺, respectivamente, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para activar linfocitos T, se incubaron linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ a 1×10^6 células/ml en un medio RPMI-1640 que contenía FCS 10% en la placa revestida con Ab anti-CD3 durante 20 a 24 h a 37 °C en un incubador de CO₂ 5%, y después se incubaron con galectina 9 recombinante (G9(S) natural) o mutéína de galectina 9 modificada, G9NC (nula), a 37 °C en un incubador de CO₂ 5%. A continuación, se realizó ensayo de apoptosis como se ha descrito en (b). Es decir, las células se incubaron con PI 50 µg/ml (SIGMA) a 37 °C durante 10 min en la oscuridad. Las células teñidas se analizaron por citometría de flujo (Sandstrom, K. y col., J Immunol Methods, 240: 55 (2000) y Zhang L. y col., Cancer Lett, 142: 129 (1999)). Despues de incubación con galectina 9 recombinante (G9(S) natural) o mutéína de galectina 9 modificada, G9NC (nula), a 37 °C en un incubador de CO₂ 5%, también se realizó ensayo de apoptosis para linfocitos T no activados (en reposo) del mismo modo que se ha descrito anteriormente.

45 (d) Resultados

Como resultado de examinar la fragmentación de ADN asociada con apoptosis por electroforesis en gel de agarosa y FACS, se ha revelado que la actividad inductora de apoptosis conservada por G9NC(nula) es equivalente a o mayor que la de G9(S) incluso cuando se aplicó uno de los procedimientos de ensayo (FIG. 6 y Tabla 1). Como resultado de ensayar con respecto a actividad de ECA de acuerdo con la técnica de cámara, G9NC(nula) mostró mayor actividad que G9(S) (FIG. 7).

Tabla 1

	Tasa de Células MOLT-4 Apoptóticas (%)				
	control	0,1 µM	0,3 µM	0,5 µM	1 µM
G9(M)	4,2	5,5	13,8	28,9	58,8
G9(S)	4,5	8,7	23,6	44,7	64,0
G9NC (nula)	5,1	11,5	33,9	57,8	72,1

La Tabla 1 muestra resultados de comparación entre galectina 9 natural (G9(S)) y muteína de galectina 9 modificada (G9NC (nula)) con respecto a sus bioactividades, en la que se examinó cada actividad de inducción de apoptosis de células MOLT-4 (análisis de FACS).

Ejemplo 4

- 5 (1. Expresión de Galectina-9 en Sinovio con Artritis Reumatoide (AR))

(Procedimiento) Los materiales tisulares de pacientes usados fueron muestras tisulares de sinovio de pacientes con AR en conformidad con los criterios de clasificación del Colegio de Reumatología Americano (ACR). Se realizó tinción inmunohistológica de muestras tisulares de los pacientes de acuerdo con las siguientes etapas:

La preparación de muestras de sección se realizó como sigue:

- 10 (1) Desparafinización: xileno 3 veces (10 min cada uno), alcohol 100%-alcohol 90%-alcohol 75% (2 min cada uno).
 (2) Tratamiento con microondas (MW): se preparó en el momento de uso tampón de ácido cítrico 10 mM (pH 6,0). Se sumergió cada muestra de sección en el tampón previamente hervido por irradiación con MW, y después se sometió a irradiación con MW (5 min x 3 veces, total 15 min para horno microondas eléctrico de 500 W). Se permitió que la sección tratada reposara a temperatura ambiente durante 20 min mientras se enfriaba gradualmente.
 (3) Inactivación de peroxidasa endógena: se preparó peróxido-metanol 0,3% en el momento de uso y la muestra de sección se sumergió en el mismo durante 30 min. Lavado con PBS 5 min x 3 veces. Se dejó caer una alícuota (4 gotas) de BSA 5% en la sección para bloqueo. A continuación, la sección se situó en una caja húmeda a temperatura ambiente durante 1 h.

En la muestra de sección se aplicaron 6 gotas de un anticuerpo primario o un anticuerpo de control con una pipeta Pasteur. Se permitió que la muestra reposara en una caja húmeda a 4 °C durante una noche, y se lavó con PBS (5 min x 3 veces) al día siguiente. Se aplicó una alícuota (6 gotas) del segundo anticuerpo, Ab marcado por peroxidasa de rábano rusticano (HRP) (DAB Envision⁺), a la muestra tisular. Después de situar la muestra tisular en una caja húmeda a temperatura ambiente durante 1 h, la muestra tisular se lavó con PBS (5 min x 3 veces). Visualización con un reactivo DAB (3,3'-diaminobenzidina-tetraclorhidrato) (el reactivo DAB se preparó en el momento de uso). El procedimiento de coloreado se llevó a cabo durante 3 min después de sumergir la muestra de sección. Inmediatamente, la reacción de coloración se detuvo lavando con agua del grifo. Se realizó tinción nuclear con hematoxilina de Mayer (20 s). Inmediatamente, la muestra se lavó con agua corriente durante 15 min. Deshidratación, penetración y sellado; alcohol 75%-alcohol 90%-alcohol 100% (2 min cada uno), xileno 3 veces (3 min cada uno).

[Resultados] Los resultados se muestran en la FIG. 53. Se observó que la galectina 9 se expresaba de forma selectiva en células de sinovio y grupos celulares parafoliculares linfáticos, así como en células endoteliales de vasos sanguíneos dendriformes dentro del folículo linfático. Apenas se observaron células positivas para galectina 9 en OA (osteoartritis) (véase FIG. 53). La galectina 9 es una molécula que es inducible a altos niveles en células sinoviales y células linfáticas que son esenciales para crecimiento de sinovio con AR, y además en nuevos vasos sanguíneos, mientras que galectina 1 es detectable en células sinoviales y pericitos y galectina 3 en las células constituyentes completas de sinovio con AR.

[2. Actividad Mediada por Galecina-9 de Inducción de Apoptosis de Células Sinoviales]

- 40 [Procedimiento] La eficacia de galectina 9 se ensayó en células sinoviales que provocarán la destrucción de articulaciones. Para el sinovio, se recogió el tejido de sinovio de un paciente con artritis reumatoide (AR) de forma aséptica y se sometió a separación para aislar células que se cultivaron. Después de 1 o 2 pasos de cultivo celular, las células resultantes se usaron en experimentos. El tejido ensayado se obtuvo de la rodilla derecha con AR de una mujer de 67 años. Las células sinoviales se sembraron y después se cultivaron durante una noche. Después de que se confirmó la adhesión celular, se añadió rhGal-9 (cada una de hG9NC(nulA), rhGal-9S y rhGal-9M) para hacer la concentración final 0, 0,03, 0,1, 0,3 y 1,0 µM, respectivamente. Después de cultivo durante 72 h, las células se observaron con un microscopio óptico. A continuación, las células se recogieron y se ensayaron con respecto a actividad inductora de apoptosis con técnica de PI. Se realizó ensayo de actividad inductora de apoptosis del mismo modo que en el Ejemplo 3.

50 [Resultados] Los resultados de observación con un microscopio óptico se muestran en la FIG. 54. Los resultados de ensayo de PI con respecto a actividad inductora de apoptosis se muestran en la FIG. 55.

La actividad inductora de apoptosis de muteína de galectina-9 modificada (Gal-9(NC-Nula)) fue más intensa que la de galectina-9 nativa (natural) (Gal-9(M) y Gal-9(S)). Se observó que todos los recombinantes tenían la actividad inductora de apoptosis de una manera dependiente de dosis. La lactosa (30 mM) inhibió las acciones inductoras de apoptosis pero la sacarosa (30 mM) no afectó.

[3. Comparación entre Actividad Inductora de Apoptosis Mediada por Galectina y Actividad Inhibidora de Crecimiento

frente a Células Sinoviales]

[Procedimiento] Se examinaron las acciones de galectinas humanas (Gal-1, Gal-3, Gal-8(M) y Gal-9NC(nula)) en células sinoviales.

- 5 El tejido de sinovio de un paciente con AR se recogió de forma aséptica y se sometió a separación para aislar células sinoviales que después se cultivaron. Después de 1 a 2 pasos de cultivo celular, las células sinoviales se sembraron, y después se cultivaron durante una noche. Después confirmarse la adhesión celular, se añadió cada galectina humana (cada una de Gal-1, Gal-3, Gal-8(M) y Gal-9NC(nula)) para hacer la concentración final 0, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3 y 1,0 μ M, respectivamente. Después de cultivo durante 24 h, las células se recogieron y se ensayaron con respecto a actividad inductora de apoptosis por el procedimiento de PI. Para la eficacia inhibidora en células sinoviales, se añadió cada galectina humana a cada pocillo de una placa de 96 pocillos para hacer la concentración final 0, 0,03, 0,1, 0,3 y 1,0 μ M, respectivamente, seguido de cultivo durante 48 h. Después del cultivo, la placa se lavó con PBS y se contaron las células que emitían luz fluorescente intensa ($\lambda_{ex} = 490$ nm, $\lambda_{em} = 515$ nm) en las que se usó kit de recuento celular F (Dojindo Laboratories, Japón, cat. nº 343-07743) con un lector de placas fluorescente.
- 10 15 [Resultados] Los resultados del ensayo de actividad inductora de apoptosis se muestran en la FIG. 56, y los resultados de ensayos con respecto a actividad inhibidora en el crecimiento de células sinoviales se muestran en la FIG. 57. En los dibujos, hGalectina 1 es galectina 1 humana recombinante; hGalectina 3, galectina humana recombinante 3; hGalectina 8(M), galectina humana recombinante 8M; y hGalectina 9, hGal9NC nula. Es muy importante inhibir el crecimiento de células sinoviales a la vista de la terapia de artritis reumatoide. La muteína de galectina 9 modificada (hGal-9NC nula) indujo apoptosis de células sinoviales proliferadas e inhibió el crecimiento de células sinoviales. Por lo tanto, la muteína de galectina 9 modificada (hGal-9NC nula) es útil como un fármaco anti-artritis reumatoide. No se observaron tales acciones entre otras galectinas.
- 20 25

Se examinó la eficacia de muteína de galectina-9 modificada, h-G9NC(nula), en una diversidad de enfermedades inflamatorias, es decir, alergia aguda/crónica, modelos de ratón de enfermedad del sistema inmunitario.

- 30 35 A partir de estos resultados, se ha sugerido que la muteína de galectina 9 modificada tiene una acción inhibidora o potenciadora en una diversidad de inflamaciones y también una acción reguladora en la producción de diversas citocinas por lo que la muteína de galectina 9 modificada es útil en el control de la reacción inflamatoria. Se describen posteriormente ejemplos que ilustran estas ventajas eficaces.
- 40 En los siguientes ejemplos [Ejemplos 5 a 12], G9NC(nula) [gal9NC(nula), h-gal9NC(nula), hG9NC(nula) o h-G9NC(nula) (galectina-9 nula humana)] está disponible de Galpharma Co., Ltd., Kagawa, Japón). Se obtuvo desxametasona (sal disódica de fosfato de desxametasona 21, Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos) del proveedor indicado.

Ejemplo 5 [Modelo de Pleuresía por Zimosan]

- 45 50 En primer lugar, los ratones recibieron una inyección pleural de cada uno de G9NC(nula) [h-gal9NC(nula) 100 μ g/ratón], zimosan (100 μ g/ratón, Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos) y dexametasona (30 mg/kg/ratón, Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos) o una mezcla de los mismos bajo anestesia con dietil éter (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japón). Se usó PBS como un control. Cuatro horas después de la inyección, los ratones recibieron una inyección intraperitoneal de 0,2 a 0,3 ml de una inyección de pentobarbital diluida con una relación de dilución de NEMBUTAL® Inyectable (Nombre comercial: pentobarbital, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd., Japón): PBS = 1:10 para anestesia, y se recogieron muestras de sangre de la aorta abdominal después de laparotomía. A continuación, los ratones se sacrificaron por sangrado, y se recogieron muestras de fluido pleural lavando la cavidad pleural dos veces con PBS (1 ml).

- 55 Se permitió que las muestras de sangre reposaran a temperatura ambiente, después se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min, los sobrenadantes se recogieron como muestras de suero y se conservaron por congelación. Las muestras de fluido pleural se sometieron a recuento de número total de células con solución de Turk. Después del recuento, parte de las muestras se sometieron al Cytospin, se secaron al aire, se tiñeron con Diff-Quik (International Reagents Co., Ltd., Japón) o solución de May-Grünwald (Muto Pure Chemical Co., Ltd) y solución de Giemsa (Merck Japan Ltd.) y se examinaron al microscopio. Cada número de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, linfocitos y mastocitos se comprobó para el recuento de células totales de 200 células. Los resultados se muestran en las FIG. 9 y 10.

Ejemplo 6 [Modelo de Dermatitis Inducida por PMA]

- Se obtuvo forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos) del proveedor indicado. Para administración a animales, los compuestos se suspendieron en PBS(-), que se usó como el vehículo en todos los experimentos (esto se aplica en lo sucesivo en el presente documento en los Ejemplos desvelados posteriormente).
- 55 Se obtuvieron ratones Balb/c (7 semanas de edad) de SLC (Shizuoka, Japón). Los animales se mantuvieron en condiciones convencionales en un ritmo de día/noche de 12 h con acceso libre a alimento y agua a voluntad. Todos

los animales recibieron cuidados humanos de acuerdo con las directrices internacionales y la ley nacional (esto se aplica en lo sucesivo en el presente documento en los Ejemplos desvelados posteriormente).

Se realizó inducción de edema en el oído en ratones como sigue: Se aplicó una solución de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, 15 mg) disuelto en acetona (30 ml) a la superficie interior y exterior del oído derecho de cada ratón (BALB/c, hembra, 7 a 8 semanas de edad, SPF, SLC Inc.). Se aplicó acetona al oído izquierdo como un control.

Los ratones recibieron una administración i.p. de G9NC(nula), dexametasona, o vehículo a una dosis de 0,345 ml/cabeza 30 min antes de la aplicación de PMA. Despues de la aplicación de PMA, se midió el grosor del oído a 0, 3, 6, 8 y 24 horas con un indicador de grosor calibrado (Mitsutoyo, Tokio, Japón) bajo anestesia con éter. El edema del oído se expresó como $(R-L)-(R_0-L_0)$, en el que R_0 y L_0 representan el grosor del oído derecho e izquierdo, respectivamente, al comienzo del experimento (0 h) y R y L representan los valores de grosor obtenidos en cada punto temporal dado.

Se realizó análisis estadístico como sigue: A no ser de que se indique de otro modo, los datos se expresan como valores medios \pm ETM. Las diferencias estadísticas de conjuntos de datos se analizaron usando ANOVA de dos vías, y las diferencias entre grupos se evaluaron por post-ensayo de Bonferroni usando software de estadística disponible en el mercado (GraphPad Software, Inc., San Diego, Estados Unidos). Los P valores $<0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Se proporcionan detalles en cada dibujo (esto se aplica en lo sucesivo en el presente documento en los Ejemplos desvelados posteriormente). Los resultados se muestran en la FIG. 11.

Ejemplo 7 [Modelo de Dermatitis Inducida por AA]

Se obtuvo ácido araquidónico (AA, Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos) del proveedor indicado. El resto fue igual que en el Ejemplo 6.

La inducción de edema en el oído en ratones se realizó como sigue: Se aplicó una solución de ácido araquidónico (AA, 750 mg) disuelto en acetona (30 ml) a la superficie interior y exterior del oído derecho de cada ratón (BALB/c, hembra, 7 a 8 semanas de edad, SPF, SLC Inc.). Se aplicó acetona al oído izquierdo como un control.

Los animales recibieron una administración i.p. de G9NC(nula), dexametasona, o vehículo a una dosis de 0,345 ml/cabeza 30 min antes de la aplicación de AA. Despues de la aplicación de AA, se midió el grosor del oído a 0, 1, 3 y 6 horas con un indicador de grosor calibrado (Mitsutoyo, Tokio, Japón) bajo anestesia con éter. El edema del oído se expresó como $(R-L)-(R_0-L_0)$, en el que R_0 y L_0 representan el grosor del oído derecho e izquierdo, respectivamente, al comienzo del experimento (0 h) y R y L representan los valores del grosor obtenidos en cada punto temporal dado. Se realizó análisis estadístico del mismo modo que en el Ejemplo 6. Los resultados se muestran en la FIG. 12.

Ejemplo 8 [Modelo de Dermatitis Inducida por Capsaicina]

Se obtuvieron ciproheptadina (Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos) y capsaicina (Nakarai, Tokio, Japón) de cada proveedor indicado. El resto fue igual que en el Ejemplo 6.

Se realizó inducción de edema del oído en ratones como sigue: Se aplicó una solución de capsaicina (500 mg) disuelta en 30 ml de acetona/aceite de oliva (volumen/volumen = 4/1) a la superficie interior y exterior del oído derecho de cada ratón (BALB/c, hembra, 7 a 8 semanas de edad, SPF, SLC Inc.). El vehículo, acetona/aceite de oliva, se aplicó al oído izquierdo como un control. Los animales recibieron una administración i.p. de G9NC(nula), dexametasona, ciproheptadina o vehículo a una dosis de 0,345 ml/cabeza 30 min antes de la aplicación de capsaicina. Despues de la aplicación de capsaicina, se midió el grosor del oído a 0, 0,5, 1 y 2 horas con un indicador del grosor calibrado (Mitsutoyo, Tokio, Japón) bajo anestesia con éter. El edema del oído se expresó como $(R-L)-(R_0-L_0)$, en el que R_0 y L_0 representan el grosor del oído derecho e izquierdo, respectivamente, al comienzo del experimento (0 h) y R y L representan los valores del grosor obtenidos en cada punto temporal dado. Se realizó análisis estadístico del mismo modo que en el Ejemplo 6. Los resultados se muestran en la FIG. 13.

Ejemplo 9 [Modelo de Dermatitis de Contacto Inducida por DNFB]

Se obtuvo dinitro-fluoro-benceno (DNFB, Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos) del proveedor indicado. El resto fue igual que en el Ejemplo 6. La inducción del edema de oído en los ratones se realizó como sigue: En el modelo de edema inducido por hipersensibilidad de tipo retardado (DTH), los ratones se sensibilizaron los días -7 y -6 aplicando una solución (30 ml) de dinitro-fluorobenceno 0,5% (DNFB) en acetona/aceite de oliva (volumen/volumen = 4/1) a su abdomen afeitado. El día 0, se indujeron reacciones de exposición con 30 ml de DNFB 0,3% en acetona/aceite de oliva (volumen/volumen = 4/1) aplicado por vía tópica a la superficie interior y exterior del oído derecho de cada ratón. El vehículo, acetona/aceite de oliva, se aplicó al oído izquierdo como un control.

Los ratones recibieron administraciones i.p. de G9NC(nula), dexametasona o vehículo a una dosis de 0,345 ml/cabeza los días -7 a 0 antes de la exposición a DNFB, 24 y 48 horas después de la exposición a DNFB. Despues de la exposición a DNFB, se midió el grosor del oído a 0, 24, 48 y 72 horas con un indicador de grosor calibrado (Mitsutoyo, Tokio, Japón) bajo anestesia con éter. El edema del oído se expresó como $(R-L)-(R_0-L_0)$, en el que R_0 y

L_0 representan el grosor del oído derecho e izquierdo, respectivamente, al comienzo del experimento (0 h) y R y L representan los valores del grosor obtenidos en cada punto temporal dado. Se realizó análisis estadístico del mismo modo que en el Ejemplo 6. Los resultados se muestran en la FIG. 14 y 15.

Ejemplo 10 [Modelo de Dermatitis Atópica Inducida por FITC]

- 5 Se obtuvo isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos) del proveedor indicado. El resto fue igual que en el Ejemplo 6.

Se realizó inducción de edema del oído en los ratones como sigue: En el modelo de edema inducido por FITC, los ratones se sensibilizaron los días -7 y -6 aplicando una solución (400 ml) de isotiocianato de fluoresceína (FITC) 0,5% en acetona/dibutil ftalato (volumen/volumen = 1/1) a su abdomen afeitado. El día 0, se indujeron reacciones de exposición con 30 ml de FITC 0,5% en acetona/dibutil ftalato (volumen/volumen = 1/1) aplicado por vía tópica a la superficie interior y exterior del oído derecho de cada ratón. El vehículo, acetona/dibutil ftalato, se aplicó al oído izquierdo como un control.

10 Los ratones recibieron administraciones i.p. de G9NC(nula), dexametasona, o vehículo a una dosis de 0,41 ml/cabeza 30 minutos antes de la exposición a FITC, 24 y 48 horas después de la exposición a FITC. Después de la exposición a FITC, se midió el grosor del oído a 0, 24, 48 y 72 horas con un indicador de grosor calibrado (Mitsutoyo, Tokio, Japón) bajo anestesia con éter. El edema del oído se expresó como $(R-L)-(R_0-L_0)$, en el que R_0 y L_0 representan el grosor del oído derecho e izquierdo, respectivamente, al comienzo del experimento (0 h) y R y L representan los valores del grosor obtenidos en cada punto temporal dado. Se realizó análisis estadístico del mismo modo que en el Ejemplo 6. Los resultados se muestran en la FIG. 16.

15 **Ejemplo 11 [Modelo de Urticaria]**

20 Se obtuvieron IgE anti-DNP (SPE7, Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos) y dinitro-fluorobenceno (DNFB, Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos) del proveedor indicado. El resto fue igual que en el Ejemplo 6.

25 Se realizó inducción de edema del oído en ratones como sigue: En el modelo de reacción cutánea bifásica, los ratones se sensibilizaron el día -1 por inyección i.v. de IgE anti-DNP (5 mg/ratón) en PBS(-). El día 0, se indujeron reacciones de exposición con 30 ml de DNFB 0,15% en acetona/aceite de oliva (volumen/volumen = 4/1) aplicado por vía tópica a la superficie interior y exterior del oído derecho de cada ratón. El vehículo, acetona/aceite de oliva se aplicó al oído izquierdo como un control.

30 Los ratones recibieron una administración i.p. de G9NC(nula), dexametasona o vehículo a una dosis de 0,345 ml/cabeza 30 minutos de la exposición a DNFB. Después de la exposición a DNFB, se midió el grosor del oído a 0, 1, 2, 4, 8 y 24 horas con un indicador de grosor calibrado (Mitsutoyo, Tokio, Japón) bajo anestesia con éter. El edema del oído se expresó como $(R-L)-(R_0-L_0)$, en el que R_0 y L_0 representan el grosor del oído derecho e izquierdo, respectivamente, al comienzo del experimento (0 h) y R y L representan los valores del grosor obtenidos en cada punto temporal dado. Se realizó análisis estadístico del mismo modo que en el Ejemplo 6. Los resultados se muestran en la FIG. 17.

35 **Ejemplo 12 [Modelo de Artritis]**

40 Se usaron ratones hembra DBA/1J (7 semanas de edad). Se administró por vía intravenosa un cóctel de anticuerpos monoclonales inductores de artritis (Chondrex, WA, Estados Unidos; Nº 62100) a la cola de cada animal a 2 mg/0,5 ml/cuerpo. Tres días después, los animales recibieron una aplicación i.p. de una mezcla de muestra (100 µl) en la que se premezclaron 5 µg de LPS (SIGMA, L6511) con h-Gal9NC(nula) a cada dosis dada. Después de la administración de la muestra, el grado de hinchamiento de cada articulación de las extremidades (de las extremidades izquierdas y derechas, anteriores y posteriores) se midió una vez al día y se puntuó la gravedad de la artritis. Los resultados se muestran en la FIG. 19.

45 La eficacia de h-G9NC(nula) se examinó en modelos de inflamación aguda, representados por modelos de pleuresía inducida por zimosan (Ejemplo 5) y modelos de peritonitis inducida por LPS. Como resultado, se observó que la administración i.p. de h-G9NC(nula) a una dosis de 100 µg condujo a la inhibición de pleuresía en el modelo de pleuresía inducida por zimosan. Se observó que h-G9NC(nula) por sí sola no tuvo casi ninguna influencia en los ratones. Además, h-G9NC(nula) afectó a las condiciones en modelos de pleuresía inducida por carragenina y fMLP.

50 Además, en el modelo de peritonitis inducida por LPS, se observó que h-G9NC(nula) indujo cambios en la producción de citocinas del suero (IFN-γ, IL-4, IL-12, IL-10) inducidas tras inflamación. Por ejemplo, cuando se recogió sangre de la órbita de un ratón 6, 12 y 24 horas después de administración i.p. contemporánea de LPS y h-G9NC, y se ensayó el nivel de IFN-γ en suero, se observó que el nivel de IFN-γ inducido tras la inflamación se elevaba transitoriamente en el grupo que recibió la administración de LPS solamente mientras que se inhibió la elevación (inducción) de IFN-γ en el grupo que recibió la administración contemporánea de LPS y h-G9NC(nula) de una manera dependiente de dosis de h-G9NC(nula). A la vista de esto, se ha sugerido que h-G9NC(nula) puede regular la producción de citocinas por lo que puede controlarse la inflamación.

Además, se ha observado que h-G9NC(nula) tiene acciones inhibidoras en modelos de inflamación, susceptibles a esteroides (inducidos por PMA) y no susceptibles a esteroides (inducidos por ácido araquidónico) (Ejemplos 6 y 7), así como en el modelo de inflamación inducida por capsaicina (Ejemplo 8).

- 5 Se examinó la eficacia de h-G9NC(nula) en la inflamación alérgica incluyendo dicha inflamación alérgica los modelos de dermatitis de contacto inducida por DNFB, dermatitis atópica inducida por FITC, urticaria sensibilizada por Ab IgE monoclonal anti-DNP. Por ejemplo, en el modelo de dermatitis de contacto inducida por DNFB (Ejemplo 9), se administró i.p. h-G9NC(nula) y su eficacia se evaluó usando edema del oído como un índice para la respuesta cutánea. Como resultado, se observó que las medicaciones con h-G9NC(nula) a 1, 10, y 100 µg, respectivamente, ejercían acciones inhibidoras mientras que no se observó que h-G9NC(nula) condujera a reducción del peso corporal significativa, inducida por la administración de dexametasona. En el modelo de dermatitis atópica inducida por FITC (Ejemplo 10), se descubrió la eficacia de h-G9NC(nula) en la fase inducida cuando se administró i.p. h-G9NC(nula). Además, cuando se administró i.p. h-G9NC(nula) a los ratones modelo de urticaria sensibilizada por Ab IgE monoclonal anti-DNP (Ejemplo 11) a 1, 10 y 100 µg, respectivamente, se inhibió la reacción cutánea bifásica debido a aplicación de antígenos (DNFB).
- 10 15 Las realizaciones desveladas en el presente documento demuestran la eficacia de h-G9NC(nula) en artritis inducida por cóctel de anticuerpos, uno de los modelos de enfermedad autoinmune. H-G9NC(nula) afecta a las condiciones en los modelos de artritis adyuvante y artritis de colágeno. Por ejemplo, se ha observado que incluso 1 µg de h-G9NC(nula) tiene una acción inhibidora en el Ejemplo 12.

20 **Ejemplo 13 [Inducción de Apoptosis Mediada por Muteína de Galectina 9 Modificada (Citotoxicidad) en Células Tumorales]**

25 [Protocolo] Cada célula se suspendió en RPMI (SIGMA) que contenía FBS 10% (JRH), se situó en una placa de 96 pocillos (FALCON) a 3×10^3 células/90 µl, y se cultivó durante 24 h (37 °C, CO₂ 5%). Después del cultivo, se añadió muteína de galectina 9 modificada, h-G9NC(nula), para hacer la concentración final 0,03 a 1 µM (10 µl), seguido de incubación durante 24 h. Después de la incubación, se añadieron 10 µl del reactivo WST-1 (Roche, 1 644 807) a cada pocillo, y se incubó a 37 °C en un incubador de CO₂ al 5% durante 2 a 4 h. A continuación, se midió la absorbancia (D.O.) a 450 nm con un lector de placas. La eficacia de la inducción de apoptosis (citotoxicidad) en cada célula tumoral se evaluó como sigue:

$$\text{Viabilidad (\%)} = [(D.O. \text{ de la Muestra} - \text{Blanco})] / (D.O. \text{ del Control Negativo} - \text{Blanco}) \times 100$$

Las células tumorales usadas se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2 Eficacia de la Muteína de Galectina 9 Modificada en la Inducción de Apoptosis (Citotoxicidad) en Células Tumorales: Datos				
Nombre de la célula	Animal	Destrucción	CI50 (µM)	Tejido
L1210	Ratón (BDF1)	99	0,026	Ganglio linfático de bazo, leucemia
EL-4	Ratón (C57BL/6)	50	1,038	Bazo
P388 D1	Ratón (DBA/2)	78	0,626	Linfoma, macrófago, monocito
NS-1	Ratón (BALB/c)	92	0,062	Linfocitos B (mieloma), derivado de MOPC-21
Meth A	Ratón (BALB/c)	92	0,198	Fibrosarcoma, subcutáneo
MH134	Ratón (C3H/He)	91	0,262	Hígado, hepatoma de líquido ascítico
B16/BL6	Ratón (C57BL/6)	0		Melanoma
B16/F10 F10	Ratón (C57BL/6)	0		Melanoma
B16/ B16/F1	Ratón (C57BL/6)	45	1,286	Melanoma
MM-RU	Ser humano	58	0,899	Melanoma
MM-BP	Ser humano	53	0,937	Melanoma
PK-1	Ser humano	66	0,184	Páncreas
PK-9	Ser humano	59	0,624	Páncreas

(continuación)

Tabla 2 Eficacia de la Muteína de Galectina 9 Modificada en la Inducción de Apoptosis (Citotoxicidad) en Células Tumorales: Datos				
Nombre de la célula	Animal	Destrucción	CI50 (μ M)	Tejido
PANC-1	Ser humano	58	0,866	Carcinoma pancreático de origen ductal
KLM-1	Ser humano	55	0,883	Páncreas
Wi-Dr-Tc	Ser humano	32		Adenocarcinoma de colon
COL0205	Ser humano	0		Adenocarcinoma de colon
Colon26	Ratón (BALB/c)	30		Carcinoma del recto
Hu09N2	Ser humano	26		Hueso
HMC-1	Ser humano	19		Mastocito humano
MCF-7 K10	Ser humano	17		Adenocarcinoma de mama
SK-Br-3	Ser humano	0		Mama
HT17	Ser humano	70	0,214	Hígado, poco diferenciado
HuH-7	Ser humano	0		Hígado, muy diferenciado
KATOIII	Ser humano	89	0,210	Estómago

En la Tabla 2, "Nombre de la célula" indica el nombre de cada célula; "Animal", el origen de cada animal del que deriva la célula tumoral indicada; "destrucción 1 μ M", destrucción (%) cuando se añade muteína de galectina 9 modificada 1 μ M; y "Tejido", cada tejido/sitio de órgano del que deriva la célula tumoral indicada.

5 [Resultados]

La Tabla 2 muestra los resultados de ensayos de inducción de apoptosis mediada por muteína de galectina 9 modificada h-G9NC(nula) (citotoxicidad) en células cultivadas. Como resultado, se ha determinado que las muteínas de galectina 9 modificada son:

- 1) eficaces en tumores de células sanguíneas
- 10 2) también eficaces en neoplasias no epiteliales tales como melanoma maligno y fibrosarcoma
- 3) eficaces también en neoplasias epiteliales tales como cánceres de estómago, cánceres de páncreas y cánceres de pulmón.

Ejemplo 14 [Eficacia Anti-tumoral (Antineoplásica) de Muteína de Galectina 9 Modificada en el Modelo de Tumor Trasplantado por Vía Subcutánea]

15 [Protocolo] Las células tumorales diana usadas fueron células LLC. Las células cultivadas (1×10^6 células/100 μ l) se incubaron con muteína de galectina 9 modificada, h-G9NC(nula), a 100 μ g/100 μ l, o solución salina fisiológica a 100 μ l a 37 °C durante 1 h, y se inyectaron después por vía subcutánea en la espalda de cada ratón C57BL6. Se midió el tamaño tumoral (longitud, latitud). Cinco semanas después del trasplante, se cortó la parte de piel administrada (tumor) para proporcionar muestras de ensayo histopatológicas que se fijaron con una solución de formaldehído tamponada neutra 10%. El tejido incluido en parafina se cortó para proporcionar secciones que se tiñeron con reactivo HE (hematoxilina-eosina).

20 [Resultados] En el modelo de tumor trasplantado por vía subcutánea, la eficacia de la muteína de galectina 9 modificada para inhibir el crecimiento de células tumorales, es decir, actividad anti-tumoral (anti-neoplásica) se muestra en la FIG. 20. Los resultados de los exámenes histopatológicos con respecto a actividad anti-tumoral (anti-neoplásica) también se muestran en la FIG. 21. En los dibujos Gal9(n) y Gal9 indican muteína de galectina 9 modificada, h-G9NC(nula) y 5S indica 5 semanas.

25 Cuando se cultivó LLC en presencia de muteína de galectina 9 modificada, h-G9NC(nula), se observó la transformación aparente de células cancerosas en un microscopio de contraste de fases. En este estadio, la muteína

de galectina 9 modificada redujo de forma dependiente de dosis el número de células LLC viales (ensayo de MTT) e indujo la pérdida de capacidad para sintetizar ADN (propiedad de captación de ^3H -timidina) y un aumento de los niveles de LDH liberados en sobrenadantes de cultivo. Estos efectos anti-tumorales mediados por mutéína de galectina 9 modificada también se observaron para líneas celulares de cáncer de pulmón humanas H226 (carcinoma de células escamosas), A549 (adenocarcinoma) y H60 (carcinoma de células pequeñas). Sin embargo, el nivel de Anexina V expresada en LLC aumentó significativamente en presencia de mutéína de galectina 9 modificada.

Por el contrario, cuando se inoculó LLC por vía subcutánea en ratones C58BL6 isogénicos en la coexistencia de mutéína de galectina 9 modificada, los tumores no se injertaron de forma exitosa, y se observaron claras diferencias de grupo de control 5 semanas después de la inoculación. La proporción superviviente de los ratones se mejoró significativamente en presencia de mutéína de galectina 9 modificada. Se ha revelado que la mutéína de galectina 9 modificada induce apoptosis en células cancerosas y ejerce acciones antitumorales.

En modelos experimentales de células de la línea celular de carcinoma de pulmón de células pequeñas humanas H69 inyectadas por vía intravenosa en ratones desnudos, que imitan micrometástasis de múltiples órganos de cánceres de pulmón humanos, se observó que se obtenía eficacia inhibidora de metástasis con la aplicación i.p. de mutéína de galectina 9 modificada.

Ejemplo 15 [Inducción Mediada por Mutéína de Galectina 9 Modificada de Apoptosis (Citotoxicidad) en Células Tumorales Cultivadas]

[Protocolo]

(1) Apoptosis de Células Meth a

Se situó una suspensión de Meth A en RPMI (SIGMA) que contenía FBS 10% (JRH) en una placa de 96 pocillos (FALCON) a 4×10^4 células/90 μl , de forma contemporánea seguido de adición de mutéína de galectina 9 modificada, h-G9NC(nula) a una dosis de 1 a 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (10 μl). Las células se incubaron después durante 24 h (37 °C, CO₂ 5%). Veinticuatro horas después, las células se lavaron una vez con 200 μl de PBS(-), se suspendieron en Tampón de Unión de Anexina V (BD PharMingen), se mezclaron con Anexina V-PE (BD PharMingen) y 7-amino-actinomicina D, se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min en oscuridad, y después se sometieron a análisis con FACS calibur (Becton, Dickinson).

(2) Apoptosis de Células B16/F10

Se situó una suspensión de B16/F10 en RPMI (SIGMA) que contenía FBS 10% (JRH) en una placa de 96 pocillos (FALCON) a 4×10^4 células/90 μl , y después se incubó durante 24 h (37 °C, CO₂ 5%). A continuación se añadió mutéína de galectina 9 modificada, h-G9NC(nula), para hacer la concentración final de 1 a 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y las células se incubaron durante 24 h. Despues de la incubación durante 24 h, las células se lavaron una vez con 200 μl de PBS(-), se trataron con Tripsina EDTA 0,05% (GIBCO), después se lavaron una vez con un medio de cultivo, seguido de lavado con PBS(-). A continuación, las células se suspendieron en Tampón de Unión de Anexina V (BD PharMingen), se mezclaron con Anexina V-PE (BD PharMingen) y 7-amino-actinomicina, se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min en oscuridad y después se sometieron a análisis con FACS calibur (Becton, Dickinson).

[Resultados] Los resultados se muestran en las FIG. 22 y 23. La FIG. 22 muestra resultados de análisis con respecto a inducción mediada por mutéína de galectina 9 modificada (h-G9NC(nula)) de apoptosis en células Meth A. La FIG. 23 muestra los resultados de análisis con respecto a inducción de apoptosis mediada por mutéína de galectina 9 modificada (h-G9NC(nula)) en células B16/F10.

Ejemplo 16 [Eficacia Antitumoral (Antineoplásica) de Mutéína de Galectina 9 Modificada en modelo de Peritonitis Cancerosa]

[Protocolo]

(1) Células Meth A: Se inoculó una suspensión celular (5×10^5 células/100 μl) de células Meth A en PBS(-) en ratones BALB/c (SLC, hembras de 6 semanas de edad, n=3) por vía intraperitoneal (i.p.).

Se administró mutéína de galectina 9 modificada (h-G9NC(nula), 100 $\mu\text{g}/300 \mu\text{l}$), i.p. cada día hasta el Día 18 después de la inoculación celular. Los animales se dividieron en cuatro grupos (n=10), dependiendo del momento de administración inicial, es decir, 1) inmediatamente, 2) el Día 3, 3) el Día 7, y 4) el Día 10 después de la inoculación de células Meth A y se compararon las proporciones de supervivencia.

(2) Células B16/F10: Se inocularon células (5×10^5 células/100 μl) i.p. en ratones C57/BL6 (SLC, hembras de 6 semanas de edad). Inmediatamente después de la inoculación, se administró cada concentración de mutéína de galectina 9 modificada (h-G9NC(nula); 10, 30 y 100 $\mu\text{g}/300 \mu\text{l}$) i.p. cada día durante 14 días. Se compararon las tasas de supervivencia. El Día 14 después de la inoculación, se examinaron los órganos.

[Resultados] Los resultados se muestran en las FIG. 24 a 27 y 48. La FIG. 24 muestra curvas de supervivencia que indican que la mutéína de galectina 9 modificada tiene actividad antitumoral contra el modelo de peritonitis cancerosa, inducido por células Meth A. FIG. 25: fotografías que muestran cada estado de los ratones, grupo al que

no se administró muteína de galectina 9 modificada (Gal9) (superior) y grupo al que se administró Gal9 (inferior). La FIG. 26 muestra curvas de supervivencia que indican que la muteína de galectina 9 modificada tiene actividad antitumoral contra el modelo de peritonitis cancerosa, inducido por células B16/F10. FIG. 27: fotografías que muestran cada estado de tejidos de órganos internos de ratones modelo con peritonitis cancerosa, inducida por células B16/F10 en comparación entre grupos a los que se administró y a los que no se administró muteína de galectina 9 modificada (Gal-9). La FIG. 48 es una gráfica de curvas de supervivencia cuando los ratones inoculados i.p. con células LLC (1×10^6 células) recibieron muteína de galectina 9 modificada (h-G9NC(nula), 100 μg /ratón) o vehículo i.p. cada día (administrado cada día desde el Día 0, consistiendo cada grupo en 7 ratones). En el modelo de ratón de peritonitis cancerosa (Meth A, célula B16/F10, célula LLC), se encuentra eficacia para mantener a los animales vivos cuando se administra G9NC(nula) i.p. (administrada de forma contemporánea con y después de la inoculación de células cancerosas). Las células Meth A y LLC son células en las que puede inducirse apoptosis por muteína de galectina 9 modificada. Sin embargo, la apoptosis en células B16/F10 no es inducible con muteína de galectina 9 modificada. Para células B16/F10, se aclara que la muteína de galectina 9 modificada inhibe la unión de células cancerosas con matrices extracelulares de una manera dependiente de dosis. Además, en el modelo de peritonitis cancerosa, inducido por células B16/F10, el número de células NK y NKT en el fluido peritoneal aumentó en los grupos a los que se administró G9NC(nula) en comparación con grupos de control. Aunque las células de melanoma B16/F10 son resistentes a apoptosis mediada por galectina-9 estabilizada, puede observarse mejora de la proporción de supervivencia e inhibición de la adhesión de células de melanoma en la pared abdominal. Se ha sugerido que la eficacia antitumoral mediada por muteína de galectina 9 modificada en el modelo de peritonitis cancerosa puede estar asociada con la inhibición de la adhesión de células tumorales en una matriz extracelular, es decir, la eficacia de inhibir la infiltración de células antiinflamatorias y células inmunitarias incluyendo células NK y NKT.

Ejemplo 17 [Análisis de Células B16/F10 Intra-abdominales Infiltradas]

[Protocolo] Se inoculó una suspensión (5×10^5 células/200 μl) de células B16/F10 en PBS(-) en la cavidad abdominal de cada ratón C57/BL6 (SCL), junto con una administración contemporánea i.p. de muteína de galectina 9 modificada (h-G9NC(nula)) a una dosis de 30 μg /300 μl . Veinticuatro horas después, se recogieron células peritoneales y se suspendieron en PBS(-). La suspensión celular se incubó con CD16/CD32 anti-ratón purificado (2.4G2; BD PharMingen) a 4 °C durante 5 min, y después con un anticuerpo seleccionado de CD122 anti-ratón PE (TM-β-1; BD PharMingen), cadena β anti-TCR de ratón FITC (H57-597; BD PharMingen), CD11b anti-ratón PE (M1/70; BD PharMingen), CD11c anti-ratón marcado con APC (HL3; BD PharMingen), CD8a anti-ratón APCe (BD PharMingen), CD4 anti-ratón FITC (BD PharMingen), a 4 °C durante 30 min y se analizó con un FACS calibur (Becton, Dickinson).

[Resultados] Los resultados se muestran en la FIG. 28. En comparación con grupos a los que se administró PBS, se ha reconocido que las células relacionadas con inmunidad tales como células NK/NKT se movilizan en un fluido de lavado abdominal entre los grupos a los que se administró muteína de galectina 9 modificada (30 μg).

Ejemplo 18 [Actividad Mediada por Muteína de Galectina 9 Modificada de Inhibición de la Adhesión de Células B16/F10]

[Protocolo] En una placa de 96 pocillos (CHEMICON) revestida con colágeno de tipo I, IV, laminina, fibronectina y vitronectina, respectivamente, se distribuyó muteína de galectina 9 modificada, h-G9NC(nula), a 10 μl para hacer la concentración final de 1 a 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$. En la placa se sembró una suspensión celular de células B16/F10 en RPMI (SIGMA) que contenían BSA 0,02% (Wako) a 4×10^4 células/pocillo (90 μl) y se incubó durante 1 h (37 °C, CO₂ 5%). Una hora después, se retiró un sobrenadante. Después, cada pocillo se lavó con 200 μl de PBS(-) dos veces, se mezcló con 90 μl de RPMI que contenía BSA 0,02% y 10 μl de WST-1 (Roche) y se incubó durante 2 a 3 h. En último lugar, se midió cada absorbancia (DO) de 450 a 600 con un lector de placas. Se calcula la adherencia (%):

$$\text{Adherencia (\%)} = [(DO \text{ de la Muestra de Ensayo} - \text{Blanco}) / (DO \text{ del Control Negativo} - \text{Blanco})] \times 100$$

[Resultados] Los resultados se muestran en la FIG. 29. La unión de células B16/F10 con cada matriz extracelular (colágeno de tipo I, colágeno de tipo IV, laminina, fibronectina y vitronectina) se inhibió por muteína de galectina 9 modificada (en el dibujo, escrito Gal-9). Se observó que la acción inhibidora era dependiente de dosis de muteína de galectina 9 modificada. A continuación, se examinó la bioactividad de la muteína de galectina 9 modificada en la inflamación. La inflamación usada en el presente documento para examinar la bioactividad de la muteína de galectina 9 modificada incluye asma bronquial, clasificada en una forma de enfermedad inflamatoria de tipo I; anemia hemolítica autoinmune, clasificada en una forma de enfermedad inflamatoria de tipo II; reacción de Arthus (angitis), clasificada en una forma de enfermedad inflamatoria de tipo III.

Ejemplo 19 [Modelo de RAH Inducida por Alérgeno (Der f)]

[Protocolo] Se obtuvieron dexametasona (sal disódica de fosfato de dexametasona 21, Sigma, MO, Estados Unidos), metacolina (MCh, Sigma, MO, Estados Unidos) y Extracto Alergénico mixto de ácaros (D. Farinae; Der f)) de cada proveedor indicado. Para administración a animales, los compuestos se suspendieron en PBS(-), que se usó como el vehículo en todos los experimentos.

Se obtuvieron ratones Balb/c (7 semanas de edad) de SLC (Shizuoka, Japón). Los animales se mantuvieron en condiciones convencionales en un ritmo de día/noche de 12 h con acceso libre al alimento y agua a voluntad. Todos los animales recibieron cuidados humanos de acuerdo con las directrices internacionales y la ley nacional.

5 La inducción de respuesta asmática hipersensible (RAH) en ratones se realizó como sigue: Para inducir hipersensibilidad de las vías respiratorias a metacolina e infiltración de eosinófilos en el tejido de las vías respiratorias murinas, los ratones macho se sensibilizaron y después se expusieron al antígeno de ácaro anteriormente descrito (Der f) como el alérgeno. Los ratones se inmunizaron por administraciones intranasales (i.n.) de 0,05 ml de Der f (0,5 mg/ml) los días 0, 7 y 20, y después se expusieron a Der f en aerosol 1% durante 30 min usando un nebulizador. El grupo de control recibió administraciones i.n. de PBS normal (0,05 ml) los días 0, 7 y 20 y 10 después se expuso a PBS durante 30 min usando un nebulizador.

Para estudiar el efecto de muteína de galectina 9 modificada, h-G9NC(nula), y dexametasona, los ratones recibieron inyecciones i.p. de muteína de galectina 9 modificada, h-G9NC(nula) (100 µg/410 µl (en PBS)/cuerpo) o dexametasona (3 mg/200 µl (en PBS)/kg(peso corporal)) antes y después de la exposición a Der f.

15 Se recogieron muestras de fluido de lavado broncoalveolar (BAL) de cada animal. El flujo de aire pulmonar total en ratones conscientes no restringidos se estimó con un pleismógrafo de cuerpo completo no restringido (PULMOS-I; M.I.P.S, Osaka, Japón). Se usaron las diferencias de presión entre una cámara que contenía los ratones y una cámara de referencia para extrapolar el volumen por minuto, volumen corriente, frecuencia de respiración y resistencia específica de las vías respiratorias (sRAW). La resistencia específica de las vías respiratorias es un parámetro adimensional que está en función del flujo aéreo pulmonar total en ratones durante el ciclo respiratorio. 20 Los ratones se expusieron a PBS en aerosol (para la medición de línea basal) o MCh (6 a 25 mg/ml) durante 2 min. Se tomaron lecturas y se promediaron para 100 respiraciones después de cada nebulización. Las células en suspensión se tiñeron con solución de Turk y se contaron con un hemocitómetro para determinar cada número de células (células/ml). A continuación, se realizaron preparaciones de cytopsin para determinar diferenciales celulares con solución de Giemsa-May-Grünwald mediante la identificación de la caracterización morfológica. En cada 25 portaobjetos, se contaron de 200 a 500 leucocitos.

30 [Resultados] Los resultados se muestran en las FIG. 30, 31 y 32. En los dibujos, cada valor representa la media ± E.T. de 7 animales. Se analizaron las diferencias estadísticas usando ANOVA de una vía, y se evaluaron las diferencias entre grupos usando el Ensayo de Comparación Múltiple de Dunnett (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001). A partir de la FIG. 30, se revela que la administración de h-G9NC(nula) [Gal-9] conduce a alivio de la hipersensibilidad de las vías respiratorias potenciada. A partir de la FIG. 31, resulta evidente que la infiltración de eosinófilos en BALF está inhibida cuando se administra h-G9NC(nula) [Gal-9]. A partir de la FIG. 32 resulta evidente que la administración de h-G9NC(nula) [Gal-9] inhibe la infiltración de células inflamatorias en el entorno de los tubos bronquiales. Por lo tanto, se sugiere que la galectina 9 inhibe la infiltración de células inflamatorias en las vías respiratorias por lo que se aliviará la hipersensibilidad de las vías respiratorias.

35 Ejemplo 20 [Modelo de RAH Inducida por OVA]

40 [Protocolo] Los animales usados fueron ratones y cobayas. Se obtuvieron ovoalbúmina (OVA, Sigma, MO, Estados Unidos), metopirona (Sigma, MO, Estados Unidos) y mepiramina (Sigma, MO, Estados Unidos) del proveedor indicado. El resto de compuestos se obtuvo del mismo modo que en el Ejemplo 19. Para administración a animales, se suspendieron los compuestos en PBS(-), que se usó como el vehículo en todos los experimentos. Se obtuvieron ratones Balb/c (7 semanas de edad) de SLC (Shizuoka, Japón) y cobayas (de 5 semanas de edad) de Kudou Co. Ltd (Kumamoto, Japón). Los animales se mantuvieron del mismo modo que en el Ejemplo 19.

45 Se realizó inducción de RAH en ratones como sigue: Para inducir hipersensibilidad de las vías respiratorias a metacolina e infiltración de eosinófilos en tejido de las vías respiratorias murinas, los ratones macho se sensibilizaron y después se expusieron a la OVA anteriormente descrita como el alérgeno. Los ratones se inmunizaron por administraciones i.p. de 0,2 ml de OVA en complejo con sulfato de potasio de aluminio (0,5 mg/ml) los días 0 y 14. Los días 14, 18 y 22, los ratones se anestesiaron con 0,2 a 0,3 ml de dilución de pentobarbital (5,0 mg/ml) en solución salina normal. Todos los grupos sensibilizados con OVA recibieron i.n. 0,05 ml de OVA 2,0 mg/ml en solución salina normal los días 14, 18 y 22. El grupo de control de los animales recibió i.p. PBS normal en mezcla con sulfato potásico de aluminio los días 0 y 14, y después i.n. 0,05 ml de PBS normal los días 14, 18 y 22.

50 Para estudiar el efecto de la muteína de galectina 9 modificada, h-G9NC(nula), y dexametasona, los ratones recibieron inyecciones i.p. de muteína de galectina 9 modificada, h-G9NC(nula) (100 µg/410 µl (en PBS)/cuerpo), o dexametasona (3 mg/200 µl (en PBS)/kg (peso corporal)), los días 0, 7, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 y 22 antes y después de la exposición a OVA.

55 Se recogieron muestras de fluido de BAL de cada animal. El flujo aéreo pulmonar total en ratones conscientes no restringidos se estimó con un pleismógrafo barométrico de cuerpo completo (Buxco Electronics, Inc., Sharon, CT). El aparato produjo una medida de cambios en el patrón respiratorio conocido como Pausa potenciada (Penh), que se correlaciona con y puede usarse para supervisar la resistencia de las vías respiratorias. Los ratones se expusieron a PBS en aerosol (para la medición de línea basal) o MCh (3 a 50 mg/ml) durante 2 min. Se tomaron

lecturas y se promediaron para 100 respiraciones después de cada nebulización de MCh. Las células en suspensión se tiñeron con solución de Turk, y se contaron con un hemocitómetro para determinar cada número de células (células/ml). A continuación, se realizaron preparaciones de cytospin para determinar diferenciales celulares con solución de Giemsa-May-Grünwald mediante identificación de la caracterización morfológica. En cada portaobjetos, 5 se contaron de 200 a 500 leucocitos.

Se realizó inducción de RAH en cobayas como sigue: Para inducir respuesta asmática inmediata (IAR) y respuesta asmática tardía (LAR) a antígeno e infiltración de eosinófilos en el tejido de las vías respiratorias, se sensibilizaron cobayas macho y después se expusieron a la OVA descrita anteriormente como el alérgeno. Las cobayas se sensibilizaron durante 10 min con un aerosol de OVA 1% en solución salina usando un nebulizador Omron NE-U17 10 (Tateishi Electric Co. Tokio, Japón) los días 0 a 7. Treinta minutos antes de la sensibilización y la exposición, se administró mepiramina (10 mg/kg) a todos los animales para evitar el choque anafiláctico.

Para estudiar el efecto de la muteína de galectina 9 modificada, h-G9NC(nula), las cobayas recibieron una inyección i.p. de muteína de galectina 9 modificada, h-G9NC(nula), a 1 µg/4 ml (en PBS/cuerpo antes y después de la exposición a OVA.

15 Se recogieron muestras de fluido de BAL de cada animal. El día 3 después de la sensibilización primaria, los animales se situaron en una cámara de pletismógrafo de cuerpo completo equipada con una máscara buconasal aislada de una cámara de cuerpo (PULMOS-I; M.I.P.S., Osaka, Japón). Se midió la conductancia de vías respiratorias específica (SGaw) de acuerdo con procedimientos de Agrawal. La relación entre flujo de aire y cambio 20 de volumen de la caja, que se calcula a partir del cambio de presión de la caja, puede determinarse como la pendiente en una representación x-y de cambio de volumen de caja y flujo de aire. La media de las pendientes en cinco ciclos respiratorios se usó para el cálculo de SGaw. Las cobayas recibieron una inyección i.p. de metopirona 10 mg/kg antes de la exposición a OVA, y se expusieron durante 5 min a un aerosol de OVA 2% en solución salina a un caudal de 3 l/min usando un nebulizador Omron NE-U17 (Tateishi Electric Co., Tokio, Japón). Después, los cambios de SGaw se supervisaron 1 min antes de y 2, 4, 5, 6, 7, 8 y 23 horas después de la exposición al antígeno. 25 30 Se tomaron lecturas y se promediaron para 100 respiraciones después de cada punto. Cada valor de SGaw se comparó con el obtenido antes de la inmunoexposición, que se definió como porcentaje de cambio en SGaw. Las células de suspensión se tiñeron con solución de Turk y se contaron con un hemocitómetro para determinar cada número de células (células/ml). A continuación, se realizaron preparaciones de cytospin para determinar diferenciales celulares con solución de Giemsa-May-Grünwald mediante identificación de la caracterización morfológica. En cada portaobjetos, se contaron 500 leucocitos.

[Resultados] Los resultados para ratones se muestran en las FIG. 33 y 34. Los resultados para ratones se muestran en las FIG. 35 y 36. En los dibujos, cada valor representa la media ± E.T. de 7 animales (FIG. 33), 5 a 7 animales (FIG. 34) y 7 u 8 animales (FIG. 35 y 36), respectivamente. Las diferencias estadísticas se analizaron usando ANOVA de una vía, y las diferencias entre grupos se evaluaron usando Ensayo de Comparación Múltiple de Dunnett 35 (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

La FIG. 33 indica que la muteína de galectina 9 modificada, h-G9NC(nula), alivia la hipersensibilidad de las vías respiratorias. La FIG. 34 indica que la muteína de galectina 9 modificada, h-G9NC(nula), inhibe la infiltración de eosinófilos en BALF.

La FIG. 35 muestra la eficacia de la muteína de galectina 9 modificada, h-G9NC(nula) en IAR/LAR. Como resultado, 40 entre los grupos a los que se administró muteína de galectina 9 modificada, se reconoce una diferencia significativa tanto en IAR como LAR, en comparación con los grupos de control, es decir, se puede percibir la eficacia inhibidora.

La FIG. 36 muestra la eficacia de la muteína de galectina 9 modificada, h-G9NC(nula), en la infiltración de células inflamatorias en las vías respiratorias. Como resultado, entre los grupos de muteína de galectina 9 modificada, se 45 encuentra una diferencia significativa de los números de células totales y eosinófilos, en comparación con los grupos de control. También se encuentra una tendencia para inhibir la infiltración de otras células.

Se sugiere que será posible inhibir las respuestas asmáticas inmediatas y tardías inducidas por antígenos e infiltración de células en las vías respiratorias entre cobayas sensibilizadas de forma activa cuando se administre muteína de galectina 9 modificada i.p. a una dosis de 1 mg/cuerpo antes de la sensibilización y exposición a antígenos.

50 Ejemplo 21 [Anemia Hemolítica Autoinmune (modelo de AIHA inducido por Ab R α MRC)]

[Protocolo] Se obtuvieron ciclofosfamida (CY, Sigma, MO, Estados Unidos), azatioprina (AZ, Sigma, MO, Estados Unidos), metotrexato (MTX, Sigma, MO, Estados Unidos) y anticuerpo de conejo anti-glóbulos rojos de ratón (Ab R α MRC) del proveedor indicado. El resto de compuestos se obtuvo del mismo modo que en el Ejemplo 19. Para la administración a animales, los compuestos se suspendieron en PBS(-), que se usó como el vehículo (V) en todos los 55 experimentos. Se obtuvieron ratones Balb/c (7 semanas de edad) de SLC (Shizuoka, Japón). Los animales se mantuvieron del mismo modo que en el Ejemplo 19.

Se realizó inducción de anemia hemolítica autoinmune (AIHA) en ratones como sigue: Se indujo anemia hemolítica por una inyección i.v. de autoanticuerpos de conejo α MRBC en ratones. Los animales recibieron una inyección i.p. de muteína de galectina 9 modificada (h-G9NC(nula)), dexametasona, otros fármacos o vehículo, a 0,345 ml/cabeza 30 minutos antes y los Días 1 a 4 después de la inyección con autoanticuerpo de conejo α MRBC.

- 5 Se recogieron muestras de sangre en tubos capilares de microhematocrito heparinizados y se centrifugaron durante 5 min a 12.000 rpm en una microcentrífuga. Los hematocritos medidos por el porcentaje de PBC empaquetados se determinaron directamente después de la centrifugación.

Se realizó análisis estadístico como sigue: A no ser que se indique de otro modo, los datos se expresan como valores medios \pm ETM. Se analizaron las diferencias estadísticas de los conjuntos de datos usando ANOVA de una vía, y se evaluaron las diferencias entre grupos por el Ensayo de Comparación Múltiple de Dunnett usando software de estadística disponible en el mercado (GraphPad Software, Inc., San Diego, Estados Unidos). Los P valores $<0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

[Resultados] Los resultados se muestran en la FIG. 37. En los grupos a los que se administró muteína de galectina 9 modificada, se observó una tendencia a inhibir la aparición de enfermedades. En el dibujo, cada valor representa la media \pm ETM de 5 a 6 animales (* $p<0,05$, ** $p<0,01$).

Ejemplo 22 [Reacción de Arthus (Angitis)]

[Protocolo] Se examinó la eficacia de muteína de galectina 9 modificada en reacción cutánea bifásica inducida por complejos inmunes (reacción de Arthus).

20 Se obtuvo IgG anti-OVA del proveedor indicado. El resto de compuestos se obtuvo del mismo modo que en el Ejemplo 20. Para administración a animales, los compuestos se suspendieron en PBS(-), que se usó como el vehículo en todos los experimentos. Se obtuvieron ratones Balb/c (7 semanas de edad) de SLC (Shizuoka, Japón). Los animales se mantuvieron del mismo modo que en el Ejemplo 19.

25 Se realizó inducción de edema del oído en ratones como sigue: En el modelo de reacción cutánea bifásica, los ratones se sensibilizaron por inyección i.d. de IgG anti-OVA (50 μ g/ratón) en cada oído derecho, e inmediatamente se expusieron por inyección i.v. de 200 μ l de OVA 1% en PBS. Los animales recibieron inyecciones i.v. de muteína de galectina 9 modificada (h-G9NC(nula)), dexametasona o vehículo, a 0,345 ml/cabeza 30 minutos antes y 5 horas después de la inyección de OVA. Después de la inyección de OVA, se midió el grosor del oído a 0, 2, 4, 8 y 24 horas con un indicador de grosor calibrado (Mitsutoyo, Tokio, Japón) con anestesia con éter.

30 El edema del oído se expresó como $(R-L) - (R_0-L_0)$, en el que R_0 y L_0 representan el grosor del oído derecho e izquierdo, respectivamente, al comienzo del experimento (0 h) y R y L representan los valores del grosor obtenidos en cada punto temporal dado.

35 Se realizó análisis estadístico como sigue: A no ser que se indique de otro modo, los datos se expresan como valores medios \pm ETM. Las diferencias estadísticas de los conjuntos de datos se analizaron usando ANOVA de una vía, y las diferencias entre grupos se evaluaron por el Post-Ensayo de Bonferroni usando software de estadística disponible en el mercado (GraphPad Software, Inc., San Diego, Estados Unidos). Los P valores $<0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

[Resultados] Los resultados se muestran en la FIG. 38. En los grupos a los que se administró muteína de galectina 9 modificada, se observó una tendencia a inhibir la aparición de enfermedades. En el dibujo, cada valor representa la media \pm ETM de 5 a 6 animales (* $p<0,05$, ** $p<0,01$).

Ejemplo 23 [Modelo de SDRA (Modelo de SDRA Inducido por LPS)]

[Protocolo] Se obtuvo lipopolisacárido (LPS, Sigma, MO, Estados Unidos) del proveedor indicado. El resto de los compuestos se obtuvieron del mismo modo que en el Ejemplo 19. Para administración a animales, los compuestos se suspendieron en PBS(-), que se usó como el vehículo en todos los experimentos. Se obtuvieron ratones Balb/c (7 semanas de edad) de SLC (Shizuoka, Japón). Los animales se mantuvieron del mismo modo que en el Ejemplo 19.

45 La inducción de SDRA en ratones se realizó como sigue: Para inducir disnea e infiltración de neutrófilos en el tejido de las vías respiratorias murinas, los ratones macho se expusieron a LPS como modelo de lesión pulmonar. Los ratones recibieron una inyección i.n. de LPS (0,6 mg/ml, 0,05 ml de volumen). El grupo de control recibió una administración de PBS normal (0,05 ml) por la misma vía.

50 Para estudiar el efecto de la muteína de galectina 9 modificada, h-G9NC(nula) y dexametasona, los ratones recibieron inyecciones i.p. de muteína de galectina 9 modificada, h-G9NC(nula) (100 μ g/410 μ l (en PBS)/cuerpo) o dexametasona (1 a 10 mg/200 μ l (en PBS)/kg(peso corporal)) 30 minutos antes y 6 horas después de la exposición a LPS.

Se analizó la función pulmonar de los ratones ((valor de Penh y volumen corriente) por plethysmografía barométrica de cuerpo completo (Buxco Electronics, Inc., Sharon CT) y plethysmografía de cuerpo completo no restringida (PULMOS-I, M.I.P.S, Osaka, Japón) una hora antes y 12 horas después de exposición a LPS.

Después del análisis de la función pulmonar, se recogieron muestras de fluido de BAL de cada animal.

- 5 El flujo de aire pulmonar total en ratones conscientes no restringidos se estimó con un plethysmógrafo de cuerpo completo no restringido.

Se usaron las diferencias de presión entre una cámara que contenía los ratones y una cámara de referencia para extrapolar el volumen por minuto, el volumen corriente, la frecuencia de respiración, el valor de Penh y la resistencia específica de las vías respiratorias (sRAW). La resistencia específica de las vías respiratorias es un parámetro adimensional que está en función del flujo de aire pulmonar total en ratones durante el ciclo respiratorio.

10 Las células en suspensión se tiñeron con solución de Turk y se contaron con un hemocitómetro para determinar cada número de células (células/ml). A continuación, se realizaron preparaciones de cytospin para determinar los diferenciales celulares con solución de Giemsa-May-Grünwald mediante identificación de la caracterización morfológica. En cada portaobjetos, se contaron de 200 a 500 leucocitos. Se realizó análisis estadístico como sigue:

15 A no ser que se indique de otro modo, los datos se expresan como valores medios \pm ETM. Se analizaron las diferencias estadísticas de conjuntos de datos usando ANOVA de una vía o ANOVA de dos vías, y se evaluaron las diferencias entre grupos por ensayo de Comparación Múltiple de Dunnett o Post-Ensaya de Bonferroni usando software de estadística disponible en el mercado (GraphPad Software, Inc., San Diego, Estados Unidos). Los P valores $<0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

20 [Resultados] Los resultados se muestran en las FIG. 39 y 40. En el dibujo, cada valor representa la media \pm ETM de 5 a 6 animales. Se analizaron las diferencias estadísticas usando ANOVA de una vía. Se evaluaron las diferencias entre grupos por ensayo de Comparación Múltiple de Dunnett (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$). La FIG. 39 muestra la eficacia de la miteína de galectina 9 modificada (h-G9NC(nula)) en la hipersensibilidad de las vías respiratorias cuando se observe alivio. La FIG. 40 indica que la miteína de galectina 9 modificada (h-G9NC(nula)) inhibe la infiltración de neutrófilos en BALF.

Ejemplo 24 [Modelo de Enfermedad Inflamatoria Inducida por Capsaicina]

[Protocolo] Se obtuvieron ciproheptadina (Sigma, MO, Estados Unidos) y capsaicina (Nakarai, Tokio, Japón) de cada proveedor indicado. El resto de compuestos se obtuvieron del mismo modo que en el Ejemplo 19. Para la administración a animales, los compuestos se suspendieron en PBS(-), que se usó como el vehículo en todos los experimentos. Se obtuvieron ratones Balb/c (de 7 semanas de edad) de SLC (Shizuoka, Japón). Los animales se mantuvieron del mismo modo que en el Ejemplo 19.

30 Se realizó inducción de edema del oído en ratones como sigue: Se aplicó una solución de capsaicina (500 μ g) en acetona/aceite de oliva (4/1, 30 μ l) a la superficie interior y exterior del oído derecho de cada ratón ((BALB/c, hembra, 7 a 8 semanas de edad, SPF, SLC Inc.). El vehículo, acetona/aceite de oliva, se aplicó al oído izquierdo como un control.

35 Los animales recibieron inyecciones de miteína de galectina 9 modificada (h-G9NC(nula)), dexametasona, ciproheptadina o vehículo (i.p., 0,345 ml/cabeza) 30 minutos e i.v. 10 minutos antes de la administración de capsaicina. Despues de la administración de capsaicina, se midió el grosor del oído a 0, 0,5, 1 y 2 horas con un indicador de grosor calibrado (Mitsutoyo, Tokio, Japón) con anestesia con éter.

40 El edema del oído se expresó como $(R-L) - (R_0-L_0)$, en el que R_0 y L_0 representan el grosor del oído derecho e izquierdo, respectivamente, al comienzo del experimento (0 h) y R y L representan los valores del grosor obtenidos en cada punto temporal dado.

45 Se realizó el análisis estadístico como sigue: A no ser que se indique de otro modo, los datos se expresan como valores medios \pm ETM. Se analizaron las diferencias estadísticas de los conjuntos de datos usando ANOVA de una vía, y se evaluaron las diferencias entre grupos por Post-Ensaya de Bonferroni usando software de estadística disponible en el mercado (GraphPad Software, Inc., San Diego, Estados Unidos). Los P valores $<0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

50 Los resultados se muestran en la FIG. 41. Se encuentra inhibición de la aparición de enfermedad en los grupos a los que se administró miteína de galectina 9 modificada (inyección i.v.). En el dibujo, cada valor representa la media \pm ETM de 5 a 6 animales. Se analizaron las diferencias estadísticas usando ANOVA de dos vías. Se evaluaron las diferencias entre grupos por ensayo de Comparación Múltiple de Dunnett (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$). Se espera que las miteínas de galectina 9 modificada actúen como inhibidores para dolor neurogénico, inflamatorio (incluyendo dolor debido a inflamación).

Ejemplo 25 [Acción de la Muteína de Galectina 9 Modificada en la Absorción de Hueso y Formación de Hueso]

[Protocolo]

1. Absorción de Hueso (Formación de Osteoclastos)

Se cultivaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC, 1×10^5 células) en presencia de RANKL (50 ng/ml) y M-CSF (50 ng/ml) durante 9 días. El número de células multinucleadas positivas para TRAP (osteoclastos) en grupos a los que se añadió muteína de galectina 9 modificada (h-G9NC(nula)) (0,1 a 10 nM) se comparó con el de grupos a los que no se añadió. H-G9NC(nula) inhibió de forma dependiente de la concentración la formación de células multinucleadas positivas para TRAP (osteoclastos). El término "h-G9NC(nula)" también se abrevia en ocasiones en el presente documento "gal-9".

10 Los resultados se muestran en la FIG. 42.

Grupo de control (cont.): $500 \pm 13,2$ células/pocillo

Grupos a los que administró muteína de Gal-9 modificada

(h-G9NC(nula), 0,1 nM): $451 \pm 7,6$ células/pocillo,

(h-G9NC(nula), 1,0 nM): $151 \pm 12,5$ células/pocillo, y

15 (h-G9NC(nula), 10 nM) : $29 \pm 14,0$ células/pocillo.

2. Formación de Hueso (Proliferación de Osteoblastos)

Para examinar la influencia de h-G9NC(nula) (0,1 a 100 nM) en la proliferación de osteoblastos humanos, las células se sembraron en una placa de 96 pocillos a 2×10^3 células/pocillo, se incubaron durante una noche, después se estimularon con h-G9NC(nula), y se observaron a 0, 24 y 48 h. La proliferación celular se evaluó basándose en las lecturas de absorbancia (DO) por el ensayo de Tetra color-1.

20 Los resultados se muestran en la FIG. 44. Las muteínas de galectina 9 modificada indujeron proliferación de osteoblastos de forma dependiente de la concentración, inhibiéndose dicha inducción por lactosa. Las muteínas de galectina 9 modificada indujeron la proliferación de osteoblastos de forma dependiente de la concentración y dicha inducción mediada por muteína de Gal-9 se inhibió por lactosa (30 nM).

25 Lecturas de absorbancia: control, $0,21 \pm 0,01$; h-G9NC(nula) (0,1 nM), $0,22 \pm 0,01$; h-G9NC(nula) (1,0 nM), $0,24 \pm 0,01$; h-G9NC(nula) (10 nM), $0,25 \pm 0,01$; y h-G9NC(nula) (100 nM), $0,26 \pm 0,02$ a las 24 h;

48 h después, control, $0,22 \pm 0,01$; h-G9NC(nula) (0,1 nM), $0,23 \pm 0,01$; h-G9NC(nula) (1,0 nM), $0,26 \pm 0,01$; h-G9NC(nula) (10 nM), $0,27 \pm 0,01$; y h-G9NC(nula) (100 nM), $0,31 \pm 0,04$.

(Diferenciación de Osteoblastos)

30 Para examinar la influencia de la muteína de galectina 9 modificada (h-G9NC(nula)) (100 nM) en la diferenciación de osteoblastos humanos, se sembró una suspensión de células en FCS 10%/DMEM en una placa de 6 pocillos a 1×10^5 células/pocillo, se incubó durante 24 horas, después se sometió a depivación en FCS 1%/DMEM durante una noche, se estimuló con gal-9 y se observó 8 h después. La diferenciación celular se evaluó basándose en ALP intracelular y valores de osteocalcina medidos usando un citómetro de flujo.

35 Los resultados se muestran en la FIG. 45. Las muteínas de galectina 9 modificada indujeron la expresión de ALP y osteocalcina, los marcadores de nueva formación de hueso en osteoblastos. ALP aumentó en 400 moléculas/célula en comparación con grupos no estimulados, y la osteocalcina en 800 moléculas/célula en comparación con grupos no estimulados. Además, cuando los osteoblastos se mezclaron con h-G9NC(nula) (10 nM) y se cultivaron durante 28 días, la tinción con ALP así como tinción von Kossa se promovió en comparación con grupos no añadidos.

40 A partir de los ensayos anteriores, la agregación de células mononucleares tuvo lugar en un periodo de 6 horas después de la adición de muteína de galectina 9 modificada. Las muteínas de galectina 9 modificada inhibieron la formación de células multinucleadas positivas para TRAP de forma dependiente de la concentración. Las muteínas de galectina 9 modificada indujeron la proliferación de osteoblastos de forma dependiente de la concentración. Las muteínas de galectina 9 modificada inducen la expresión de ALP y osteocalcina en osteoblastos.

45 A la vista de los resultados anteriormente descritos, se ha sugerido que las muteínas de galectina 9 modificada y proteínas de muteína de galectina 9 nativas pueden actuar en la absorción de hueso de forma supresora y en la formación de hueso de forma aceleradora. Por lo tanto, se considerará que pueden actuar como fármacos acelerantes de la formación de hueso para aplicaciones terapéuticas para osteoporosis postmenopáusica.

Ejemplo 26 [Acción de la Muteína de Galectina 9 Modificada en el Modelo de Neumonía Intersticial]

50 [Protocolo] Se usaron ratones para animales modelo de neumonía intersticial. Se trataron ratones C57BL/5 (hembra,

6 semanas de edad, de 7 a 8 semanas de edad cuando se usaron, 20 animales) de acuerdo con los documentos de referencia: Blood 2002, 99: 1289-98 y Am J Respir Crit Care Med 2003, 168: 1075-83 para inducir neumonía intersticial. Se usaron los compuestos rhIL-2 (Pepro Tech, 5 µg x 10 animales x 2 grupos x 14 días = 1400 µg = 1,4 mg) y rmIL-18 (MBL, 0,2 µg x 10 animales x 2 grupos x 14 días = 56 µg).

5 Los grupos de muestra consisten en grupos de control y grupos a los que se administró muteína de galectina 9 modificada (Gal-9) preparados.

(1) Grupo de Control (10 ratones)

Los ratones recibieron inyecciones intraperitoneales (i.p.) de IL-2 (5 µg/ratón/día) + IL-18 (0,2 µg/ratón/día) los Días 0 a 13 cada día. Los ratones de control recibieron inyecciones i.p. de PBS (200 µl/ratón/día) los Días 0 a 13 cada día.

(2) Grupo al que se administró Gal-9 (10 ratones)

Los ratones recibieron inyecciones i.p. de IL-2 (5 µg/ratón/día) + IL-18 (0,2 µg/ratón/día) los Días 0 a 13 cada día. Se injectó una solución de muteína de galectina 9 modificada, h-G9NC(nula), en PBS a animales a 100 µg/300 µl de PBS/ratón de los Días 0 a 13 cada día. Ambos grupos recibieron una inyección i.p. de NEMBUTAL® para anestesiar.

15 Cada proporción de supervivencia de ratones se tomó como el primer indicador de la evaluación de la eficacia. Los animales que sobrevivieron al Día 14 se sometieron a examen de su tejido pulmonar.

Se realizó tomando muestras de los ratones como sigue: Los ratones que murieron durante el ensayo se diseccionaron tras su muerte para proporcionar muestras tisulares de pulmón. Los ratones que sobrevivieron hasta el día 14 se trataron como sigue: anestesia con éter → recogida de sangre de la órbita → dislocación de las vértebras cervicales → toracotomía → recogida de tejido pulmonar.

20 Se examinó el efecto de la administración rhGal-9nula i.p. en este modelo. Las proporciones de supervivencia respectivas el Día 14 de los grupos a los que se administró y no se administró rhGal-9nula se tomaron como patrones de evaluación de la eficacia y además se compararon sus imágenes tisulares el Día 14.

25 Los resultados se muestran en las FIG. 46 y 47. La FIG. 46 muestra proporciones de supervivencia. Para las proporciones de supervivencia el Día 14, el grupo al que no se administró dio 30% (sobrevivieron 3 animales de entre 10) mientras que el grupo al que se administró h-G9NC(nula) (Gal-) dio 90% (sobrevivieron 9 animales de entre 10). Por lo tanto, se obtuvo una mejora de la proporción de supervivencia a través de la administración de muteína de galectina 9 modificada (h-G9NC(nula): Gal-9).

30 La FIG. 47 muestra imágenes de tejido pulmonar (teñido con HE, fotografía) de ratones supervivientes el Día 14. En el grupo no administrado, incluso los ratones supervivientes mostraron engrosamiento en los intersticios pulmonares, que acompañaban a la invasión intensiva generalizada de células. En el grupo al que se administró muteína de galectina 9 modificada (h-G9NC(nula): Gal-9), tanto el engrosamiento de intersticios como la invasión celular fueron ligeros, y se encontraron muchos restos tisulares normales. Por lo tanto, se ha revelado que la galectina 9 (Gal-9) es eficaz en la supresión de la aparición de enfermedad en este modelo. Aunque tuvieron lugar cambios del peso corporal en este ensayo, no se observó cambio significativo del peso corporal para ratones tanto muertos como supervivientes en el grupo no administrado.

Ejemplo 27 [Actividad contra Modelo de Metástasis de Cáncer]

[Protocolo] Para examinar la acción de muteínas de galectina 9 modificada en el modelo de metástasis de cáncer, se usaron B16/F10.

40 Las células (5×10^5 células/200 µl) se inocularon por vía intravenosa (i.v.) en la cola de cada ratón C57/BL6 (SLC, hembras de 6 semanas de edad). Inmediatamente después de la inoculación, se administró muteína de galectina 9 modificada (h-G9NC(nula), abreviada como "Gal-9"; 100 µg/300 µl) o PBS (N = 15 cada uno) i.v. en la cola cada día durante 11 días (12 inyecciones). Doce días después de la administración, los animales se diseccionaron, y se contó el número de colonias.

45 La FIG. 49 muestra los resultados de ensayo (cada vista exterior de los pulmones del animal modelo). Los resultados de recuento del número de colonias de pulmón se muestran en la FIG. 50. Como resultado de la comparación del grupo al que se administró muteína de galectina 9 modificada (grupo Gal-9) con el grupo al que se administró PBS (grupo PBS), se descubrió la eficacia de inhibición de metástasis de las muteínas de galectina 9 modificada. En la comparación de números de colonia de pulmón, los números de colonias medios son: grupo al que se administró muteína de galectina 9 modificada (Gal-9), $231,3 \pm 20,87$; y grupo al que se administró PBS (PBS), $122,1 \pm 13,61$. Los P valores <0,0001 se consideraron significativos. Por lo tanto, se ha verificado que las muteínas de galectina 9 modificadas son eficaces en la inhibición de metástasis de cáncer.

Ejemplo 28 [Modelo de Enfermedad Inflamatoria Inducida por Carragenina: Edema de la Pata de Ratas Inducido por Carragenina]

- Se obtuvo carragenina (Izushi kagaku, Japón) del proveedor indicado. Para administración a animales, los compuestos se suspendieron en PBS(-), que se usó como el vehículo en todos los experimentos. Se obtuvieron ratas Lewis hembra (5 semanas de edad) de SLC (Shizuoka, Japón). Los animales se mantuvieron del mismo modo que en el Ejemplo 19. Para examinar el efecto de las mutéinas de galectina 9 modificada, las ratas recibieron una inyección i.v. de mutéina de galectina 9 modificada (h-G9NC(nula), abreviada a "gal-9"; 30 a 300 µg/cuerpo (en PBS)) 10 min antes de la inyección de carragenina. Los grupos de control positivos recibieron dexametasona (Dex.) a una dosis de 3 mg/kg o 7 mg/kg.
- 5 [Edema de la Pata inducido por Carragenina] Para examinar la actividad antiinflamatoria de la mutéina de galectina 9 modificada (galectina-9 nula humana, h-G9NC(nula)), se realizaron ensayos de edema de pata inducido por carragenina en ratas de acuerdo con procedimientos de Sugishita y col. (1981). Las ratas recibieron una inyección i.v. de un compuesto farmacológico (30, 100 y 300 µg/cuerpo) o vehículo (PBS) 10 minutos antes de la inyección de carragenina (0,15 ml; 1% p/v en solución salina) en la almohadilla plantar de la pata posterior derecha. El volumen de la pata se midió por plethysmografía de desplazamiento de mercurio (Muromachi, Tokio, Japón). Las mediciones del volumen de la pata se repitieron para la pata a la que se inyectó carragenina y la pata contralateral (se inyectó solución salina en la pata posterior derecha) a -1, 2, 4, 6, 24, 48 y 72 h después de la inducción de edema. Los cambios del volumen de la pata se calcularon como las diferencias entre la lectura -1 h y lectura de cada punto temporal dado. El edema inducido por carragenina se expresó como la diferencia entre la pata a la que se inyectó carragenina y la pata contralateral para cada animal.
- 10 15 20
- Se realizó análisis estadístico como sigue: A no ser que se indique de otro modo, los datos se expresan como valores medios ± ETM. Se analizaron las diferencias estadísticas de los conjuntos de datos usando ANOVA de una vía o ANOVA de dos vías, y se evaluaron las diferencias entre grupos por el Ensayo de Comparación Múltiple de Dunnett o Post-Ensayo de Bonferroni usando software de estadística disponible en el mercado (GraphPad Software, Inc., San Diego, Estados Unidos). Los P valores <0,05 se consideraron estadísticamente significativos.
- 25
- [Resultados] Los resultados se muestran en la FIG. 51 (mutéina de galectina 9 modificada) y FIG. 52 (dexametasona). Se ha observado que las mutéinas de galectina 9 modificada están activas en la inhibición de la aparición de enfermedad incluso a un nivel de dosis de 30 µg/ratón.

Ejemplo 29

- 30 1. Acción Analgésica de la Mutéina de Galectina 9 Modificada en Adyuvante

Modelo de Artritis

- [Protocolo] [Dolor Desencadenado por Estímulos Mecánicos (Ensayos de Randall-Selitto = Medición de la Presión Vertical del Umbral del Dolor)] Se obtuvo *Mycobacterium butyricum* (Difco, Detroit, MI, Estados Unidos) del proveedor indicado. Para la administración a animales, los compuestos se suspendieron en PBS(-), que se usó como el vehículo en todos los experimentos. Se obtuvieron ratas Lewis hembra (5 semanas de edad) de SLC (Shizuoka, Japón). Los animales se mantuvieron del mismo modo que en el Ejemplo 19. Para examinar el efecto de las mutéinas de galectina 9 modificada, las ratas recibieron i.v. de mutéina de galectina 9 modificada, h-G9NC(nula) (abreviada a "Gal-9") a una dosis de 30 a 300 µg/cuerpo (en PBS) los Días 0 a 22 antes y después de la inyección de adyuvante. El grupo de control positivo recibió indometacina (Indo) a una dosis de 3 mg/kg.
- 35 40 45
- [Artritis Adyuvante] Se pesaron ratas Lewis hembra (5 semanas de edad) y se marcó la cola de cada rata. Los animales se dividieron después en grupos en los que cada grupo consistía en 9 animales. Se registró el peso corporal de cada rata y el volumen de la almohadilla plantar de ambas patas traseras antes de la inyección de adyuvante (Día 0). A continuación, se inyectó adyuvante en la pata trasera derecha de cada rata. Los grupos a los que no se inyectó adyuvante se tomaron como controles de la misma edad normales (simulados). Se registró el peso corporal y el volumen de las patas de las ratas en cada grupo antes del sacrificio de las ratas cada día dado después de la inyección de adyuvante.

[Protocolo para Adyuvante] Se molvió *Mycobacterium butyricum* en un mortero para proporcionar un adyuvante que se mezcló con un aceite para hacer la concentración final 10 mg/ml. Se inyectó una alícuota (0,2 ml) de la mezcla de adyuvante en la almohadilla plantar de la pata posterior derecha de la rata con una aguja de calibre 27, 1,25 cm.

- 50 55
- [Análisis de Dolor Desencadenado por Estimulación Mecánica] Se evaluó la intensidad de hiperalgesia usando el procedimiento de Randall-Selitto con algunas modificaciones para estudiar si la mutéina de galectina 9 modificada, galectina-9 nula humana (h-G9NC(nula)), tenía o no actividad analgésica tal como actividad de aliviar la hiperalgesia periférica en respuesta a presión externa en tejido inflamado agudo y no inflamado. Brevemente, se inyectó una alícuota de Adyuvante Completo de Freund s.c. en la pata posterior derecha de cada rata de Lewis hembra (5 semanas de edad) para inducir enfermedad inflamatoria aguda y crónica. La intensidad de hiperalgesia en respuesta a presión externa se midió por el ensayo de Randall-Selitto, en tejido inflamado agudo y no inflamado 2 días antes de la inyección de adyuvante y 5 días después de la inyección de adyuvante, y se continuó la supervisión hasta el

Día 25 (1 vez/semana). Después se aplicó gradualmente presión externa a las patas tanto inflamadas como no inflamadas contralaterales (0 a 200 g) con un Calibrador de Medición de Fuerza Digital (Imada, Aichi, Japón) bajo el control de un observador. El "umbral de dolor" se definió como la presión a la que el animal mostró en primer lugar pruebas de la sensación de dolor, indicado por la extensión de los dedos y/o las señales iniciales de retirada de la pata y/o vocalización. Se realizó análisis estadístico del mismo modo que en el Ejemplo 28. Brevemente, a no ser que se indique de otro modo, los datos se expresan como valores medios \pm ETM. Se analizaron las diferencias estadísticas de conjuntos de datos usando ANOVA de una vía o ANOVA de dos vías, y se evaluaron las diferencias entre grupos por Ensayo de Comparación Múltiple de Dunnett o Post-Ensayo de Bonferroni usando software de estadística disponible en el mercado (GraphPad Software, Inc., San Diego, Estados Unidos). Los P valores $<0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

[Resultados] Los resultados se muestran en la FIG. 58 (muteína de galectina 9 modificada, Gal-9) y FIG. 59 (indometacina). En los dibujos, cada valor representa la media \pm ETM de 8 a 9 animales ($n= 8$ a 9, FIG. 58) y de 9 animales ($n=9$, FIG. 59) en cada punto dado. Se analizaron las diferencias estadísticas usando ANOVA de dos vías, y se evaluaron las diferencias entre grupos usando Post-Ensayo de Bonferroni (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$). Cuando se administraron muteínas de galectina 9 modificada, el umbral del dolor en respuesta a estimulación externa aumentó de forma dependiente de la concentración no solamente para los sitios no inflamados sino también para sitios inflamados (véase FIG. 66 izquierda). Es decir, las muteínas de galectina 9 modificada elevan de forma sistémica los umbrales del dolor.

2. Modelo de Enfermedad Inflamatoria Aguda Inducida por Carragenina: Edema de la Pata inducido por Carragenina en ratas

[Protocolo] Se obtuvo carragenina (Izushi kagaku, Japón) del proveedor indicado. Para administración a animales, los compuestos se suspendieron en PBS(-), que se usó como el vehículo en todos los experimentos. Se obtuvieron ratas Lewis hembra (5 semanas de edad) de SLC (Shizuoka, Japón). Los animales se mantuvieron del mismo modo que en el Ejemplo 19. Para examinar el efecto de las muteínas de galectina 9 modificada, las ratas recibieron una inyección i.v. de muteína de galectina 9 modificada, h-G9NC(nula) (abreviada a "Gal-9"), a una dosis de 30 a 300 μ g/cuerpo (en PBS) 10 minutos antes de la inyección de carragenina. El grupo de control positivo recibió dexametasona (Dex) a una dosis de 3 mg/kg o 7 mg/kg.

[Análisis de Dolor Desencadenado por Estimulación Mecánica] La intensidad de hiperalgesia se evaluó usando el procedimiento de Randall-Selitto con algunas modificaciones para estudiar si la muteína de galectina 9 modificada, galectina-9 nula humana (h-G9NC(nula)), tenía o no actividad analgésica tal como actividad de alivio de hiperalgesia periférica en respuesta a presión externa en tejido inflamado agudo y no inflamado. Brevemente, se inyectó s.c. carragenina en la pata posterior derecha de cada rata Lewis hembra (5 semanas de edad) para inducir enfermedad inflamatoria aguda y crónica. La intensidad de hiperalgesia en respuesta a presión externa se midió por el ensayo de Randall-Selitto, en tejido inflamado agudo y no inflamado 1 día antes de la inyección de carragenina y a las 6 horas después de la inyección de carragenina y se continuó la supervisión hasta 75 h (1 vez/día). Despues se aplicó gradualmente presión externa a las patas tanto inflamadas como no inflamadas contralaterales (0 a 200 g) con un Calibrador de Medición de Fuerza Digital (Imada, Aichi, Japón) bajo el control de un observador. El "umbral del dolor" se definió como la presión a la que el animal mostró por primera vez pruebas de la sensación de dolor, indicado por la extensión de los dedos y/o las señales iniciales de retirada de la pata y/o vocalización.

Se realizó análisis estadístico del mismo modo que en el Ejemplo 28. Brevemente, a no ser que se indique de otro modo, los datos se expresan como valores medios \pm ETM. Se analizaron las diferencias estadísticas de conjuntos de datos usando ANOVA de una vía o ANOVA de dos vías y se evaluaron las diferencias entre grupos por Ensayo de Comparación Múltiple de Dunnett o Post-Ensayo de Bonferroni usando software de estadística disponible en el mercado (GraphPad Software, Inc., San Diego, Estados Unidos). Los P valores $<0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

(Resultados) Los resultados se muestran en la FIG. 60 (muteína de galectina 9 modificada, gal-9) y FIG. 61 (dexametasona). En los dibujos, cada valor representa la media \pm ETM de 9 animales ($n= 9$) en cada punto dado. Se analizaron las diferencias estadísticas usando ANOVA de dos vías, y se evaluaron las diferencias entre grupos usando Post-Ensayo de Bonferroni (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$). Cuando se administran muteínas de galectina 9 modificada, el umbral del dolor en respuesta a estimulación externa aumenta de forma dependiente de la concentración no solamente para sitios no inflamados sino también para sitios inflamados. Es decir, las muteínas de galectina 9 modificada elevan de forma sistémica los umbrales del dolor.

Ejemplo 30 [Estabilidad de Muteína de Galectina 9 Modificada en Fluido Sinovial Humano]

Condiciones de Reacción

55	Muestra de fluido sinovial de artritis reumatoide humana G9NC(nula) o G9(S) (5 μ l en PBS)	160 μ l 40 μ l
----	---	---------------------------

Se incubó galectina 9 en fluido sinovial al 80% a 37 °C durante 24 o 96 h (toma de muestras a las 6, 24, 48 y 72 h

durante la incubación).

Tratamiento con SD y transferencia de Western

Muestra 4,5 µl; H₂O 40,5 µl; tampón de muestra (4x, + 2-ME) 15 µl; SDS-PAGE: 12,5% (10 µl/carril).

Los resultados se muestran en la FIG. 62. Se ha aclarado que la muteína de galectina 9 modificada, G9NC(nula), es más estable incluso en fluido sinovial con alta actividad proteasa que galectina-9S (G9(S)).

Ejemplo 31 [Modelo de Artritis]

1. Modelo Inducido por Cóctel de Ab: Muteína de Galectina 9 Modificada (administración i.v.)

[Protocolo] Se usaron ratones hembra DBA/1J (7 a 8 semanas de edad). Se administró por vía intravenosa (i.v.) un cóctel de anticuerpos monoclonales artritogénicos (Chondrex, WA, Estados Unidos; N° 62100) a la cola de cada animal a 2 mg/0,5 ml/cuerpo. Tres días después, los animales recibieron una inyección i.p. de LPS (SIGMA, L6511) a 50 µg/0,2 ml. Además, se inyectó i.v. una solución de muteína de galectina 9 modificada, h-Gal9NC(nula) (abreviada a "Gal-9") a la cola de cada animal a 30 µg/200 µl. Los grupos de ensayo consisten en 3 grupos; grupo al que se administró PBS y grupos a los que se administró h-Gal9NC(nula) que consisten en grupo de administración única (al que se administró una vez el Día 0, es decir, fecha de la administración de LPS) y grupo de administración diaria (al que se administró cada día hasta el Día 10, 10 administraciones). Cada grupo se midió con respecto al grado de hinchamiento de la articulación de cada extremidad (de las extremidades derechas e izquierdas, anteriores y posteriores) una vez al día y se puntuó la gravedad de la artritis.

[Resultados] Los resultados se muestran en la FIG. 63. Después de la administración de cóctel de Ab, se indujo artritis con LPS. Cuando se aplicaron i.v. muteínas de galectina 9 modificada, la artritis también se inhibió. Se ha observado que incluso la administración única conduce a efecto inhibidor en la aparición de la enfermedad.

2-1. Modelo de CIA (Artritis Inducida por Colágeno): Muteína de Galectina 9 Modificada (administración i.p.)

[Protocolo] Se disolvió colágeno de tipo II bovino (BCII: Chondrex Inc., cat. n° 2002-1) en adyuvante completo (CFA: Difco cat n° 263810) para formar una emulsión que se inyectó por vía subcutánea (s.c.) en la base de la cola de cada ratón (ratón DBA/1J, de 7 a 8 semanas de edad, hembra) a una dosis de 100 µl (0,1 mg de BCII/100 µl/ratón). El día 21 después de la inmunización, se proporcionó la inyección de refuerzo de emulsión de colágeno, y se puntuó la gravedad de la artritis tres veces por semana para las 4 extremidades. Inmediatamente después de la inyección de refuerzo, se proporcionó i.p. muteína de galectina 9 modificada (abreviada a "Gal-9"; 30 µg/ratón) o PBS. A continuación, se repitió la inyección de fármaco cada día. Los ratones se supervisaron por múltiples observadores y se dio a cada extremidad una puntuación clínica (observaciones artríticas). Se clasificó cada extremidad, y se obtuvo una puntuación total por animal sumando cada puntuación individual, dando como resultado una mutación clínica máxima de 16 por animal. Finalmente, se calculó cada puntuación media.

- un dedo hinchado: 1
- dos dedos hinchados: 2
- hinchamiento hasta el dorso de la pata: 3
- hinchamiento grave, deformidades: 4

[Resultados] Los resultados se muestran en la FIG. 64. Se ha verificado que las muteínas de galectina 9 modificada son inhibidoras contra la aparición de la enfermedad.

2-2. Modelo de CIA (Artritis Inducida por Colágeno): Muteína de Galectina 9 Modificada (administración i.v.)

[Protocolo] Se disolvió colágeno de tipo II bovino (BCII: Chondrex Inc., cat. n° 2002-1) en adyuvante incompleto de Freund (IFA: Difco) premezclado con H37 Ra de *Mycobacterium tuberculosis* desecado (H37 Ra: Difco) para formar una emulsión que se inyectó s.c. en la base de la cola de cada ratón (ratón DBA/1J, 7 a 8 semanas de edad, hembra) a una dosis de 100 µl (0,2 mg de BCII/0,2 mg de H37 Ra/100 µl/ratón). El día 21 después de la inmunización, se proporcionó la inyección de refuerzo de emulsión de colágeno, y se puntuó la gravedad de la artritis tres veces por semana para las 4 extremidades. Los ratones se supervisaron por múltiples observadores y se dio a cada extremidad una puntuación clínica (observaciones artríticas). Se clasificó cada extremidad y se calculó la puntuación acumulativa para las cuatro extremidades de cada animal (máximo de 16 por animal). Finalmente, se calculó cada puntuación media. Inmediatamente después de la inyección de refuerzo, se proporcionó i.p. muteína de galectina 9 modificada (abreviada a "Gal-9"; 30 µg/ratón: N = 15) o PBS (N=10). A continuación, se repitió la inyección de fármaco cada día. Documento de Referencia: "Enhancement of collagen-induced arthritis in mice genetically deficient in extracellular superoxide dismutase", Ross AD, Banda NK, Muggli M, Arend WP. *Arthritis Rheum.* nov. 2004; 50(11):3702-11.

[Resultados] Los resultados se muestran en la FIG. 65. Se ha verificado que las muteínas de galectina 9 modificadas son inhibidoras contra la aparición de la enfermedad.

3. Modelo de Artritis Inducida por Adyuvante (AIA): Muteína de Galectina 9 Modificada

(Administración i.v.)

[Protocolo] Se obtuvo *Mycobacterium butyricum* (Difco, Detroit, MI, Estados Unidos) del proveedor indicado. Para la administración a animales, los compuestos se suspendieron en PBS(-), que se usó como el vehículo en todos los experimentos. Se obtuvieron ratas Lewis hembra (5 semanas de edad) de SLC (Shizuoka, Japón). Los animales se mantuvieron del mismo modo que en el Ejemplo 19. Para examinar el efecto de las muteínas de galectina 9 modificada, las ratas recibieron inyecciones i.v. de muteína de galectina 9 modificada, h-G9NC(nula) (abreviada a "Gal-9"; 30-300 µg/cuerpo (en PBS)) los Días 0 a 22 antes y después de la inyección de adyuvante.

[Artritis Adyuvante] Se pesaron ratas Lewis hembra (5 semanas de edad) y se marcó cada cola. Los animales se dividieron en grupos en los que cada grupo consistía en 9 animales. Se registró el peso corporal de cada rata y el volumen de la almohadilla plantar de ambas patas traseras antes de la inyección de adyuvante (Día 0). A continuación, se inyectó adyuvante en la pata trasera derecha de cada rata. Los grupos a los que no se inyectó adyuvante se tomaron como controles de la misma edad normales (simulados). Se registró el peso corporal y el volumen de la pata de ratas en cada grupo antes del sacrificio de las ratas en cada día dado después de la inyección de adyuvante.

[Volumen de la Pata] El volumen de la pata se midió por plethysmografía de desplazamiento de mercurio (Muromachi, Tokio, Japón). Se calcularon los cambios del volumen de la pata como las diferencias entre la lectura del Día 0 y la lectura de cada punto de datos dado.

[Evaluación Clínica] Se evaluó la gravedad de la artritis para cada extremidad como sigue: Se clasificaron cada una de las extremidades anteriores y posteriores para 1. articulaciones interfalangicas y dedos, 2. dorso o palma y 3. articulación del tobillo o muñeca, usando una escala de 0 a 3: 0, sin eritema e hinchamiento; 1, ligero eritema o hinchamiento; 2, eritema o hinchamiento moderado en la articulación del tobillo o la muñeca; y 3, eritema o hinchamiento grave.

La gravedad de la enfermedad se puntuó para cada grupo de ratas. Se obtuvo la puntuación de artritis acumulativa diaria por cada rata sumando cada puntuación de artritis de pata clasificada individual.

[Protocolo para Adyuvante] Se molvió *Mycobacterium butyricum* en un mortero para proporcionar un adyuvante que se mezcló con un aceite para hacer la concentración final 10 mg/ml. Se inyectó una alícuota (0,2 ml) de la mezcla de adyuvante en la almohadilla plantar de la pata posterior derecha de la rata con una aguja de calibre 27, 1,27 cm.

Se realizó análisis estadístico del mismo modo que en el Ejemplo 28. Brevemente, a no ser que se indique de otro modo, los datos se expresan como valores medios ± ETM. Se analizaron las diferencias estadísticas de conjuntos de datos usando ANOVA de una vía o ANOVA de dos vías y se evaluaron las diferencias entre grupos por Ensayo de Comparación Múltiple de Dunnett o Post-Ensayo de Bonferroni usando software de estadística disponible en el mercado (GraphPad Software, Inc., San Diego, Estados Unidos). Los P valores <0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

[Resultados] Los resultados se muestran en la FIG. 66 (muteína de galectina 9 modificada, Gal-9) y FIG. 67 (indometacina, Indo). La artritis adyuvante es inflamación que se produce debido a inmunidad adquirida principalmente asociada con inmunidad innata y linfocitos T. Aunque las muteínas de galectina 9 modificada inhiben ambas inflamaciones, estas inhiben principalmente la inflamación intensa debida a inmunidad adquirida. Se observa que el grupo al que se administró muteína de galectina 9 modificada tendía a actuar para un aumento o pérdida de peso corporal del mismo modo que el grupo al que se administró indometacina.

Ejemplo 32 [Modelo de CIA (Artritis Inducible por Colágeno) de rata: Muteína de Galectina 9 Modificada (administración i.v.)]

[Protocolo] Se disolvió colágeno de tipo II bovino (Collagen Gijutsu Kenkyukai, Tokio, Japón) en adyuvante incompleto de Freund (IFA: Difco) para formar una emulsión que se inyectó s.c. en la espalda de cada rata (DA(Slc, 45 11 semanas de edad; Japan SLC, Inc., Japón) a una dosis de 500 µl (colágeno 50 µg/500 µl/ratón) para sensibilización primaria. Una semana después, se inyectó una alícuota de la misma emulsión de colágeno (colágeno, 50 µg/500 µl/ratón) en la base de la cola de cada animal para sensibilización secundaria. Cada extremidad se puntuó tres veces por semana. Inmediatamente después de la inyección de refuerzo, los animales recibieron una inyección i.v. de muteína de galectina 9 modificada (galectina-9 humana nula = h-G9NC(nula); 3, 10 y 30 µg/1 ml/ratón o material de referencia negativa, PBS (1 ml/ratón), o una aplicación oral de material de referencia positiva, prednisolona (3 mg/10 ml/kg: SIGMA), una vez al día durante 32 días hasta el Día 38.

Se midió el volumen de la pata de cada extremidad (incluyendo extremidades derechas e izquierdas, anteriores y posteriores) el Día 0 (fecha de la sensibilización primaria con colágeno), Días 7, 15, 18, 22, 26, 30, 35 y 39 después de la sensibilización primaria y se calculó cada porcentaje de hinchamiento (%) de acuerdo con la siguiente fórmula:

Porcentaje de hinchamiento (%) = [volumen de la pata después de la exposición (ml) – volumen de la pata antes de la exposición (ml)] / [volumen de pata antes de la exposición (ml)] x 100

Se realizó análisis estadístico como sigue: Se tomó el valor acumulativo para los valores de las patas traseras derecha e izquierda como el valor individual para cada animal.

- 5 Los resultados se expresaron como el valor medio del porcentaje de hinchamiento (%) y un error típico. Se examinó la igualdad de varianzas entre el grupo de PBS y el grupo al que se administró prednisolona por ensayo de F. se realizó comparación de datos entre el grupo de PBS y el grupo al que se administró prednisolona usando ensayo de t Student para varianzas iguales pero usando el ensayo de t de Aspin-Wech para varianzas desiguales. A continuación, se examinó la igualdad de varianzas entre el grupo de PBS y el grupo al que se administró muteína de galectina-9 modificada por ensayo de Bartlet. Se realizó comparación de datos entre el grupo de PBS y el grupo al que se administró muteína de galectina-9 modificada usando el ensayo de Dunnett paramétrico para varianzas iguales pero usando el ensayo de Dunnett no paramétrico para varianzas desiguales. El nivel de significación se estableció a menos del 5% (los P valores <0,05 se consideraron significativos). Se expresaron valores menores del 5% por separado de valores menores del 1% ($p<0,01$). Los resultados se muestran en la FIG. 68 y Tabla 3. En la
- 10 Tabla 3, cada valor representa la media ± ETM. ##: significativamente diferente del control (Días 15, 18 y 22: ensayo de t de Student, * $p<0,05$, ** $p<0,01$: significativamente diferente del control (Días 18 y 22: ensayo de Dunnett paramétrico; Día 15: ensayo de Dunnett no paramétrico). Se ha descubierto que las muteínas de galectina-9 modificada son inhibidoras contra la aparición de la enfermedad.
- 15

Tabla 3

Grupo	Dosis	Vía	N	Hinchamiento (%) el día			
				7	15	18	22
Control, PBS	-	i.v.	8	0,8 ± 0,2	129,1 ± 5,8	149,0 ± 6,3	137,0 ± 5,9
galectina-9 humana nula	0,03 mg/cuerpo	i.v.	8	0,7 ± 0,2	65,0 ± 16,3	129,5 ± 5,7	143,2 ± 4,7
	0,1 mg/cuerpo	i.v.	8	0,8 ± 0,2	23,5 ± 4,3	108,0 ± 12,3	** 135,0 ± 9,9
	0,3 mg/cuerpo	i.v.	8	0,7 ± 0,1	13,9 ± 23	52,5 ± 13,0	96,9 ± 8,9
Prednisolona	3 mg/kg	p.p.	8	0,7 ± 0,2	## 13,5 ± 17,2	## 53,1 ± 13,5	## 87,4 ± 10,1

- 20 Las muteínas de galectina 9 modificada (galectina 9 estabilizada, por ejemplo h-G9NC(nula)) ejercen eficacia antitumoral, esperable a partir de la siguiente bioactividad:

- agregación de células tumorales: eficacia de agregación en una diversidad de células tumorales
 inhibición de adhesión: eficacia de la inhibición de adhesión a matrices extracelulares
 apoptosis, citotoxicidad: eficacia de la inducción de apoptosis en una diversidad de células tumorales
 activación de células dendríticas (DC) eficacia de la inducción de la diferenciación de DC
 activación de NK, NKT: eficacia de la aceleración del reclutamiento
 supresión del dolor: supresión del dolor desencadenado por capsaicina.

- El presente inventor y su grupo asociado han verificado que durante el estudio sobre la expresión de galectina 9 en tejido de cáncer de mama la frecuencia de metástasis distante es menor en muestras positivas para galectina-9. Basándose en esto, se están desarrollando en la actualidad kits de diagnóstico para predecir metástasis (Clin Cancer Res, 2005 en prensa, Galectin-9 as a prognostic factor with anti-metastatic potential in breast cancer).

- También se ha verificado que las líneas celulares de cáncer de mama humano transferidas con el gen de galectina 9 muestran altas propiedades de agregación *in vitro*, y ejercen una capacidad de agregación similar en cuerpos de ratones desnudos. Además, se ha observado que son citotóxicas contra diversas líneas celulares incluyendo células tumorales malignas hematológicas. Se ha verificado que la mayoría de tales acciones se atribuyen a la inducción de apoptosis (Int J Cancer.2002 20; 99(6): 809-816, Possible role of galectin-9 in cell aggregation and apoptosis of human melanoma cell lines and its clinical significance; J immunol. 2003 170(7d): 3631-3636, Galectin-9 induces apoptosis through the caspase-1 pathway).

Además, cuando se aplica a galectina 9 por vía tópica, puede observarse reclutamiento de células NK(NKT y líneas celulares Mφ, sugiriendo de este modo que es posible inducir el mecanismo de inmunidad mediada por células (inmunidad celular) contra cáncer.

5 A la vista de lo anterior, las moléculas de galectina 9 estabilizadas (o moléculas de galectina 9 estables, es decir, mutéinas de galectina 9 modificada, por ejemplo, h-G9NC(nula) y materiales relacionados) ejercen eficacia citotóxica contra tumores malignos hematológicos tales como leucemia y células cancerosas liberadas en pacientes postquirúrgicos; eficacia supresora de metástasis, atribuible a la inhibición de la agregación de células cancerosas/adhesión de células cancerosas a la pared de los vasos sanguíneos e infiltración de células cancerosas en otros tejidos; eficacia de la supresión de aparición de peritonitis cancerosa; y acciones adicionales incluyendo elevación de sensibilidad inmune antitumoral debido al reclutamiento de células efectoras a las cercanías del tumor. Por lo tanto, puede esperarse que tengan más acciones y efectos preferibles. Por lo tanto, se espera que actúen como nuevos materiales antineoplásicos con menos efectos secundarios.

10 Son dianas de fármacos biológicos (tales como anticuerpo monoclonal) que se están desarrollando en la actualidad las moléculas de superficie celular inmunes, moléculas intracelularmente funcionales y citocinas inflamatorias. Es decir, tales fármacos actúan fisiológicamente y farmacológicamente con su eficacia inhibidora. Por el contrario, los fármacos de moléculas de galectina 9 estabilizadas ejercen eficacia en inducción de apoptosis de células sinoviales y linfocitos T activados y en supresión de destrucción del hueso, proporcionando de este modo una expectativa de inmunorregulación innata, antiinflamación y regeneración de tejido óseo/cartilaginoso. En consecuencia, los materiales de la invención proporcionan un nuevo enfoque de desarrollo completamente diferente desde el punto de vista conceptual de la terapia anti-citocinas. El dolor es una señal observada principalmente en artritis reumatoide y la capsaicina usada en los ejemplos anteriormente descritos es un mediador importante que induce dolor inflamatorio en enfermedad inflamatoria neurogénica. La galectina 9 estabilizada inhibe el edema del oído inducido por extensión de capsaicina. En otras palabras, se espera que la galectina 9 estabilizada actúe como un nuevo agente terapéutico con menos efectos secundarios para enfermedades autoinmunes sistémicas. Las moléculas de galectina 9 estabilizadas tienen nuevas funciones, siendo de este modo prometedoras para actuar potencialmente como agentes anti-artritis reumatoide que muestren menos efectos secundarios. Las moléculas de galectina 9 estabilizadas tienen características clínicamente eficaces, incluyendo inhibición de inflamación, reparación de tejido articular y supresión del dolor por lo que podría esperarse que proporcionen mecanismos tales como (1) inducción de apoptosis en linfocitos T activados, (2) apoptosis de células sinoviales, (3) cascada de ácido araquidónico y (4) supresión de destrucción del hueso. Por lo tanto, las moléculas de galectina 9 estabilizadas serán prometedoras para actuar como agentes terapéuticos para artritis reumatoide. En la práctica se ha verificado que inhiben la aparición de artritis en el modelo de CIA (cóctel de Ab).

Aplicabilidad industrial

35 Las mutéinas de galectina 9 modificada son más resistentes contra enzimas que las proteínas Gal-9 naturales. Por lo tanto, las mutéinas de galectina 9 modificada son bastante útiles en la utilización eficaz y aplicación de acciones y funciones versátiles que pertenecen a la galectina 9 natural. Se ha sugerido que la galectina 9 natural induce la inhibición de metástasis y regresión de cáncer por acciones directas sobre el tumor (actividad de inducción de adhesión célula a célula y apoptosis de células tumorales), y/o acciones a través del sistema inmunitario. En consecuencia, puede esperarse que las mutéinas de galectina 9 modificada actúen como materiales activos ventajosos que tengan actividad equivalente a la de galectina 9, por ejemplo, fármacos antitumorales. La galectina 9 natural no actúa en linfocitos no activados pero induce apoptosis en linfocitos T activados, incluyendo entre otros linfocitos T positivos para CD4 que provocan respuestas hiperinmunes.

40 Por lo tanto, puede esperarse que las mutéinas de galectina 9 modificada actúen como materiales activos ventajosos que tengan actividad equivalente a galectina 9, por ejemplo, fármacos antiinflamatorios, fármacos anti-alérgicos y/o fármacos para osteoporosis. Puesto que resulta evidente que la galectina 9 natural tiene una potente propiedad inductora de apoptosis contra células sinoviales implicadas en la deformidad de articulaciones en artritis reumatoide, puede esperarse que las mutéinas de galectina 9 modificada actúen como materiales provechosamente activos que tengan actividad equivalente a la de galectina 9. Por lo tanto, la presente invención puede utilizarse como una herramienta no solamente para el desarrollo de fármacos terapéuticos para cánceres, enfermedades autoinmunes refractarias (incluyendo artritis reumatoide), enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, trastornos relacionados con el metabolismo del hueso sino también con la revelación, investigación y desarrollo de funciones de galectina 9.

<Texto Libre del Listado de Secuencias>

55 SEC ID Nº: 1, Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido para mutéina de galectina-9, G9NC(nula)
SEC ID Nº: 2, Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido para mutéina de galectina-9
SEC ID Nº: 5, isoforma media de galectina-9
SEC ID Nº: 10, Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido que actúa como un cebador para PCR
SEC ID Nº: 11, Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido que actúa como un cebador para PCR
SEC ID Nº: 12, Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido que actúa como un cebador para PCR
60 SEC ID Nº: 13, Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido que actúa como un cebador para PCR

ES 2 407 465 T3

Listado de secuencias

5 <110> GALPHARMA Co., Ltd.
 <120> Nuevas muteínas de galectina-9 y uso de las mismas
 <130> GL-05PCT
 10 <150> JP 2004-94401
 <151> 29-03-2004
 <150> JP 2004-287005
 <151> 03-09-2004
 15 <150> JP 2005-43156
 <151> 18-02-2005
 <160> 13
 20 <170> PatentIn versión 3.1
 <210> 1
 <211> 891
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polinucleótido para muteína de galectina-9
 30 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(891)
 <223> G9NC(nula)
 35 <400> 1

```

atg gcc ttc agc ggt tcc cag gct ccc tac ctg agt cca gct gtc ccc      48
Met Ala Phe Ser Gly Ser Gln Ala Pro Tyr Leu Ser Pro Ala Val Pro
1           5                   10                  15

ttt tct ggg act att caa gga ggt ctc cag gac gga ctt cag atc act      96
Phe Ser Gly Thr Ile Gln Gly Leu Gln Asp Gly Leu Gln Ile Thr
20          25                   30

gtc aat ggg acc gtt ctc agc tcc agt gga acc agg ttt gct gtg aac      144
Val Asn Gly Thr Val Leu Ser Ser Gly Thr Arg Phe Ala Val Asn
35          40                   45

ttt cag act ggc ttc agt gga aat gac att gcc ttc cac ttc aac cct      192
Phe Gln Thr Gly Phe Ser Gly Asn Asp Ile Ala Phe His Phe Asn Pro
50          55                   60

cgg ttt gaa gat gga ggg tac gtg gtg tgc aac acg agg cag aac gga      240
Arg Phe Glu Asp Gly Gly Tyr Val Val Cys Asn Thr Arg Gln Asn Gly
65          70                   75                  80

agc tgg ggg ccc gag gag agg aag aca cac atg cct ttc cag aag ggg      288
Ser Trp Gly Pro Glu Arg Lys Thr His Met Pro Phe Gln Lys Gly
85          90                   95

atg ccc ttt gac ctc tgc ttc ctg gtg cag agc tca gat ttc aag gtg      336
Met Pro Phe Asp Leu Cys Phe Leu Val Gln Ser Ser Asp Phe Lys Val
100         105                  110
  
```

ES 2 407 465 T3

	atg gtg aac ggg atc ctc ttc gtg cag tac ttc cac cgc gtg ccc ttc Met Val Asn Gly Ile Leu Phe Val Gln Tyr Phe His Arg Val Pro Phe 115 120 125	384
	cac cgt gtg gac acc atc tcc gtc aat ggc tct gtg cag ctg tcc tac His Arg Val Asp Thr Ile Ser Val Asn Gly Ser Val Gln Leu Ser Tyr 130 135 140	432
	atc agc ttc cag cat atg act ccc gcc atc cca cct atg atg tac ccc Ile Ser Phe Gln His Met Thr Pro Ala Ile Pro Pro Met Met Tyr Pro 145 150 155 160	480
	cac ccc gcc tat ccg atg cct ttc atc acc acc att ctg gga ggg ctg His Pro Ala Tyr Pro Met Pro Phe Ile Thr Thr Ile Leu Gly Gly Leu 165 170 175	528
	tac cca tcc aag tcc atc ctc ctg tca ggc act gtc ctg ccc agt gct Tyr Pro Ser Lys Ser Ile Leu Leu Ser Gly Thr Val Leu Pro Ser Ala 180 185 190	576
	cag agg ttc cac atc aac ctg tgc tct ggg aac cac atc gcc ttc cac Gln Arg Phe His Ile Asn Leu Cys Ser Gly Asn His Ile Ala Phe His 195 200 205	624
	ctg aac ccc cgt ttt gat gag aat gct gtg gtc cgc aac acc cag atc Leu Asn Pro Arg Phe Asp Glu Asn Ala Val Val Arg Asn Thr Gln Ile 210 215 220	672
	gac aac tcc tgg ggg tct gag gag cga agt ctg ccc cga aaa atg ccc Asp Asn Ser Trp Gly Ser Glu Glu Arg Ser Leu Pro Arg Lys Met Pro 225 230 235 240	720
	ttc gtc cgt ggc cag agc ttc tca gtg tgg atc ttg tgt gaa gct cac Phe Val Arg Gly Gln Ser Phe Ser Val Trp Ile Leu Cys Glu Ala His 245 250 255	768
	tgc ctc aag gtg gcc gtg gat ggt cag cac ctg ttt gaa tac tac cat Cys Leu Lys Val Ala Val Asp Gly Gln His Leu Phe Glu Tyr Tyr His 260 265 270	816
	cgc ctg agg aac ctg ccc acc atc aac aga ctg gaa gtg ggg ggc gac Arg Leu Arg Asn Leu Pro Thr Ile Asn Arg Leu Glu Val Gly Gly Asp 275 280 285	864
	atc cag ctg acc cat gtg cag aca tag Ile Gln Leu Thr His Val Gln Thr 290 295	891
	<210> 2	
	<211> 296	
5	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Polinucleótido para muteína de galectina-9	
10	<400> 2	
	Met Ala Phe Ser Gly Ser Gln Ala Pro Tyr Leu Ser Pro Ala Val Pro 1 5 10 15	

ES 2 407 465 T3

Phe Ser Gly Thr Ile Gln Gly Gly Leu Gln Asp Gly Leu Gln Ile Thr
20 25 30

Val Asn Gly Thr Val Leu Ser Ser Ser Gly Thr Arg Phe Ala Val Asn
35 40 45

Phe Gln Thr Gly Phe Ser Gly Asn Asp Ile Ala Phe His Phe Asn Pro
50 55 60

Arg Phe Glu Asp Gly Gly Tyr Val Val Cys Asn Thr Arg Gln Asn Gly
65 70 75 80

Ser Trp Gly Pro Glu Glu Arg Lys Thr His Met Pro Phe Gln Lys Gly
85 90 95

Met Pro Phe Asp Leu Cys Phe Leu Val Gln Ser Ser Asp Phe Lys Val
100 105 110

Met Val Asn Gly Ile Leu Phe Val Gln Tyr Phe His Arg Val Pro Phe
115 120 125

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

Ile Ser Phe Gln His Met Thr Pro Ala Ile Pro Pro Met Met Tyr Pro
145 150 155 160

His Pro Ala Tyr Pro Met Pro Phe Ile Thr Thr Ile Leu Gly Gly Leu
165 170 175

Tyr Pro Ser Lys Ser Ile Leu Leu Ser Gly Thr Val Leu Pro Ser Ala
180 185 190

Gln Arg Phe His Ile Asn Leu Cys Ser Gly Asn His Ile Ala Phe His
195 200 205

Leu Asn Pro Arg Phe Asp Glu Asn Ala Val Val Arg Asn Thr Gln Ile
210 215 220

Asp Asn Ser Trp Gly Ser Glu Glu Arg Ser Leu Pro Arg Lys Met Pro
225 230 235 240

Phe Val Arg Gly Gln Ser Phe Ser Val Trp Ile Leu Cys Glu Ala His
245 250 255

Cys Leu Lys Val Ala Val Asp Gly Gln His Leu Phe Glu Tyr Tyr His
260 265 270

ES 2 407 465 T3

Arg Leu Arg Asn Leu Pro Thr Ile Asn Arg Leu Glu Val Gly Gly Asp
275 280 285

Ile Gln Leu Thr His Val Gln Thr
290 295

<210> 3

<211> 148

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ala Phe Ser Gly Ser Gln Ala Pro Tyr Leu Ser Pro Ala Val Pro
1 5 10 15

Phe Ser Gly Thr Ile Gln Gly Leu Gln Asp Gly Leu Gln Ile Thr
20 25 30

Val Asn Gly Thr Val Leu Ser Ser Ser Gly Thr Arg Phe Ala Val Asn
35 40 45

Phe Gln Thr Gly Phe Ser Gly Asn Asp Ile Ala Phe His Phe Asn Pro
50 55 60

Arg Phe Glu Asp Gly Gly Tyr Val Val Cys Asn Thr Arg Gin Asn Gly
65 70 75 80

Ser Trp Gly Pro Glu Glu Arg Lys Thr His Met Pro Phe Gln Lys Gly
85 90 95

Met Pro Phe Asp Leu Cys Phe Leu Val Gln Ser Ser Asp Phe Lys Val
100 105 110

Met Val Asn Gly Ile Leu Phe Val Gln Tyr Phe His Arg Val Pro Phe
115 120 125

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

Ile Ser Phe Gln
145

10

<210> 4

<211> 146

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

ES 2 407 465 T3

Thr Pro Ala Ile Pro Pro Met Met Tyr Pro His Pro Ala Tyr Pro Met
1 5 10 15

Pro Phe Ile Thr Thr Ile Leu Gly Gly Leu Tyr Pro Ser Lys Ser Ile
20 25 30

Leu Leu Ser Gly Thr Val Leu Pro Ser Ala Gln Arg Phe His Ile Asn
35 40 45

Leu Cys Ser Gly Asn His Ile Ala Phe His Leu Asn Pro Arg Phe Asp
50 55 60

Glu Asn Ala Val Val Arg Asn Thr Gln Ile Asp Asn Ser Trp Gly Ser
65 70 75 80

Glu Glu Arg Ser Leu Pro Arg Lys Met Pro Phe Val Arg Gly Gln Ser
85 90 95

Phe Ser Val Trp Ile Leu Cys Glu Ala His Cys Leu Lys Val Ala Val
100 105 110

Asp Gly Gln His Leu Phe Glu Tyr Tyr His Arg Leu Arg Asn Leu Pro
115 120 125

Thr Ile Asn Arg Leu Glu Val Gly Gly Asp Ile Gln Leu Thr His Val
130 135 140

Gln Thr
145

<210> 5
<211> 972
5 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
10 <221> CDS
<222> (1)..(972)
<223> isoforma media de galectina-9
<400> 5

ES 2 407 465 T3

atg gcc ttc agc ggt tcc cag gct ccc tac ctg agt cca gct gtc ccc Met Ala Phe Ser Gly Ser Gln Ala Pro Tyr Leu Ser Pro Ala Val Pro	48
1 5 10 15	
ttt tct ggg act att caa gga ggt ctc cag gac gga ctt cag atc act Phe Ser Gly Thr Ile Gln Gly Leu Gln Asp Gly Leu Gln Ile Thr	96
20 25 30	
gtc aat ggg acc gtt ctc agc tcc agt gga acc agg ttt gct gtg aac Val Asn Gly Thr Val Leu Ser Ser Gly Thr Arg Phe Ala Val Asn	144

ES 2 407 465 T3

35	40	45	
ttt cag act ggc ttc agt gga aat gac att gcc ttc cac ttc aac cct Phe Gln Thr Gly Phe Ser Gly Asn Asp Ile Ala Phe His Phe Asn Pro	50	55	192
50	55	60	
cggttt gaa gat gga ggg tac gtg gtg tgc aac acg agg cag aac gga Arg Phe Glu Asp Gly Gly Tyr Val Val Cys Asn Thr Arg Gln Asn Gly	65	70	240
65	70	75	80
agc tgg ggg ccc gag gag agg aag aca cac atg cct ttc cag aag ggg Ser Trp Gly Pro Glu Glu Arg Lys Thr His Met Pro Phe Gln Lys Gly	85	90	288
85	90	95	
atg ccc ttt gac ctc tgc ttc ctg gtg cag agc tca gat ttc aag gtg Met Pro Phe Asp Leu Cys Phe Leu Val Gln Ser Ser Asp Phe Lys Val	100	105	336
100	105	110	
atg gtg aac ggg atc ctc ttc gtg cag tac ttc cac cgc gtg ccc ttc Met Val Asn Gly Ile Leu Phe Val Gln Tyr Phe His Arg Val Pro Phe	115	120	384
115	120	125	
cac cgt gtg gac acc atc tcc gtc aat ggc tct gtg cag ctg tcc tac His Arg Val Asp Thr Ile Ser Val Asn Gly Ser Val Gln Leu Ser Tyr	130	135	432
130	135	140	
atc agc ttc cag cct ccc ggc gtg tgg cct gcc aac ccg gct ccc att Ile Ser Phe Gln Pro Pro Gly Val Trp Pro Ala Asn Pro Ala Pro Ile	145	150	480
145	150	155	160
acc cag aca gtc atc cac aca gtg cag agc gcc cct gga cag atg ttc Thr Gln Thr Val Ile His Thr Val Gln Ser Ala Pro Gly Gln Met Phe	165	170	528
165	170	175	
tct act ccc gcc atc cca cct atg atg tac ccc cac ccc gcc tat ccg Ser Thr Pro Ala Ile Pro Pro Met Met Tyr Pro His Pro Ala Tyr Pro	180	185	576
180	185	190	
atg cct ttc atc acc acc att ctg gga ggg ctg tac cca tcc aag tcc Met Pro Phe Ile Thr Thr Ile Leu Gly Gly Leu Tyr Pro Ser Lys Ser	195	200	624
195	200	205	
atc ctc ctg tca ggc act gtc ctg ccc agt gct cag agg ttc cac atc Ile Leu Leu Ser Gly Thr Val Leu Pro Ser Ala Gln Arg Phe His Ile	210	215	672
210	215	220	
aac ctg tgc tct ggg aac cac atc gcc ttc cac ctg aac ccc cgt ttt Asn Leu Cys Ser Gly Asn His Ile Ala Phe His Leu Asn Pro Arg Phe	225	230	720
225	230	235	240
gat gag aat gct gtg gtc cgc aac acc cag atc gac aac tcc tgg ggg Asp Glu Asn Ala Val Val Arg Asn Thr Gln Ile Asp Asn Ser Trp Gly	245	250	768
245	250	255	
tct gag gag cga agt ctg ccc cga aaa atg ccc ttc gtc cgt ggc cag Ser Glu Glu Arg Ser Leu Pro Arg Lys Met Pro Phe Val Arg Gly Gln	260	265	816
260	265	270	
agc ttc tca gtg tgg atc ttg tgt gaa gct cac tgc ctc aag gtg gcc Ser Phe Ser Val Trp Ile Leu Cys Glu Ala His Cys Leu Lys Val Ala	275	280	864
275	280	285	
gtg gat ggt cag cac ctg ttt gaa tac tac cat cgc ctg agg aac ctg			912

ES 2 407 465 T3

Val Asp Gly Gln His Leu Phe Glu Tyr Tyr His Arg Leu Arg Asn Leu				
290	295	300		
ccc acc atc aac aga ctg gaa gtg ggg ggc gac atc cag ctg acc cat				960
Pro Thr Ile Asn Arg Leu Glu Val Gly Gly Asp Ile Gln Leu Thr His				
305	310	315	320	
gtg cag aca tag				972
Val Gln Thr				
 5 <210> 6				
<211> 323				
<212> PRT				
<213> Homo sapiens				
 <400> 6				
Met Ala Phe Ser Gly Ser Gln Ala Pro Tyr Leu Ser Pro Ala Val Pro				
1	5	10	15	
Phe Ser Gly Thr Ile Gln Gly Gly Leu Gln Asp Gly Leu Gln Ile Thr				
20	25	30		
Val Asn Gly Thr Val Leu Ser Ser Ser Gly Thr Arg Phe Ala Val Asn				
35	40	45		
Phe Gln Thr Gly Phe Ser Gly Asn Asp Ile Ala Phe His Phe Asn Pro				
50	55	60		
Arg Phe Glu Asp Gly Gly Tyr Val Val Cys Asn Thr Arg Gln Asn Gly				
65	70	75	80	
Ser Trp Gly Pro Glu Glu Arg Lys Thr His Met Pro Phe Gln Lys Gly				
85	90	95		
Met Pro Phe Asp Leu Cys Phe Leu Val Gln Ser Ser Asp Phe Lys Val				
100	105	110		
Met Val Asn Gly Ile Leu Phe Val Gln Tyr Phe His Arg Val Pro Phe				
115	120	125		
His Arg Val Asp Thr Ile Ser Val Asn Gly Ser Val Gln Leu Ser Tyr				
130	135	140		
Ile Ser Phe Gln Pro Pro Gly Val Trp Pro Ala Asn Pro Ala Pro Ile				
145	150	155	160	
Thr Gln Thr Val Ile His Thr Val Gln Ser Ala Pro Gly Gln Met Phe				
165	170	175		

ES 2 407 465 T3

Ser Thr Pro Ala Ile Pro Pro Met Met Tyr Pro His Pro Ala Tyr Pro
180 185 190

Met Pro Phe Ile Thr Thr Ile Leu Gly Gly Leu Tyr Pro Ser Lys Ser
195 200 205

Ile Leu Leu Ser Gly Thr Val Leu Pro Ser Ala Gln Arg Phe His Ile
210 215 220

Asn Leu Cys Ser Gly Asn His Ile Ala Phe His Leu Asn Pro Arg Phe
225 230 235 240

Asp Glu Asn Ala Val Val Arg Asn Thr Gln Ile Asp Asn Ser Trp Gly
245 250 255

Ser Glu Glu Arg Ser Leu Pro Arg Lys Met Pro Phe Val Arg Gly Gln
260 265 270

Ser Phe Ser Val Trp Ile Leu Cys Glu Ala His Cys Leu Lys Val Ala
275 280 285

Val Asp Gly Gln His Leu Phe Glu Tyr Tyr His Arg Leu Arg Asn Leu
290 295 300

Pro Thr Ile Asn Arg Leu Glu Val Gly Gly Asp Ile Gln Leu Thr His
305 310 315 320

Val Gln Thr

<210> 7

<211> 61

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Asn Pro Arg Thr Val Pro Val Gln Pro Ala Phe Ser Thr Val Pro Phe
1 5 10 15

Ser Gln Pro Val Cys Phe Pro Pro Arg Pro Arg Gly Arg Arg Gln Lys
20 25 30

Pro Pro Gly Val Trp Pro Ala Asn Pro Ala Pro Ile Thr Gln Thr Val
35 40 45

Ile His Thr Val Gln Ser Ala Pro Gly Gln Met Phe Ser
50 55 60

ES 2 407 465 T3

<210> 8
<211> 29
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5
<400> 8

Pro Pro Gly Val Trp Pro Ala Asn Pro Ala Pro Ile Thr Gln Thr Val
1 5 10 15

Ile His Thr Val Gln Ser Ala Pro Gly Gln Met Phe Ser
20 25

10 <210> 9
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <400> 9

Thr Gln Thr Val Ile His Thr Val Gln Ser Ala Pro Gly Gln Met Phe
1 5 10 15

Ser

20 <210> 10
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Oligonucleótido para actuar como cebador para la PCR

<400> 10
cgtccctata tggccttcag cggttccag 30

30 <210> 11
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Oligonucleótido para actuar como cebador para la PCR

<400> 11
cgaccgcata tgctggaagc tcatgttagga cag 33

40 <210> 12
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido para actuar como cebador para la PCR

<400> 12
cgtccctata tgactccccgc catcccacct atg 33

<210> 13
<211> 33
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido para actuar como cebador para la PCR

5

<400> 13

cgaccggat ccctatgtct gcacatgggt cag

33

REIVINDICACIONES

1. Una proteína, o una sal de la misma, que comprende una proteína galectina 9 mutante que tiene actividad de unión a β -galactósido y que tiene la estructura (N-CRD)-Engarce-(C-CRD), en la que N-CRD es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 3, una variante de la misma que difiere de la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 3 en una delección, sustitución o adición de 1 a 8 restos de aminoácidos y que tiene actividad polipeptídica sustancialmente equivalente a SEC ID Nº: 3, o una variante del mismo que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 70% homóloga de SEC ID Nº: 3 y que tiene actividad polipeptídica sustancialmente equivalente a SEC ID Nº: 3;
- 5 C-CRD es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 4, una variante del mismo que difiere de la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 4 en una delección, sustitución o adición de 1 a 21 restos de aminoácidos y que tiene actividad polipeptídica sustancialmente equivalente a SEC ID Nº: 4, o una variante del mismo que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 70% homóloga de SEC ID Nº: 4 y que tiene actividad polipeptídica sustancialmente equivalente a SEC ID Nº: 4; y
- 10 Engarce es una secuencia de aminoácidos que consiste en 2 restos de aminoácidos arbitrarios, o que tiene la secuencia Arg Ile Pro.
- 15
2. La proteína o sal de la misma de la reivindicación 1, en la que el Engarce es un polipéptido que tiene la secuencia His Met o Arg Ile Pro.
3. La proteína o sal de la misma de la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID Nº: 2.
- 20
4. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4, siendo dicha molécula un polinucleótido.
6. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, siendo dicha molécula ADN o ARN.
- 25
7. Un vector recombinante que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.
8. El vector recombinante de acuerdo con la reivindicación 7 comprendiendo dicho vector una secuencia de nucleótidos que codifica un marcador proteico y/o un marcador peptídico en combinación con la molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.
- 30
9. Una célula transformada o transfectada que porta la molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 o el vector recombinante de acuerdo con la reivindicación 7 u 8.
10. La célula transformada o transfectada de acuerdo con la reivindicación 9, siendo dicha célula huésped procariota o eucariota.
- 35
11. Un fármaco que comprende una cantidad eficaz de al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en la proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, el vector recombinante de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, y la célula transformada o transfectada de acuerdo con la reivindicación 9 o 10.
12. El fármaco de acuerdo con la reivindicación 11 que es un inmunorregulador o inmunomodulador.
13. El fármaco de acuerdo con la reivindicación 11 que es un agente antineoplásico o antitumoral.
- 40
14. Un reactivo de ensayo o prueba que comprende una cantidad eficaz de al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en la proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, el vector recombinante de acuerdo con la reivindicación 7 u 8 y la célula transformada o transfectada de acuerdo con la reivindicación 9 o 10.

FIG. 1

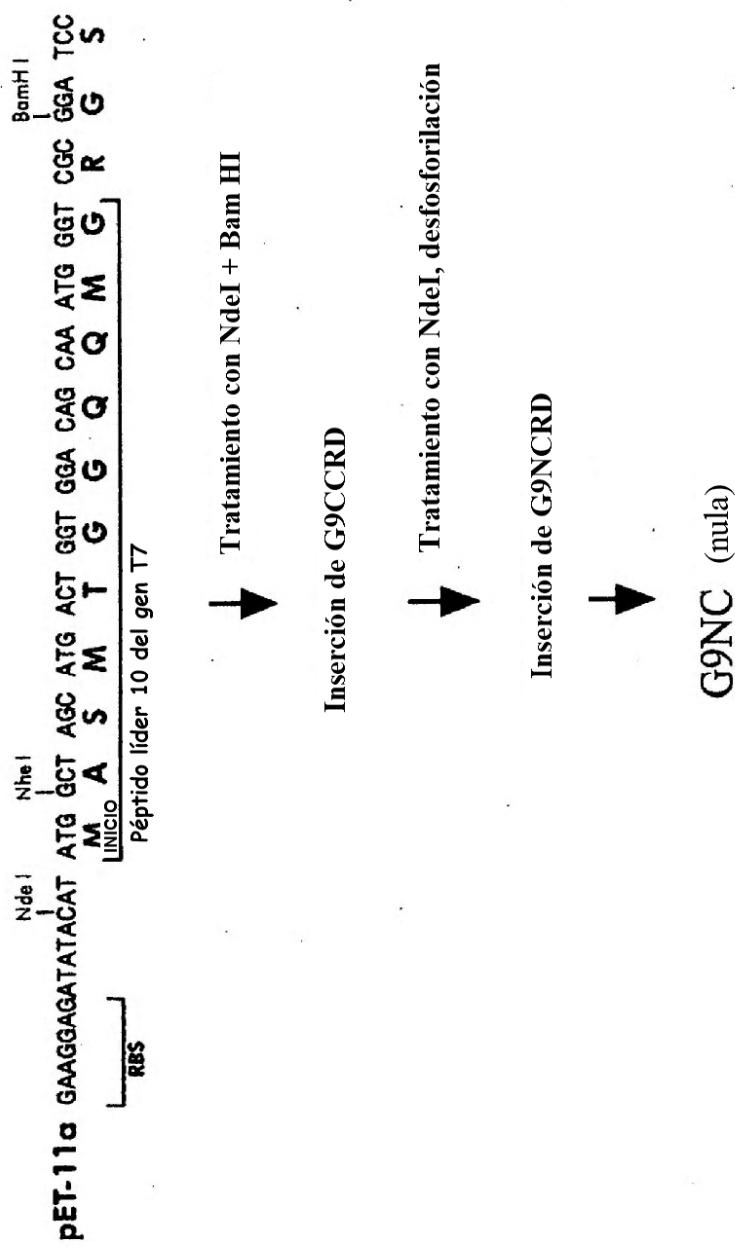
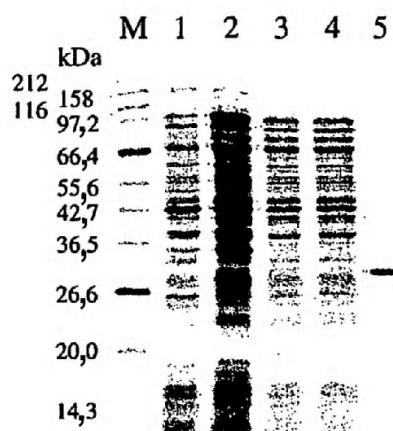


FIG. 2



M: Marcador molecular

- 1: Lisado de *E. coli* (Pre-inducción)
- 2: Lisado de *E. coli* (Post-inducción)
- 3: Extracto de *E. coli*
- 4: Fracción no adsorbida en columna de lactosa de extracto de *E. coli*
- 5: G9NC (nula) purificada de fracción de eluato de columna de lactosa

FIG. 3

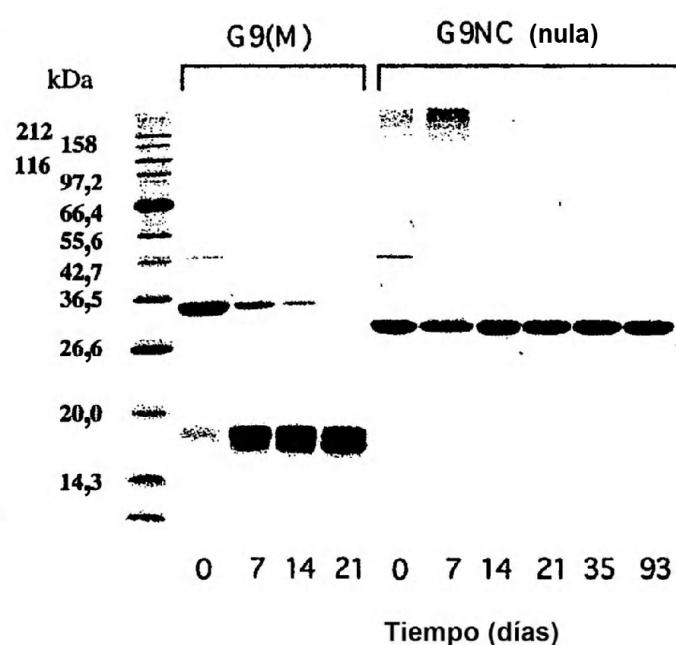


FIG. 4

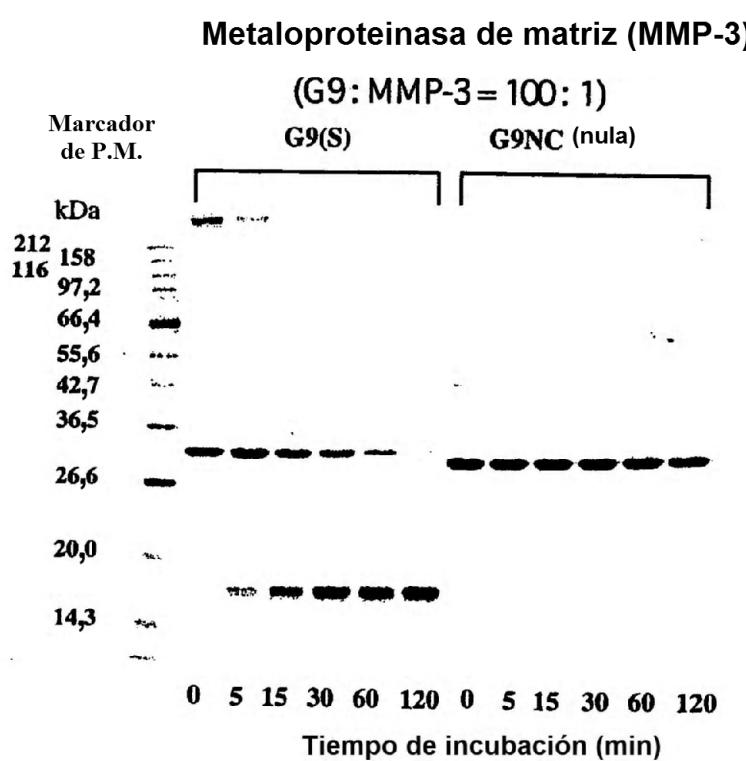


FIG. 5

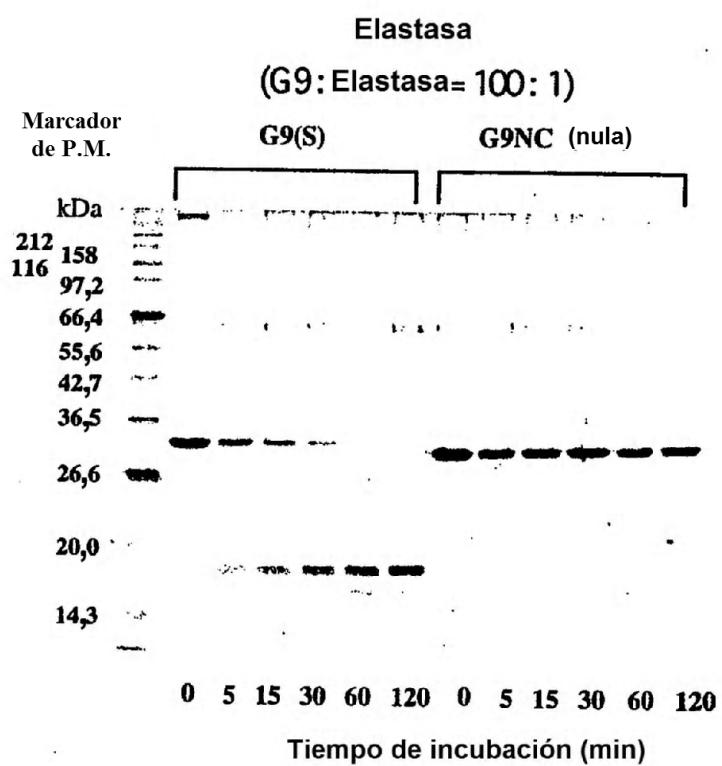


FIG. 6

Apoptosis de MOLT-4

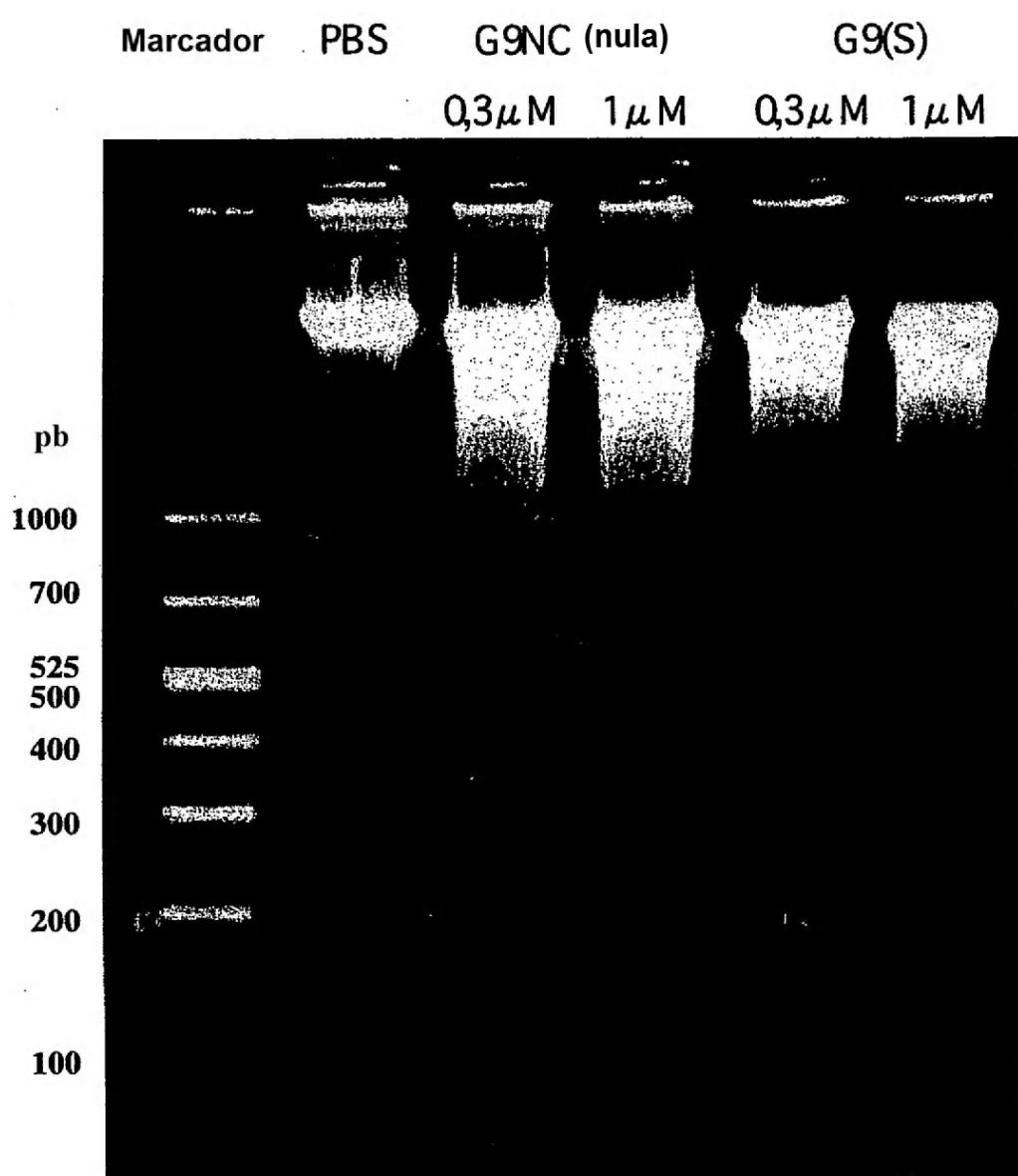


FIG. 7

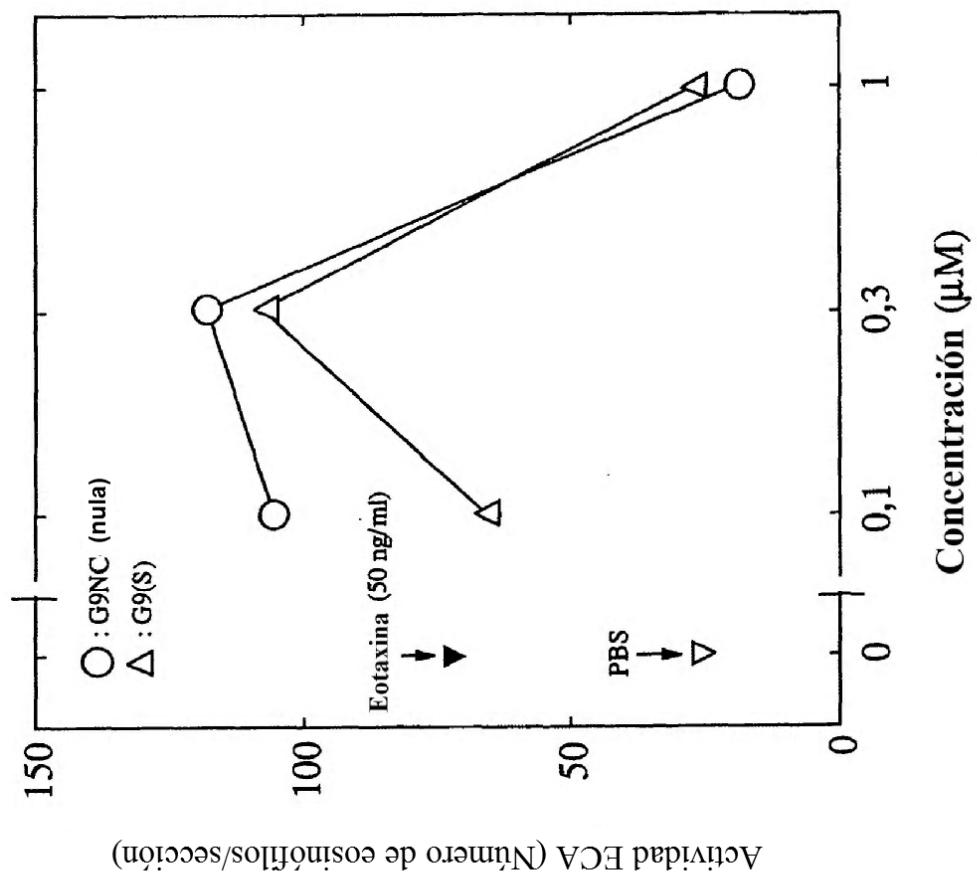


FIG. 8

	Posiciones				
	5	88	135	238	281
Secuencia corregida	gg <u>t</u> (G)	u <u>a</u> g (K)	t <u>c</u> c (S)	ccc (P)	g <u>a</u> a (E)
Ecalectina	- <u>a</u> - (S)	- <u>K</u> - (K)	- <u>S</u> - (S)	- <u>P</u> - (P)	- <u>E</u> - (E)
Gal-9	- <u>G</u> - (G)	- <u>R</u> - (R)	- <u>F</u> - (F)	- <u>L</u> - (L)	- <u>G</u> - (G)
Clones de EST (fuente)					
AA428401 (tumor de ovario)	- <u>G</u> - (G)	- <u>K</u> - (K)	- <u>S</u> - (S)		
AA476845 (tumor de ovario)	- <u>G</u> - (G)	- <u>K</u> - (K)			
AA443641 (tumor de ovario)		- <u>K</u> - (K)	- <u>S</u> - (S)		
AA448365 (tumor de ovario)					- (E)
AA477070 (tumor de ovario)				- (P)	
AA353933 (linfocitos T Jurkat)	- <u>G</u> - (G)	- <u>K</u> - (K)			
AA354210 (linfocitos T Jurkat)	- <u>G</u> - (G)	- <u>K</u> - (K)			
AA354814 (linfocitos T Jurkat)				- (P)	
AA382104 (linfocitos T activados)	- <u>G</u> - (G)				
AA394654 (leucemia de linfocitos B)	- <u>G</u> - (G)	- <u>K</u> - (K)			
AA295169 (tumor de páncreas)		- <u>K</u> - (K)	- (P)		
AA295767 (tumor de páncreas)		- <u>K</u> - (K)	- (P)		
AA825886 (tumor de colon)				- (E)	
AA829906 (tumor de pulmón)				- (E)	
AA810306 (amígdala)	- <u>G</u> - (G)	- <u>K</u> - (K)			
AA484985 (amígdala)		- <u>K</u> - (K)			
AA89534 (hígado y bazo)				- (P)	

FIG. 9

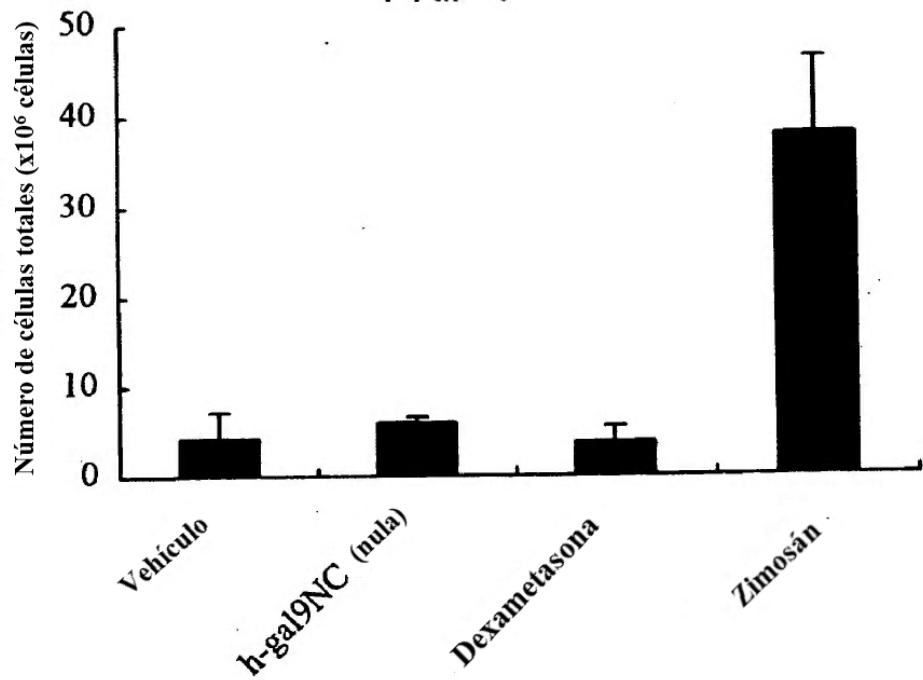


FIG. 10

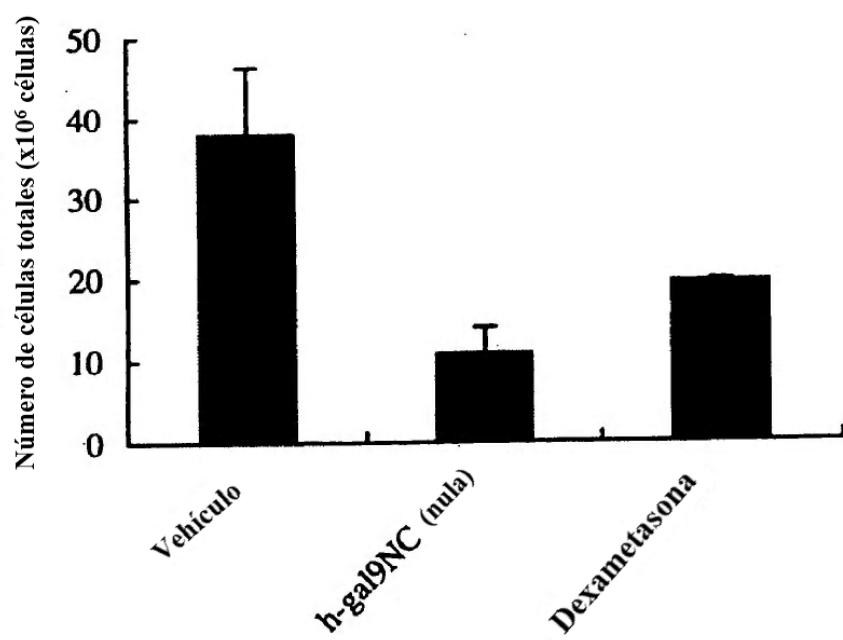


FIG. 11

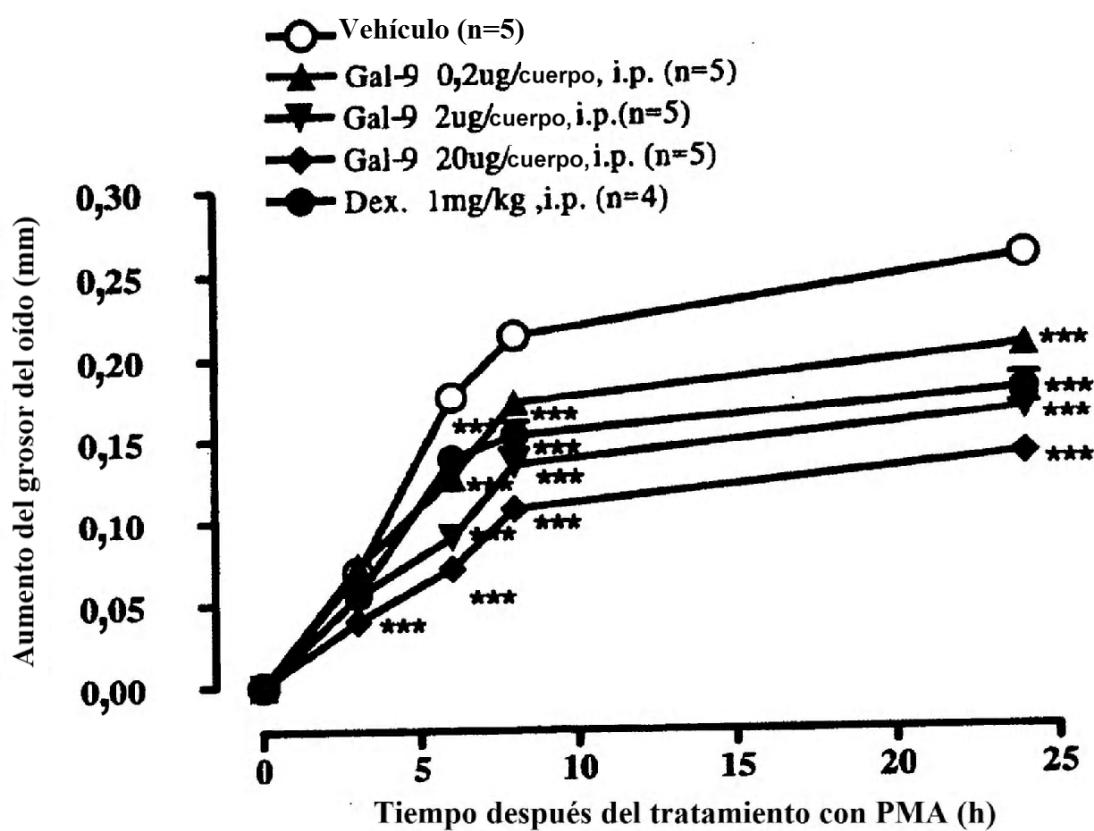


FIG. 12

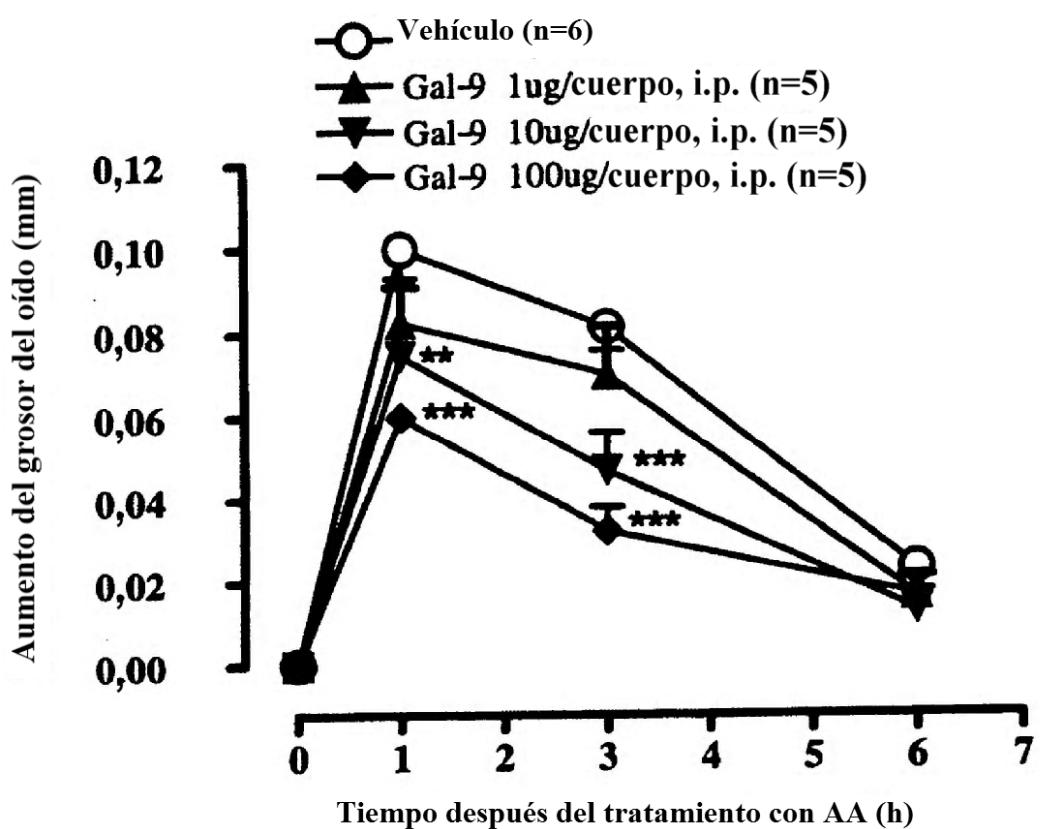


FIG. 13

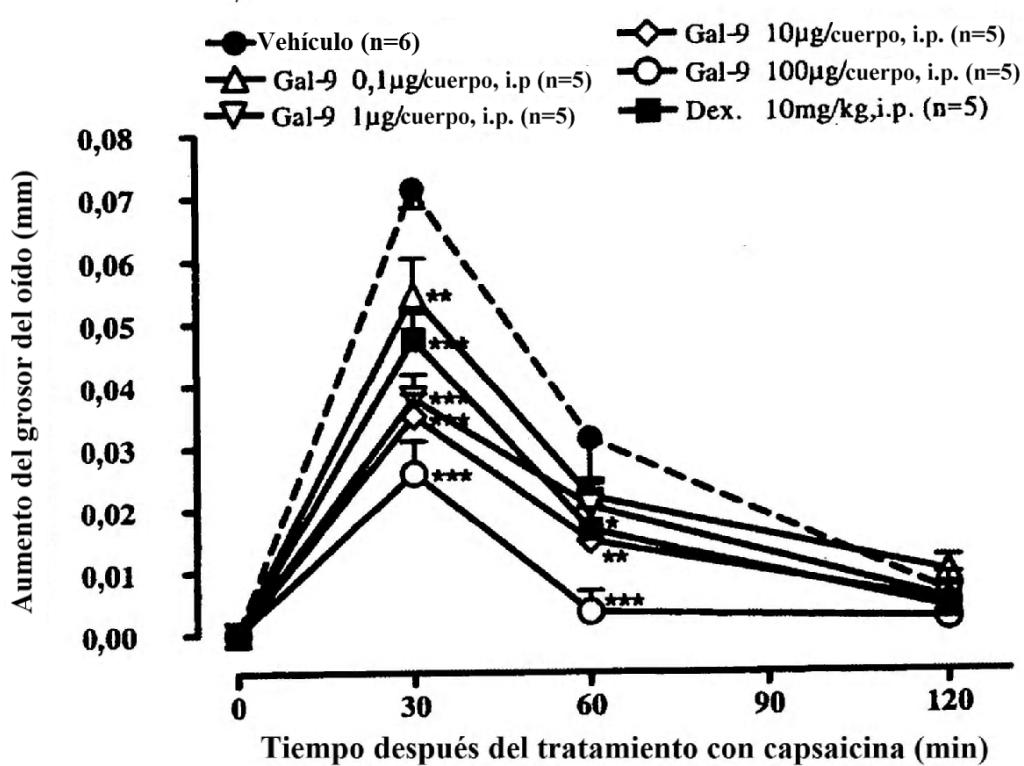


FIG. 14

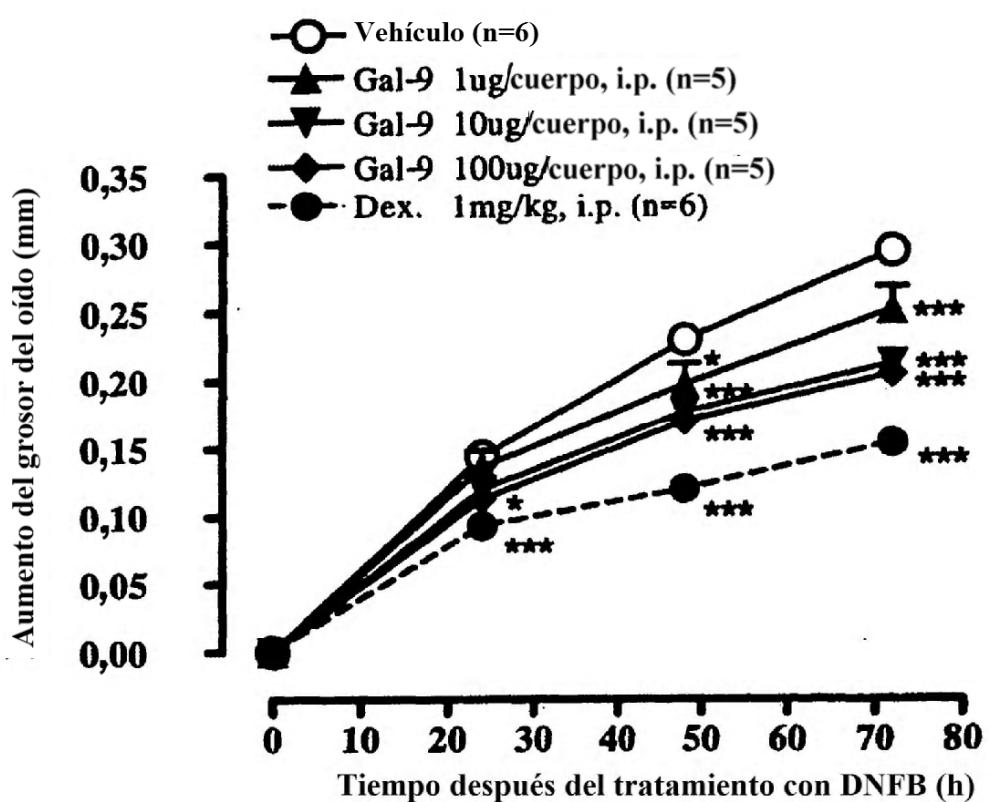


FIG. 15

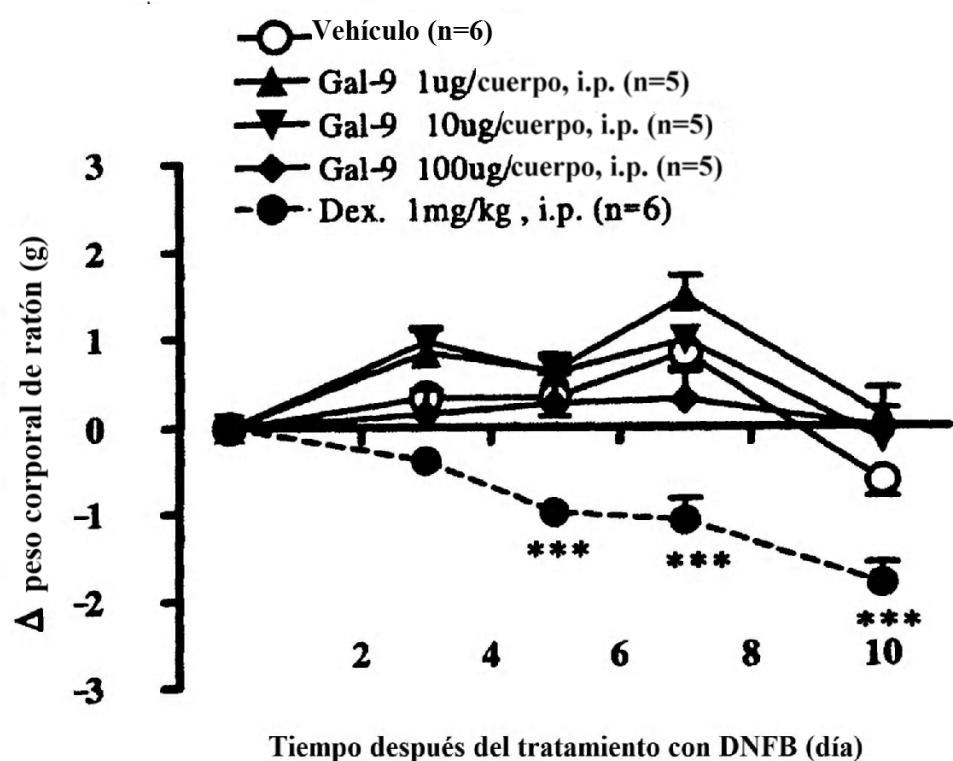


FIG. 16

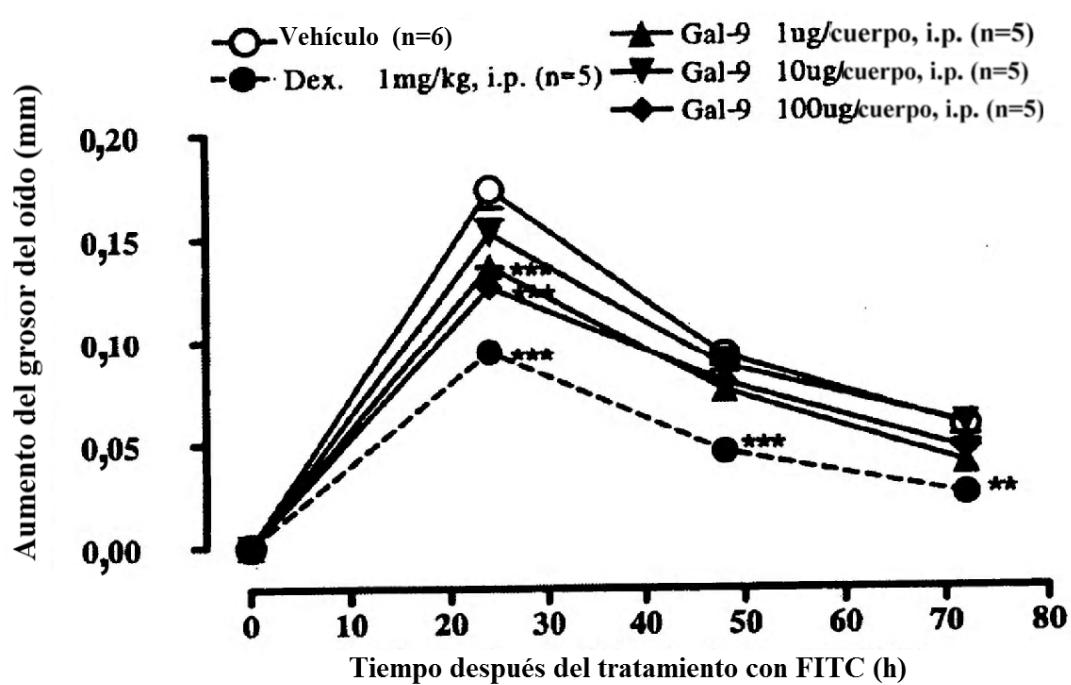


FIG. 17

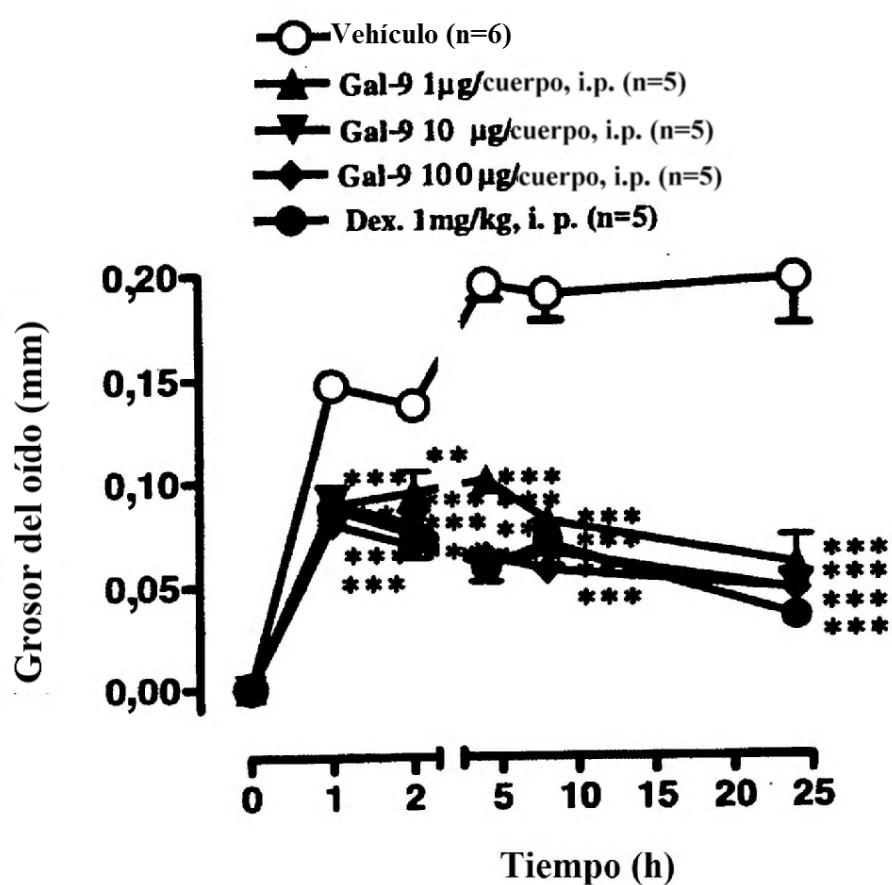


FIG. 18

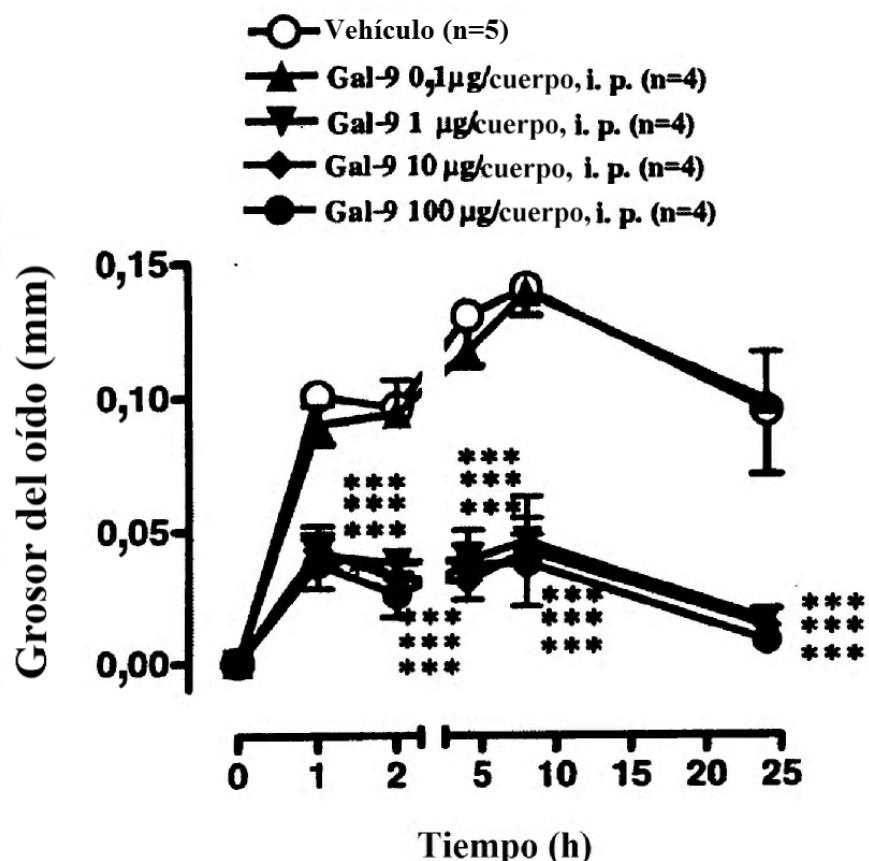


FIG. 19

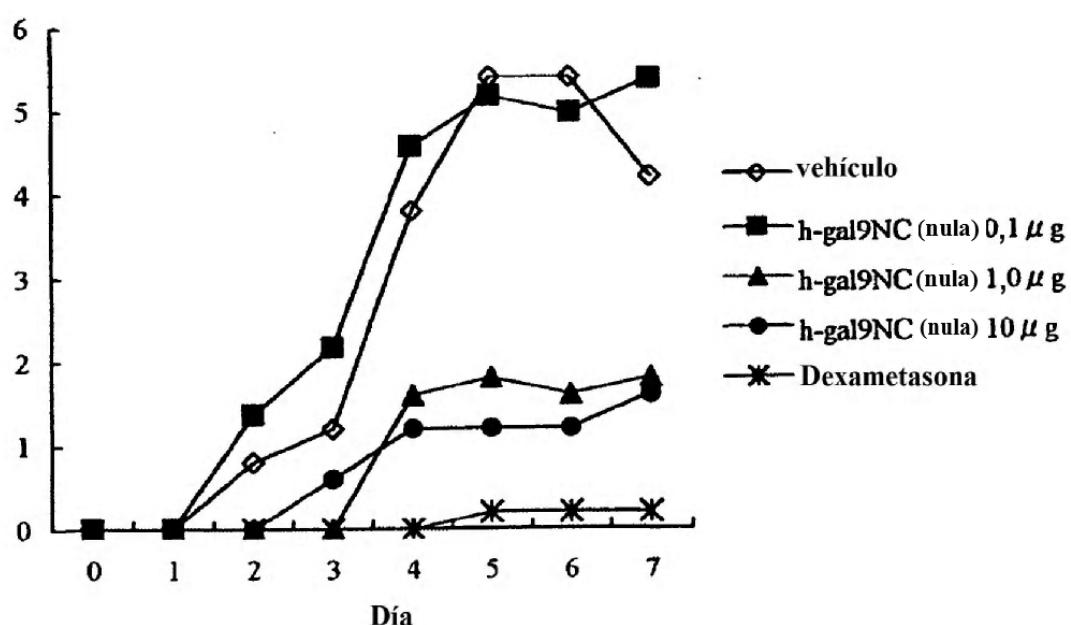


FIG. 20

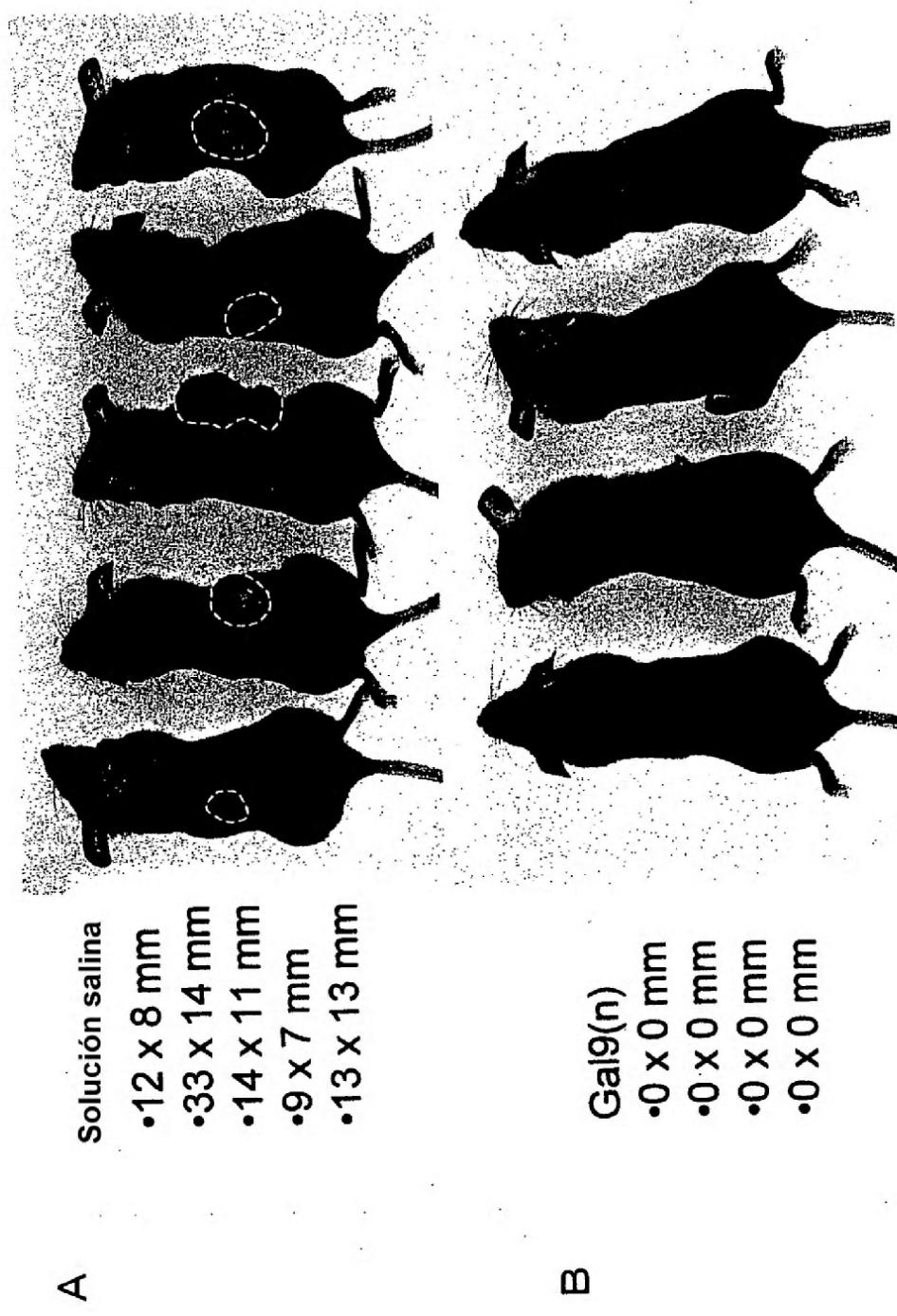


FIG. 21

Piel 5S
Administración de LLC + Gal 9: Tono macroscópico blanco

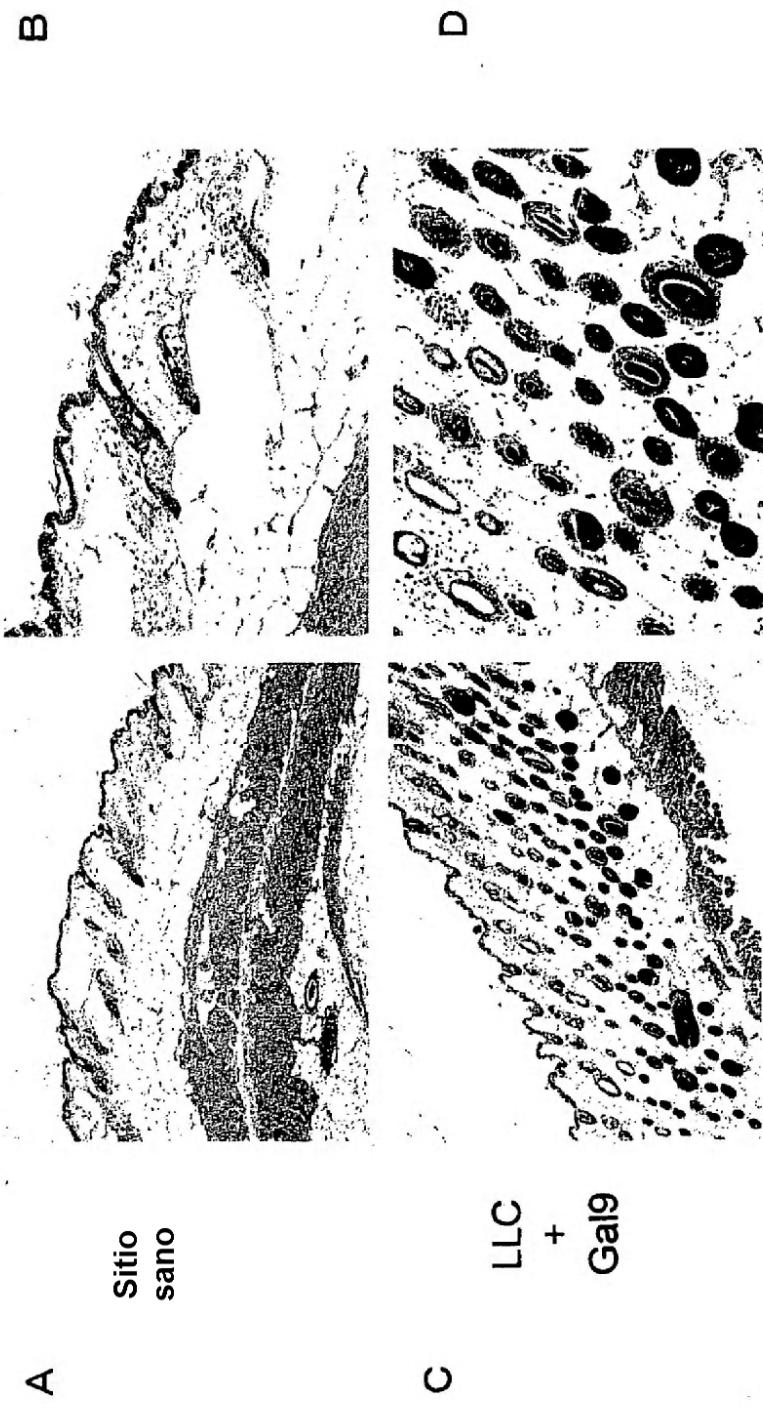


FIG. 22

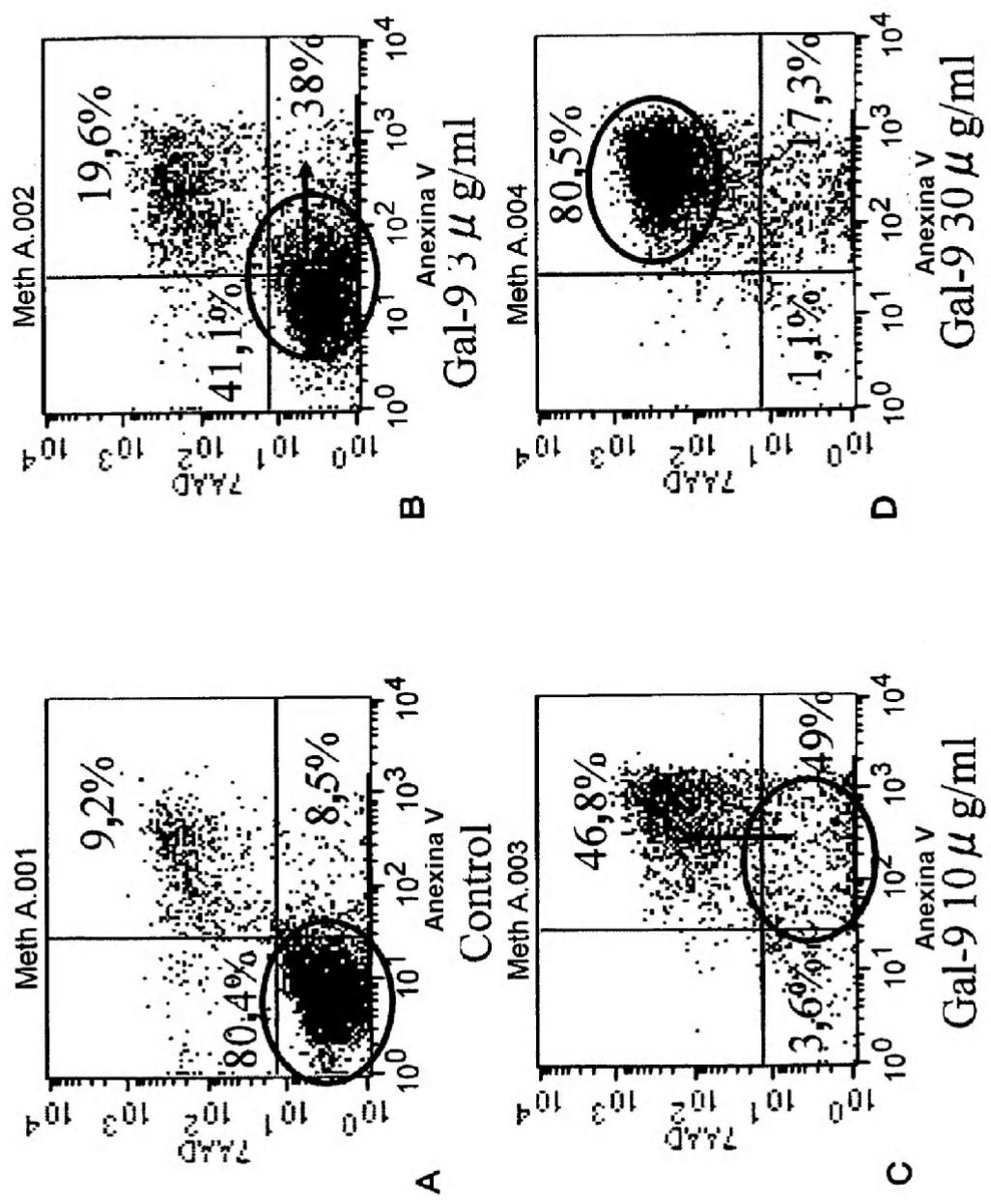


FIG. 23

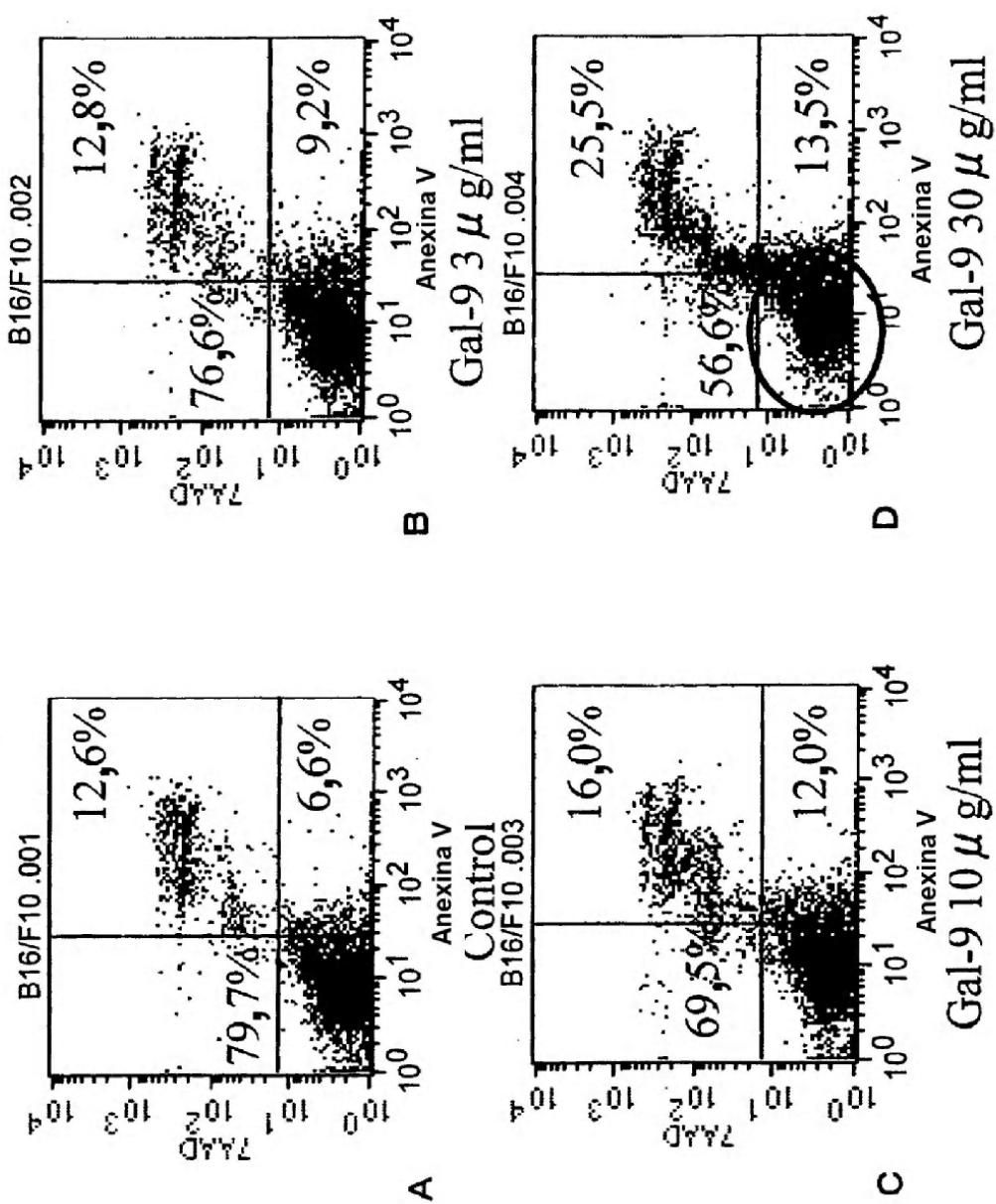


FIG. 24

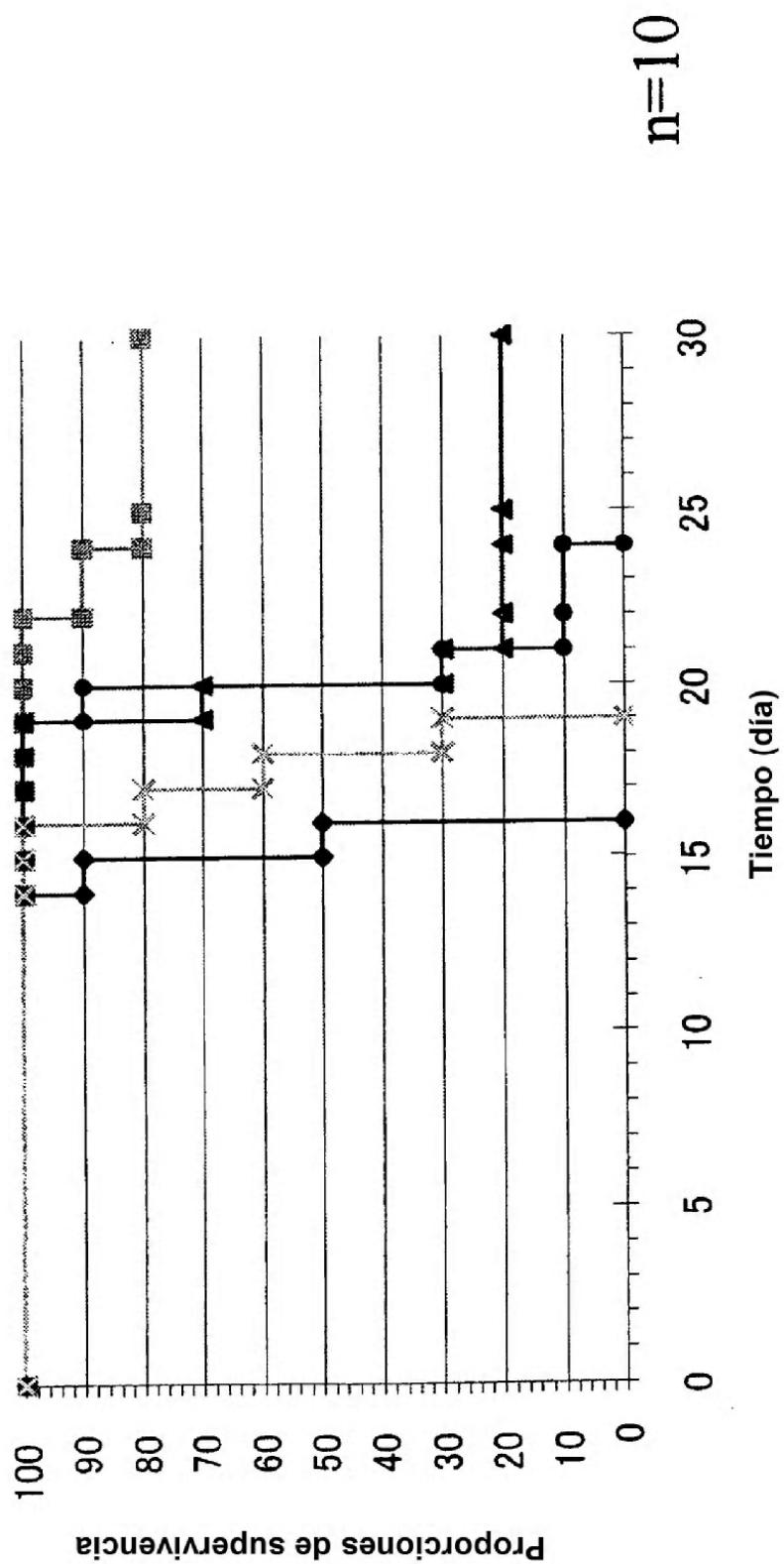
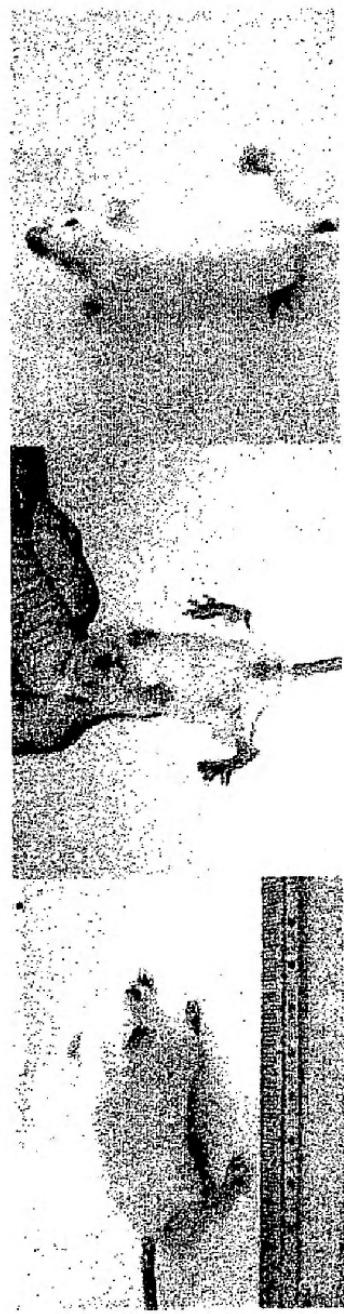
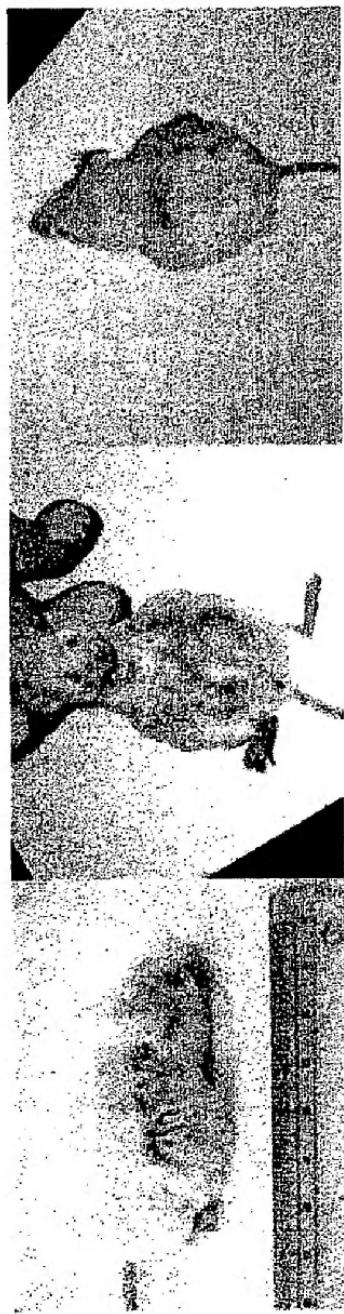


FIG. 25

A Grupo al que no se administró Gal-9: Día 14



B Grupo al que se administró Gal-9: Día 14

FIG. 26

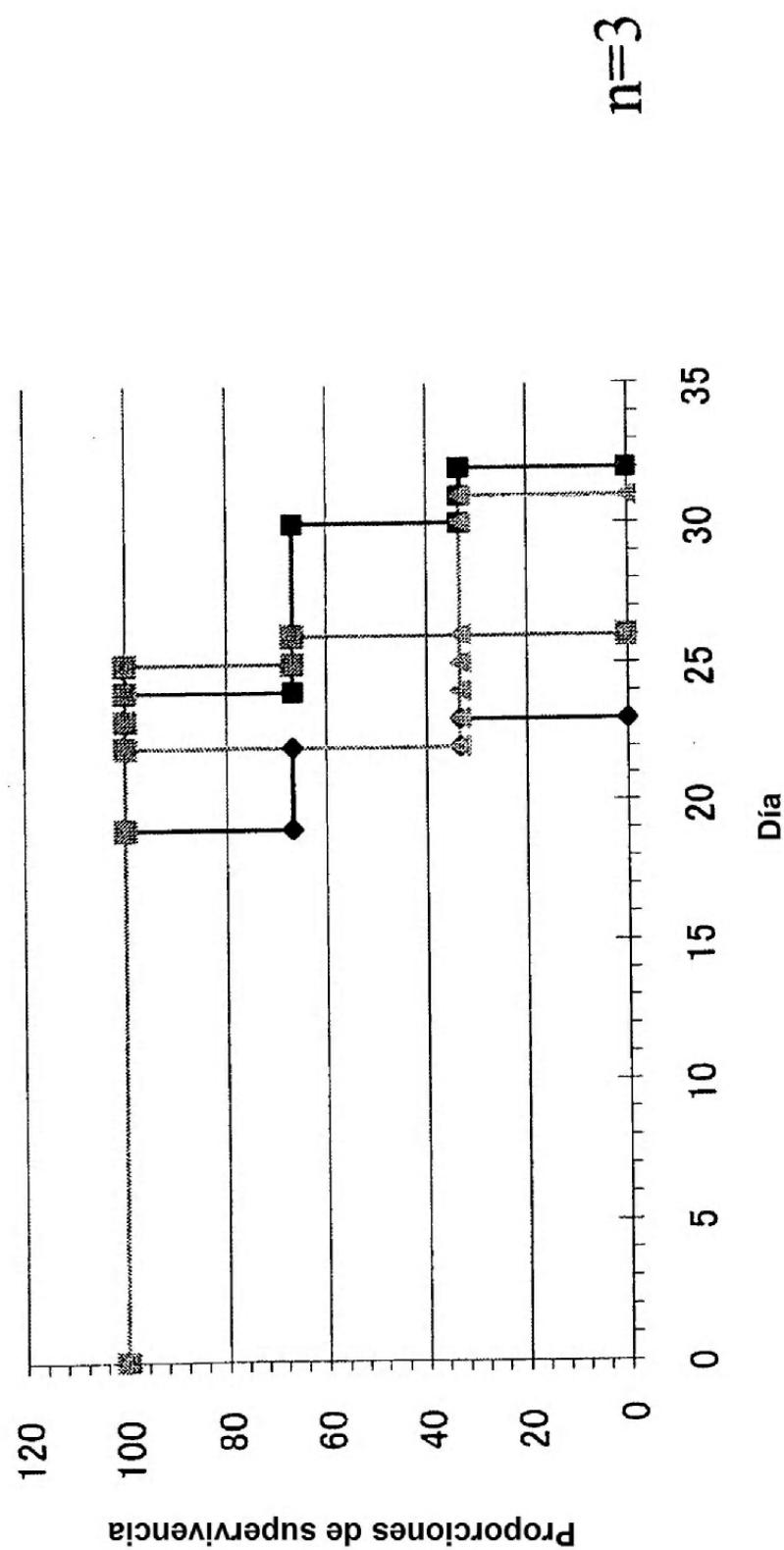


FIG. 27 Modelo de peritonitis cancerosa: B16/F10 (Melanoma) Día 14

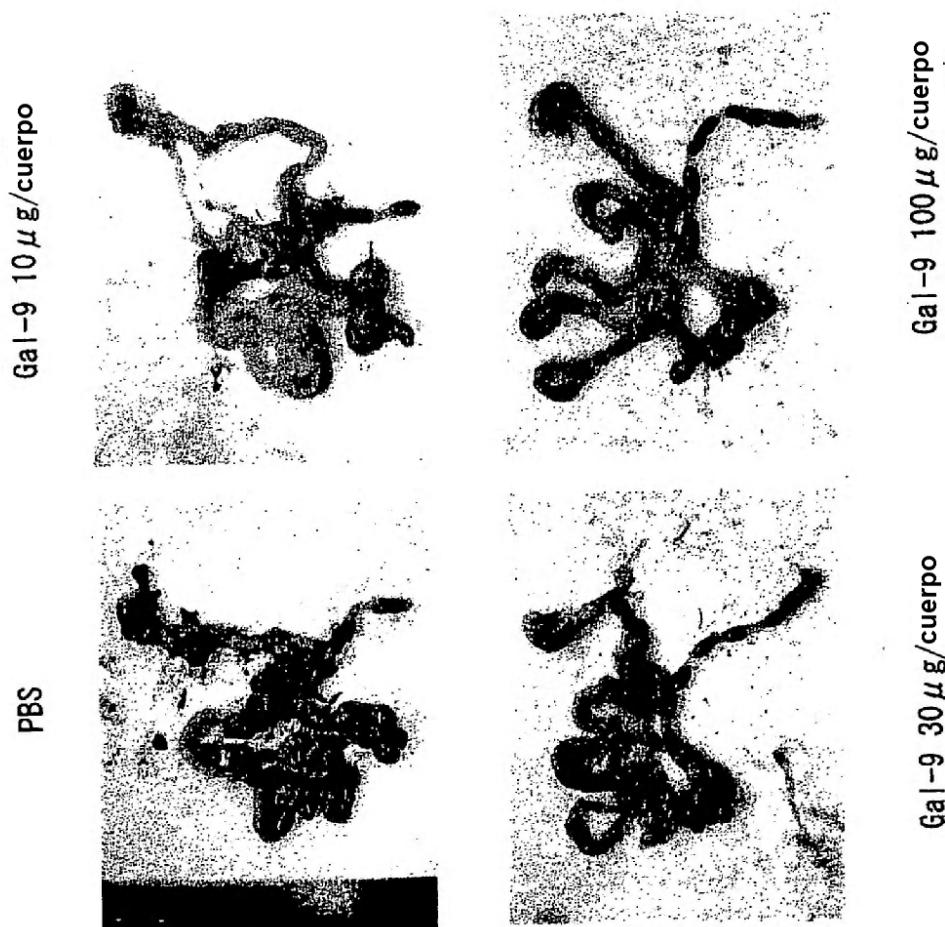


FIG. 28

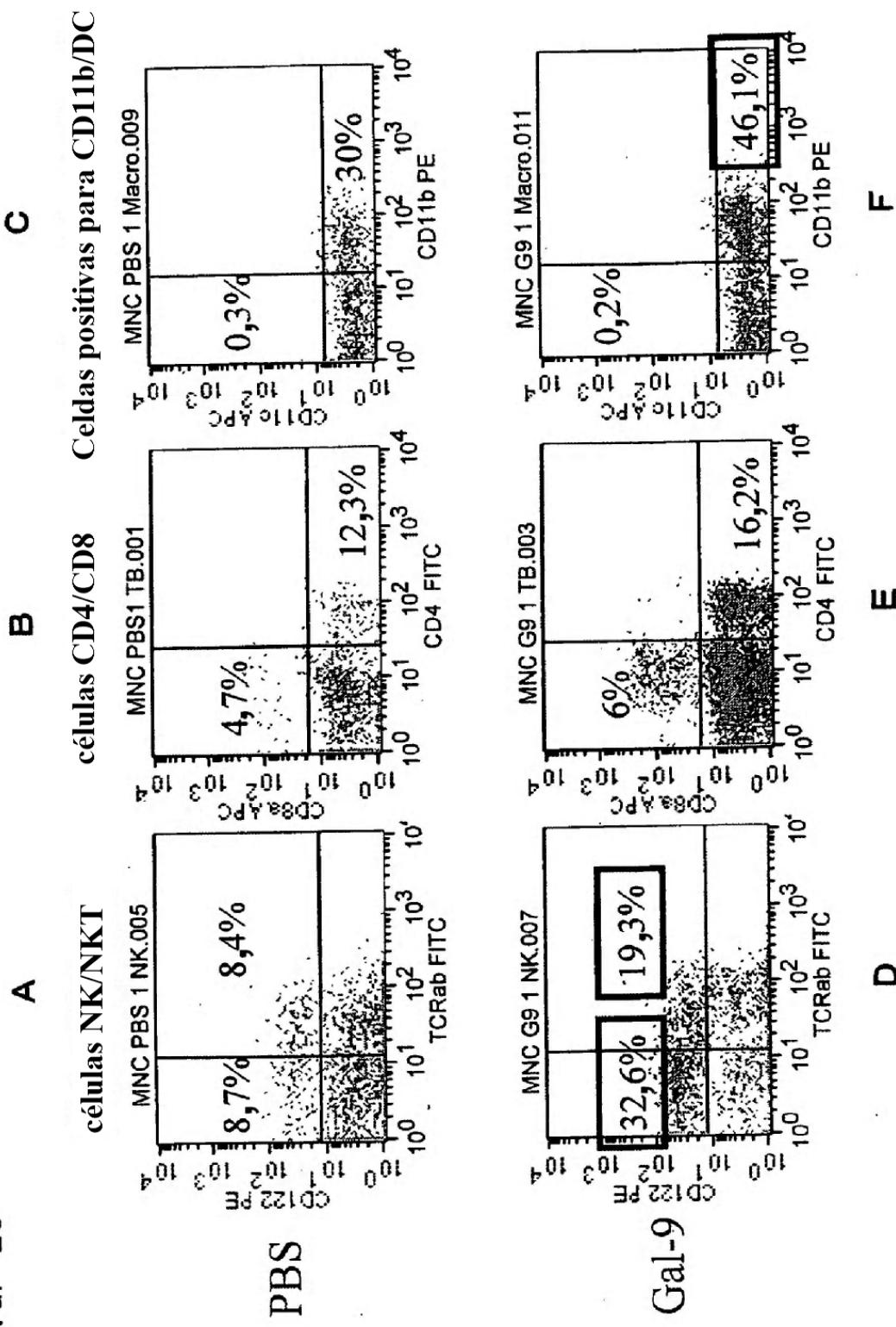


FIG. 29



FIG. 30

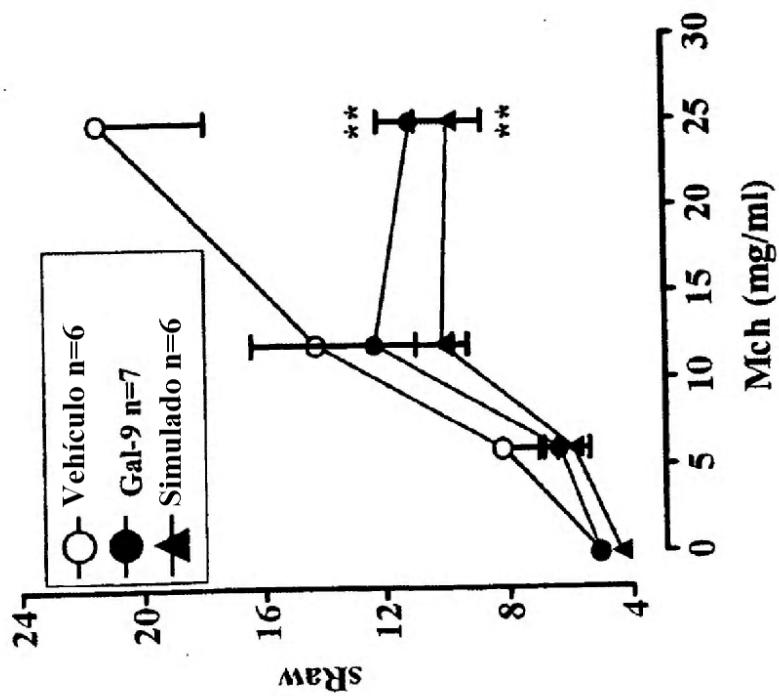
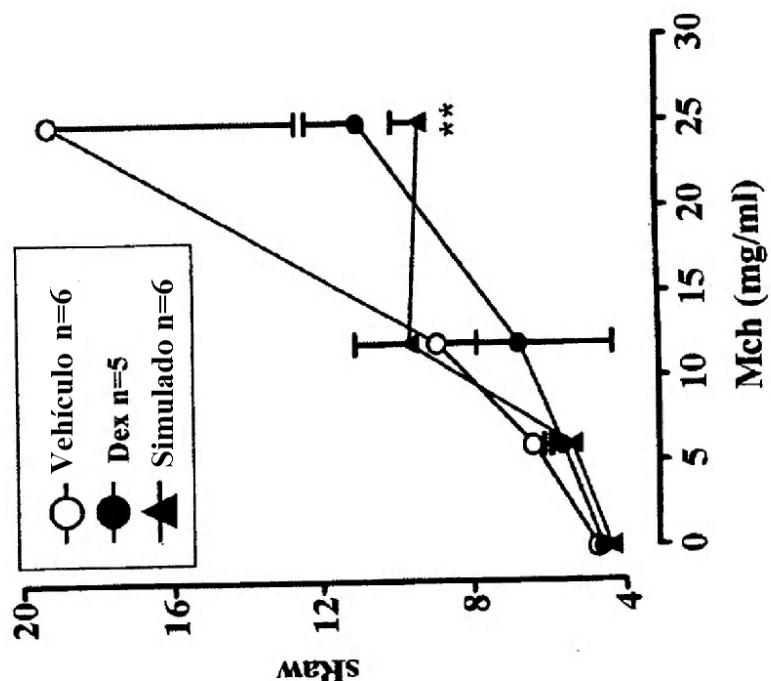
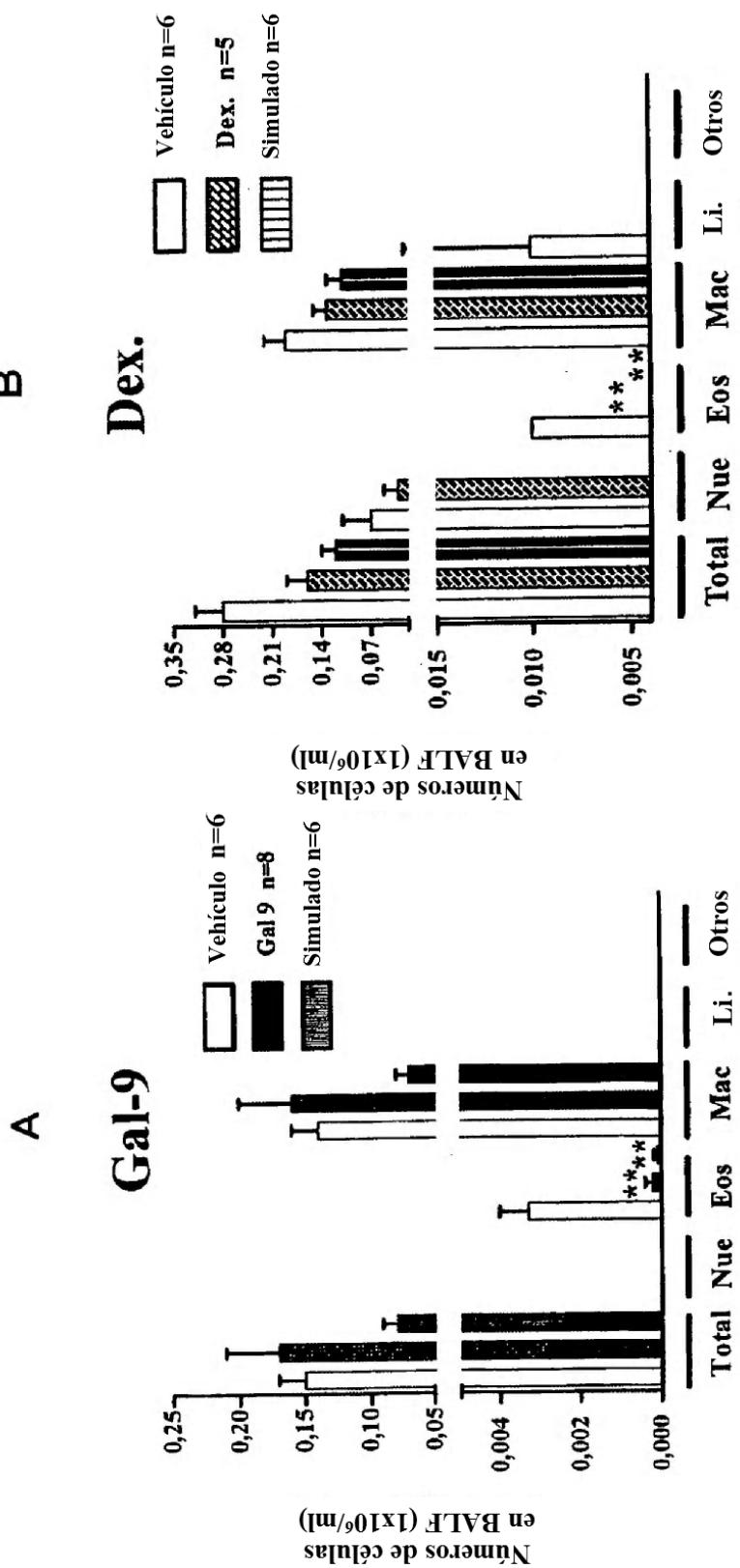
A**Gal-9****B****Dex.**

FIG. 31



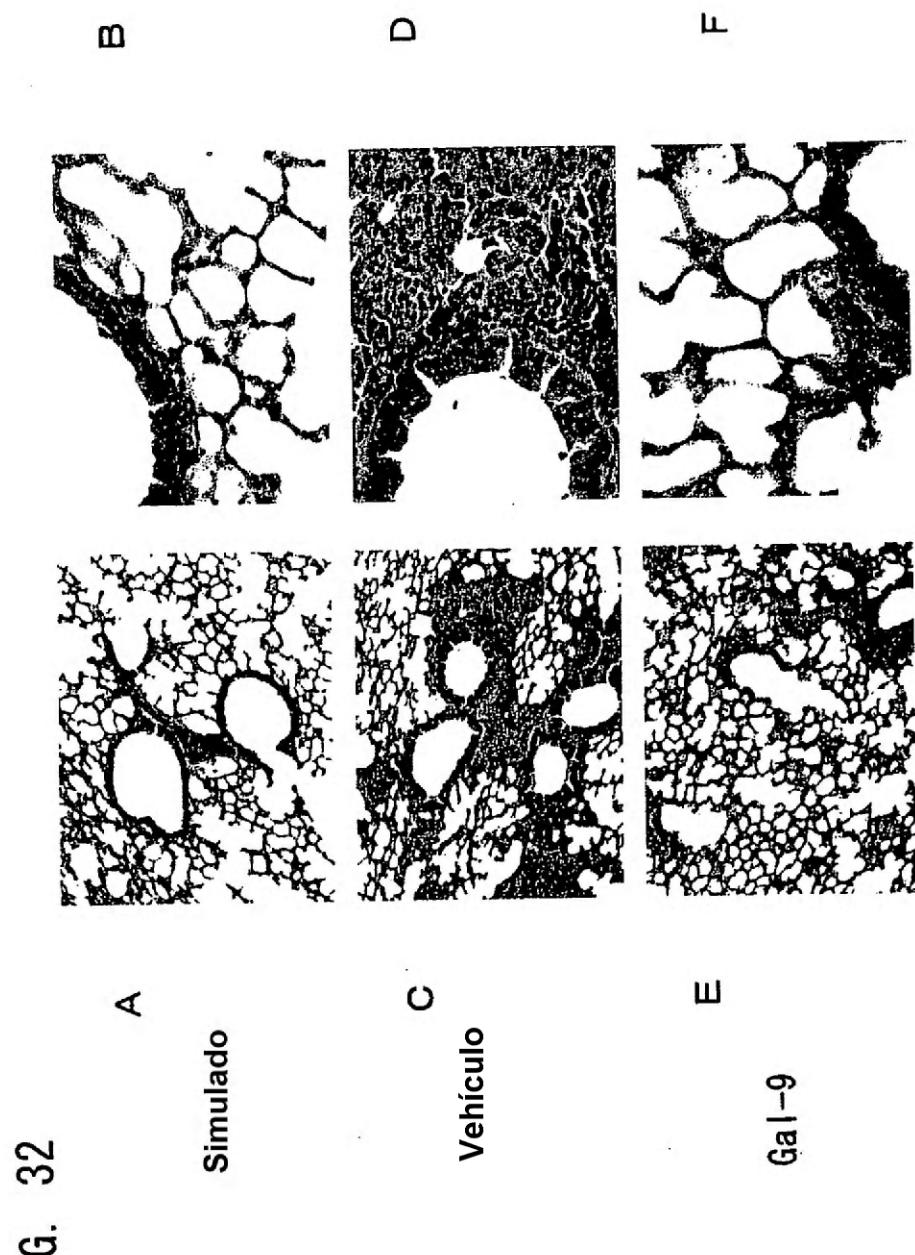


FIG. 33

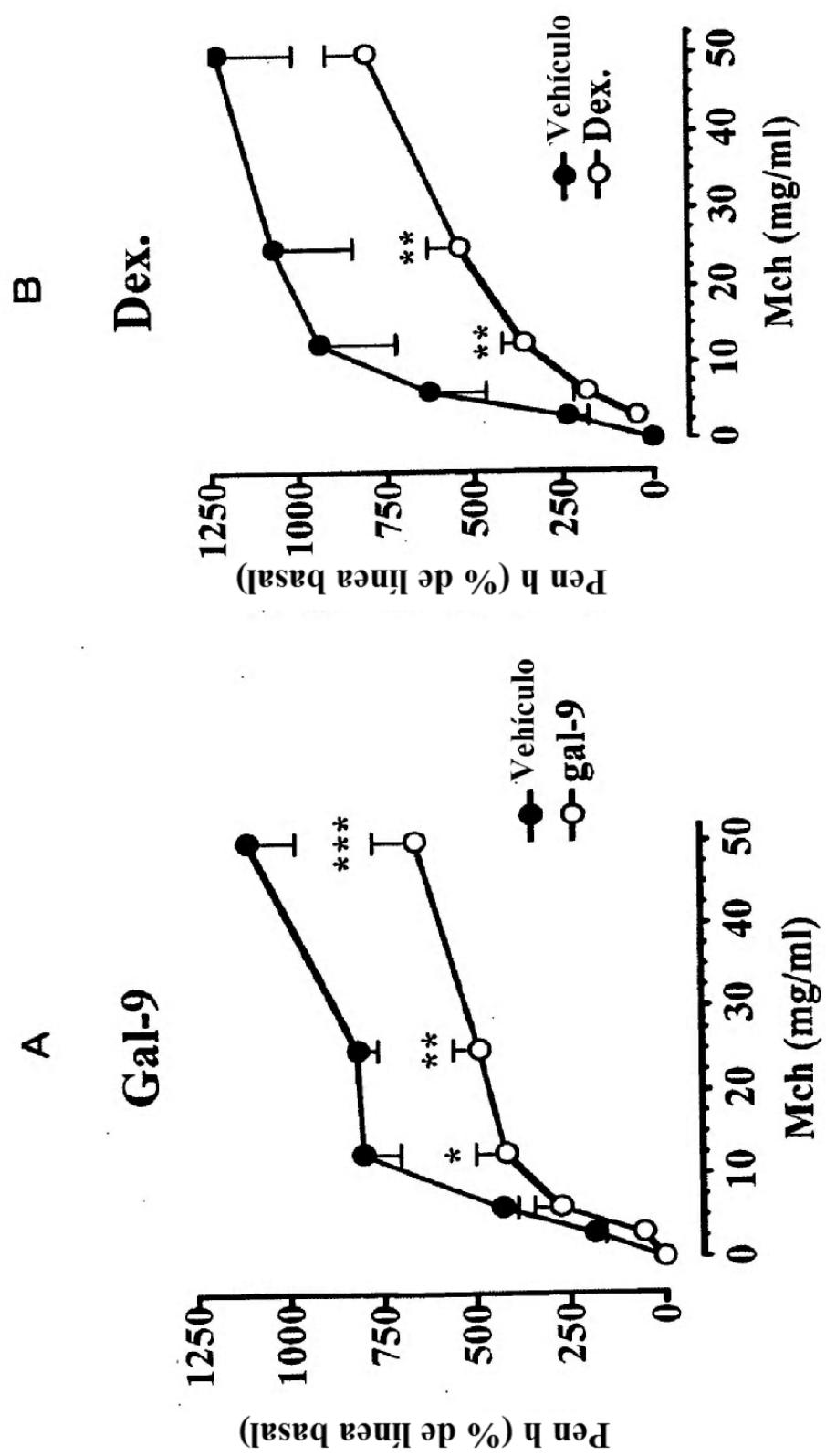


FIG. 34

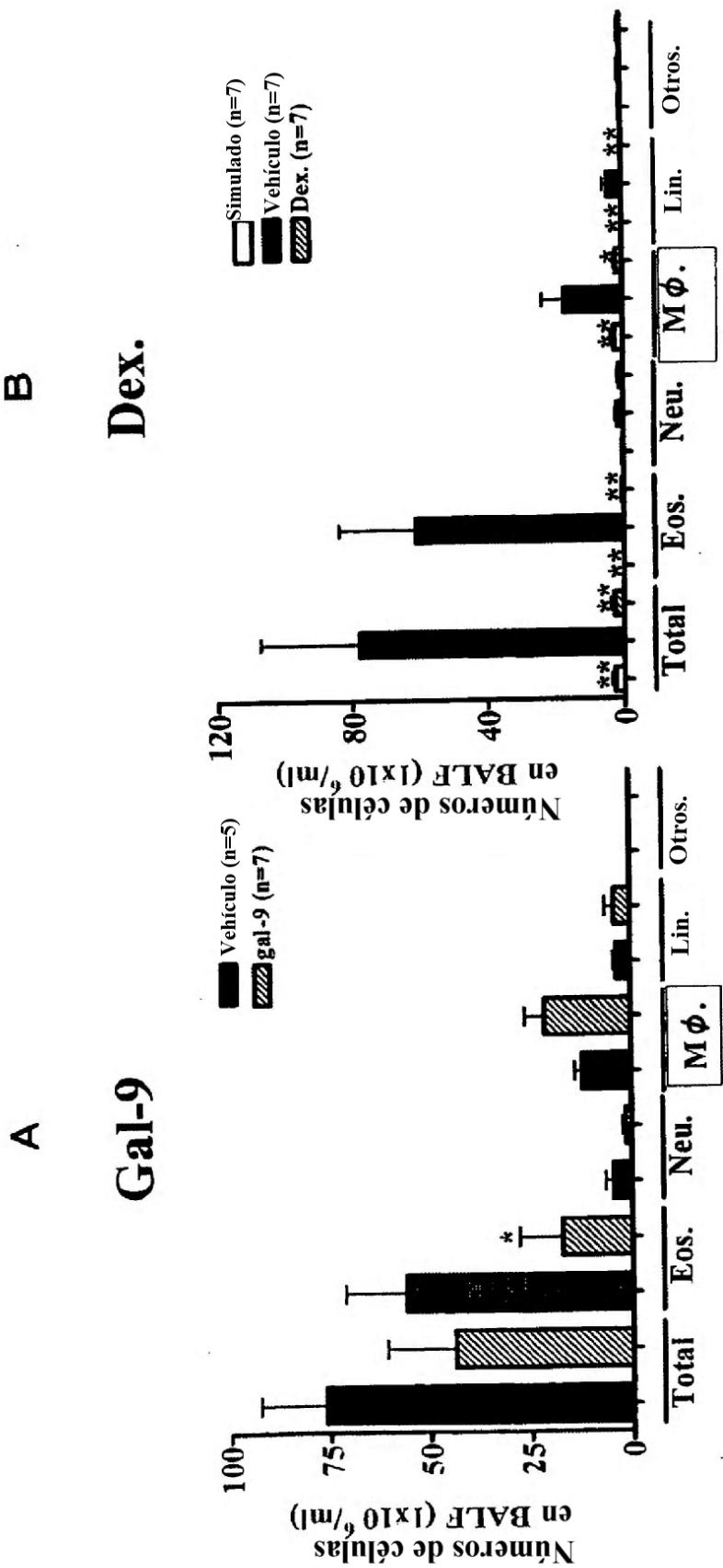


FIG. 35

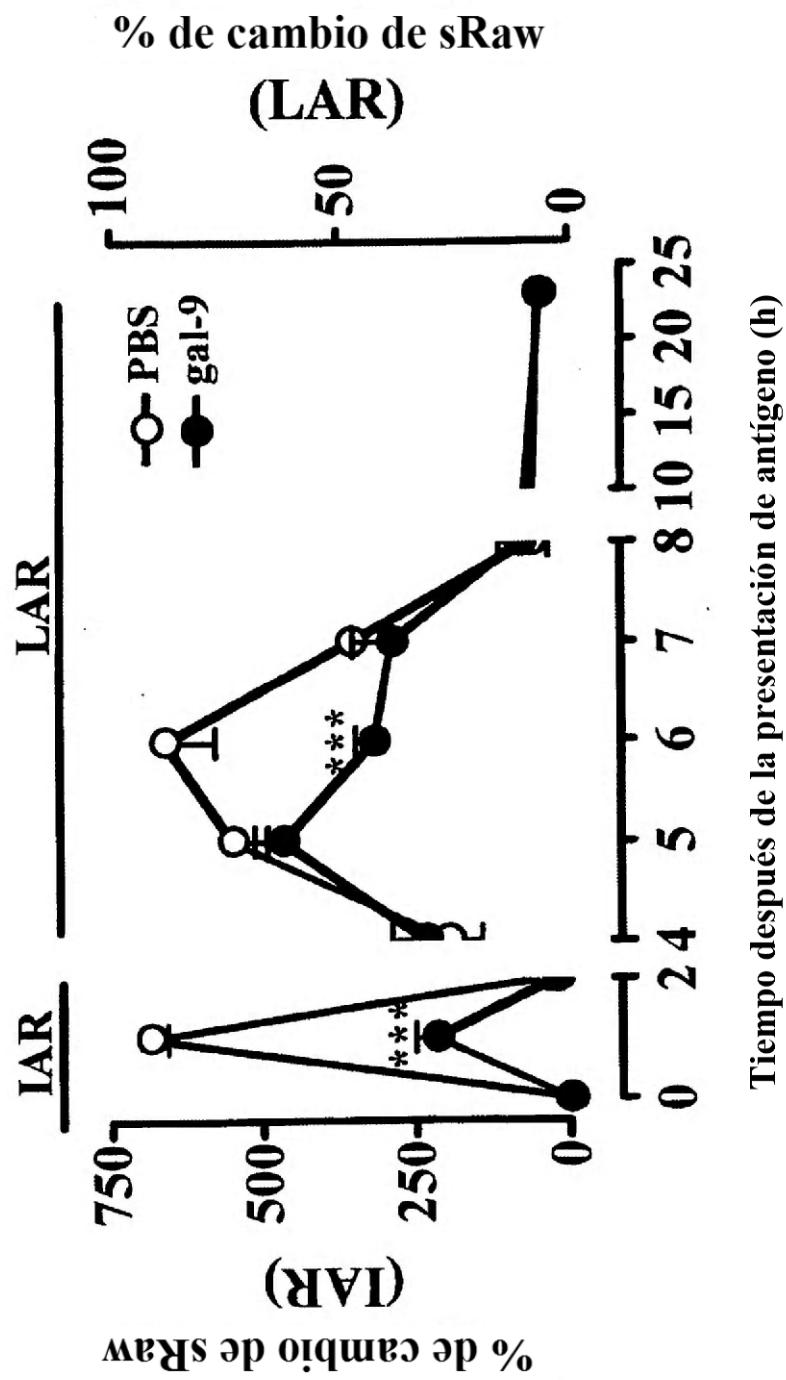
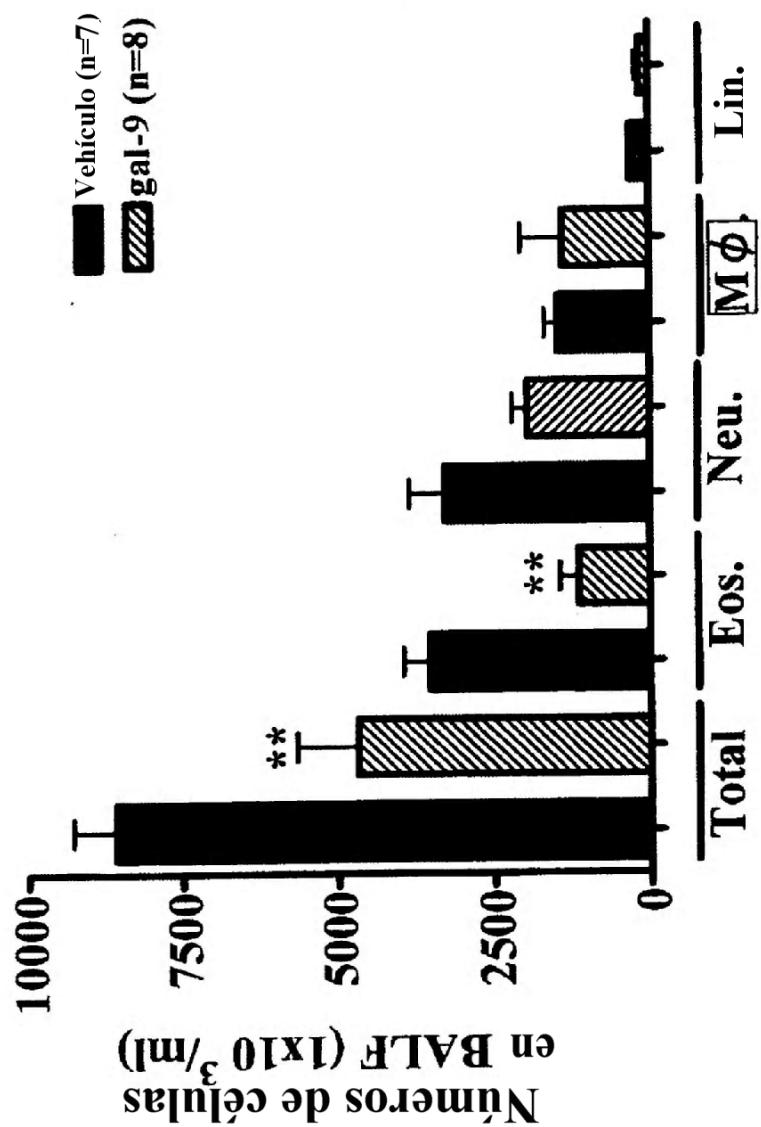


FIG. 36



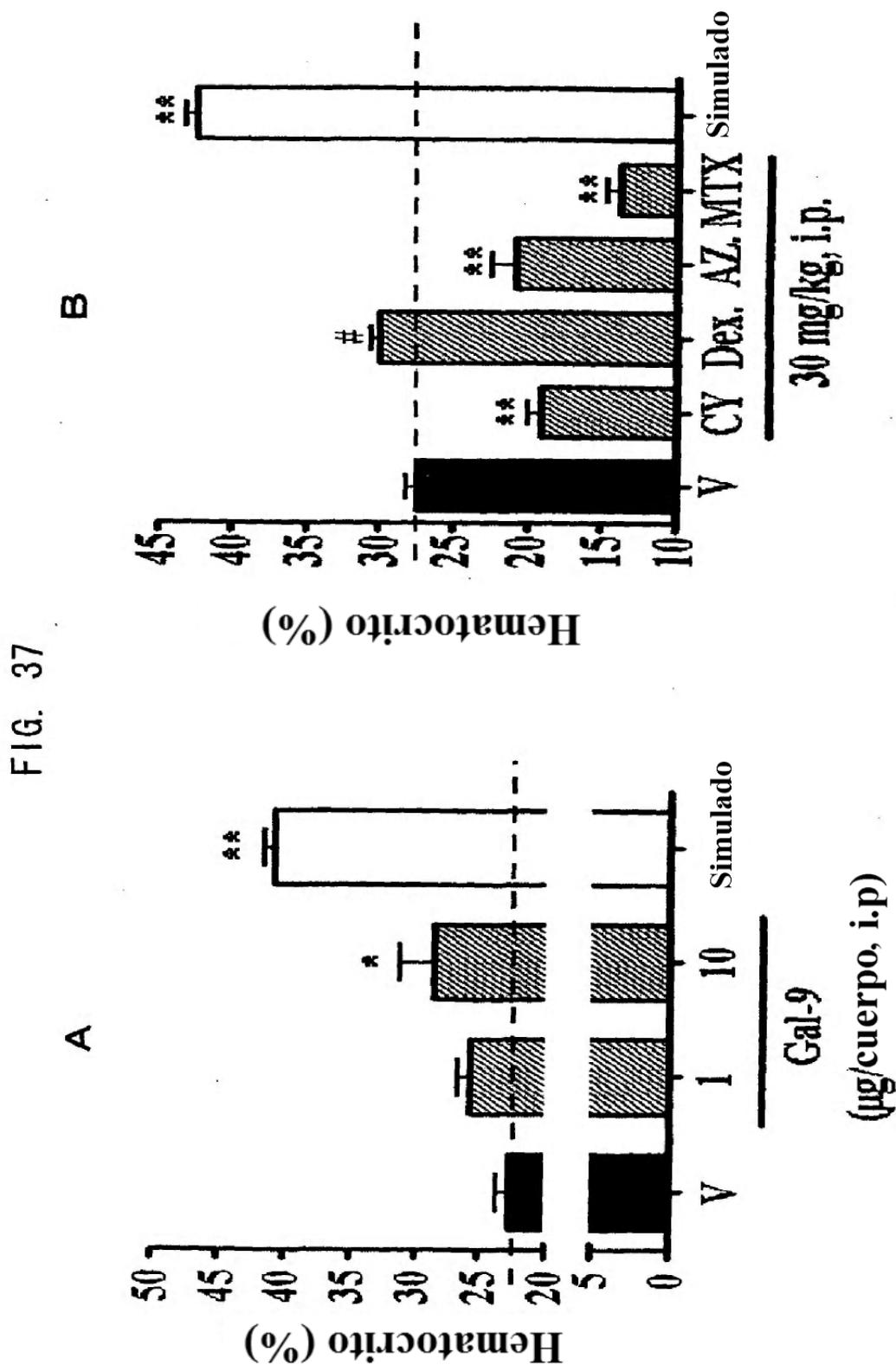


FIG. 38

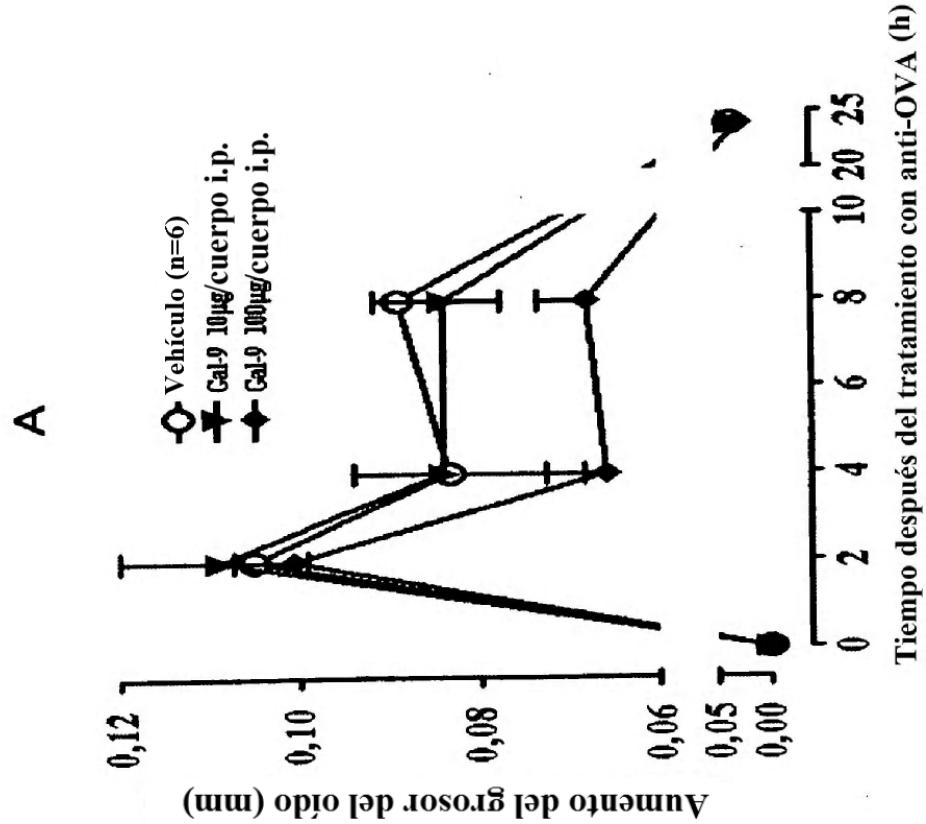
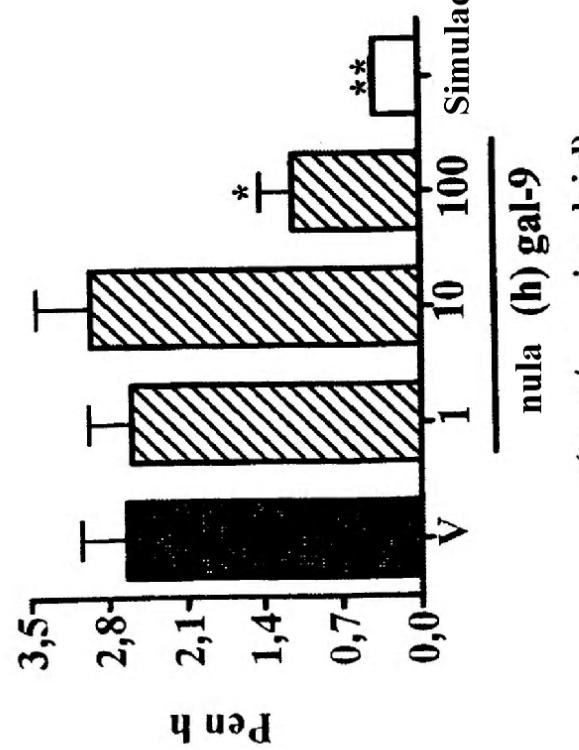


FIG. 39

A



(μ g /cuerpo, i.p., b.i.d)

Dex.
(mg/kg, i.p., b.i.d)

Dex.

1

Dex.

2

FIG. 39

A
B
Gal-9
Dex.

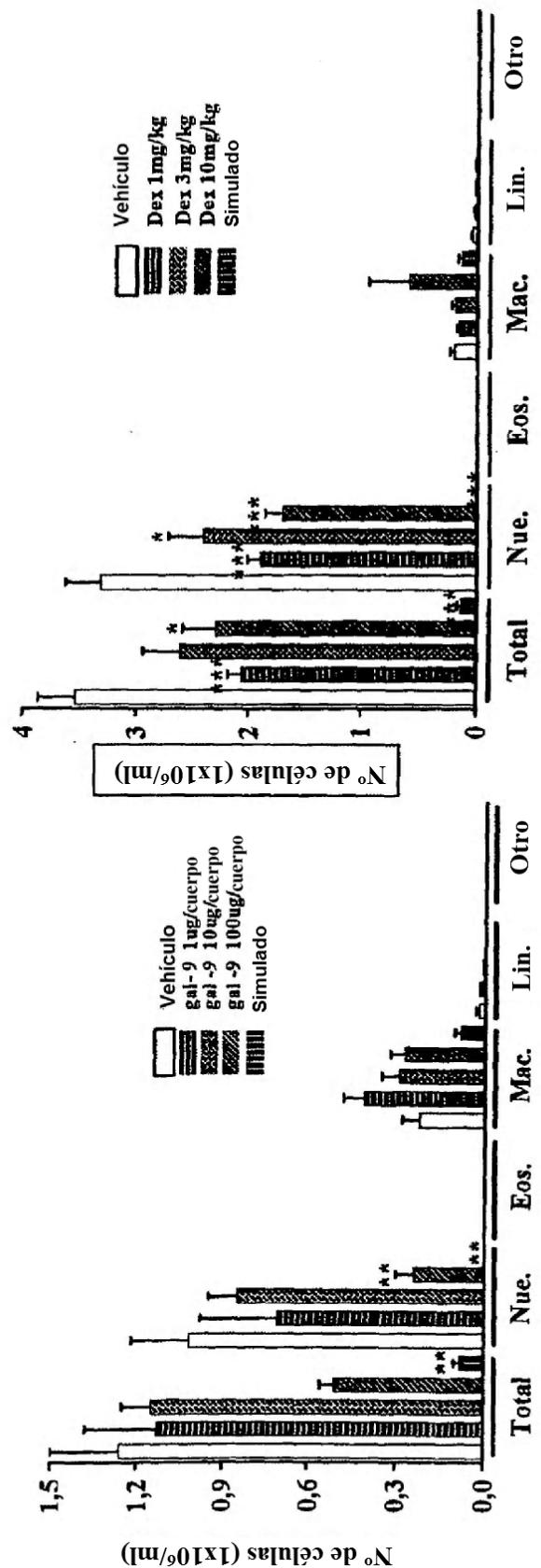


FIG. 41

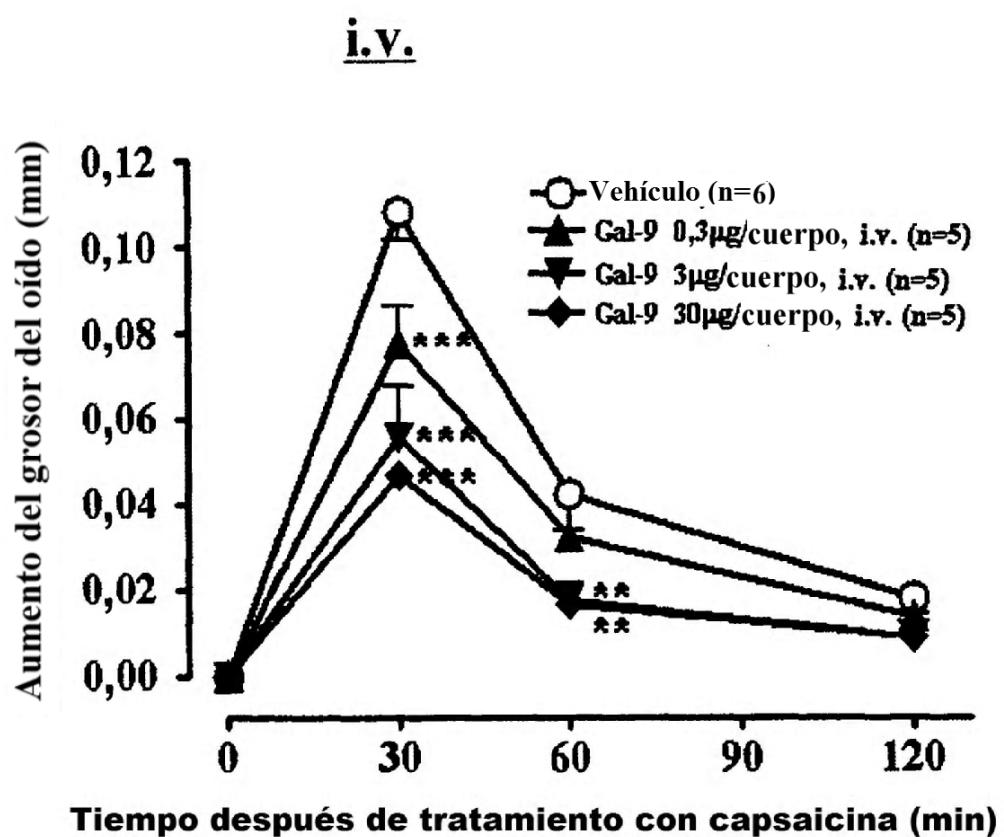
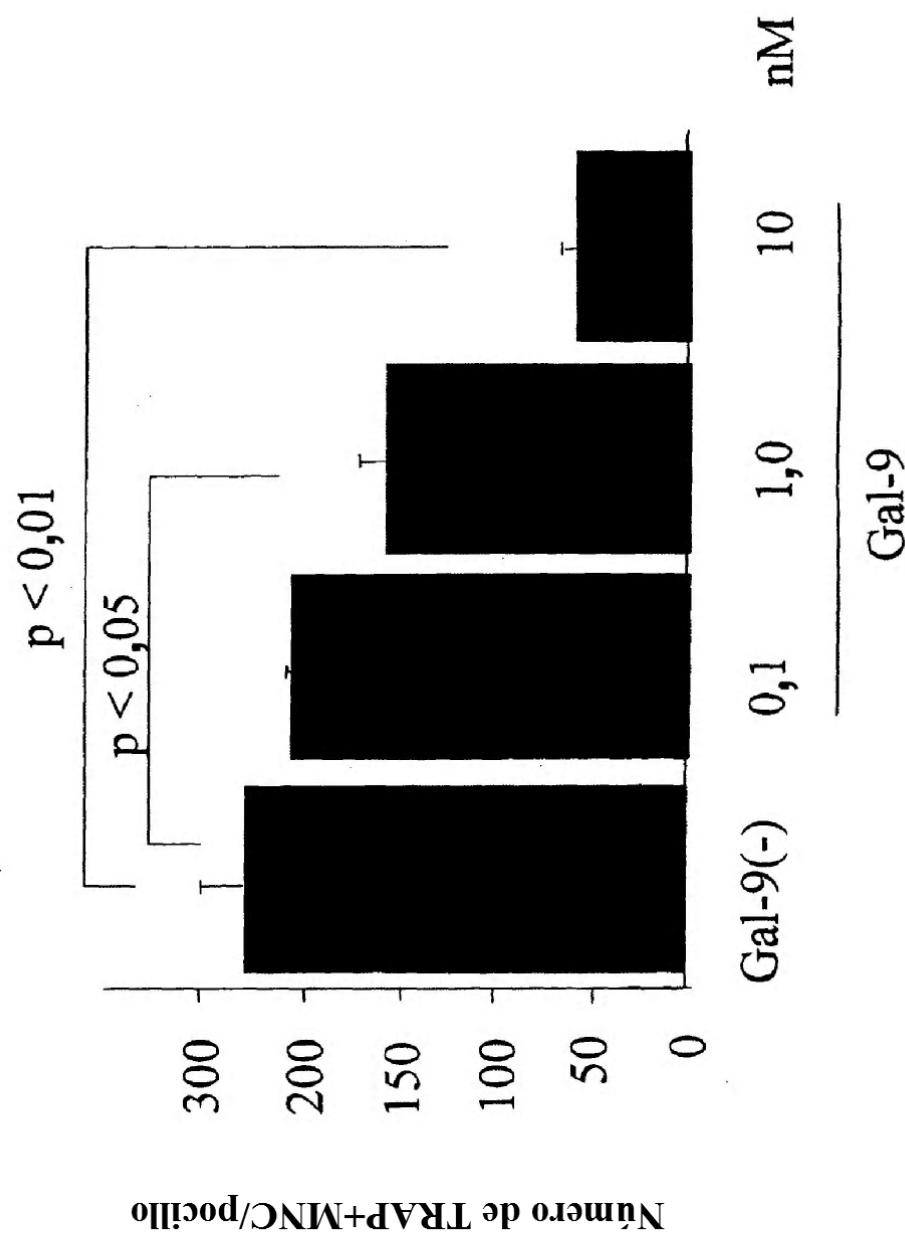


FIG. 42



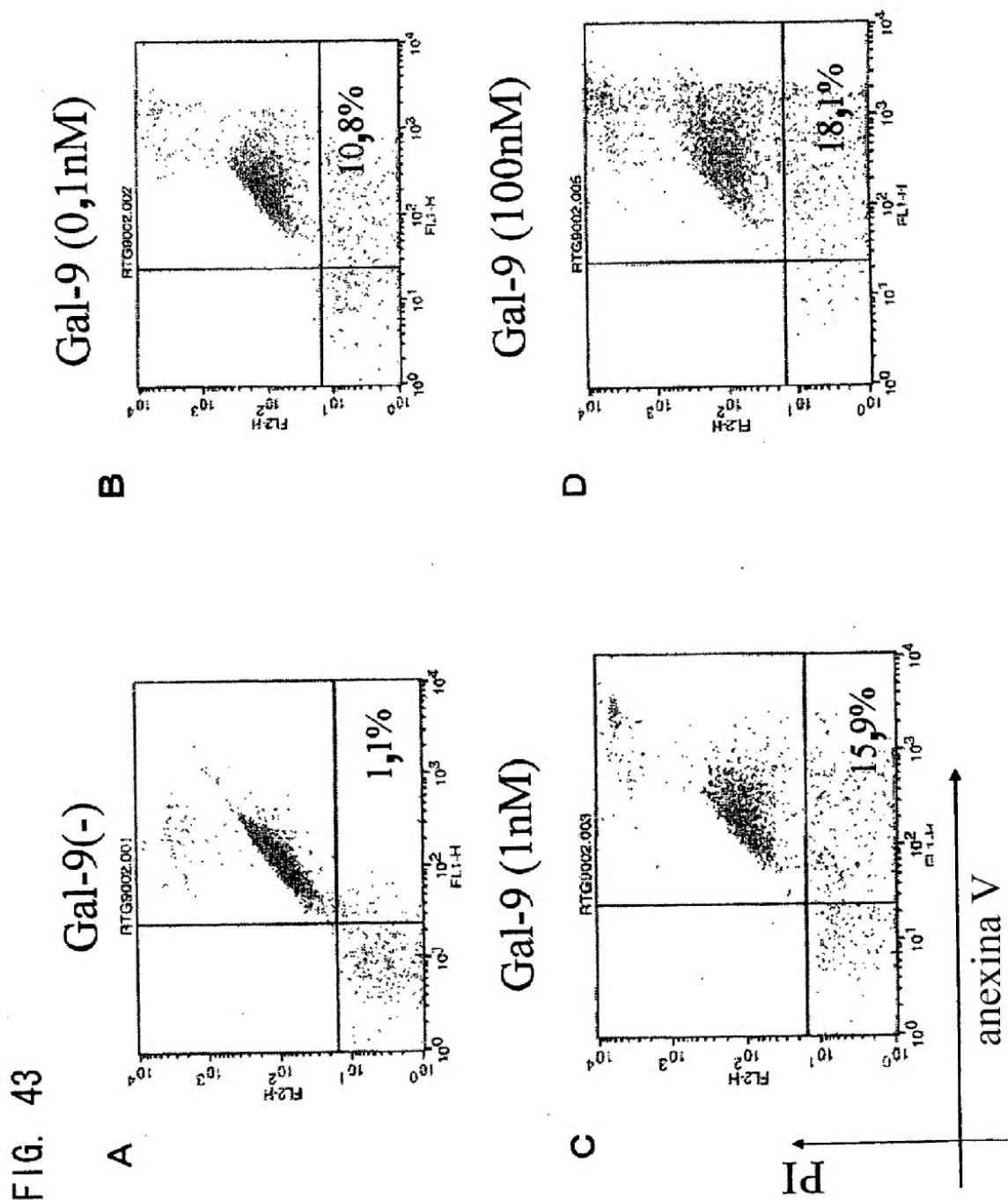


FIG. 44

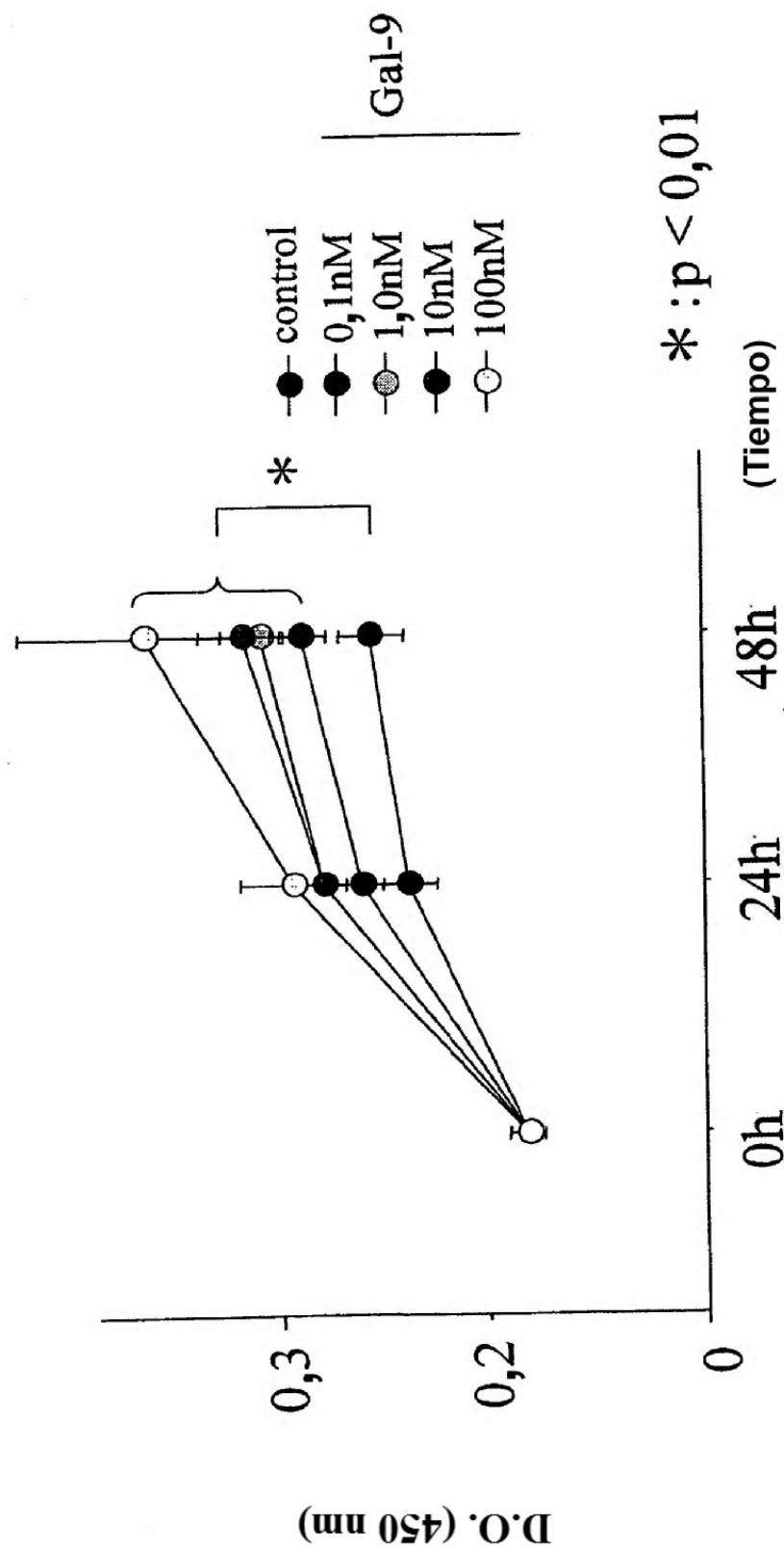


FIG. 45

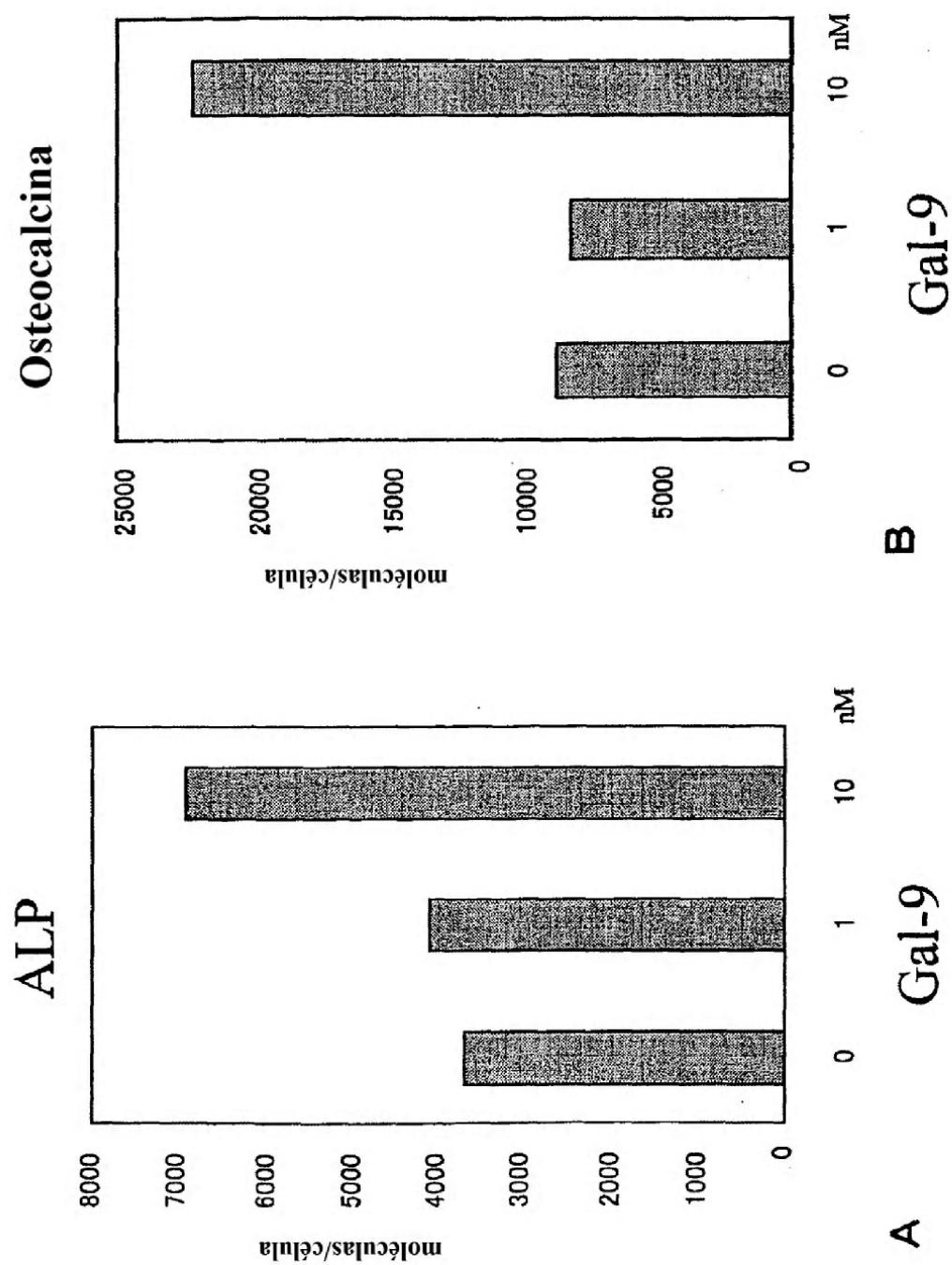


FIG. 46 Proporciones de supervivencia

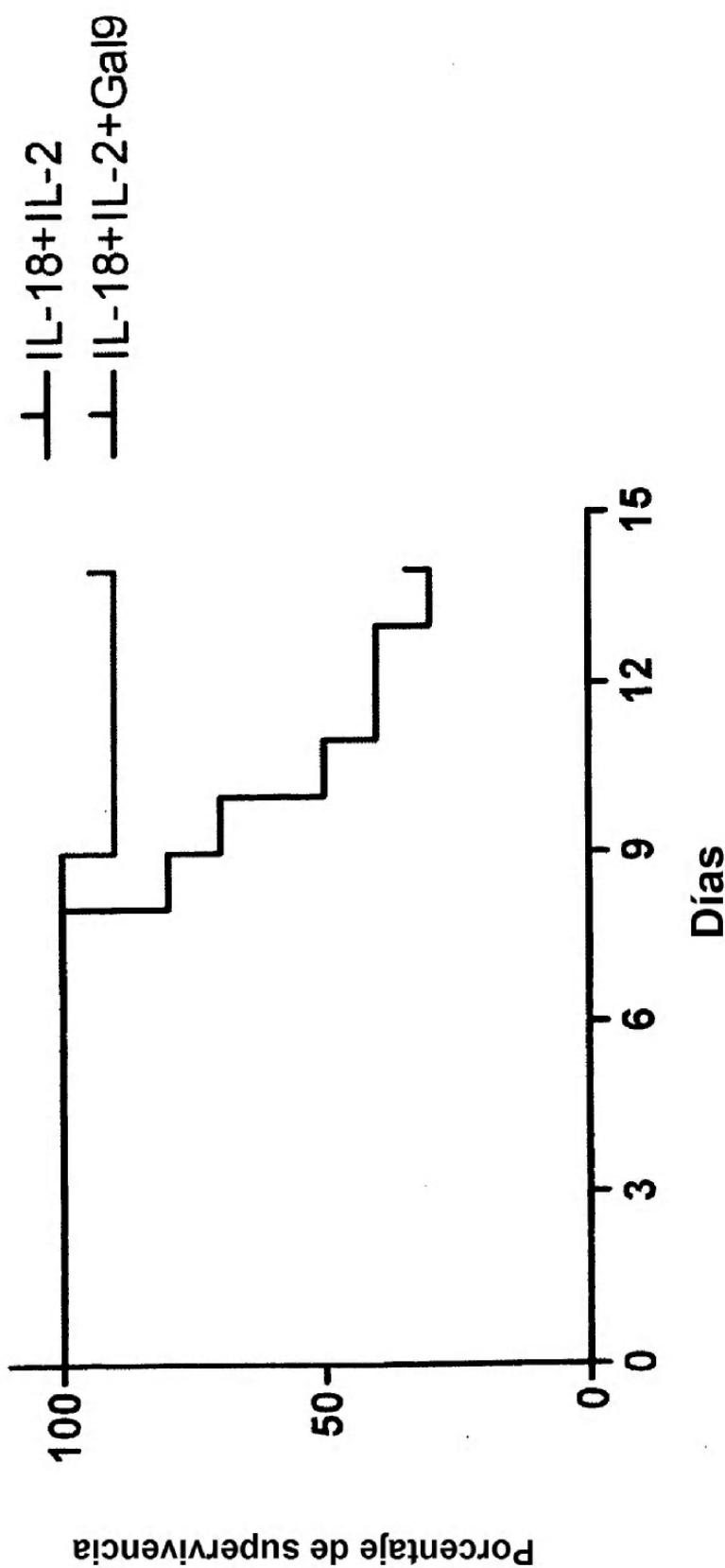
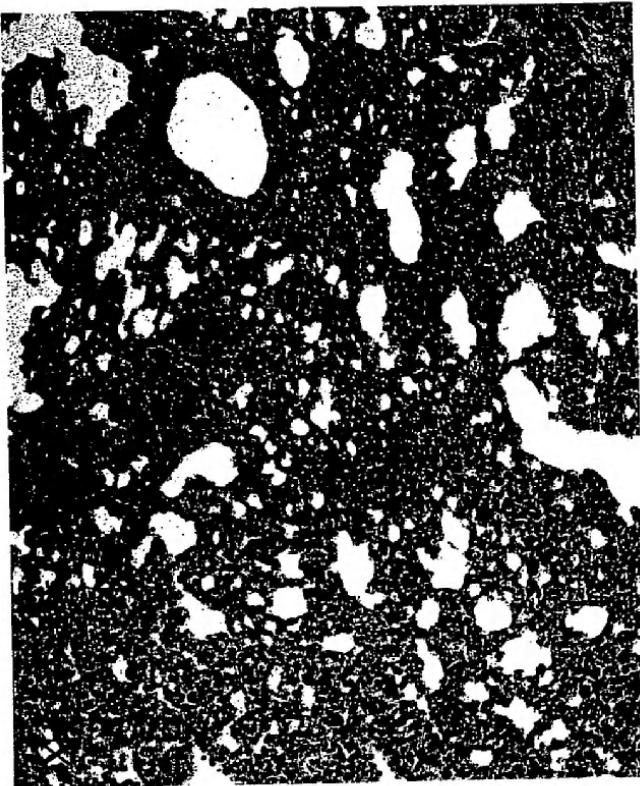


FIG. 47

A

Grupo de PBS día 14



B

Grupo de Gal-9 día 14

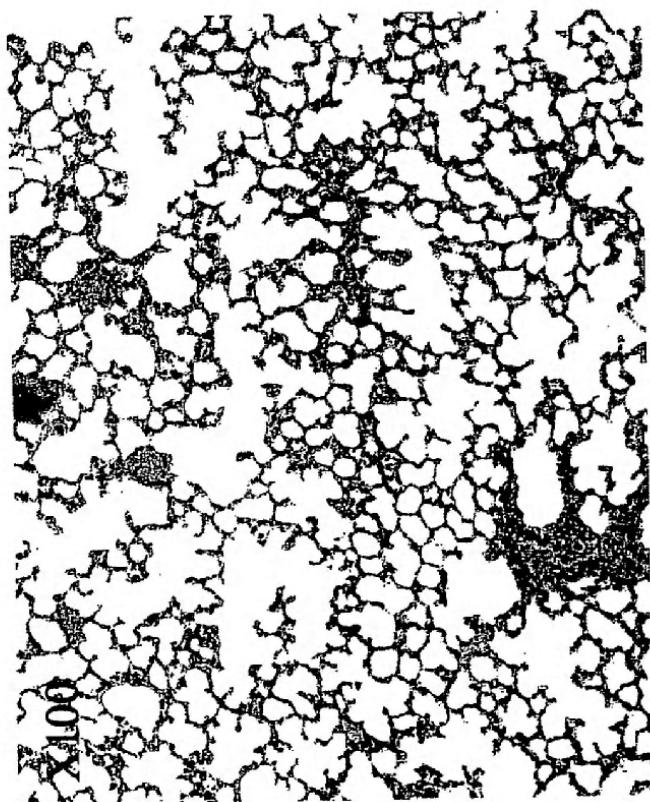


FIG. 48

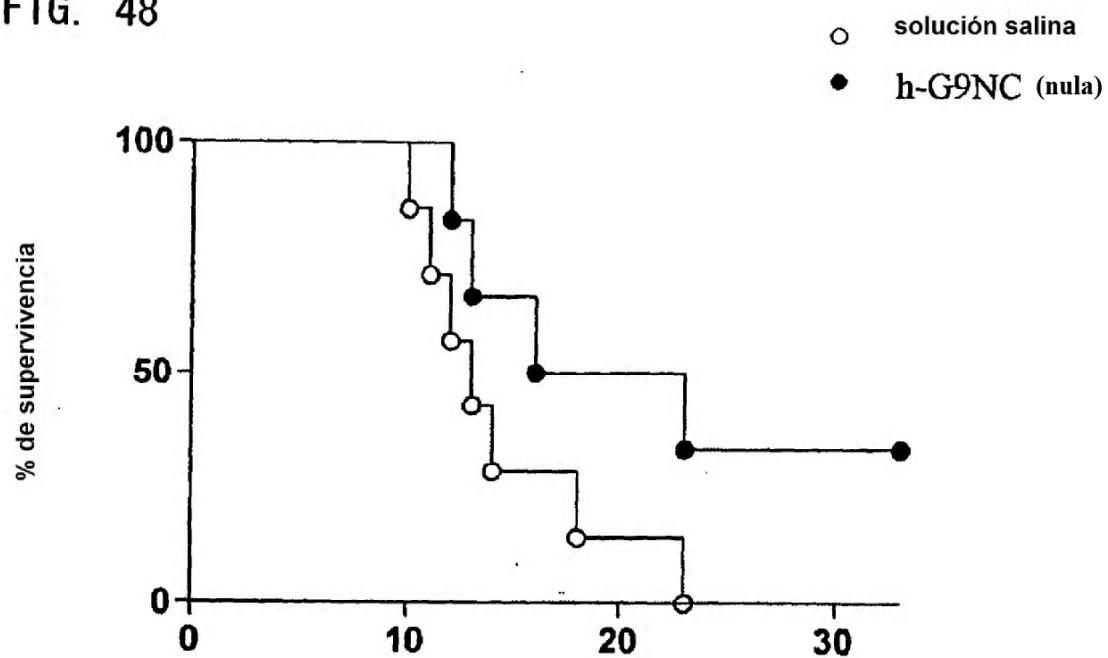
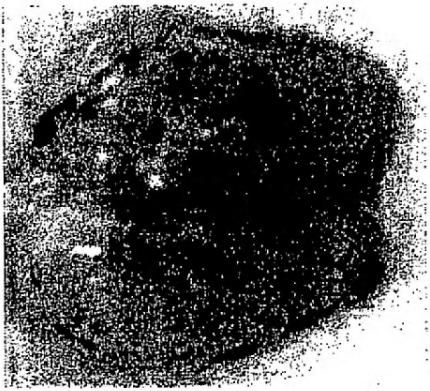


FIG. 49

Modelo metastásico: B16/F10 (Melanoma)

Grupo de Gal-9



Grupo de PBS

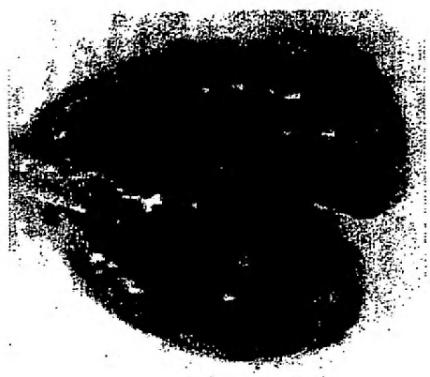


FIG. 50
Modelo metastásico: B16/F10 (Melanoma)

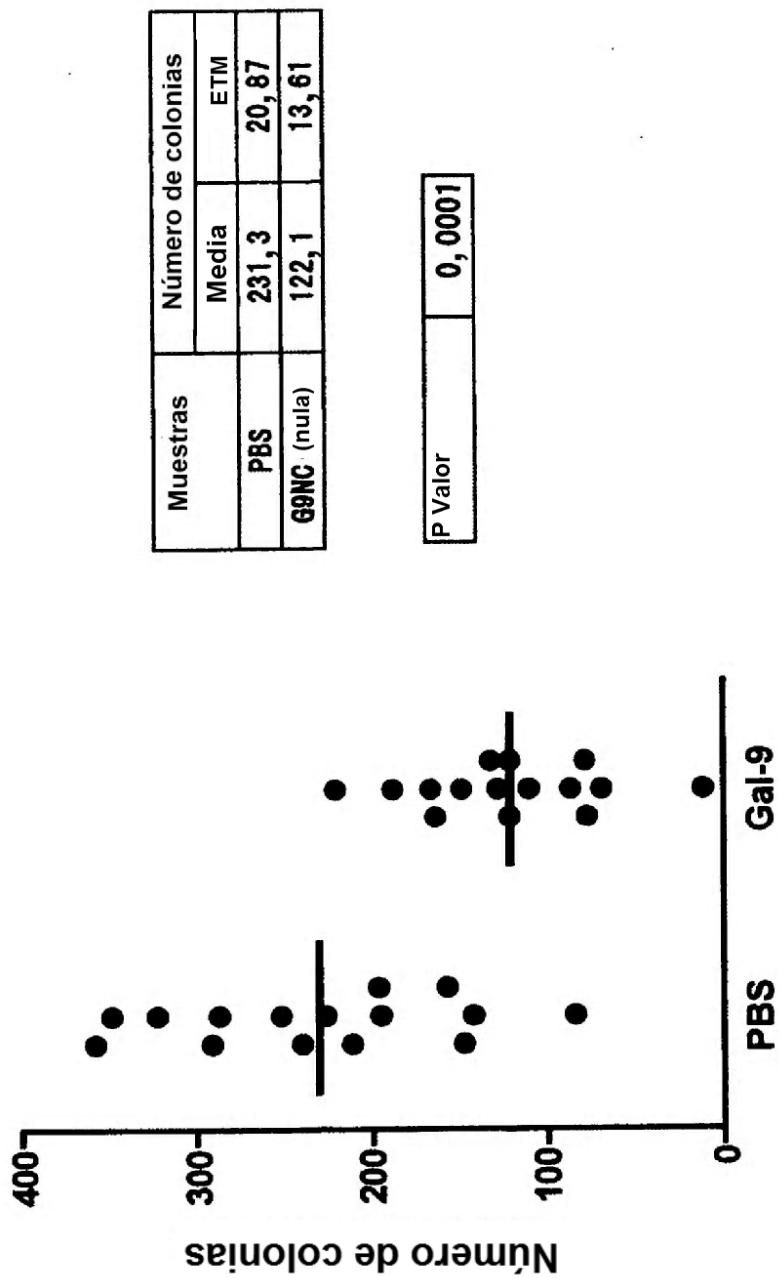


FIG. 51

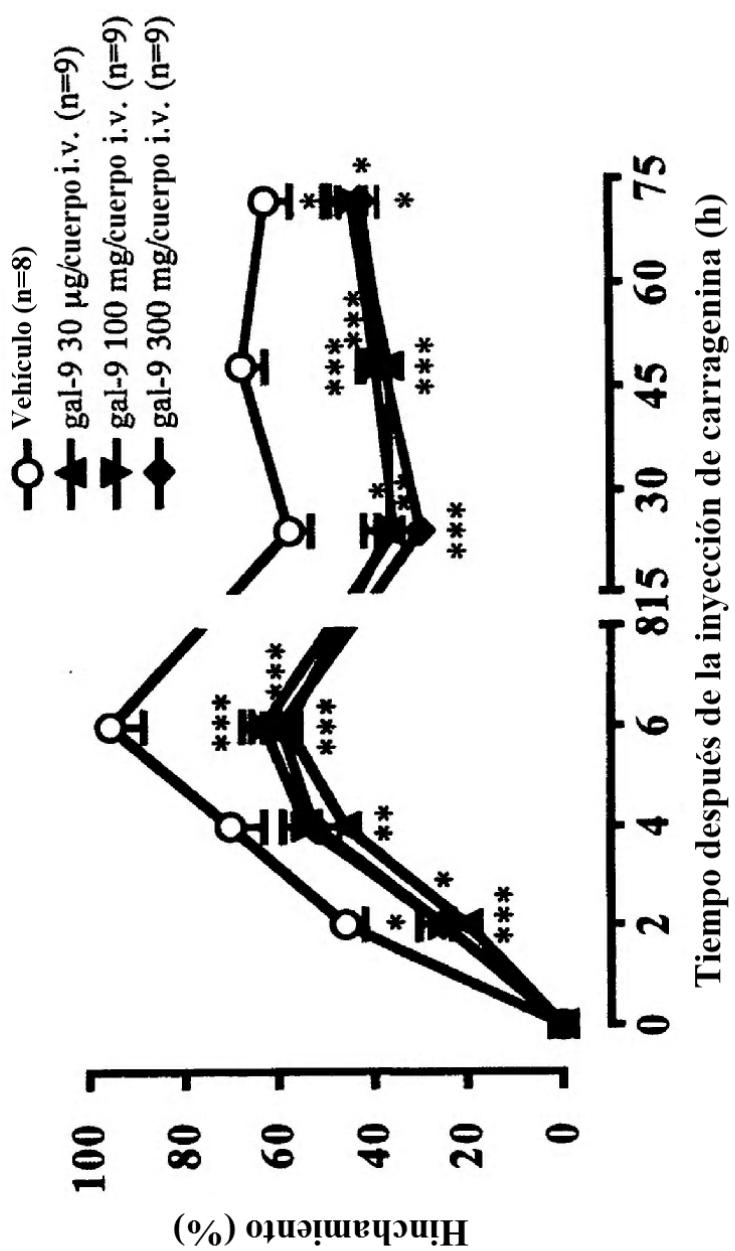


FIG. 52

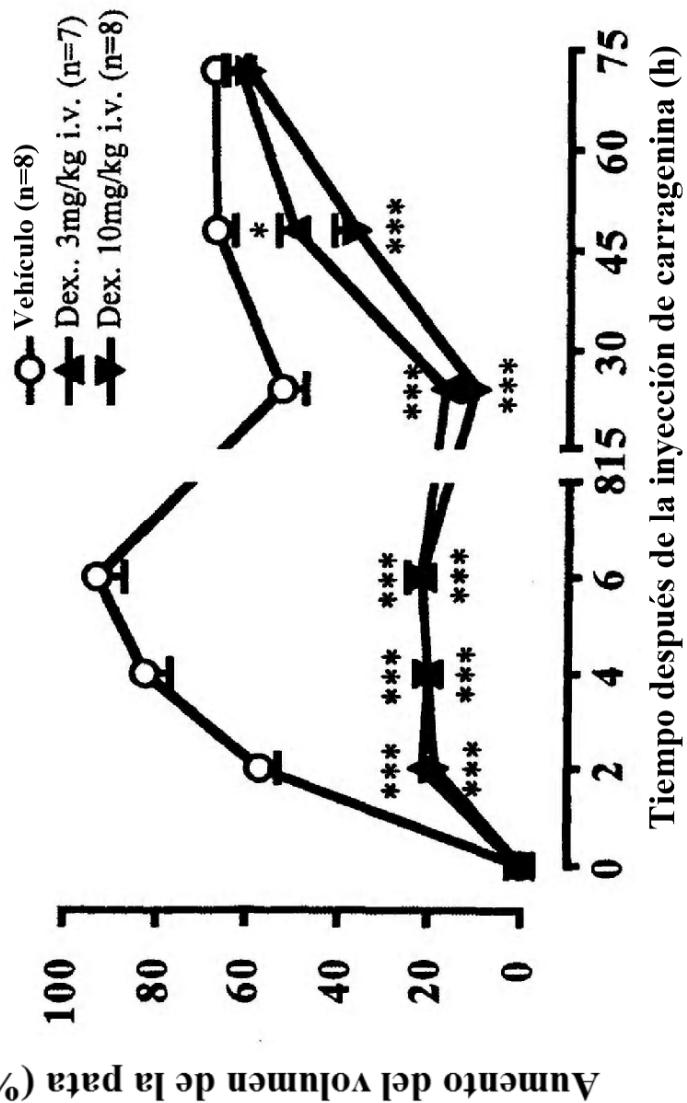
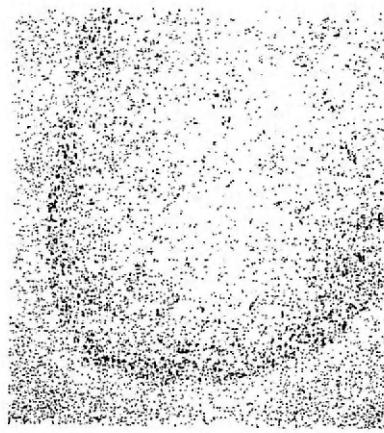


FIG. 53 Expresión de galectina-9 en sinovio con AR

Sinovio con OA



Sinovio con AR

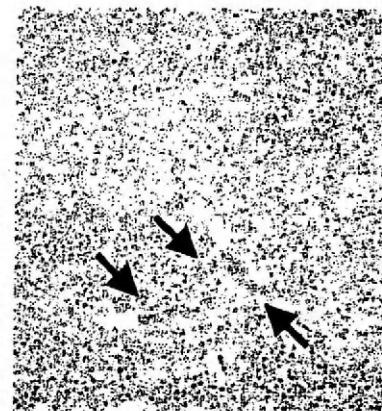
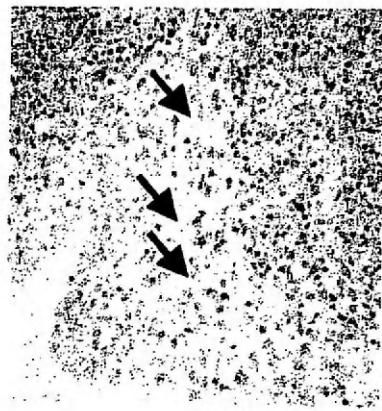
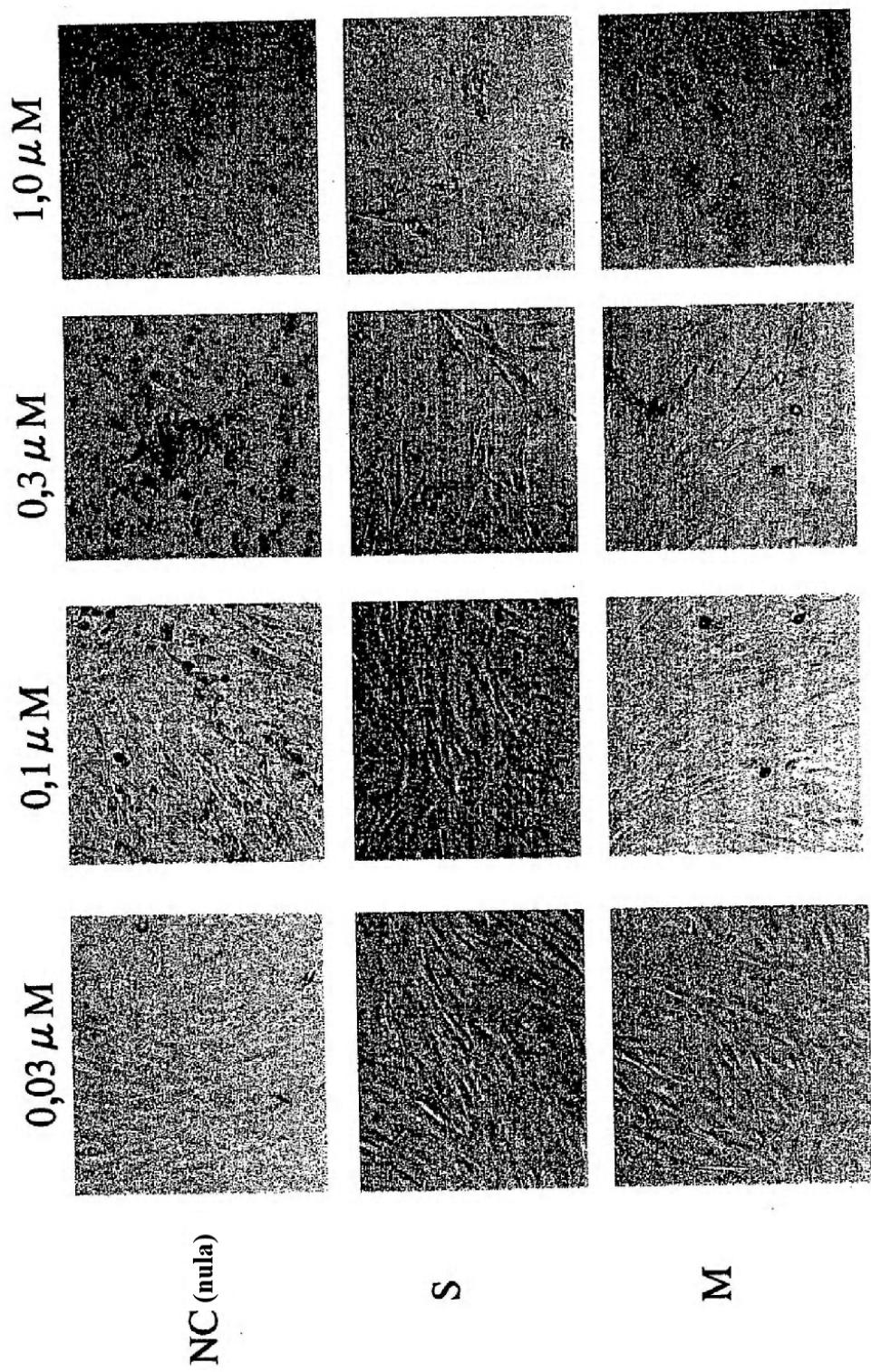


FIG. 54 Inducción de células sinovial apoptótica



Inducción de células sinoviales apoptóticas

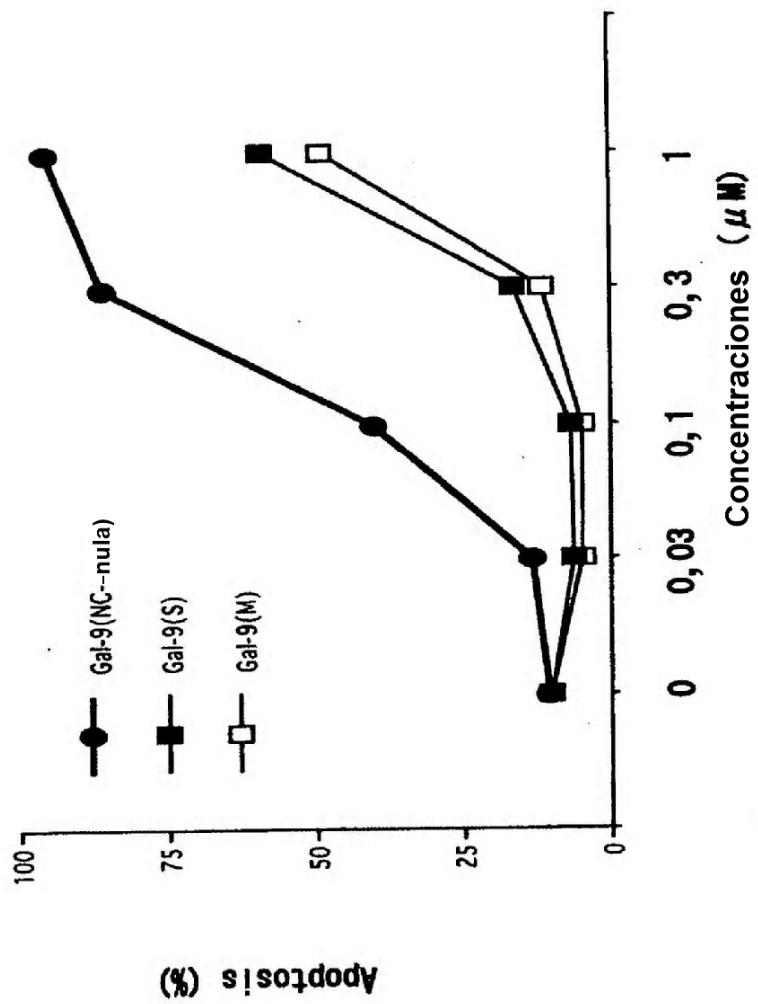


FIG. 55

Inducción mediada por galectina de células sinoviales apoptóticas

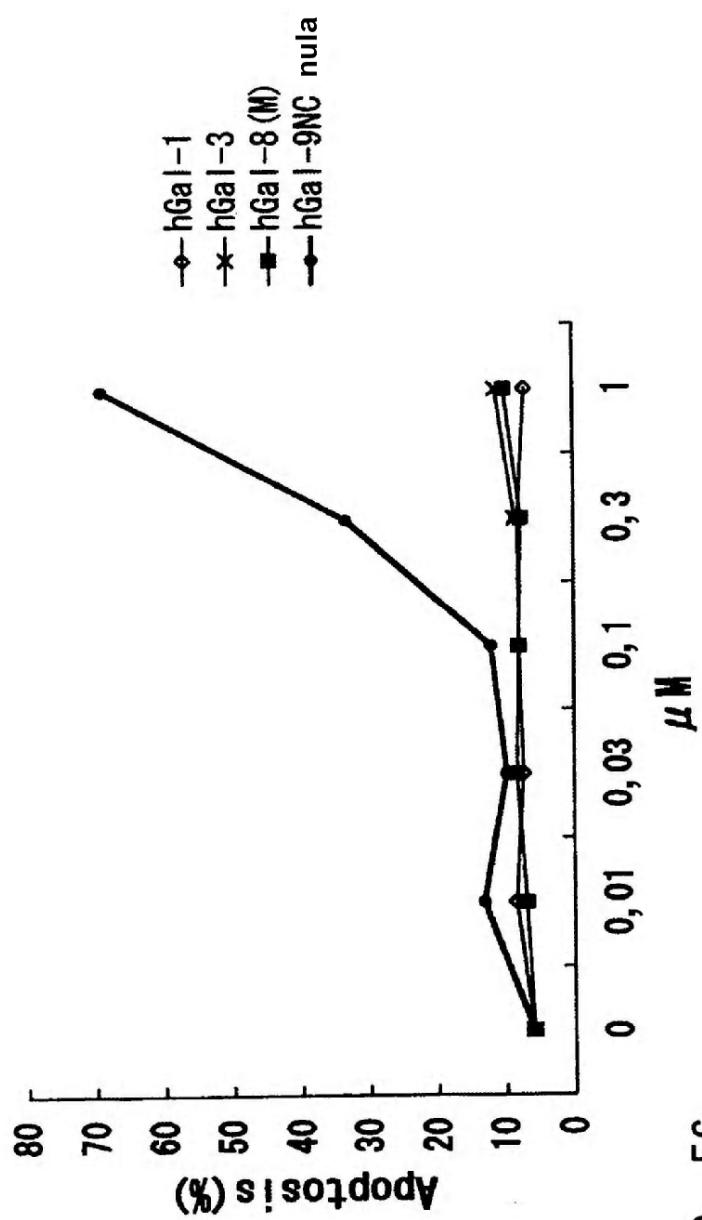


FIG. 56

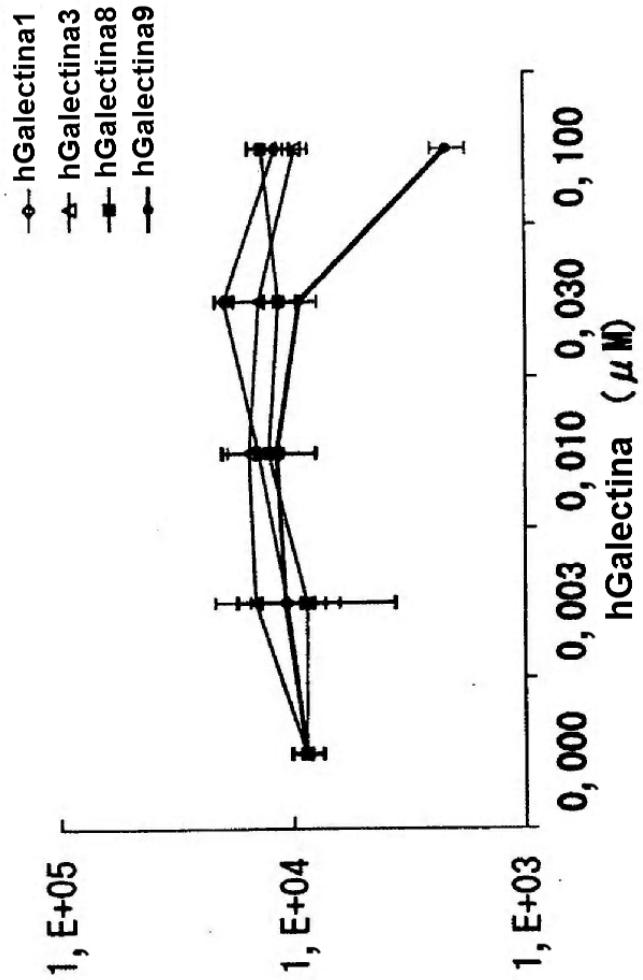
Eficacia inhibidora mediada por galectina del crecimiento de células sinoviales

FIG. 57

FIG. 58

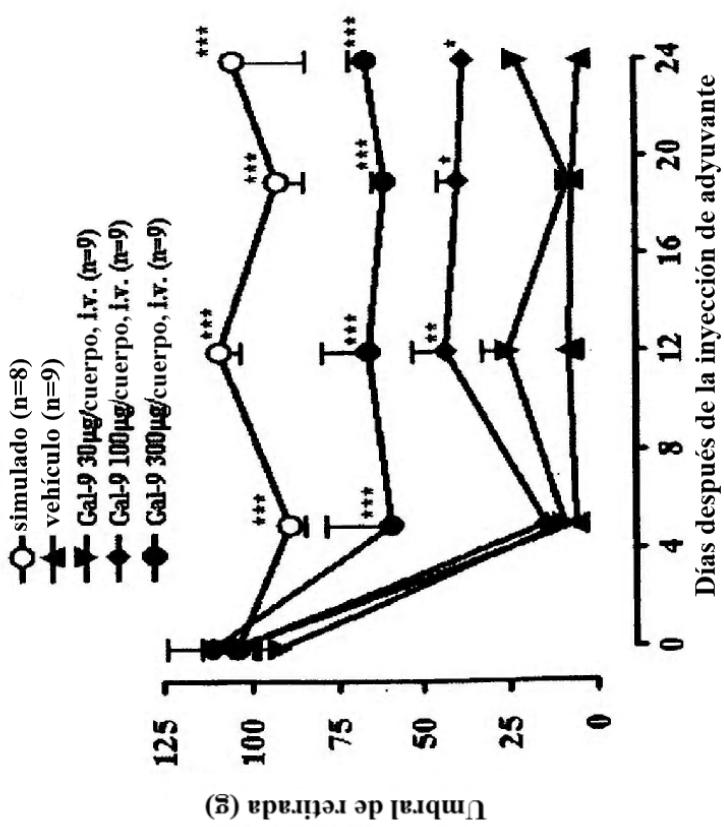
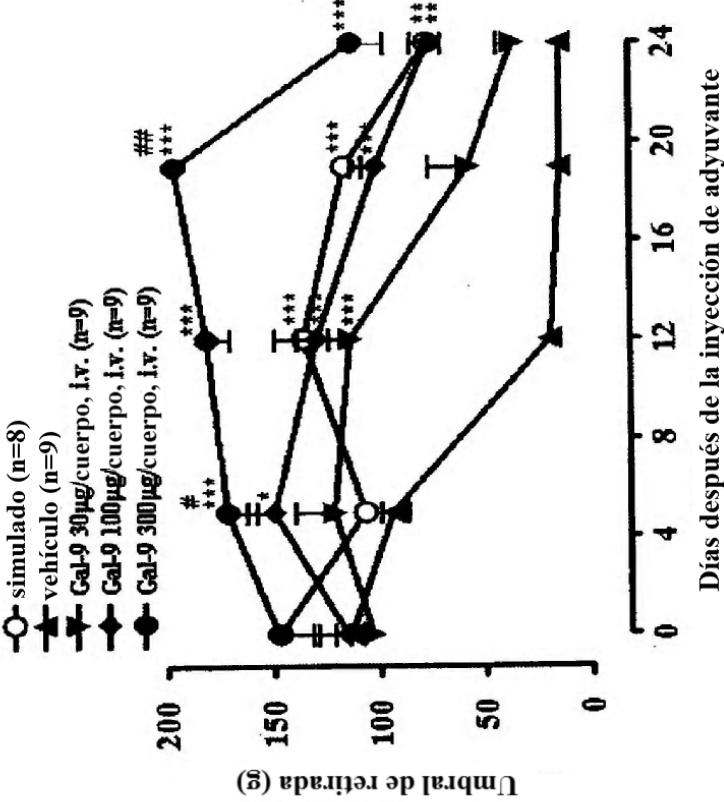
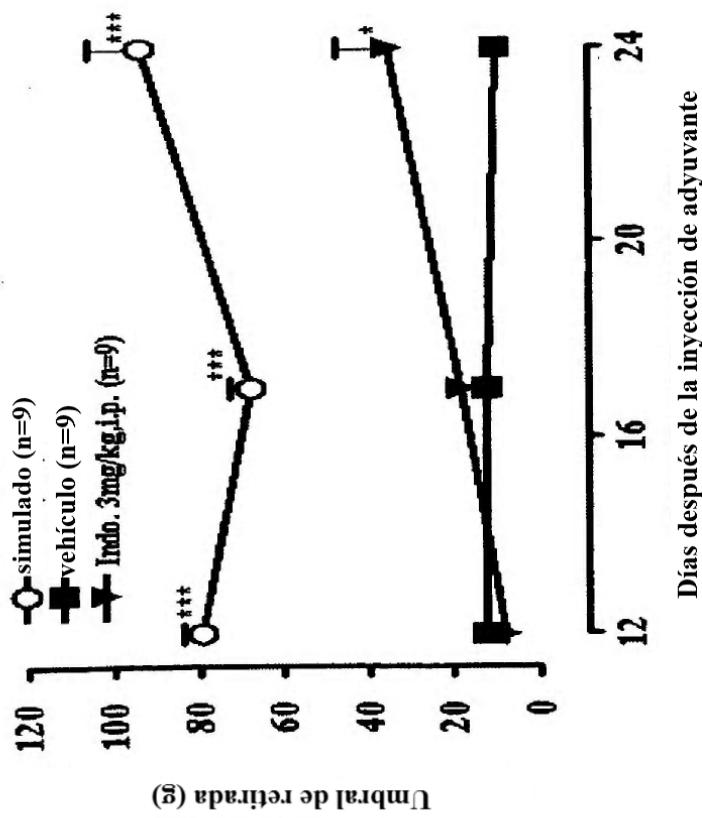
Pata con adyuvante inyectado (derecha)Pata sin adyuvante inyectado (izquierda)

FIG. 59

Pata con adyuvante inyectado (derecha)



Pata sin adyuvante inyectado (izquierda)

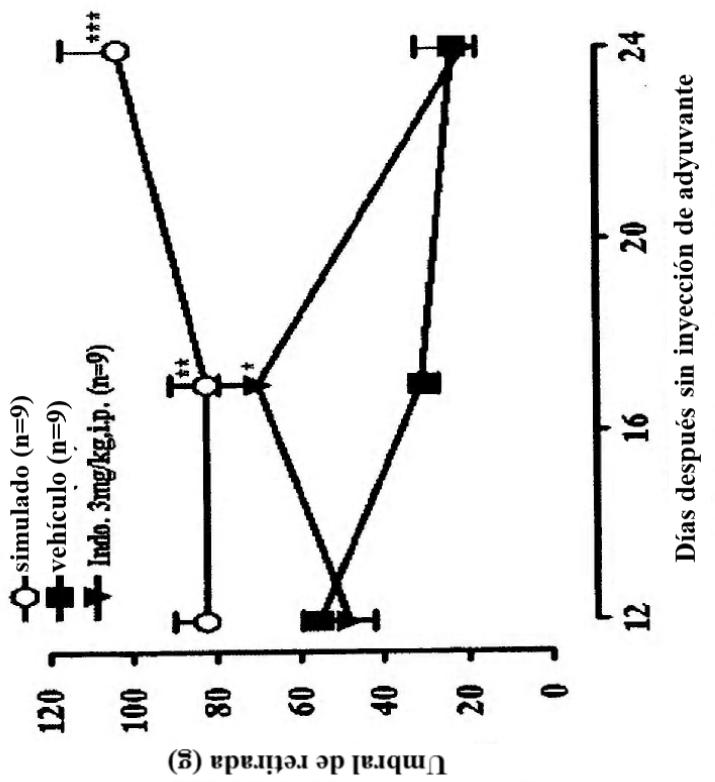


FIG. 60

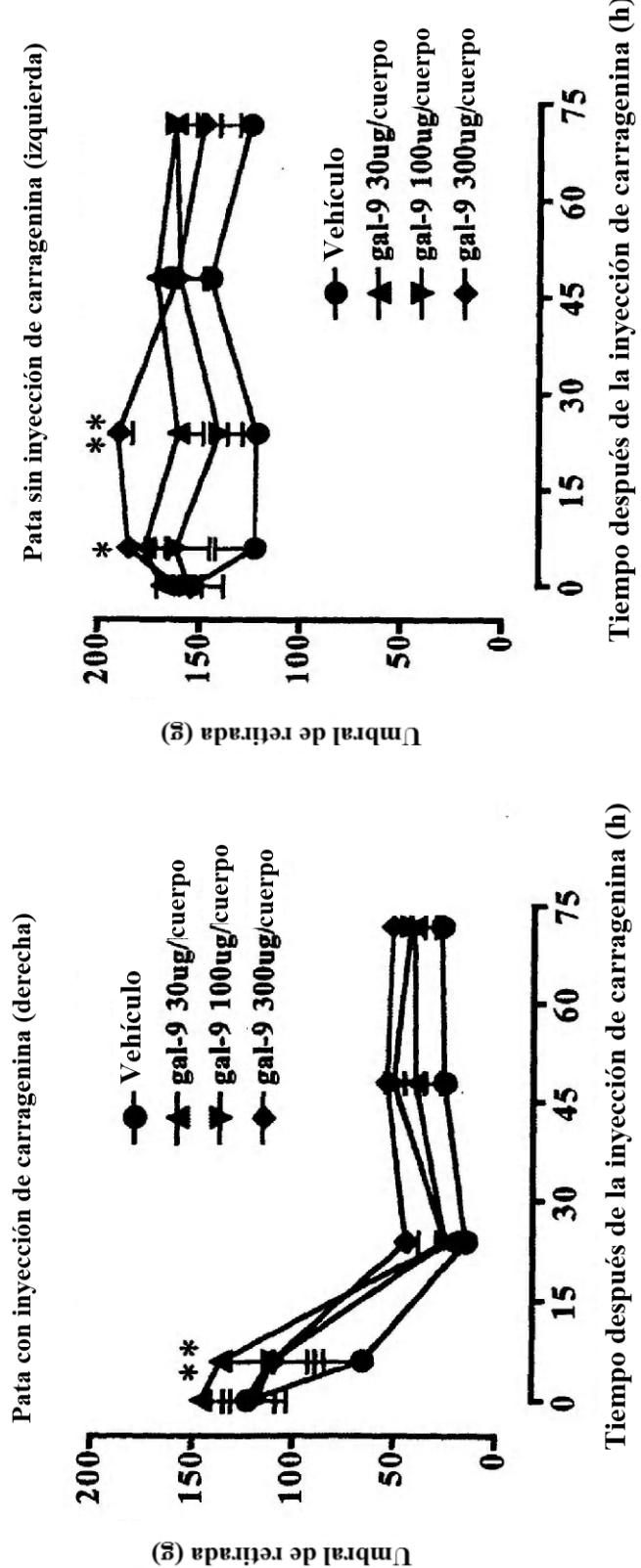


FIG. 61

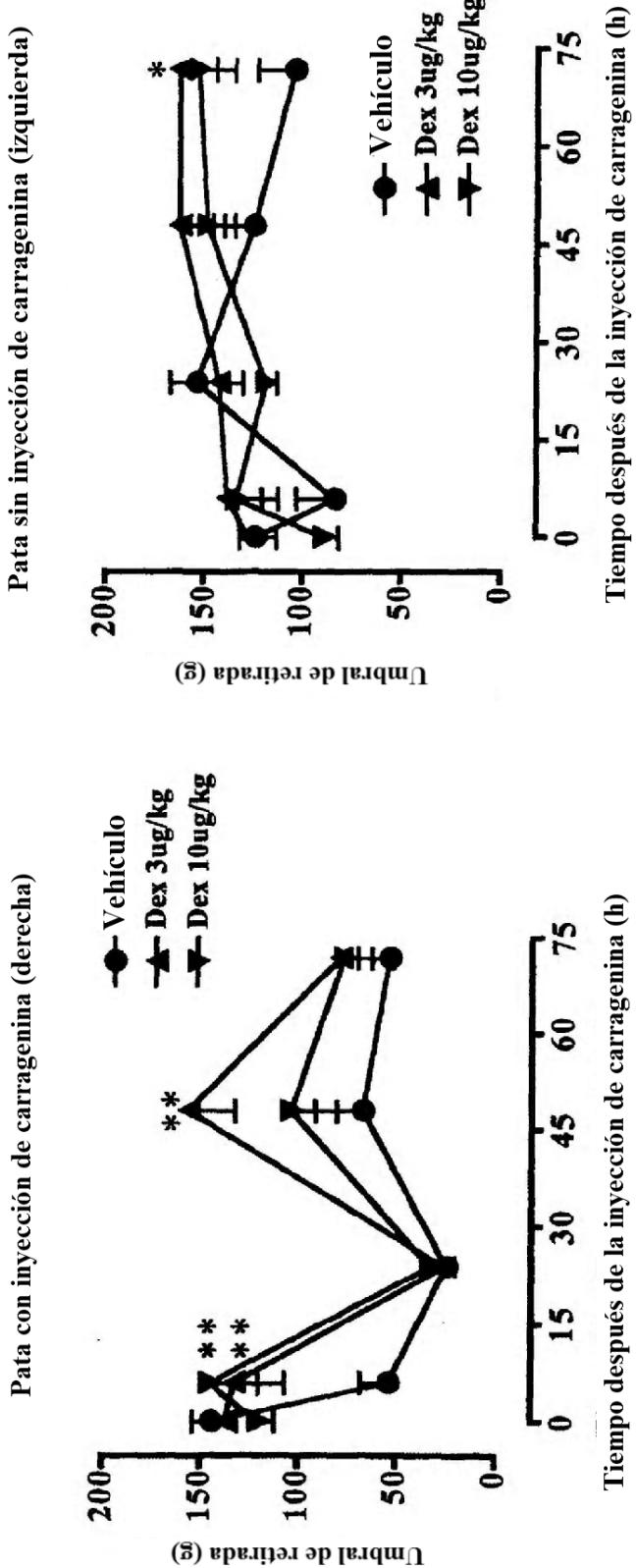


FIG. 62

Estabilidad de galectina 9 en fluido sinovial

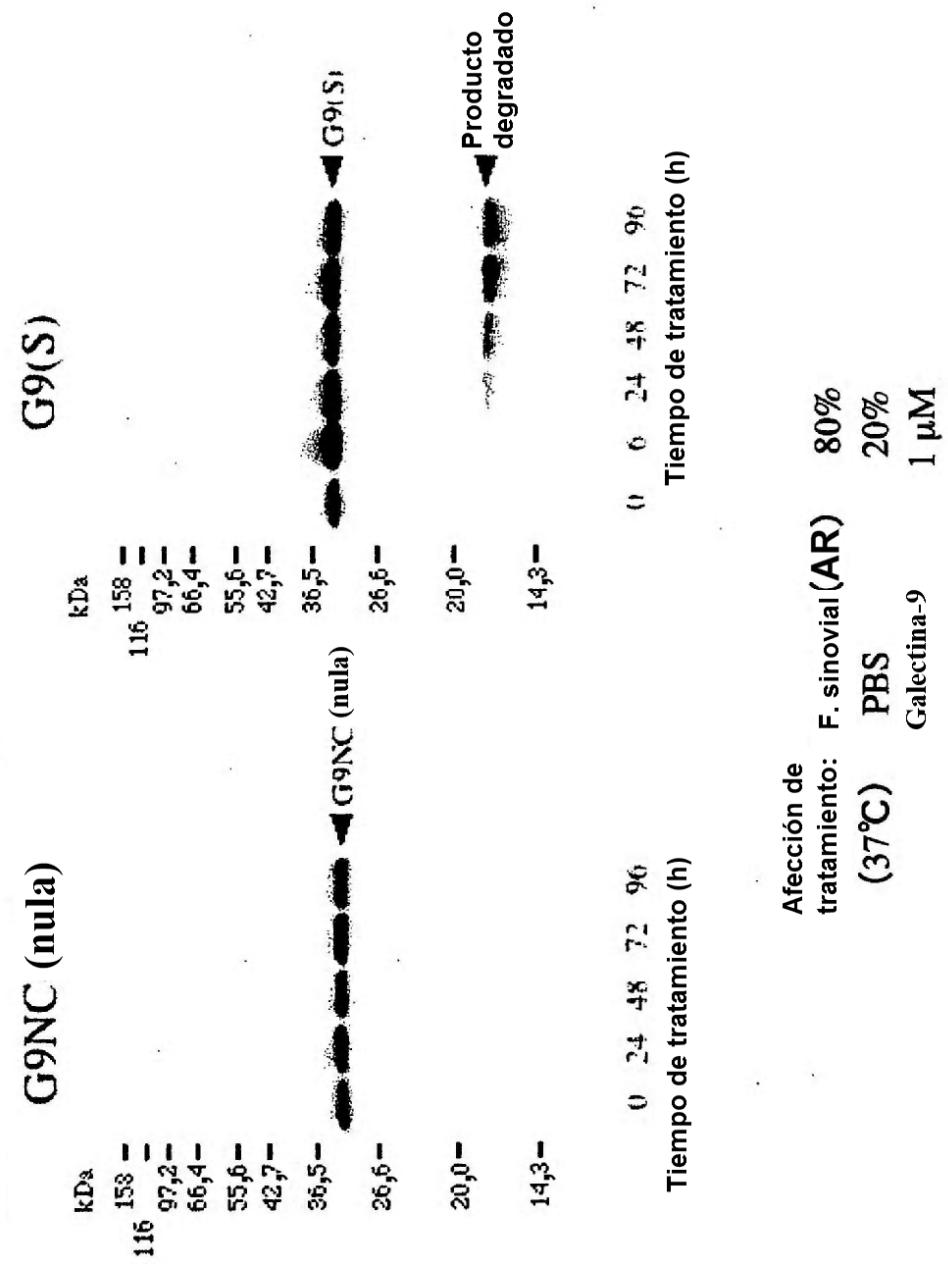


FIG. 63

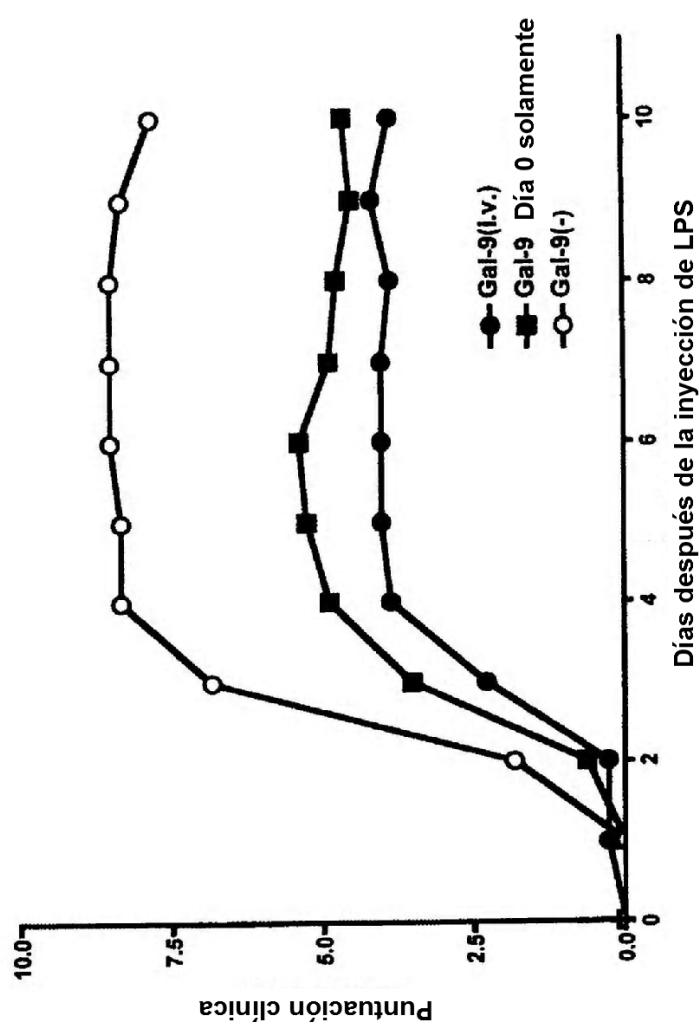


FIG. 64

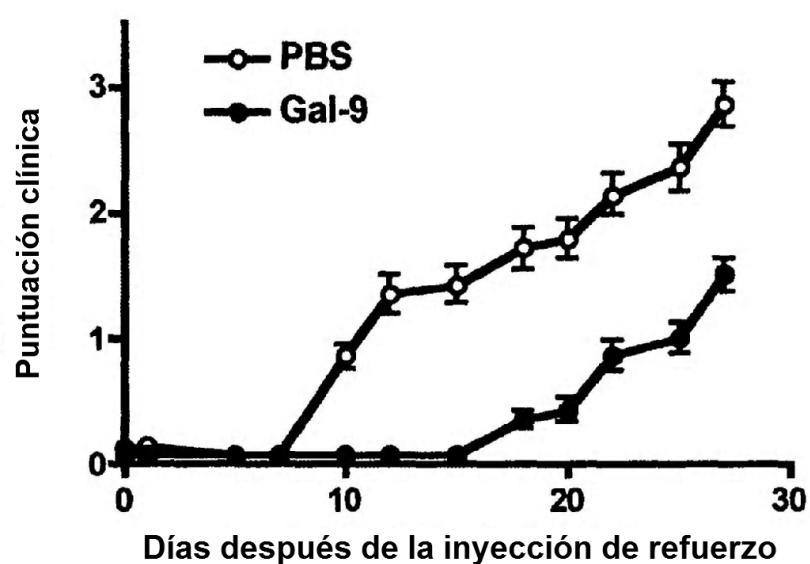


FIG. 65

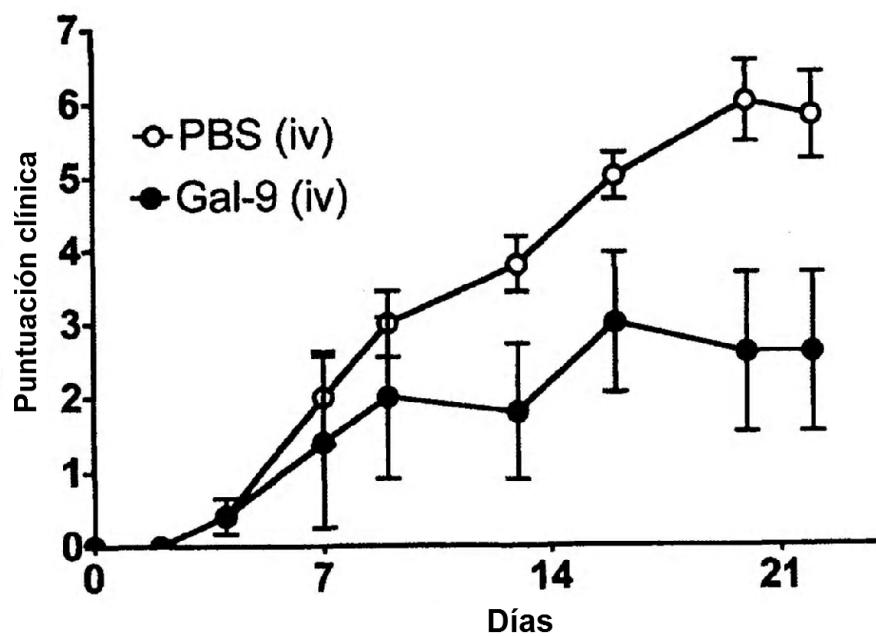


FIG. 66

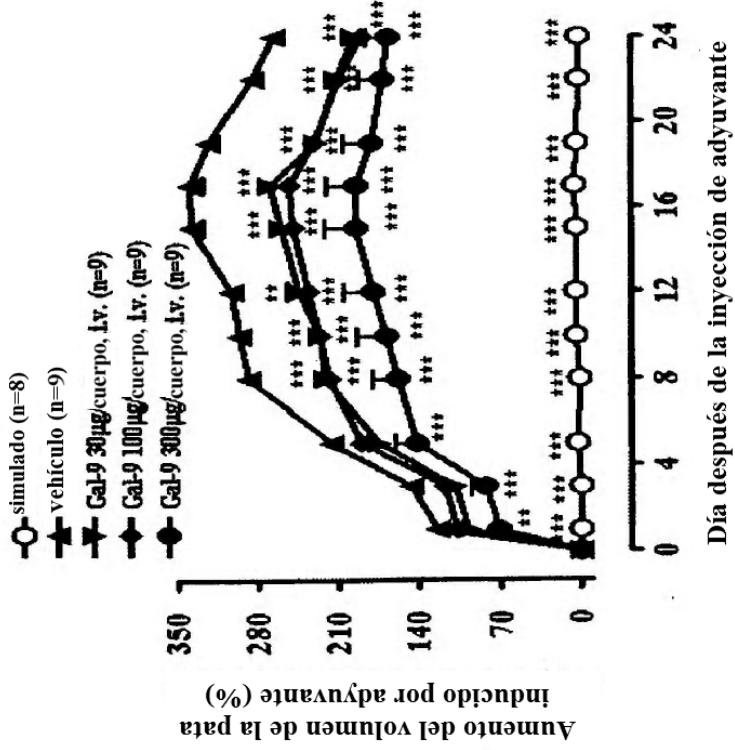
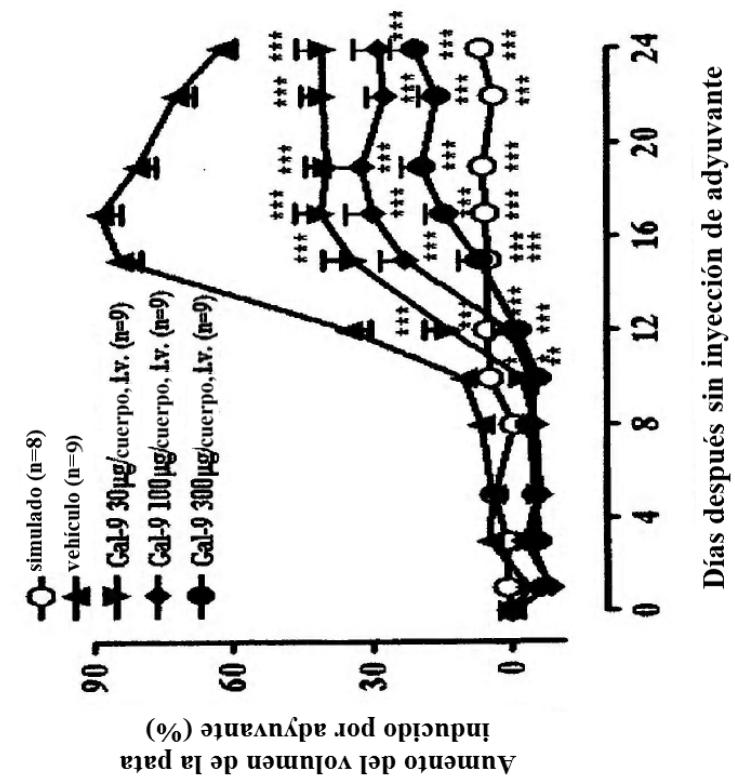
Pata con adyuvante inyectado (derecha)Pata sin adyuvante inyectado (izquierda)

FIG. 67

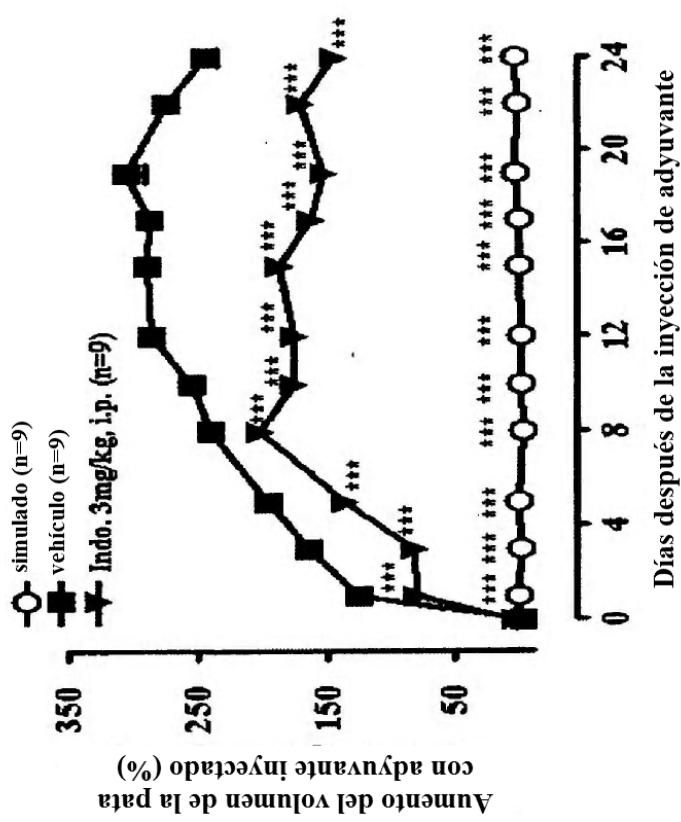
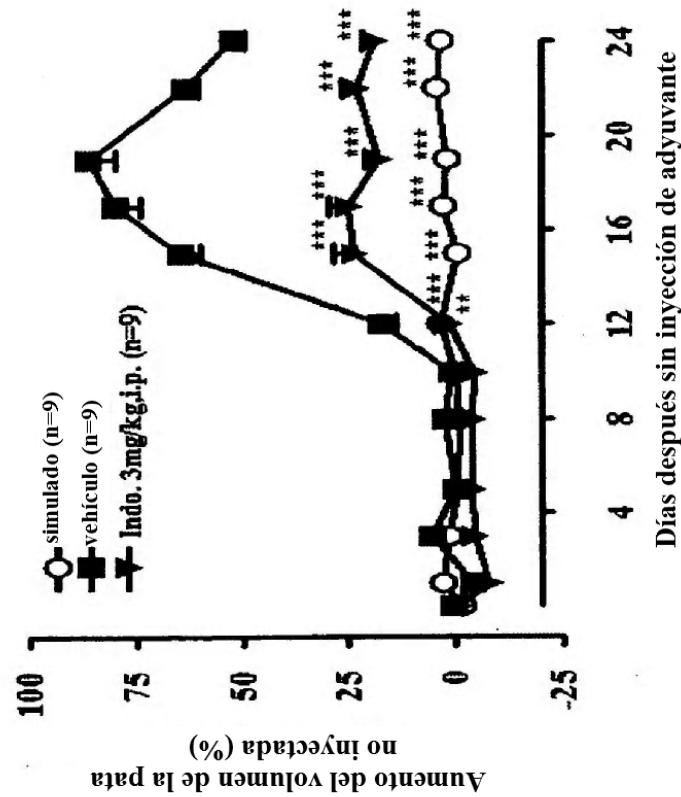
Pata con adyuvante inyectado (derecha)Pata sin adyuvante inyectado (izquierda)

FIG. 68

