

(11) Número de Publicação: **PT 1481990 E**

(51) Classificação Internacional:  
**C07K 14/705** (2006.01) **C12N 15/12** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01) **C12Q 1/68** (2006.01)  
**G01N 33/577** (2006.01)

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

(22) Data de pedido: <b>1998.11.20</b>	(73) Titular(es): <b>GENENTECH, INC.</b> <b>1 DNA WAY SOUTH SAN FRANCISCO, CA</b> <b>94080-4990</b> <b>US</b>
(30) Prioridade(s): <b>1997.11.21 US 66364 P</b> <b>1998.03.20 US 78936 P</b> <b>1998.09.17 WO</b> <b>PCT/US98/19437</b>	(72) Inventor(es): <b>SHERMAN FONG</b> <b>US</b> <b>AUSTIN L. GURNEY</b> <b>US</b> <b>WILLIAM I. WOOD</b> <b>US</b> <b>DANIEL TUMAS</b> <b>US</b> <b>AUDREY GODDARD</b> <b>US</b>
(43) Data de publicação do pedido: <b>2004.12.01</b>	(74) Mandatário: <b>ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA</b> <b>R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA</b> <b>PT</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2007.06.06</b> <b>081/2007</b>	

(54) Epígrafe: **ANTIGÉNIOS RELACIONADOS COM A-33 E SUAS UTILIZAÇÕES FARMACOLÓGICAS**

(57) Resumo:  
**ANTIGÉNIOS RELACIONADOS COM A-33 E SUAS UTILIZAÇÕES FARMACOLÓGICAS**

## RESUMO

"Antigénios relacionados com A-33 e suas utilizações  
farmacológicas"

O presente invento refere-se a composições e a métodos de tratamento e diagnóstico de desordens caracterizadas pela presença de antígenos associados a doenças inflamatórias e/ou a cancro, e a sequências de nucleótidos, incluindo marcadores de sequência expressa (EST, "*expressed sequence tags*"), sondas oligonucleotídicas, polipéptidos, vectores e células hospedeiras que expressam estes antígenos PRO301, PRO362 ou PRO245.

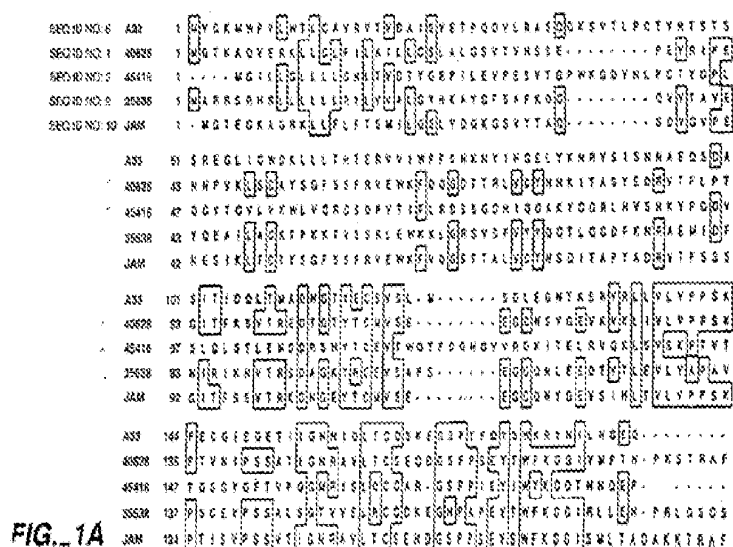


FIG. 1A

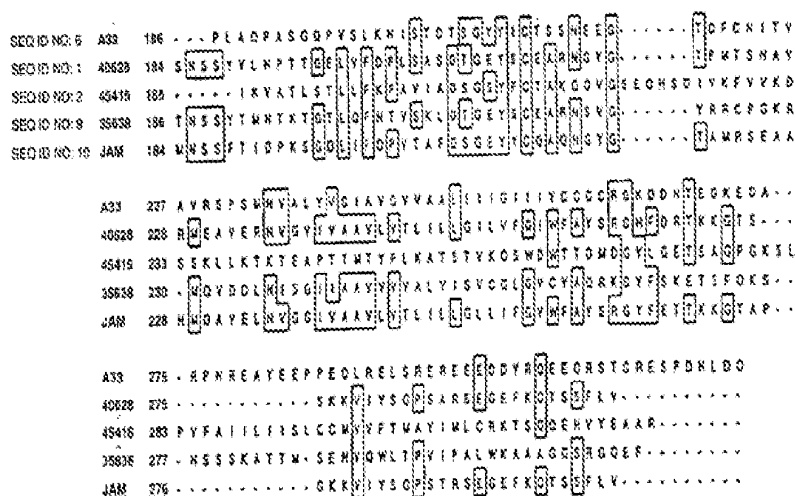


FIG. 1B

## DESCRIÇÃO

### **"Antigénios relacionados com A-33 e suas utilizações farmacológicas"**

#### **CAMPO DO INVENTO**

O presente invento refere-se em geral à identificação, isolamento e produção recombinante de novos ADN e a novos polipéptidos cuja presença está associada a doenças inflamatórias (antigénios associados a inflamação) e/ou ao cancro, e a composições e métodos para diagnóstico e tratamento de condições caracterizadas por estes antigénios.

#### **ANTECEDENTES DO INVENTO**

A resposta inflamatória é complexa e é mediada por uma variedade de moléculas de sinalização produzidas localmente por mastócitos, terminais nervosos, plaquetas, leucócitos e activação de complemento. Algumas destas moléculas de sinalização fazem com que o revestimento de células endoteliais se torne mais poroso e/ou mesmo que estas expressem selectinas que actuam como moléculas de superfície celular que reconhecem e atraem leucócitos através de reconhecimento específico de hidratos de carbono. A ligação de leucócitos mais forte é mediada por integrinas, que medeiam o movimento de leucócitos através do endotélio. Moléculas de sinalização adicionais actuam como atractores químicos, fazendo com que os leucócitos ligados se movimentem muito lentamente no sentido da fonte do atrator. Outras moléculas de sinalização, produzidas no decurso de uma resposta inflamatória, escapam-se para o sangue e estimulam a medula óssea a produzir mais leucócitos e a libertá-los para a corrente sanguínea.

A inflamação é tipicamente iniciada por um antigénio, que pode ser virtualmente qualquer molécula capaz de iniciar uma resposta imunitária. Sob condições fisiológicas normais são moléculas estranhas, mas moléculas geradas pelo próprio organismo podem servir como catalisador, como se sabe que ocorre em vários estados de doença.

A proliferação de células T numa cultura linfocitária mista ou numa reacção linfocitária mista (MLR) é uma indicação estabelecida da capacidade de um composto para estimular o

sistema imunitário. Numa resposta inflamatória, os leucócitos que respondem podem ser neutrófilos, eosinófilos, monócitos ou linfócitos. O exame histológico dos tecidos afectados proporciona evidências de uma resposta imunitária estimulante ou inibidora. Ver *Current Protocols in Immunology*, ed. John E. Coligan, 1994, John Wiley and Sons. Inc.

Doença inflamatória do intestino (DII) é um termo utilizado para descrever colectivamente desordens intestinais incluindo colite ulcerosa (CU) e a doença de Crohn (DC), que são ambas classificadas como desordens distintas, mas que partilham aspectos particulares e que provavelmente partilham a patologia. A semelhança dos critérios de diagnóstico pode tornar difícil de determinar com exactidão qual das duas desordens está presente num paciente; no entanto, o tipo e a localização da lesão são tipicamente diferentes em cada uma. As lesões de CU são caracteristicamente uma úlcera superficial da mucosa e surgem no cólon, proximal ao recto. As lesões de DC são caracteristicamente fissuras lineares extensas, e podem surgir em qualquer local no intestino, ocasionalmente envolvendo o estômago, esófago e duodeno.

Os tratamentos convencionais para a DII envolvem usualmente a administração de agentes anti-inflamatórios ou imunossuppressores, tais como sulfassalazina, corticosteróides. 6-mercaptopurina/azatioprina ou ciclosporina, que proporcionam apenas um alívio parcial ao paciente afectado. Contudo, quando as terapias anti-inflamatória/imunossupressora falham, as colectomias são a última linha de defesa. A cirurgia é requerida para cerca de 30% dos pacientes de DC durante o primeiro ano após diagnóstico, a probabilidade do procedimento operatório aumentando depois cerca de 5% anualmente. Infelizmente, a DC tem também uma elevada taxa de recorrência, uma vez que cerca de 5% dos pacientes requerem cirurgia subsequente após o ano inicial. Os pacientes com CU têm adicionalmente um risco substancialmente acrescido de desenvolverem cancro colorrectal. Presumivelmente, isto é devido aos ciclos recorrentes de lesão no epitélio, seguida de recrescimento, com aumentos contínuos do risco de transformação neoplásica.

Um membro recentemente revelado da superfamília de imunoglobulinas conhecido como Molécula de Adesão de Junção (JAM, do inglês "Junctional Adhesion Molecule") foi recentemente identificado como estando concentrado

selectivamente nas junções intercelulares de células endoteliais e epiteliais de diferentes origens. Manin-Padura, I. et al., *J. Cell Biol.* 142(1): 117-27 (1998). A JAM é uma proteína de membrana integral do tipo I com duas voltas de dissulfureto intracadeia extracelulares do tipo V. A JAM comporta uma homologia substancial com o antigénio A33 (Fig. 1 ou Fig. 18). Constatou-se que um anticorpo monoclonal dirigido contra a JAM inibe a transmigração espontânea e induzida por quimioquina de monócitos através de uma monocamada de células endoteliais *in vitro*. Martin-Padura, *supra*.

Constatou-se recentemente que a expressão de JAM está aumentada no cólon de ratinhos CRF2-4-/- com colite. Os ratinhos CRF2-4-/- (ratinhos "knockout" relativamente à subunidade IL-10R) desenvolvem uma colite espontânea mediada por linfócitos, monócitos e neutrófilos. Vários dos animais desenvolveram também adenocarcinoma do cólon. Como resultado, é previsível que os compostos do invento sejam provavelmente expressos com níveis elevados ou estejam de outro modo associados a doenças humanas tais como doença inflamatória do intestino, outras doenças inflamatórias intestinais, bem como carcinoma colorrectal.

Os compostos do invento comportam também uma homologia significativa com o antigénio A33, um marcador conhecido associado ao cancro colorrectal. O antigénio A33 é expresso em mais de 90% dos cancros do cólon primários ou metastáticos, bem como no epitélio normal do cólon. Em carcinomas com origem na mucosa do cólon, o antigénio A33 é expresso homogeneamente em mais de 95% de todos os casos. O antigénio A33, porém, não tem sido detectado numa vasta gama de outros tecidos normais, *i.e.*, a sua expressão parece ser específica do órgão. Deste modo, o antigénio A33 parece desempenhar um papel importante na indução do cancro colorrectal.

Uma vez que o cancro do cólon é uma doença comum, o diagnóstico e o tratamento precoces são um objectivo médico importante. O diagnóstico e tratamento do cancro do cólon podem ser implementados utilizando anticorpos monoclonais (mAb) específicos, possuindo para o efeito marcadores fluorescentes, magnéticos nucleares ou radioactivos. Podem-se utilizar mAb marcados com genes radioactivos, toxinas e/ou fármacos, para tratamento *in situ* com uma descrição mínima para o paciente. Podem-se também utilizar mAb para diagnóstico durante o diagnóstico e tratamento de cancros do cólon. Por

exemplo, quando os níveis séricos do antigénio A33 estão elevados num paciente, uma queda dos níveis após cirurgia indicará que a ressecção do tumor foi bem sucedida. Por outro lado, um aumento subsequente nos níveis de antigénio A33 no soro após cirurgia indicará que se podem ter formado metástases do tumor original ou que podem ter aparecido novos tumores primários.

Estes anticorpos monoclonais podem ser utilizados em alternativa ou conjuntamente com cirurgia e/ou outras quimioterapias. Por exemplo, estudos pré-clínicos de análise e localização em pacientes infectados com carcinoma colorrectal com um mAb em relação a A33 são descritos em Welt et al., *J. Clin. Oncol.* 8: 1894-1906 (1990) e Welt et al., *J. Clin. Oncol.* 12: 1561-1571 (1994), enquanto que a Patente dos E.U.A. n.º 4 579 827 e o Pedido de Patente n.º de série US 424 991 (EP 199 141) são dirigidos à administração terapêutica de anticorpos monoclonais, referindo-se esta última à aplicação de mAb anti-A33.

Os WO98/40483 & WO98/42739, publicados na terceira data de prioridade do presente pedido de patente, ou posteriormente, revelam sequências similares às do PRO245.

### **SUMÁRIO DO INVENTO**

O presente invento refere-se adicionalmente a composições e métodos para o diagnóstico e tratamento de doenças inflamatórias em mamíferos, incluindo seres humanos. O presente invento é baseado na identificação de proteínas (incluindo anticorpos agonistas e antagonistas) que estimulam ou inibem a resposta imunitária em mamíferos. As doenças inflamatórias podem ser tratadas por supressão da resposta inflamatória. Moléculas que intensificam uma resposta inflamatória estimulam ou potenciam a resposta imunitária a um antigénio. Moléculas que estimulam uma resposta inflamatória podem ser inibidas quando a supressão da resposta inflamatória é benéfica. Moléculas que estimulam a resposta inflamatória podem ser utilizadas terapeuticamente quando a melhoria da resposta inflamatória é benéfica. Estas moléculas estimulantes podem também ser inibidas quando a supressão da resposta inflamatória é útil. Os anticorpos neutralizantes são exemplos de moléculas que inibem moléculas possuindo actividade imunoestimulante e que serão benéficos no tratamento de doenças inflamatórias. Moléculas que inibem a resposta

inflamatória podem também ser utilizadas (proteínas, directamente ou através da utilização de agonistas de anticorpos) para inibir a resposta inflamatória e assim melhorar doenças inflamatórias.

Por conseguinte, as proteínas do invento são úteis para diagnóstico e/ou tratamento (incluindo prevenção) de doenças imuno-relacionadas. Anticorpos que se ligam a proteínas estimulantes são úteis para suprimir a resposta inflamatória. Anticorpos que se ligam a proteínas inibidoras são úteis para estimular a resposta inflamatória e o sistema imunitário. As proteínas e anticorpos do invento são também úteis para preparar remédios e medicamentos para o tratamento de doenças inflamatórias e imuno-relacionadas.

Conforme definido nas reivindicações, o invento refere-se a utilizações médicas do polipéptido PRO245, e a antagonistas de polipéptido PRO245 que inibem uma ou mais das funções ou actividades dos polipéptidos PRO301, PRO362 ou PRO245, para utilização num método de tratamento.

O antagonista de PRO245 pode ser utilizado no tratamento de uma doença inflamatória, por administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz a um paciente que o necessite para o tratamento de uma doença seleccionada entre doença inflamatória do intestino, lúpus eritematoso sistémico, artrite reumatóide, artrite crónica juvenil, espondiloartropatias, esclerose sistémica (esclerodermia), miopatias inflamatórias idiopáticas (dermatomiosite, polimiosite), síndrome de Sjögren, vasculite sistémica, sarcoidose, anemia hemolítica auto-imune (pancitopenia imune, hemoglobinúria paroxística nocturna), trombocitopenia auto-imune (púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia imunomediada), tiroidite (doença de Grave, tiroidite de Hashimoto, tiroidite linfocítica juvenil, tiroidite atrófica), diabetes *mellitus*, doença renal imunomediada (glomerulonefrite, nefrite tubulo-intersticial), doenças desmielinizantes dos sistemas nervosos central e periférico tais como esclerose múltipla, polineuropatia idiopática, doenças hepatobiliares tais como hepatite infecciosa (hepatites A, B, C, D, E e outros vírus não hepatotrópicos), hepatite activa crónica auto-imune, cirrose biliar primária, hepatite granulomatosa, e colangite esclerosante, doenças inflamatórias e fibróticas do pulmão (e.g., fibrose cística, pneumonias eosinófilas, fibrose pulmonar idiopática e

pneumonite de hipersensibilidade), enteropatia sensível ao glúten, doença de Whipple, doenças de pele auto-imunes ou imunomediadas incluindo doenças bolhosas de pele, eritema multiforme e dermatite de contacto, psoríase, doenças alérgicas do pulmão tais como pneumonias eosinófilas, fibrose pulmonar idiopática e pneumonite de hipersensibilidade, doenças associadas a transplantação incluindo rejeição de enxertos e doença de enxerto-versus-hospedeiro.

### **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

A Figura 1 mostra uma comparação entre os polipéptidos codificados e o antígeno A33 (SEQ ID NO:6), DNA40628 (SEQ ID NO:1), DNA45416 (SEQ ID NO:2), DNA35638 (SEQ ID NO:9) e JAM (SEQ ID NO:10). O DNA35638 é aqui revelado, o DNA40628 e o DNA45416 são revelados em WO99/27098, a partir do qual este pedido de patente foi dividido.

A Figura 2 mostra a sequência de nucleótidos (SEQ ID NO:8) de um ADNc de PRO245 de sequência nativa, onde a sequência de nucleótidos é designada por "UNQ219" e/ou "DNA35638".

A Figura 3 mostra a sequência de aminoácidos derivada de um polipéptido PRO245 de sequência nativa (SEQ ID NO:9) codificado pela sequência de nucleótidos da Figura 2 (DNA35638, SEQ ID NO:8).

A Figura 4 mostra uma identidade de 24,3% entre a sequência de aminoácidos codificada por DNA35638 (SEQ ID NO:9) e o antígeno A33 (SEQ ID NO:6).

A Figura 5 mostra uma identidade de 34,2% entre a sequência de aminoácidos codificada por DNA35638 (SEQ ID NO:29) e a JAM (SEQ ID NO:10).

A Figura 6 mostra uma identidade de 26% entre a sequência de aminoácidos codificada de antígeno A33 (SEQ ID NO:6) e JAM (SEQ ID NO:10).

A Figura 7 mostra os resultados do ensaio de expressão de ARNm Taqman descrito no Exemplo 5.



## **DESCRIÇÃO DETALHADA DAS CONCRETIZAÇÕES PREFERIDAS**

### **1. Definições**

Os termos "PRO245" ou "polipéptido PRO245" e "antigénio associado a cancro", quando aqui utilizados, abrangem PRO245 de sequência nativa e suas variantes (que são adicionalmente aqui definidas). O PRO245 pode ser isolado a partir de uma variedade de fontes, tal como a partir de tipos de tecidos humanos ou de outra fonte, ou preparado por métodos recombinantes ou de síntese.

O termo "doença inflamatória" significa uma doença na qual um componente do sistema imunitário de um mamífero causa, medeia ou de outro modo contribui para uma resposta inflamatória contribuindo para a morbilidade no mamífero. São também incluídas doenças nas quais a estimulação ou intervenção da resposta inflamatória tem um efeito de melhoria na progressão da doença. Estão incluídas neste termo as doenças inflamatórias imunomediadas.

O termo doença "mediada por células T" significa uma doença na qual as células T medeiam directa ou indirectamente, ou de outro modo contribuem para, a morbilidade num mamífero. A doença mediada por células T pode estar associada com efeitos mediados por células, efeitos mediados por linfoquinas, etc. e mesmo efeitos associados a células B se as células B forem estimuladas, por exemplo, pelas linfoquinas segregadas por células T.

Exemplos de doenças inflamatórias e imuno-relacionadas, algumas das quais mediadas por células T, que podem ser tratadas de acordo com o invento incluem: doença inflamatória do intestino, lúpus eritematoso sistémico, artrite reumatóide, artrite crónica juvenil, espondiloartropatias, esclerose sistémica (esclerodermia), miopatias inflamatórias idiopáticas (dermatomiosite, polimiosite), síndrome de Sjögren, vasculite sistémica, sarcoidose, anemia hemolítica auto-imune (pancitopenia imune, hemoglobínúria paroxística nocturna), trombocitopenia auto-imune (púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia imunomediada), tiroidite (doença de Grave, tiroidite de Hashimoto, tiroidite linfocítica juvenil, tiroidite atrófica), diabetes mellitus, doença renal imunomediada (glomerulonefrite, nefrite tubulo-intersticial), doenças desmielinizantes dos sistemas nervosos central e

periférico tais como esclerose múltipla, polineuropatia idiopática, doenças hepatobiliares tais como hepatite infecciosa (hepatites A, B, C, D, E e outros vírus não hepatotrópicos), hepatite activa crónica auto-imune, cirrose biliar primária, hepatite granulomatosa e colangite esclerosante, doenças inflamatórias e fibróticas do pulmão (e.g., fibrose cística), enteropatia sensível ao glúten, doença de Whipple, doenças de pele auto-imunes ou imunomediadas incluindo doenças bolhosas de pele, eritema multiforme e dermatite de contacto, psoríase, doenças alérgicas do pulmão tais pneumonias eosinófilas, fibrose pulmonar idiopática e pneumonite de hipersensibilidade, doenças associadas a transplantação incluindo rejeição de enxertos e doença de enxerto-versus-hospedeiro.

"Tumor", como aqui utilizado, refere-se ao crescimento e proliferação de todas as células neoplásicas, quer malignas quer benignas, e de todos os tecidos e células pré-cancerosas.

Os termos "cancro" e "canceroso" referem-se a, ou descrevem, a condição fisiológica em mamíferos que é tipicamente caracterizada por crescimento celular desregulado. Exemplos de cancro incluem, mas não estão limitados a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma e leucemia. Exemplos mais particulares destes cancros incluem cancro da mama, cancro da próstata, cancro do cólon, cancro de células escamosas, cancro do pulmão de células pequenas, cancro do pulmão não de células pequenas, cancro gastrintestinal, cancro pancreático, glioblastoma, cancro cervical, cancro do ovário, cancro do fígado, cancro da bexiga, hepatoma, cancro colorrectal, carcinoma endometrial, carcinoma da glândula salivar, cancro do rim, cancro do fígado, cancro da vulva, cancro da tiróide, carcinoma hepático e vários tipos de cancro da cabeça e pescoço.

"Tratamento" é uma intervenção realizada com a intenção de impedir o desenvolvimento ou a alteração da patologia de uma desordem. Deste modo, "tratamento" refere-se tanto ao tratamento terapêutico como a medidas profilácticas ou preventivas. Os necessitados de tratamento incluem aqueles já com a desordem bem como aqueles onde se pretende prevenir a desordem. No tratamento de uma doença imuno-relacionada, um agente terapêutico diminui ou aumenta directamente a magnitude da resposta de um componente da resposta imunitária, ou torna a doença mais susceptível a tratamento por outros agentes

terapêuticos, e.g., antibióticos, antifúngicos, agentes anti-inflamatórios, quimioterapêuticos, etc.

A "patologia" de uma doença imuno-relacionada inclui todos os fenómenos que comprometem o bem-estar do paciente. Isto inclui, sem limitação, crescimento anormal ou não controlável (neutrófilos, eosinófilos, monócitos, linfócitos), produção de anticorpos, produção de auto-anticorpos, produção de complemento, interferência com o funcionamento normal de células vizinhas, libertação de citocinas ou outros produtos de secreção com níveis anormais, supressão ou agravamento de qualquer resposta inflamatória ou imunológica, infiltração de células inflamatórias (neutrófilos, eosinófilos, monócitos, linfócitos) em espaços celulares, etc.

O termo "mamífero" como aqui utilizado refere-se a qualquer mamífero classificado como um mamífero, incluindo seres humanos, animais domésticos e de criação, e animais de jardim zoológico, de desporto ou de estimação tais como cavalos, porcos, gado, cães, gatos e furões, etc. Numa concretização preferida do invento, o mamífero é um ser humano.

Administração "em combinação com" um ou mais agentes terapêuticos adicionais inclui a administração simultânea (concorrente) e consecutiva por qualquer ordem.

O termo "agente citotóxico" como aqui utilizado refere-se a uma substância que inibe ou impede o funcionamento de células e/ou causa a destruição de células. O termo pretende incluir isótopos radioactivos (e.g.  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$  e  $Re^{186}$ ), agentes quimioterapêuticos e toxinas enzimaticamente activas de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, ou seus fragmentos.

Um "agente quimioterapêutico" é um composto útil no tratamento do cancro. Exemplos de agentes quimioterapêuticos incluem adriamicina, doxorubicina, epirubicina, 5-fluorouracilo, arabinósido de citosina ("Ara-C"), ciclofosfamida, tiotepa, bussulfano, citoxina, taxóides, e.g. paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) e docetaxel (Taxotere<sup>®</sup>, Rhône-Poulenc Roher, Antony, França), toxotere, metotrexato, cisplatina, melfalano, vinblastina, bleomicina, etoposido, ifosfamida, mitomicina C, mitoxantrona, vincristina (Loucristine), vinorelbina,

carboplatina, teniposido, daunomicina, carminomicina, aminopterina, dactinomicina, mitomicinas, esperamicinas (ver Patente dos E.U.A. n.º 4 675 187), melfalano e outras mostardas relacionadas com azoto. Incluem-se também nesta definição agentes hormonais que actuam para regular ou inibir a acção hormonal sobre tumores tais como tamoxifeno e onapristona.

Um "agente inibidor de crescimento" quando aqui utilizado refere-se a um composto ou a uma composição que inibem o crescimento de uma célula, especialmente células de cancro, que expressam ou sobre-expressam qualquer dos genes aqui identificados, quer *in vitro* quer *in vivo*. Assim, o agente inibidor de crescimento é um agente que reduz significativamente a percentagem de células que expressam ou sobre-expressam estes genes em fase S. Exemplos de agentes inibidores de crescimento incluem agentes que bloqueiam a progressão do ciclo celular (num outro local que não a fase S), tais como agentes que induzem paragem em fase G1 e paragem em fase M. Bloqueadores clássicos em fase M incluem os alcalóides de vinca (vincristina e vinblastina), taxol, e inibidores de topo II tais como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etoposido e bleomicina. Os agentes que param em fase G1 contribuem também para a paragem em fase S, por exemplo, agentes de alquilação de ADN tais como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatina, metotrexato, 5-fluorouracilo e ara-C. Informação adicional pode ser encontrada em *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo I, intitulado *Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs* por Murakami et al. (W.B. Saunders, Philadelphia, 1995), especialmente na página 13.

O termo "citoquina" é um termo genérico para proteínas libertadas por uma população de células que actuam sobre outras células como mediadores intercelulares. Exemplos destas citoquinas são as linfoquinas, monoquinas e hormonas polipeptídicas tradicionais. Entre as citoquinas incluem-se hormonas de crescimento tais como hormona de crescimento humana, N-metionil-hormona de crescimento humana e hormona de crescimento bovina, hormona paratiroideia, tiroxina, insulina, pró-insulina, relaxina, pró-relaxina, hormonas de glicoproteína tais como hormona estimulante de folículo (FSH), hormona estimulante da tiróide (TSH) e hormona luteinizante (LH), factor de crescimento hepático, factor de crescimento de

fibroblastos, prolactina, lactogénio placentário, factor  $\alpha$  e  $\beta$  de necrose tumoral, substância inibidora Mulleriana, péptido associado a gonadotropina de ratinho, inibina, activina, factor de crescimento endotelial vascular, integrina, trombopoietina (TPO), factores de crescimento de nervos tais como NGF- $\beta$ , factor de crescimento de plaquetas, factores de crescimento transformantes (TGF) tais como TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ , factor de crescimento I e II do tipo insulina, eritropoietina (EPO), factores osteoindutores, interferões tais como interferão  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ; factores estimulantes de colónias (CSF) CSF de macrófagos (M-CSF), CSF de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) e CSF de granulócitos (G-CSF), interleucinas (IL) tais como IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, um factor de necrose tumoral tal como TNF- $\alpha$  ou TNF- $\beta$ , e outros factores polipeptídicos incluindo LIF e ligando *kit* (KL). Como aqui utilizado, o termo citocina inclui proteínas de fontes naturais ou de culturas de células recombinantes e equivalentes biologicamente activos das citocinas de sequência nativa.

"Quantidade terapeuticamente eficaz" é a quantidade de PRO245 activo ou de antagonista que é requerida para conseguir uma inibição ou uma estimulação mensuráveis, conforme o caso, da resposta inflamatória.

Um "PRO245 de sequência nativa" compreende um polipéptido possuindo a mesma sequência de aminoácidos que o PRO245 obtido a partir da natureza. Este PRO245 de sequência nativa pode ser isolado a partir da natureza ou pode ser produzido por meios recombinantes ou sintéticos. O termo "PRO245 de sequência nativa" abrange especificamente formas truncadas ou segregadas de ocorrência natural de PRO245 (e.g., uma sequência de domínio extracelular), formas variantes de ocorrência natural (e.g., formas montadas (*spliced*) alternativamente) e variantes alélicas de ocorrência natural de PRO245.

Numa concretização, o polipéptido PRO245 de sequência nativa é um polipéptido PRO245 de sequência nativa maduro ou de comprimento completo compreendendo os aminoácidos 1 a 312 da Figura 3 (SEQ ID NO:9).

Uma "variante de PRO245" significa um PRO245 activo como definido adiante possuindo pelo menos cerca de 80% identidade de sequência de aminoácidos com PRO245 com a sequência de aminoácidos deduzida apresentada na Fig. 3 (SEQ ID NO:9) para

um polipéptido PRO245 de sequência nativa de comprimento completo, com ou sem a sua sequência de sinal nativa, com ou sem a metionina de iniciação, com ou sem o domínio transmembranar potencial, e com ou sem o domínio intracelular. Estas variantes de PRO245 incluem, por exemplo, polipéptidos PRO245 onde um ou mais resíduos de aminoácido estão adicionados, ou eliminados, no terminal N ou C da sequência de Fig. 3 (SEQ ID NO:9). Preferivelmente, a identidade de sequência de aminoácidos é pelo menos cerca de 85%, mais preferivelmente pelo menos cerca de 90%, e ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 95%.

"Porcentagem (%) de identidade de sequência de aminoácidos", em relação às sequências de PRO245 aqui identificadas, é definida como a percentagem de resíduos de aminoácido numa sequência candidata que são idênticos aos resíduos de aminoácido na sequência de PRO245, respectivamente, após alinhamento das sequências e introdução de espaços vazios, se necessário, para conseguir a percentagem máxima de identidade de sequência, e não considerando quaisquer substituições conservativas como parte da identidade de sequência. Para efeitos de determinar a percentagem de identidade de sequência de aminoácidos, o alinhamento pode ser conseguido de várias formas que estão dentro dos conhecimentos da especialidade, por exemplo, utilizando programas de computador disponíveis ao público tais como os programas BLAST, BLAST-2, ALIGN ou Megalign (DNASTAR). Os peritos na especialidade podem determinar os parâmetros apropriados para medição do alinhamento, incluindo quaisquer algoritmos necessários para conseguir o alinhamento máximo ao longo de todo o comprimento das sequências que estão a ser comparadas.

"Porcentagem (%) de identidade de sequência de ácidos nucleicos", em relação às sequências que codificam PRO245 aqui identificadas (e.g., DNA35638), é definida como a percentagem de nucleótidos numa sequência candidata que são idênticos aos nucleótidos na sequência que codifica PRO245, respectivamente, após alinhamento das sequências e introdução de espaços vazios, se necessário, para conseguir a percentagem máxima de identidade de sequência. Para efeitos de determinar a percentagem de identidade de sequência de ácidos nucleicos, o alinhamento pode ser conseguido de várias formas que estão dentro dos conhecimentos da especialidade, por exemplo, utilizando programas de computador disponíveis ao público tais como os programas BLAST, BLAST-2, ALIGN ou Megalign (DNASTAR).

Os peritos na especialidade podem determinar os parâmetros apropriados para medição do alinhamento, incluindo quaisquer algoritmos necessários para conseguir o alinhamento máximo ao longo de todo o comprimento das sequências que estão a ser comparadas.

"Isolado" quando utilizado para descrever os vários polipéptidos aqui revelados, significa um polipéptido que foi identificado e separado e/ou recuperado de um componente do seu ambiente natural. Componentes contaminantes do seu ambiente natural são materiais que tipicamente interfeririam com utilizações terapêuticas ou de diagnóstico para o polipéptido, e podem incluir enzimas, hormonas e outros solutos proteicos ou não proteicos. Em concretizações preferidas, o polipéptido será purificado (1) até um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos de uma sequência de aminoácidos N-terminais ou internos por utilização de um sequenciador de taça giratória (*spinning cup sequenator*), ou (2) até à homogeneidade por SDS-PAGE sob condições não redutoras ou redutoras utilizando coloração com azul de Coomassie ou, preferivelmente, com prata. Um polipéptido isolado inclui o polipéptido *in situ* dentro de células recombinantes, desde que não esteja presente pelo menos um componente do ambiente natural do PRO245. Habitualmente, porém, um polipéptido isolado será preparado através de pelo menos um passo de purificação.

Uma molécula "isolada" de ácido nucleico que codifica o polipéptido PRO245 é uma molécula de ácido nucleico que foi identificada e separada de pelo menos uma molécula de ácido nucleico contaminante com a qual está habitualmente associada na fonte natural do ácido nucleico que codifica o polipéptido PRO245. Uma molécula isolada de ácido nucleico que codifica polipéptido PRO245 está numa outra forma que não na forma ou configuração que é encontrada na natureza. Deste modo, as moléculas isoladas de ácido nucleico que codificam polipéptido PRO245 distinguem-se da molécula de ácido nucleico DNA40628 na medida em que esta existe em células naturais. Contudo, uma molécula isolada de ácido nucleico que codifica polipéptido PRO245 inclui moléculas de ácido nucleico que codificam polipéptido PRO245 contidas em células que normalmente expressam polipéptido PRO245 codificado onde, por exemplo, a molécula de ácido nucleico está numa localização cromossómica diferente da das células naturais.

O termo "sequências de controlo" refere-se a sequências de ADN necessárias para a expressão de uma sequência de codificação ligadas operativamente num organismo hospedeiro particular. As sequências de controlo que são adequadas para procariotas incluem, por exemplo, um promotor, opcionalmente uma sequência operadora, um local de ligação ao ribossoma. É conhecido que as células eucariotas utilizam promotores, sinais de poliadenilação e potenciadores (*enhancers*).

O ácido nucleico está "ligado operativamente" quando estiver colocado numa relação funcional com outra sequência de ácido nucleico. Por exemplo, o ADN para uma pré-sequência ou comando de secreção está ligado operativamente a ADN para um polipéptido se for expresso como uma pré-proteína que participa na secreção do polipéptido; um promotor ou potenciador está ligado operativamente a uma sequência de codificação se afectar a transcrição da sequência; ou um local de ligação ao ribossoma está ligado operativamente a uma sequência de codificação se estiver posicionado de modo a facilitar a tradução. Geralmente, "ligado operativamente" significa que as sequências de ADN que estão ligadas são contíguas, e, no caso de um comando de secreção, contíguas e em fase de leitura. No entanto, os potenciadores não têm que estar contíguos. A ligação é realizada por ligação em locais de restrição convenientes. Se tais locais não existirem, utilizam-se os adaptadores ou ligantes oligonucleotídicos sintéticos de acordo com a prática convencional.

O termo "anticorpo" é utilizado no sentido mais amplo e cobre especificamente anticorpos monoclonais individuais (incluindo anticorpos agonistas, antagonistas e neutralizantes) e composições de anticorpo anti-PRO245 com especificidade poliepitópica. O termo "anticorpo monoclonal", conforme aqui utilizado, refere-se a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogénea, *i.e.*, os anticorpos individuais que constituem a população são idênticos com excepção de possíveis mutações de ocorrência natural que podem estar presentes em pequenas quantidades.

"Activo" ou "actividade" para os presentes propósitos referem-se a formas de PRO245 que retêm as actividades biológica e/ou imunológica do PRO245 nativo ou de ocorrência natural. Uma actividade preferida é a capacidade para se ligar e afectar, *e.g.*, bloquear ou de outro modo modular, uma



actividade de ligação ao antigénio. A actividade envolve preferivelmente a regulação da actividade de antigénios de cancro e/ou virais associados.

A "rigor" das reacções de hibridação é facilmente determinável por uma pessoa competente na matéria, e é geralmente um cálculo empírico dependente do comprimento da sonda, da temperatura de lavagem e da concentração de sal. Em geral, sondas mais longas requerem temperaturas mais elevadas para uma hibridação adequada, enquanto que sondas mais curtas necessitam de temperaturas mais baixas. A hibridação depende geralmente da capacidade do ADN desnaturado para re-hibridar quando estão presentes cadeias complementares num ambiente abaixo da sua temperatura de fusão. Quanto mais elevado for o grau de homologia desejado entre a sonda e a sequência hibridável, mais elevada a temperatura relativa que pode ser utilizada. Como resultado, seque-se que temperaturas relativas mais elevadas tenderão a tornar as condições de reacção mais rigorosas, enquanto que temperaturas mais baixa o fazem menos. Para detalhes adicionais e explicação do rigor de reacções de hibridação, ver Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

"Condições rigorosas" ou "condições de elevado rigor", como aqui definido, podem ser identificadas como aquelas que: (1) utilizam força iónica baixa e temperatura elevada para lavagem, por exemplo cloreto de sódio 0,015 M/citrato de sódio 0,0015 M/0,1% de dodecilsulfato de sódio a 50°C; (2) utilizam durante a hibridação um agente desnaturante, tal como formamida, por exemplo, 50% (v/v) de formamida com 0,1% de albumina de soro de bovino/0,1% de Ficoll/0,1% de polivinilpirrolidona/tampão de fosfato de sódio 50 mM a pH 6,5 com cloreto de sódio 750 mM, citrato de sódio 75 mM a 42°C; ou (3) utilizam 50% de formamida, SSC 5x (NaCl 0,75 M, citrato de sódio 0,075 M), fosfato de sódio 50 mM (pH 6,8), 0,1% de pirofosfato de sódio, solução de Denhardt 5x, ADN de esperma de salmão tratado por ultra-sons (50 µg/ml), 0,1% de SDS e 10% de sulfato de dextrano a 42°C, com lavagens a 42°C em SSC 0,2x (cloreto de sódio/citrato de sódio) e 50% de formamida a 55°C, seguindo-se uma lavagem de elevado rigor consistindo em SSC 0,1x contendo EDTA a 55°C.

"Condições moderadamente rigorosas" podem ser identificadas como descrito por Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York; Cold Spring Harbor

Press, 1989, e incluem a utilização de solução de lavagem e condições de hibridação (e.g., temperatura, força iónica e % de SDS) menos rigorosas do que as acima descritas. Um exemplo de condições moderadamente rigorosas é a incubação de um dia para o outro a 37°C numa solução compreendendo: 20% de formamida, SSC 5x (NaCl 150 mM, citrato trissódico 15 mM), fosfato de sódio 50 mM (pH 7,6), solução de Denhardt 5x, 10% de sulfato de dextrano e 20 mg/mL de ADN de esperma de salmão desnaturado por cisalhamento, seguida por lavagem dos filtros em SSC 1x a cerca de 37-50°C. O perito na especialidade reconhecerá como ajustar a temperatura, força iónica, etc. conforme necessário para ter em consideração factores tais como o comprimento da sonda e outros.

O termo "marcado com epítopo", quando aqui utilizado, refere-se a um polipéptido quimérico compreendendo um polipéptido do invento fundido com um "polipéptido marcador". O polipéptido marcador possui resíduos suficientes para proporcionar um epítopo contra o qual se pode criar um anticorpo, mas no entanto é suficientemente curto para não interferir com a actividade biológica do polipéptido ao qual está fundido. O polipéptido marcador é também preferivelmente bastante único pelo que o anticorpo não reage substancialmente de modo cruzado com outros epítopos. Polipéptidos marcadores adequados possuem geralmente pelo menos seis resíduos de aminoácido e usualmente entre cerca de 8 e 50 resíduos de aminoácido (preferivelmente entre cerca de 10 e 20 resíduos de aminoácido).

"Activo" ou "actividade" no contexto de variantes do polipéptido do invento referem-se a formas de proteínas do invento que retêm as actividades biológica e/ou imunológica de um polipéptido do invento nativo ou de ocorrência natural.

"Actividade biológica" no contexto de um anticorpo ou outra molécula que possam ser identificados pelos ensaios de rastreio aqui revelados (e.g. uma molécula pequena orgânica ou inorgânica, péptido, etc.) é utilizado para referir a capacidade destas moléculas para induzir ou inibir a infiltração de células inflamatórias num tecido, para estimular ou inibir a proliferação de células T e para estimular ou inibir a libertação de linfoquinas por células. Outra actividade preferida é a permeabilidade vascular aumentada ou a sua inibição.

O termo "antagonista" é utilizado no sentido mais amplo, e inclui qualquer molécula que bloqueia, inibe ou neutraliza, parcial ou completamente, uma actividade biológica de um polipéptido nativo do invento aqui revelado. De um modo similar, o termo "agonista" é utilizado no sentido mais amplo e inclui qualquer molécula que mimetiza a actividade biológica de um polipéptido nativo do invento aqui revelado. Moléculas agonistas ou antagonistas adequadas incluem especificamente anticorpos ou fragmentos de anticorpo agonistas ou antagonistas, fragmentos ou variantes de sequência de aminoácidos de polipéptidos nativos do invento, péptidos, moléculas orgânicas pequenas, etc.

Uma "molécula pequena" é aqui definida como possuindo um peso molecular inferior a cerca de 600 dalton.

"Anticorpos" (Ab) e "imunoglobulinas" (Ig) são glicoproteínas possuindo as mesmas características estruturais. Enquanto os anticorpos exibem especificidade de ligação para com um antígeno específico, as imunoglobulinas incluem tanto anticorpos como outras moléculas do tipo anticorpo que não possuem especificidade para com um antígeno. Os polipéptidos deste último tipo, por exemplo, são produzidos em níveis baixos pelo sistema linfático e em níveis aumentados por mielomas. O termo "anticorpo" é utilizado no sentido mais amplo e cobre especificamente, sem limitação, anticorpos monoclonais intactos, anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (e.g. anticorpos biespecíficos) formados a partir de pelo menos dois anticorpos intactos, e fragmentos de anticorpo, desde que estes exibam a actividade biológica desejada.

"Anticorpos nativos" e "imunoglobulinas nativas" são usualmente glicoproteínas heterotetraméricas de cerca de 150 000 dalton, compostas por duas cadeias leves (L) idênticas e duas cadeia pesadas (H) idênticas. Cada cadeia leve está ligada a uma cadeia pesada através de uma ligação covalente de dissulfureto, embora o número de ligações dissulfureto varie entre as cadeias pesadas de diferentes isotipos de imunoglobulina. Cada cadeia pesada e leve possui também pontes de dissulfureto intracadeia espaçadas regularmente. Cada cadeia pesada tem numa extremidade um domínio variável ( $V_H$ ) seguido por um certo número de domínios constantes. Cada cadeia leve tem um domínio variável numa extremidade ( $V_L$ ) e um domínio constante na sua outra extremidade; o domínio

constante da cadeia leve está alinhado com o primeiro domínio constante da cadeia pesada, e o domínio variável da cadeia leve está alinhado com o domínio variável da cadeia pesada. Pensa-se que resíduos de aminoácido particulares formam uma interface entre os domínios variável de cadeia leve e pesada.

O termo "variável" refere-se ao facto de certas porções dos domínios variáveis diferirem consideravelmente na sequência entre anticorpos e serem utilizadas na ligação e especificidade de cada anticorpo particular pelo seu antigénio particular. No entanto, a variabilidade não está uniformemente distribuída ao longo dos domínios variáveis de anticorpos. Está concentrada em três segmentos denominados regiões determinantes de complementaridade (CDR) ou regiões hipervariáveis em ambos os domínios variáveis da cadeia leve e da cadeia pesada. As porções mais altamente conservadas dos domínios variáveis são denominadas o estruturais (FR, *framework*). Os domínios variáveis das cadeias pesada e leve nativas compreendem, cada um, quatro regiões FR, adoptando largamente uma configuração em folha beta, ligadas por três CDR, que formam ansas ligando a estrutura em folha beta, e que em alguns casos fazem parte desta. As CDR em cada cadeia são mantidas em conjunto em estreita proximidade pelas regiões FR e, com as CDR da outra cadeia, contribuem para a formação do local de ligação ao antigénio de anticorpos (ver Kabat et al., *NIH Publ. No. 91-3242*, Vol. 1, págs. 647-669 (1991)). Os domínios constantes não estão envolvidos directamente na ligação de um anticorpo a um antigénio, mas exibem várias funções efectoras, tais como participação do anticorpo na toxicidade celular dependente de anticorpo.

"Fragmentos de anticorpo" compreendem uma porção de anticorpo intacto, preferivelmente a região variável ou de ligação ao antigénio do anticorpo intacto. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> e Fv; diacorpos; anticorpos lineares (Zapata et al., *Protein Eng.* 8(10):1057-1062 [1995]); moléculas de anticorpo de cadeia simples; e anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpo.

A digestão de anticorpos com papaína produz dois fragmentos idênticos de ligação ao antigénio, denominados fragmentos "Fab", cada um com um único local de ligação ao antigénio, e um fragmento "Fc" residual. A designação "Fc" reflecte a capacidade para cristalizar rapidamente. O

tratamento de pepsina proporciona um fragmento  $F(ab')_2$  que possui dois locais de combinação com antígeno e que é ainda capaz de ligação cruzada com o antígeno.

"Fv" é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um local de reconhecimento e ligação ao antígeno completo. Esta região consiste num dímero de um domínio variável de cadeia pesada e um domínio variável de cadeia leve em estreita associação, não covalente. É nesta configuração que as três CDR de cada domínio variável interactuam para definir um local de ligação ao antígeno sobre a superfície do dímero  $V_H-V_L$ . Colectivamente, as seis CDR conferem especificidade de ligação ao antígeno ao anticorpo. No entanto, mesmo um único domínio variável (ou metade de um Fv compreendendo apenas três CDR específicas de um antígeno) tem a capacidade para reconhecer e ligar-se a um antígeno, ainda que com uma menor afinidade do que o local de ligação inteiro.

O fragmento Fab contém também o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (CH1) da cadeia pesada. Os fragmentos Fab' diferem dos fragmentos Fab pela adição de alguns resíduos no terminal carboxi do domínio CH1 da cadeia pesada, incluindo uma ou mais cisteínas da região charneira do anticorpo. A designação Fab'-SH é aqui a designação para Fab' em que resíduo(s) cisteína dos domínios constantes são portadores de um grupo tiol livre. Os fragmentos de anticorpo  $F(ab')_2$  foram originalmente produzidos na forma de pares de fragmentos Fab' que possuem entre si cisteínas de charneira. São também conhecidos outros acoplamentos químicos de fragmentos de anticorpo.

As "cadeias leves" de anticorpos (imunoglobulinas) de qualquer espécie de vertebrado podem ser atribuídas a um de dois tipos claramente distintos, denominados kappa ( $\kappa$ ) e lambda ( $\lambda$ ), com base nas sequências de aminoácidos dos seus domínios constantes.

Dependendo da sequência de aminoácidos do domínio constante das suas cadeias pesadas, as imunoglobulinas podem ser atribuídas a diferentes classes. Existem cinco classes principais de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, e várias destas pode ser adicionalmente subdivididas em subclasses (isotipos), e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Os domínios constantes de cadeia pesada que correspondem às diferentes classes de imunoglobulinas são designados por  $\alpha$ ,

$\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  e  $\mu$ , respectivamente. São bem conhecidas as estruturas de subunidades e as configurações tridimensionais de diferentes classes de imunoglobulinas.

O termo "anticorpo monoclonal", conforme aqui utilizado, refere-se a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogênea, *i.e.*, os anticorpos individuais que constituem a população são idênticos com excepção de possíveis mutações de ocorrência natural que podem estar presentes em pequenas quantidades. Os anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo dirigidos contra um local antigénico único. Adicionalmente, em contraste com preparações de anticorpo (policlonal) convencionais, que incluem tipicamente anticorpos diferentes dirigidos contra determinantes (epítomos) diferentes, cada anticorpo monoclonal é dirigido contra um determinante único sobre o antigénio. Para além da sua especificidade, os anticorpos monoclonais são vantajosos pelo facto de serem sintetizados pela cultura de hibridoma, não contaminados por outras imunoglobulinas. O adjectivo "monoclonal" indica o carácter do anticorpo conforme é obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogênea, e não deve ser entendido como requerendo a produção do anticorpo por qualquer método particular. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a utilizar de acordo com o presente invento podem ser preparados pelo método do hibridoma primeiro descrito por Kohler *et al.*, *Nature*, 256: 495 (1975), ou podem ser preparados por métodos de ADN recombinante (ver, *e.g.*, Patente dos E.U.A. N.º 4 816 567). Os "anticorpos monoclonais" podem também ser isolados a partir de bibliotecas de anticorpos sobre fagos utilizando as técnicas descritas em Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) e em Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), por exemplo. Ver também Patentes dos E.U.A. N.ºs 5 750 373, 5 571 698, 5 403 484 e 5 223 409 que descrevem a preparação de anticorpos utilizando vectores fagemídicos e fagos.

Os anticorpos monoclonais incluem aqui especificamente anticorpos (imunoglobulinas) "quiméricos" nos quais uma porção da cadeia pesada e/ou leve é idêntica ou homóloga a sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie particular ou pertencentes a uma classe ou subclasse de anticorpo particular, enquanto o restante da(s) cadeia(s) é idêntico ou homólogo a sequências correspondentes em anticorpos derivados de outra espécie ou pertencentes a outra

classe ou subclasse de anticorpo, bem como fragmentos destes anticorpos, desde que estes exibam a actividade biológica desejada (Patente dos E.U.A. N.º 4 816 567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)).

Formas "humanizadas" de anticorpos não humanos (e.g., de murino) são imunoglobulinas quiméricas, cadeias de imunoglobulina ou seus fragmentos (tais como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> ou outras subsequências de anticorpos de ligação ao antigénio) que contêm uma sequência mínima derivada de imunoglobulina não humana. Na sua maioria, os anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor) em que vários ou todos os resíduos de uma região determinante de complementaridade (CDR) do receptor estão substituídos por resíduos de uma CDR de uma espécie não humana (anticorpo doador) tal como de ratinho, rato ou coelho, possuindo a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Em alguns casos, certos resíduos da região estrutural de Fv (FR) da imunoglobulina humana podem também estar substituídos por resíduos não humanos correspondentes. Adicionalmente, os anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não se encontram nem no anticorpo receptor nem nas sequências de CDR ou estruturais importadas. Estas modificações são efectuadas para refinar e otimizar adicionalmente o desempenho do anticorpo. Em geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente a totalidade de pelo menos um, e tipicamente dois domínios variáveis, em que a totalidade ou substancialmente a totalidade das regiões CDR correspondem às de uma imunoglobulina não humana e a totalidade ou substancialmente a totalidade das regiões FR são as de uma sequência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado compreenderá também optimamente pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de uma imunoglobulina humana. Para mais detalhes, ver Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann *et al.*, *Nature*, 332:323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992). O anticorpo humanizado inclui um anticorpo, "primatizado" onde a região de ligação ao antigénio do anticorpo é derivada de um anticorpo produzido por imunização de macacos *Macaque* com o antigénio de interesse. Anticorpos contendo resíduos de macacos do Velho Mundo são também possíveis dentro do invento. Ver, por exemplo, as Patentes dos E.U.A. N.ºs 5 658 570; 5 693 780; 5 681 722; 5 750 105; e 5 756 096.

Fragmentos de anticorpo "Fv de cadeia simples" ou "sFv" compreendem os domínios  $V_H$  e  $V_L$  de anticorpo, onde estes domínios estão presentes numa cadeia simples de polipéptido. Preferivelmente, o polipéptido Fv compreende adicionalmente um ligante polipeptídico entre os domínios  $V_H$  e  $V_L$ , o que permite ao sFv formar a estrutura desejada para ligação ao antigénio. Para uma revisão dos sFv ver Pluckthun em *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg e Moore eds. Springer-Verlag, New York, págs. 269-315 (1994).

O termo "diacorpos" refere-se a pequenos fragmentos de anticorpo com dois locais de ligação ao antigénio, fragmentos que compreendem um domínio variável de cadeia pesada ( $V_H$ ) ligado a um domínio variável de cadeia leve ( $V_L$ ) na mesma cadeia polipeptídica ( $V_H$ - $V_L$ ). Por utilização de um ligante que é demasiado curto para permitir o emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia, os domínios são forçados a emparelharem com os domínios complementares de outra cadeia e a criarem dois locais de ligação ao antigénio. Os diacorpos são descritos mais detalhadamente, por exemplo, em EP 404 097; WO 93/11161; e Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 90:6444-6448 (1993).

Um anticorpo "isolado" é um anticorpo que foi identificado e separado e/ou recuperado de um componente do seu ambiente natural. Componentes contaminantes do seu ambiente natural são materiais que interfeririam com utilizações terapêuticas ou de diagnóstico para o anticorpo, e podem incluir enzimas, hormonas e outros solutos, proteicos ou não proteicos. Em concretizações preferidas, o anticorpo será purificado (1) até mais do que 95% em peso de anticorpo, conforme determinado pelo método de Lowry, e muito preferivelmente mais do que 99% em peso, (2) até um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos de uma sequência de aminoácidos N-terminal ou interna por utilização de um sequenciador de taça giratória, ou (3) até à homogeneidade por SDS-PAGE, sob condições redutoras ou não redutoras, utilizando coloração com azul de Coomassie ou, preferivelmente, com prata. Um anticorpo isolado inclui o anticorpo *in situ* dentro de células recombinantes, desde que não esteja presente pelo menos um componente do ambiente natural do anticorpo. Habitualmente, porém, o anticorpo isolado será preparado por pelo menos um passo de purificação.



A palavra "marcador" quando aqui utilizada refere-se a um composto ou composição detectável que é conjugado directamente ou indirectamente com o composto, e.g. anticorpo ou polipeptido, de modo a gerar um composto "marcado". O marcador pode ser ele próprio detectável (e.g., marcadores radioisotópicos ou marcadores fluorescentes) ou, no caso de um marcador enzimático, pode catalisar a alteração química de um composto ou composição substrato que é detectável.

Por "fase sólida" entende-se uma matriz não aquosa à qual o composto do presente invento pode aderir. Exemplos de fases sólidas aqui abrangidas incluem as formadas parcialmente ou inteiramente de vidro (e.g. vidro de poro controlado), polissacáridos (e.g., agarose), poliacrilamidas, poliestireno, poli(álcool vinílico) e silicones. Em certas concretizações, dependendo do contexto, a fase sólida pode consistir do poço de uma placa de ensaio; noutras, é uma coluna de purificação (e.g., uma coluna de cromatografia de afinidade). Este termo inclui também uma fase sólida descontínua de partículas discretas, tais como as descritas na Patente dos E.U.A. N.º 4 275 149.

Um "lipossoma" é uma pequena vesícula composta por vários tipos de lípidos, fosfolípidos e/ou tensioactivos, que é útil para entrega de um fármaco (tal como anticorpos anti-ErbB2 aqui revelados e, opcionalmente, um agente quimioterapêutico) a um mamífero. Os componentes do lipossoma estão normalmente dispostos numa formação em bicamada, similar ao arranjo dos lípidos em membranas biológicas.

Como aqui utilizado, o termo "imunoadesina" designa moléculas do tipo anticorpo que combinam a especificidade de ligação de uma proteína heteróloga (uma "adesina") com as funções efectoras de domínios constantes de imunoglobulina. Estruturalmente, as imunoadesinas compreendem uma fusão de uma sequência de aminoácidos com a especificidade de ligação desejada, que é outra que não o local de reconhecimento e de ligação ao antigénio de um anticorpo (i.e., é "heteróloga"), e de uma sequência de domínio constante de imunoglobulina. A parte adesina de uma molécula de imunoadesina é tipicamente uma sequência de aminoácidos contígua compreendendo pelo menos o local de ligação de um receptor ou um ligando. A sequência de domínio constante de imunoglobulina na imunoadesina pode ser obtida a partir de qualquer imunoglobulina, tal como os

subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 e IgG-4, IgA (incluindo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD ou IgM.

## **II. Composições e métodos do invento**

### **A. Preparação dos polipéptidos PRO245**

#### **1. Polipéptidos PRO245 de comprimento completo**

Em conjunto com WO 99/27098, a partir do qual foi dividido, o presente pedido de patente identifica e isola sequências de nucleótidos codificando polipéptidos designados no presente pedido de patente por PRO301, PRO362 ou PRO245. Em particular, os requerentes identificaram e isolaram ADNc codificando um polipéptido PRO245, conforme revelado com mais detalhe nos Exemplos adiante. Utilizando os programas de computador para alinhamento de sequências BLAST e FastA, os Requerentes constataram que sequências nativas de comprimento completo de PRO301 (SEQ ID NO:1), PRO362 (SEQ ID NO:3) e PRO245 (Figura 3, SEQ ID NO:9) têm homologia significativa com os antígenos A33 e JAM. (Ver Figuras 1, 4-6). Por conseguinte, crê-se presentemente que o PRO301 revelado no presente pedido de patente é um membro identificado pela primeira vez da família de proteínas do antígeno A33 e pode estar associado a desordens inflamatórias, tais como doença inflamatória do intestino bem como com doenças neoplásicas humanas tais como cancro colorrectal.

#### **2. Variantes de PRO245**

Para além do PRO245 de sequência nativa de comprimento completo aqui descrito, é contemplado que podem ser preparadas variantes de PRO245. As variantes de PRO245 podem ser preparadas por introdução de alterações de nucleótidos apropriadas no ADN de PRO245, respectivamente, ou por síntese dos polipéptidos PRO245 desejados. Os peritos na especialidade notarão que as alterações de aminoácidos podem alterar processos pós-tradução do PRO245, tal como por alteração do número ou posição de locais de glicosilação ou alteração das características de ancoragem à membrana.

As variações no PRO245 de sequência nativa de comprimento completo ou em vários domínios do PRO245 aqui descritas, podem ser efectuadas, por exemplo, utilizando qualquer das técnicas e linhas de orientação para mutações conservativas e não

conservativas descritas, por exemplo, na Patente dos E.U.A. N.º 5 364 934. As variações podem ser uma substituição, deleção ou inserção de um ou mais codões que codificam PRO245 que resultam numa alteração na sequência de aminoácidos de PRO245 relativamente ao PRO245 de sequência nativa. Opcionalmente, a variação é por substituição de pelo menos um aminoácido por qualquer outro aminoácido num ou mais dos domínios de PRO245. A orientação para determinar que resíduos de aminoácido podem ser inseridos, substituídos ou eliminados, sem afectar adversamente a actividade desejada, pode ser encontrada comparando a sequência de PRO245 com a de moléculas de proteína homólogas conhecidas e minimizando o número de alterações de sequência de aminoácidos efectuadas em regiões de homologia elevada. As substituições de aminoácidos podem ser o resultado da substituição de um aminoácido por outro aminoácido com propriedades estruturais e/ou químicas similares, tais como a substituição de uma leucina por uma serina, i.e., substituições de aminoácidos conservativas. As inserções ou deleções podem estar opcionalmente na gama de 1 a 5 aminoácidos. A variação permitida pode ser determinada efectuando sistematicamente inserções, deleções ou substituições de aminoácidos na sequência e ensaiando as variantes resultantes quanto à actividade no ensaio *in vitro* descrito nos Exemplos adiante.

As variações podem ser efectuadas utilizando métodos conhecidos na especialidade, tais como mutagénese mediada por oligonucleótidos (dirigida), varrimento de alaninas e mutagénese por PCR. Para produzir a variante de ADN de PRO245, podem-se realizar no ADN clonado mutagénese dirigida [Carter *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 13:4331 (1986); Zoller *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 10:6487 (1987)], mutagénese por cassete [Wells *et al.*, *Gene*. 34:315 (1985)], mutagénese de restrição e selecção [Wells *et al.*, *Philos. Trans. R. Soc. London SerA*. 317:415 (1986)] ou outras técnicas conhecidas.

A análise de aminoácidos por varrimento pode também ser utilizada para identificar um ou mais aminoácidos a longo de uma sequência contígua. Entre os aminoácidos de varrimento preferidos incluem-se os aminoácidos neutros relativamente pequenos. Estes aminoácidos incluem alanina, glicina, serina e cisteína. A alanina é tipicamente um aminoácido de varrimento preferido entre este grupo porque elimina a cadeia lateral para além do carbono beta e menos provavelmente alterará a conformação da cadeia principal da variante. A alanina é

também tipicamente preferida porque é o aminoácido mais comum. Adicionalmente, é frequentemente encontrada tanto nas posições enterradas como nas expostas [Creighton. *The Proteins*, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, *J. Mol. Biol.*, 150:1 (1976)]. Se a substituição de alanina não produzir quantidades adequadas de variante, pode-se utilizar um aminoácido isotérico.

### **3. Modificações de PRO245**

No âmbito deste invento incluem-se modificações covalentes de PRO245. Um tipo de modificação covalente inclui fazer reagir resíduos de aminoácido pretendidos do PRO245 com um agente de derivatização orgânico que é capaz de reagir com cadeias laterais seleccionadas ou com os resíduos dos terminais N ou C do PRO245. A derivatização com agentes bifuncionais é útil, por exemplo, para ligação cruzada do PRO245 a uma superfície ou matriz de suporte insolúvel em água, para utilização no método para purificação de anticorpos anti-PRO245, e vice-versa. Agentes de ligação cruzada normalmente utilizados incluem, e.g., 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldeído, ésteres de N-hidroxi-succinimida, por exemplo, ésteres com ácido 4-azido-salicílico, imidoésteres homobifuncionais, incluindo ésteres de di-succinimidilo tais como 3,3'-ditiobis-(succinimidil-propionato), maleimidas bifuncionais tais como bis-N-maleimido-1,8-octano e agentes tais como 3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato de metilo.

Outras modificações incluem desamidação de resíduos glutaminilo e asparaginilo nos resíduos glutamilo e aspartilo correspondentes, respectivamente, hidroxilação de prolina e lisina, fosforilação de grupos hidroxilo de serilo ou treonilo, metilação dos grupos  $\alpha$ -amino de cadeias laterais de lisina, arginina e histidina [T.E. Creighton. *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, págs. 79-86 (1983)], acetilação da amina N-terminal, e amidação de qualquer grupo carboxilo C-terminal.

Outro tipo de modificação covalente do polipéptido PRO245 incluída no âmbito deste invento compreende a alteração do padrão de glicosilação nativo do polipéptido. Para os presentes propósitos, "alteração do padrão de glicosilação nativo" significa a deleção de uma ou mais porções hidrato de carbono encontradas no PRO245 de sequência nativa, e/ou a

adição de um ou mais locais de glicosilação que não estão presentes no PRO245 de sequência nativa, e/ou alteração da proporção e/ou composição dos resíduos de açúcar ligados aos locais de glicosilação.

A adição de locais de glicosilação ao polipéptido PRO245 pode ser realizada por alteração da sequência de aminoácidos. A alteração pode ser efectuada, por exemplo, pela adição de, ou substituição por, um ou mais resíduos serina ou treonina ao PRO245 de sequência nativa (para locais de glicosilação ligados a O). A sequência de aminoácidos de PRO245 pode ser opcionalmente alterada através de alterações ao nível do ADN, particularmente por mutação do ADN que codifica o polipéptido PRO245 em bases pré-seleccionadas, de modo a serem gerados codões que traduzirão os aminoácidos desejados.

Outro meio para aumentar o número de porções hidrato de carbono no polipéptido PRO245 é por acoplamento químico ou enzimático de glicósidos ao polipéptido. Estes métodos estão descritos na especialidade, e.g., em WO 87/05330 publicado em 11 Setembro de 1987, e em Aplin e Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, págs. 259-306 (1981).

A remoção de porções hidrato de carbono presentes no polipéptido PRO245 pode ser realizada química ou enzimaticamente ou por substituição, por mutação, de codões que codificam resíduos de aminoácido que servem como alvos para glicosilação. As técnicas de glicosilação químicas são conhecidas na especialidade e são descritas, por exemplo, por Hakimuddin, et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987) e por Edge et al., *Anal. Biochem.*, 118:131 (1981). A clivagem enzimática de porções hidrato de carbono em polipéptidos pode ser conseguida por utilização de uma variedade de endo- e exoglicosidases como descrito por Thotakura et al., *Meth. Enzymol.*, 138:350 (1987).

Outro tipo de modificação covalente de PRO245 compreende a ligação do polipéptido PRO245 a um de uma variedade de polímeros não proteicos, e.g., polietilenoglicol, polipropilenoglicol ou polioxiálquilenos, do modo apresentado nas Patentes dos E.U.A. N.<sup>os</sup> 4 640 835; 4 496 689; 4 301 144; 4 670 417; 4 791 192 ou 4 179 337.

O PRO245 do presente invento pode também ser modificado de modo a formar uma molécula quimérica compreendendo PRO245

fundido com outra sequência heteróloga de aminoácidos ou polipéptido. Numa concretização, uma tal molécula quimérica compreende uma fusão do PRO245 com um polipéptido marcador que proporciona um epítipo ao qual anticorpo anti-marcador se pode ligar selectivamente. O marcador epitópico está geralmente colocado no terminal amino ou carboxilo do PRO245. A presença destas formas marcadas com epítipo do PRO245 pode ser detectada utilizando um anticorpo contra o polipéptido marcador. Também, a provisão do marcador epitópico permite ao PRO245 ser prontamente purificado por purificação de afinidade utilizando um anticorpo anti-marcador ou outro tipo de matriz de afinidade que se liga ao marcador epitópico. Numa concretização alternativa, a molécula quimérica pode compreender uma fusão do PRO245 com uma imunoglobulina ou com uma região particular de uma imunoglobulina. Para uma forma bivalente da molécula quimérica, uma tal fusão podia ser com a região Fc de uma molécula de IgG.

São conhecidos na especialidade vários polipéptidos marcadores e seus anticorpos respectivos. Exemplos incluem marcadores poli-histidina (poli-His) ou poli-histidina-glicina (poli-His-Gly); o polipéptido marcador HA da gripe e o seu anticorpo 12CA5 [Field et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:2159-2165 (1988)]; o marcador c-myc e os seus anticorpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 e 9E10 [Evan et al., *Molecular and Cellular Biology*, 5:3610-3616 (1985)]; e o marcador glicoproteína D (gD) do vírus Herpes Simplex e o seu anticorpo [Paborsky et al., *Protein Engineering*, 3(6):547-553 (1990)]. Outros polipéptidos marcadores incluem o péptido Flag [Hopp et al., *BioTechnology*, 6:1204-1210 (1988)]; o péptido epitópico KT3 [Martin et al., *Science*, 255:192-194 (1992)]; um péptido epitópico de  $\alpha$ -tubulina [Skinner et al., *J. Biol. Chem.*, 266:15163-15166 (1991)]; e o marcador peptídico de proteína do gene 10 de T7 [Lutz-Freyermuth et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6393-6397 (1990)].

#### **4. Produção e isolamento de PRO245**

A descrição adiante refere-se principalmente à produção de PRO245 por cultura de células transformadas ou transfectadas com um vector contendo ácido nucleico de PRO245. Está obviamente contemplado que se podem utilizar métodos alternativos, que são bem conhecidos na especialidade, para preparar PRO245. Por exemplo, a sequência de PRO245, ou suas porções, podem ser produzidas por síntese peptídica directa

utilizando técnicas de fase sólida [ver, e.g., Stewart et al., *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **85**:2149-2154 (1963)]. A síntese de proteína *in vitro* pode ser realizada utilizando técnicas manuais ou automáticas. A síntese automatizada pode ser realizada, por exemplo, utilizando um sintetizador de péptidos da Applied Biosystems (Foster City, CA) de acordo com as instruções do fabricante. Várias porções do PRO245 podem ser sintetizadas quimicamente em separado e combinadas utilizando métodos químicos ou enzimáticos para produzir o PRO245 de comprimento completo.

#### **a. Isolamento de ADN que codifica PRO245**

O ADN que codifica PRO245 pode ser obtido a partir de uma biblioteca de ADNc preparada a partir de tecido que se crê possuir o ARNm de PRO245 e que o expressa num nível detectável. Deste modo, o ADN de PRO245 humano pode ser convenientemente obtido a partir de uma biblioteca de ADNc preparada a partir de tecido humano, tal como descrito nos Exemplos. O gene codificando PRO245 pode também ser obtido a partir de uma biblioteca genómica ou por síntese de oligonucleótidos.

As bibliotecas podem ser rastreadas com sondas (tais como anticorpos contra o PRO245 ou oligonucleótidos de pelo menos cerca de 20-80 bases) concebidas para identificar o gene de interesse ou a proteína por ele codificada. O rastreio da biblioteca genómica ou de ADNc com a sonda seleccionada pode ser conduzido utilizando procedimentos padrão, tal como descrito em Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Um meio alternativo para isolar o gene que codifica PRO245 é utilizar a metodologia de PCR (Sambrook et al., *supra*; Dieffenbach et al., *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Os Exemplos adiante descrevem técnicas para rastreio de uma biblioteca de ADNc. As sequências oligonucleotídicas seleccionadas como sondas deverão ter um comprimento suficiente e ser suficientemente não ambíguas de modo a minimizar os falsos positivos. O oligonucleótido está preferivelmente marcado de modo a poder ser detectado aquando da hibridação com o ADN na biblioteca que está a ser rastreada. Os métodos de marcação são bem conhecidos na

especialidade, e incluem a utilização de radiomarcadores tais como ATP marcado com  $^{32}\text{P}$ , biotinilação ou marcação enzimática. As condições de hibridação, incluindo rigor moderado e rigor elevado, são proporcionadas em Sambrook et al., *supra*.

As sequências identificadas nestes métodos de rastreio de bibliotecas podem ser comparadas e alinhadas com outras sequências conhecidas depositadas e disponíveis em bases de dados públicas, tais como a GenBank, ou outras bases de dados de sequências privadas. A identidade de sequência (quer ao nível dos aminoácidos quer ao nível dos nucleótidos), dentro de regiões definidas da molécula ou ao longo da sequência de comprimento completo, pode ser determinada através de alinhamento de sequências utilizando programas de *software* de computador tais como BLAST, BLAST-2, ALIGN, DNASTar e INHERIT, que utilizam vários algoritmos para medir a homologia.

Pode-se obter ácido nucleico possuindo a sequência de codificação da proteína por rastreio de bibliotecas genómicas ou de ADNc seleccionadas, utilizando a sequência de aminoácidos deduzida aqui revelada pela primeira vez, e, se necessário, utilizando procedimentos de extensão de iniciadores convencionais como descrito em Sambrook et al., *supra*, para detectar precursores, e processamento de intermediários de ARNm que podem não ter sido transcritos de modo inverso em ADNc.

#### ***b. Selecção e transformação de células hospedeiras***

As células hospedeiras são transfectadas ou transformadas, com vectores de expressão ou clonagem aqui descritos, para produção de PRO245 e cultivadas em meios nutrientes convencionais, modificados como apropriado para indução de promotores, selecção de transformantes ou amplificação dos genes que codificam as sequências desejadas. As condições de cultura, tais como meios, temperatura, pH e outras, podem ser seleccionadas por um técnico especialista sem experimentação indevida. Em geral, princípios, protocolos e técnicas práticas para maximização da produtividade de culturas de células podem ser encontrados em *Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach*. M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) e Sambrook et al., *supra*.

Os métodos de transfecção são conhecidos de uma pessoa competente na matéria, por exemplo, CaPO e electroporação.



Dependendo da célula hospedeira utilizada, a transformação é realizada utilizando técnicas padrão apropriadas para essa célula. O tratamento com cálcio utilizando cloreto de cálcio, como descrito em Sambrook et al., *supra*, ou a electroporação, são geralmente utilizados para procariotas ou outras células que contêm barreiras de parede celular substanciais. A infecção com *Agrobacterium tumefaciens* é utilizada para transformação de certas células de plantas, como descrito por Shaw et al., *Gene*, 23:315 (1983) e WO 89/05859 publicado em 29 de Junho de 1989. Para células de mamífero sem estas paredes celulares, pode-se utilizar o método de precipitação com fosfato de cálcio de Graham e van der Eb, *Virology*, 52:456-457 (1978). Aspectos gerais de transformações de sistemas de células hospedeiras de mamífero estão descritos na Patente dos E.U.A. N.º 4 399 216. Transformações em levedura são tipicamente realizadas de acordo com o método de Van Solingen et al., *J. Bact.*, 130:946 (1977) e Hsiao et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76:3829 (1979). No entanto, podem-se também utilizar outros métodos para introdução de ADN em células, tais como por micro-injecção nuclear, electroporação, fusão de protoplastos bacterianos com células intactas, ou policações, e.g., polibreno, poliornitina. Para várias técnicas para transformação de células de mamífero, ver Keown et al., *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990) e Mansour et al., *Nature*, 336:348-352 (1988).

As células hospedeiras adequadas para clonagem ou expressão do ADN nos presentes vectores incluem células procariotas, de levedura ou eucariotas superiores. Os procariotas adequados incluem, mas não estão limitados a, eubactérias, tais como organismos Gram-negativos ou Gram-positivos, por exemplo, *Enterobacteriaceae* tais como *E. coli*. Estão disponíveis publicamente várias estirpes de *E. coli*, tais como *E. coli* K12 estirpe MM294 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); *E. coli* estirpe W3110 (ATCC 27.325) e K5 772 (ATCC 53.635).

Para além dos procariotas, os micróbios eucariotas como fungos filamentosos ou leveduras, são hospedeiros de clonagem ou expressão adequados para vectores que codificam PRO245. A *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo eucariota inferior normalmente utilizado.

As células hospedeiras adequadas para a expressão de PRO245 glicosilado são obtidas a partir de organismos

multicelulares. Exemplos de células de invertebrados incluem células de insecto tais como S2 de *Drosophila* e Sf9 de *Spodoptera*, bem como células de plantas. Exemplos de linhas de células hospedeiras de mamífero úteis incluem células de ovário de hamster Chinês (CHO) e células COS. Exemplos mais específicos incluem a linha CV1 de rim de macaco transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); linha de rim de embrião humano (células 293 ou 293 subclonadas para crescimento em cultura de suspensão, Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 36:59 (1977)); Células de ovário de hamster Chinês/-DHFR (CHO, Urlaub e Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratinho (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)); células de pulmão humano (W138, ATCC CCL 75); células de fígado humano (Hep G2, HB 8065); e células tumorais mamário de ratinho (MMT 060562, ATCC CCL51). Supõe-se que a selecção da célula hospedeira apropriada está dentro dos conhecimentos da especialidade.

### **c. Selecção e utilização de um vector replicável**

Pode-se inserir ácido nucleico (e.g. ADNc ou ADN genómico) codificando PRO245 num vector replicável para clonagem (amplificação do ADN) ou para expressão. Estão disponíveis ao público vários vectores. Por exemplo, o vector pode ser na forma de um plasmídeo, cosmídeo, partícula viral ou fago. A sequência de ácido nucleico apropriada pode ser inserida no vector por uma variedade de procedimentos. Em geral, o ADN é inserido em locais de endonucleases de restrição apropriados utilizando técnicas conhecidas na especialidade. Os componentes do vector incluem geralmente, mas não estão limitados a, um ou mais de uma sequência de sinal, uma origem de replicação, um ou mais genes marcadores, um elemento potenciador, um promotor e uma sequência de terminação da transcrição. A construção de vectores adequados contendo um ou mais destes componentes utiliza técnicas de ligação padrão que são conhecidas do técnico especialista.

O PRO245 pode ser produzido de modo recombinante não apenas directamente, mas também na forma de um polipéptido de fusão com um polipéptido heterólogo, que pode ser uma sequência de sinal ou outro polipéptido possuindo um local de clivagem específico no terminal N da proteína madura ou polipéptido. Em geral, a sequência de sinal pode ser um componente do vector, ou pode ser uma parte do ADN de PRO245 que é inserido no vector. A sequência de sinal pode ser uma

sequência de sinal procariota seleccionada, por exemplo, de entre o grupo das sequências de comando de fosfatase alcalina, penicilinase, Ipp ou enterotoxina II estáveis ao calor. Para secreção em levedura, a sequência de sinal pode ser e.g., o comando de invertase de levedura, o comando de factor alfa (incluindo o comando de factor alfa de *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*, esta última descrita na Patente dos E.U.A. N.º 5 010 182), ou o comando de fosfatase ácida, o comando de glucoamilase de *C. albicans* (EP 362 179 publicado em de 4 Abril de 1990), ou o sinal descrito em WO 90/13646 publicado em 15 de Novembro de 1990. Na expressão em células de mamífero, podem-se utilizar sequências de sinal de mamífero para dirigir a secreção da proteína, tais como sequências de sinal a partir de polipéptidos segregados da mesma espécie ou de espécies relacionadas, bem como comandos de secreção virais.

Os vectores de expressão e clonagem contêm uma sequência de ácido nucleico que permite ao vector replicar numa ou mais células hospedeiras seleccionadas. Estas sequências são bem conhecidas para uma variedade de bactérias, leveduras e vírus. A origem de replicação do plasmídeo pBR322 é adequada para a maioria das bactérias Gram-negativas, a origem do plasmídeo 2µ é adequada para levedura e várias origens virais (SV40, poliovírus, adenovírus, VSV ou BPV) são úteis para vectores de clonagem em células de mamífero.

Os vectores de expressão e clonagem conterão tipicamente um gene de selecção, também denominado por marcador seleccionável. Genes de selecção típicos codificam proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou a outras toxinas, e.g., ampicilina, neomicina, metotrexato ou tetraciclina, (b) complementam deficiências auxotróficas ou (c) fornecem nutrientes críticos não disponíveis a partir de meios complexos, e.g., o gene que codifica D-alanina-racemase para *Bacilli*.

Os exemplos de marcadores seleccionáveis adequados para células de mamífero são aqueles que permitem a identificação de células competentes para incorporar o ácido nucleico de PRO245, tais como DHFR ou timidina-quinase. Uma célula hospedeira apropriada quando se utiliza DHFR do tipo selvagem é a linha de células CHO deficiente em actividade de DHFR, preparada e propagada como descrito por Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980). Um gene de selecção

adequado para utilização em levedura é o gene *trp1* presente no plasmídeo de levedura YRp7 [Stinchcomb et al., *Nature*, 282:39 (1979); Kingsman et al., *Gene*, 7:141 (1979); Tschemper et al., *Gene*, 10:157 (1980)]. O gene *trp1* proporciona um marcador de selecção para uma estirpe mutante de levedura sem a capacidade para crescer em triptofano, por exemplo, ATCC N.º 44076 ou PEP4-1 [Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)].

Os vectores de expressão e clonagem contêm usualmente um promotor ligado operativamente à sequência de ácido nucleico de PRO245 para dirigir a síntese de ARNm. São bem conhecidos promotores reconhecidos por uma variedade de células hospedeiras potenciais. Promotores adequados para utilização com hospedeiros procariotas incluem os sistemas promotores da  $\beta$ -lactamase e da lactose (Chang et al., *Nature*, 275:615 (1978); Goeddel et al., *Nature*, 281:544 (1979)], fosfatase alcalina, um sistema promotor do triptofano (*trp*) [Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980); EP 36 776], e promotores híbridos tais como o promotor *tac* [deBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25 (1983)]. Os promotores para utilização em sistemas bacterianos conterão também uma sequência de Shine-Dalgarno (S.D.) ligada operativamente ao ADN que codifica PRO245.

Os exemplos de sequências de promoção adequadas para utilização com hospedeiros de levedura incluem os promotores para 3-fosfoglicerato-quinase [Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.*, 255:2073 (1980)] ou outras enzimas glicolíticas (Hess et al., *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7:149 (1968); Holland, *Biochemistry*, 17:4900 (1978)), tais como enolase, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, hexoquinase, piruvato-descarboxilase, fosfofrutoquinase, glucose-6-fosfato-isomerase, 3-fosfoglicerato-mutase, piruvato-quinase, triosefosfato-isomerase, fosfoglucoisomerase e glucoquinase.

Outros promotores de levedura, que são promotores indutíveis possuindo a vantagem adicional de transcrição controlada pelas condições de crescimento, são as regiões promotoras para álcool-desidrogenase 2, isocitocromo C, fosfatase ácida, enzimas degradadoras associadas ao metabolismo do azoto, metalotioneína, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase e enzimas responsáveis pela utilização de maltose e galactose. Vectores e promotores adequados para

utilização na expressão em levedura são adicionalmente descritos na EP 73 637.

A transcrição de PRO245 a partir de vectores em células hospedeiras de mamífero é controlada, por exemplo, por promotores obtidos a partir dos genomas de vírus tais como poliomavírus, poxvírus avícola (*fowlpox*) (UK 2 211 504 publicado em 5 de Julho de 1989), adenovírus (tal como Adenovírus 2), papilomavírus de bovino, vírus de sarcoma das aves, citomegalovírus, um retrovírus, vírus da hepatite B e Vírus de Símio 40 (SV40), promotores de mamífero heterólogos, e.g., o promotor de actina ou um promotor de imunoglobulina, e promotores de choque térmico, desde que estes promotores sejam compatíveis com os sistemas da célula hospedeira.

A transcrição de um ADN que codifica o PRO245 por eucariotas superiores pode ser aumentada por inserção de uma sequência potenciadora (*enhancer*) no vector. Os potenciadores são elementos de ADN de actuação em *cis*, usualmente com cerca de 10 a 300 pb, que actuam sobre um promotor para aumentar a sua transcrição. São agora conhecidas muitas sequências potenciadoras de genes de mamífero (globina, elastase, albumina,  $\alpha$ -fetoproteína e insulina). Tipicamente, porém, utilizar-se-á um potenciador de um vírus de célula eucariota. Exemplos incluem o potenciador de SV40 no lado tardio da origem de replicação (100-270 pb), o potenciador do promotor precoce de citomegalovírus, o potenciador de polioima no lado tardio da origem de replicação e potenciadores de adenovírus. O potenciador pode ser montado (*spliced*) no vector numa posição 5' ou 3' em relação à sequência de codificação de PRO245, mas está preferivelmente localizado num local 5' em relação ao promotor.

Vectores de expressão utilizados em células hospedeiras eucariotas (levedura, fungos, insectos, planta, animal, humano, ou células nucleadas a partir de outros organismos multicelulares) conterão também sequências necessárias para a terminação da transcrição e para estabilização do ARNm. Estas sequências estão normalmente disponíveis a partir das regiões não traduzidas a 5' e, ocasionalmente a 3', de ADN ou ADNc eucariotas ou virais. Estas regiões contêm segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados na porção não traduzida do ARNm que codifica PRO245.

Ainda outros métodos, vectores e células hospedeiras, adequados para adaptação à síntese de PRO245 em culturas de células recombinantes de vertebrado, estão descritos em Gething et al., *Nature*, 293:620-625 (1981); Mantei et al., *Nature*, 281:40-46 (1979); EP 117 060; e EP 117 058.

#### **d. Detecção da amplificação/expressão de genes**

A amplificação e/ou expressão de genes pode ser medida numa amostra directamente, por exemplo, por *Southern blotting* convencional, *Northern blotting* para quantificar a transcrição de ARNm [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:5201-5205 (1980)], *dot blotting* (análise de ADN), ou hibridação *in situ*, utilizando uma sonda apropriadamente marcada, com base nas sequências aqui proporcionadas. Alternativamente, podem-se utilizar anticorpos que podem reconhecer cópias específicos, incluindo cópias de ADN, cópias de ARN, e cópias híbridas de ADN-ARN ou cópias de ADN-proteína. Por sua vez, os anticorpos podem estar marcados e pode ser realizado um ensaio em que o dúplice é ligado a uma superfície, tal que, por formação do dúplice sobre a superfície, se pode detectar a presença de anticorpo ligado ao dúplice.

Alternativamente, a expressão de genes pode ser medida por métodos imunológicos, tais como coloração imuno-histoquímica de células ou secções de tecido, e ensaio de cultura de células ou de fluidos corporais, para quantificar directamente a expressão do produto génico. Anticorpos úteis para coloração imuno-histoquímica e/ou ensaio de fluidos de amostra podem ser quer monoclonais quer policlonais, e podem ser preparados em qualquer mamífero. Convenientemente, os anticorpos podem ser preparados contra um polipéptido PRO245 de sequência nativa ou contra um péptido sintético baseado nas sequências de ADN aqui proporcionadas ou contra uma sequência exógena fundida com ADN de PRO245 e codificando um epítipo de anticorpo específico.

#### **e. Purificação de polipéptidos**

As formas de PRO245 podem ser recuperadas a partir do meio de cultura ou a partir de lisados de células hospedeiras. Se ligadas a membranas, podem ser libertadas da membrana utilizando uma solução detergente adequada (e.g. Triton X-100) ou por clivagem enzimática. As células utilizadas na expressão de PRO245 podem ser rompidas por vários meios físicos ou

químicos, tais como ciclos de congelação-descongelação, tratamento com ultra-sons, ruptura mecânica ou agentes de lise celular.

Pode ser desejado purificar PRO245 a partir de proteínas ou polipéptidos de células recombinantes. Os procedimentos seguintes são exemplos de procedimentos de purificação adequados: por fraccionamento numa coluna de permuta iónica; precipitação com etanol; HPLC de fase inversa; cromatografia em sílica ou numa resina de permuta catiónica tal como DEAE; cromatofocagem; SDS-PAGE; precipitação com sulfato de amónio; filtração em gel utilizando, por exemplo, Sephadex G-75; colunas de proteína A-Sepharose para remover contaminantes tais como IgG; e colunas de quelantes de metais para ligar formas marcadas com epítipo do PRO245. Podem-se utilizar vários métodos de purificação de proteínas e estes métodos são conhecidos na especialidade e estão descritos por exemplo em Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York (1982). Os passos de purificação seleccionados dependerão, por exemplo, da natureza do processo de produção utilizado e do PRO245 particular produzido.

## **2. Distribuição nos tecidos**

A localização de tecidos que expressam os polipéptidos do invento pode ser identificada determinando a expressão de ARNm em vários tecidos humanos. A localização destes genes fornece informação acerca de quais os tecidos que muito provavelmente serão afectados pelas actividades de estimulação e inibição dos polipéptidos do invento. A localização de um gene num tecido específico proporciona também amostras de tecido para os ensaios de bloqueio de actividade adiante descritos.

A expressão de genes em vários tecidos pode ser medida por *Southern blotting* convencional, *Northern blotting* para quantificar a transcrição de ARNm (Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:5201-5205 [1980]), *dot blotting* (análise de ADN), ou hibridação *in situ*, utilizando uma sonda apropriadamente marcada, com base nas sequências aqui proporcionadas. Alternativamente, podem-se utilizar anticorpos que podem reconhecer cópias específicas, incluindo cópias de ADN, cópias de ARN, e cópias híbridas de ADN-ARN ou cópias de ADN-proteína.

Alternativamente, a expressão de genes pode ser medida por métodos imunológicos, tais como coloração imuno-histoquímica de células ou secções de tecido, e ensaio de cultura de células ou de fluidos corporais, para quantificar directamente a expressão do produto génico. Anticorpos úteis para coloração imuno-histoquímica e/ou ensaio de fluidos de amostra podem ser quer monoclonais quer policlonais, e podem ser preparados em qualquer mamífero. Convenientemente, os anticorpos podem ser preparados contra uma sequência nativa de um polipéptido do invento ou contra um péptido sintético baseado nas sequências de ADN codificando o polipéptido do invento ou contra uma sequência exógena fundida com ADN codificando um polipéptido do invento e codificando um epítopo de anticorpo específico. São adiante fornecidas técnicas gerais para a geração de anticorpos, e protocolos especiais para *Northern blot* e hibridação *in situ*.

### **3. Estudos de ligação de anticorpos**

A actividade dos polipéptidos do invento pode ser adicionalmente verificada por estudos de ligação de anticorpos, nos quais se testa a capacidade de anticorpos contra PRO245 inibirem o efeito dos polipéptidos PRO245 em células de tecido. Exemplos de anticorpos incluem anticorpos policlonais, monoclonais, humanizados, biespecíficos e heteroconjugados, cuja preparação será aqui adiante descrita.

Os estudos de ligação de anticorpos podem ser realizados em qualquer método de ensaio conhecido, tal como ensaios de ligação competitiva, ensaios em sanduíche, directos e indirectos, e ensaios de imunoprecipitação. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*. págs.147-158 (CRC Press. Inc., 1987).

Os ensaios de ligação competitiva baseiam-se na capacidade de um padrão marcado competir com o analito na amostra de teste pela ligação com uma quantidade limitada de anticorpo. A quantidade de proteína alvo na amostra de teste é inversamente proporcional à quantidade de padrão que fica ligada aos anticorpos. Para facilitar a determinação da quantidade de padrão que fica ligada, os anticorpos são preferivelmente insolubilizados antes ou após a competição, de modo que padrão e analito, que estão ligados aos anticorpos, podem ser convenientemente separados de padrão e analito que permanecem não ligados.



Os ensaios em sanduíche envolvem a utilização de dois anticorpos, cada um capaz de se ligar a uma porção imunogénica ou epítopo diferente, da proteína a detectar. Num ensaio em sanduíche, o analito na amostra de teste é ligado por um primeiro anticorpo que está imobilizado sobre um suporte sólido, e depois um segundo anticorpo liga-se ao analito, formando assim um complexo insolúvel tripartido. Ver, e.g., Patente dos E.U.A. N.º 4 376 110. O segundo anticorpo pode ele próprio estar marcado com uma porção detectável (ensaios em sanduíche directos) ou pode ser medido utilizando um anticorpo anti-imunoglobulina que está marcado com uma porção detectável (ensaio em sanduíche indirecto). Por exemplo, um tipo de ensaio em sanduíche é um ensaio ELISA, caso em que a porção detectável é uma enzima.

Para imuno-histoquímica, a amostra de tecido pode ser fresca ou congelada ou pode ser embebida em parafina e fixada com um conservante tal como formalina, por exemplo.

#### **4. Ensaios baseados em células**

Podem-se utilizar ensaios baseados em células e modelos animais para doenças imuno-relacionadas para compreender adicionalmente a relação entre os genes e os polipéptidos aqui identificados e o desenvolvimento e a patogénese da doença imuno-relacionada.

Numa abordagem diferente, células de um tipo celular que se sabe estar envolvido numa doença particular imuno-relacionada são transfectadas com os ADNc aqui descritos, e analisa-se a capacidade destes ADNc para estimular ou inibir a função imunitária. Podem-se transfectar células adequadas com o gene desejado, e monitoram-se quanto à actividade da função imunitária. Estas linhas de células transfectadas podem depois ser utilizadas para testar a capacidade de anticorpos policlonais ou monoclonais ou de composições de anticorpos para inibir ou estimular a função imunitária, por exemplo para modular a proliferação de células T ou a infiltração de células inflamatórias. Podem-se utilizar adicionalmente células transfectadas com as sequências de codificação dos genes aqui identificados para identificar fármacos candidatos para o tratamento de doenças imuno-relacionadas.

Adicionalmente, podem-se aqui utilizar culturas derivadas de animais transgénicos (como adiante descrito) nos ensaios baseados em células, ainda que se prefiram linhas de células estáveis. São bem conhecidas na especialidade técnicas para obter linhas de células contínuas a partir de animais transgénicos (ver, e.g. Small, et al., *Mol. Cell. Biol.* 5, 642-648 [1985]).

Um ensaio baseado em células adequado é a reacção linfocitária mista (MLR). *Current Protocols in Immunology*, unidade 3.12; editado por J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Marglies, E.M. Shevach, W. Strober, National Institutes of Health, publicado por John Wiley & Sons. Inc. Neste ensaio, é ensaiada a capacidade de um composto de teste para estimular a proliferação de células T activadas. Uma suspensão de células T respondedoras é cultivada com células estimulantes alogénicas e a proliferação de células T é medida pela incorporação de timidina tritiada. Este ensaio é uma medida geral da reactividade de células T. Uma vez que a maioria das células T respondem a IL-2 e produzem IL-2 após activação, diferenças em resposta neste ensaio reflectem em parte diferenças na produção de IL-2 pelas células respondedoras. Os resultados de MLR podem ser verificados por um ensaio padrão de detecção de linfoquinas (IL-2). *Current Protocols in Immunology*, supra, 3.15, 6.3.

Uma resposta de células T proliferativas num ensaio de MLR pode ser devida a uma resposta mitogénica ou pode ser devida a uma resposta estimulante pelas células T. Uma verificação adicional da actividade estimulante de células T dos polipéptidos do invento pode ser obtida por um ensaio de co-estimulação. A activação de células T requer um sinal específico do antígeno mediado através do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e um sinal co-estimulante, mediado através de uma segunda interacção de ligação de ligandos, por exemplo, a interacção de ligação B7 (CD80, CD86)/CD28. A ligação cruzada de CD28 aumenta a secreção de linfoquina pelas células T activadas. A activação de células T tem controlos tanto negativos como positivos através da ligação de ligandos que têm um efeito negativo ou positivo. A CD28 e a CTLA-4 são glicoproteínas relacionadas da superfamília de Ig que se ligam a B7. A ligação de CD28 a B7 tem um efeito de co-estimulação positivo de activação de células T; inversamente, a ligação de CTLA-4 a B7 tem um efeito negativo de desactivação de células T. Chambers, C.A. e

Allison, J.P., *Curr. Opin. Immunol.* (1997) 9:396. Schwartz, R. H., *Cell* (1992) 71:1065; Linsey, P.S. e Ledbetter, J.A., *Annu. Rev. Immunol.*, (1993) 11:191; June, C.H. et al., *Immunol. Today* (1994) 15:321; Jenkins, M.K., *Immunity* (1994) 1:405. Num ensaio de co-estimulação, os polipéptidos do invento são ensaiados quanto a actividade co-estimulante ou inibidora de células T.

Os polipéptidos do invento, bem como outros compostos do invento, que são estimulantes (co-estimulantes) da proliferação de células T, conforme determinado por ensaios de MLR e de co-estimulação, por exemplo, são úteis no tratamento de doenças imuno-relacionadas caracterizadas por uma função imunitária fraca, sub-ótima ou inadequada. Estas são tratadas por estimulação da proliferação e activação de células T (e da imunidade mediada por células T) e por melhoria da resposta imunitária num mamífero através da administração de um composto estimulante, tal como os polipéptidos estimulantes do invento. O polipéptido estimulante pode ser um polipéptido PRO301, PRO362 ou PRO245 ou um seu anticorpo agonista. A terapia com imunoadjuvantes para tratamento de tumores, descrita adiante em mais detalhe, é um exemplo desta utilização dos compostos estimulantes do invento. Anticorpos que se ligam a polipéptidos inibidores funcionam para melhorar a resposta imunitária removendo o efeito inibidor dos polipéptidos inibidores. Este efeito é observado em experiências utilizando anticorpos anti-CTLA-4 que melhoram a proliferação de células T, presumivelmente por remoção do sinal inibidor causado pela ligação de CTLA-4. Walunas, T.L. et al., *Immunity* (1994) 1:405. Esta utilização está também validada em experiências com glicoproteína 4-1BB, um membro da família de receptores de factor de necrose tumoral, que se liga a um ligando (4-1BBL) expresso em células T provocadas e que sinaliza a activação e o crescimento de células T. Alderson, M.E. et al., *J. Immunol.* (1994) 24:2219. A inibição da ligação de 4-1BB por tratamento com um anticorpo anti-4-1BB aumenta a gravidade da doença de enxerto-versus-hospedeiro e pode ser utilizada para erradicar tumores. Hellstrom, I. e Hellstrom, K.E., *Crit. Rev. Immunol.* (1998) 18:1.

Por outro lado, polipéptidos do invento, bem como outros compostos do invento, que são inibidores da proliferação/activação de células T e/ou da secreção de linfoquinas, podem ser utilizados directamente para suprimir a resposta imunitária. Estes compostos são úteis para reduzir o

grau da resposta imunitária e para tratar doenças imuno-relacionadas caracterizadas por uma resposta hiperactiva, super-óptima ou auto-imune. Alternativamente, anticorpos que se ligam aos polipéptidos estimulantes do invento e que bloqueiam o efeito estimulante destas moléculas podem ser utilizados para suprimir a resposta imunitária mediada por células T por inibição da proliferação/activação de células T e/ou da secreção de linfoquinas. Bloquear o efeito estimulante dos polipéptidos suprime a resposta imunitária do mamífero.

## **5. Modelos animais**

Os resultados dos ensaios *in vitro* baseados em células podem ser adicionalmente verificados utilizando modelos animais *in vivo* e ensaios para avaliar a função de células T. Uma variedade de modelos animais bem conhecidos pode ser utilizada para compreender adicionalmente o papel dos genes aqui identificados no desenvolvimento e patogénese de doenças imuno-relacionadas, e para testar a eficácia de agentes terapêuticos candidatos, incluindo anticorpos, e outros antagonistas dos polipéptidos nativos, incluindo antagonistas de molécula pequena. A natureza *in vivo* destes modelos torna-os particularmente preditivos de respostas em pacientes humanos. Modelos animais de doenças imuno-relacionadas incluem animais não recombinantes e recombinantes (transgénicos). Modelos animais não recombinantes incluem, por exemplo, roedores, e.g., modelos murinos. Estes modelos podem ser gerados por introdução de células em ratinhos singénicos utilizando técnicas padrão, e.g. injeção subcutânea, injeção na veia caudal, implantação no baço, implantação intraperitoneal, implantação sob a cápsula renal, etc.

A hipersensibilidade de contacto é um ensaio *in vivo* simples da função imunitária mediada por células. Neste procedimento, células epidérmicas são expostas a haptenos exógenos que dão origem a uma reacção de hipersensibilidade do tipo retardado que é medida e quantificada. A sensibilidade de contacto envolve uma fase de sensibilização inicial seguida por uma fase de indução. A fase de indução ocorre quando as células epidérmicas encontram um antigénio com o qual tinham tido um contacto anterior. A inchaço e a inflamação ocorrem, fazendo disto um modelo excelente de dermatite de contacto alérgica humana. Um procedimento adequado é descrito em detalhe em *Current Protocols in Immunology*, Eds. J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach e W. Strober,

John Wiley & Sons. Inc., 1994, unidade 4.2. Ver também Grabbe, S. e Schwarz, T, *Immun. Today* 19(1):37-44 (1998).

A doença de enxerto-versus-hospedeiro ocorre quando células imunocompetentes são transplantadas para pacientes imunossuprimidos ou tolerantes. As células do doador reconhecem e respondem a antígenos do hospedeiro. A resposta pode variar desde uma inflamação grave com perigo de vida até casos ligeiros de diarreia e perda de peso. Os modelos de doença de enxerto-versus-hospedeiro proporcionam um meio de avaliar a reactividade de células T contra antígenos de MHC e antígenos de enxerto menores. Um procedimento adequado é descrito em detalhe em *Current Protocols in Immunology*, *supra*, unidade 4.3.

Um modelo animal para a rejeição de aloenxertos de pele é um meio para testar a capacidade de células T para mediar a destruição de tecido *in vivo*, o que é indicativo e uma medida do seu papel em imunidade antiviral e antitumoral. Os modelos mais comuns e aceites utilizam enxertos de pele de cauda de murino. Experiências repetidas têm mostrado que a rejeição de aloenxertos de pele é mediada por células T, células T auxiliares e células T assassinas-efectoras, e não por anticorpos. Auchincloss, H. Jr. e Sachs, D.H., *Fundamental Immunology*, 2.<sup>a</sup> W.E. Paul ed., Raven Press, NY, 1989, 889-992. Um procedimento adequado é descrito em detalhe em *Current Protocols in Immunology*, *supra*, unidade 4.4. Outros modelos de rejeição de transplantes, que podem ser utilizados para testar os compostos do invento, são os modelos de transplante de coração alogénico descritos por Tanabe, M. et al., *Transplantation* (1994) 58:23 e Tinubu, S.A. et al., *J. Immunol.* (1994) 4330-4338.

Modelos animais para hipersensibilidade do tipo retardado proporcionam também um ensaio da função imunitária mediada por células. Reacções de hipersensibilidade do tipo retardado são uma resposta imunitária *in vivo*, mediada por células T, caracterizada por inflamação que não atinge um pico antes de ter decorrido um certo período de tempo após provocação com um antígeno. Estas reacções ocorrem também em doenças auto-imunes específicas de tecido tais como esclerose múltipla (EM) e encefalomielite auto-imune experimental (EAE, um modelo da EM). Um procedimento adequado é descrito em detalhe em *Current Protocols in Immunology*, acima, unidade 4.5.

A EAE é uma doença auto-imune mediada por células T caracterizada por inflamação de células T e de células mononucleares e subsequente desmielinização de axónios no sistema nervoso central. A EAE é geralmente considerada um modelo animal relevante para a EM em humanos. Bolton, C., *Multiple Sclerosis* (1995) 1:143. Têm sido desenvolvidos modelos agudos e recorrentes-remitentes. Os compostos do invento podem ser testados quanto à actividade estimulante ou inibidora de células T contra doenças desmielinizantes imuno-mediadas utilizando o protocolo descrito em *Current Protocols in Immunology*, acima, unidades 15.1 e 15.2. Ver também os modelos para a doença de mielina em que oligodendrócitos ou células de Schwann são enxertados no sistema nervoso central como descrito em Duncan, I.D. et al., *Molec. Med. Today* (1997) 554-561.

Um modelo animal para a artrite é a artrite induzida por colagénio. Este modelo partilha características clínicas, histológicas e imunológicas com a artrite reumatóide auto-imune humana e é um modelo aceitável para a artrite auto-imune humana. Os modelos de ratinho e rato são caracterizados por sinovite, e por erosão de cartilagem e do osso subcondral. Os compostos do invento podem ser testados quanto à actividade contra a artrite auto-imune utilizando os protocolos descritos em *Current Protocols in Immunology*, acima, unidade 15.5. Ver também o modelo que utiliza um anticorpo monoclonal contra CD18 e integrinas VLA-4 descrito em Issekutz, A.C. et al., *Immunology* (1996) 88:569.

Foi descrito um modelo de asma no qual são induzidas hiper-reatividade das vias aéreas, eosinofilia pulmonar e inflamação, induzidas por antigénio, por sensibilização de um animal com ovalbumina e depois provocação do animal com a mesma proteína entregue por aerossol. Vários modelos animais (porquinho-da-índia, rato, primata não humano) apresentam sintomas similares aos da asma atópica em humanos após provocação com antigénios em aerossol. Os modelos murinos têm muitas das particularidades da asma humana. Procedimentos adequados para testar os compostos do invento, quanto à actividade e eficácia no tratamento de asma, são descritos por Wolyniec, W.W. et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (1998) 18:777 e as referências aí citadas.

Adicionalmente, os compostos do invento podem ser testados em modelos animais para doenças tais como a psoríase.

As evidências sugerem uma patogénese de células T para a psoríase. Os compostos do invento podem ser testados no modelo de ratinho scid/scid descrito por Schon, M.P. et al., *Nat. Med.* (1997) 3:183, no qual os ratinhos apresentam lesões histopatológicas da pele que se assemelham a psoríase. Outro modelo adequado é a quimera de pele humana/ratinho scid preparada como descrito por Nickoloff, B.J. et al., *Am. J. Path.* (1995) 146:580.

Podem ser manipulados modelos animais recombinantes (transgénicos) introduzindo a porção de codificação dos genes aqui identificados no genoma de animais de interesse, utilizando técnicas padrão para a produção de animais transgénicos. Animais que podem servir como alvo para manipulação transgénica incluem, sem limitação, ratinhos, ratos, coelhos, porquinhos-da-índia, ovelhas, cabras, porcos, e primatas não humanos, e.g. babuínos, chimpanzés e macacos. Técnicas conhecidas na especialidade para introduzir um transgene nestes animais incluem micro-injecção pró-nuclear (Hoppe e Wanger, Patente dos E.U.A. N.º 4 873 191); transferência de genes mediada por retrovírus em linhas germinais (e.g., Van der Putten et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6148-615 [1985]); direcção de genes para células estaminais embrionárias (Thompson et al., *Cell* 56, 313-321 [1989]); electroporação de embriões (Lo, *Mol. Cel. Biol.* 3, 1803-1814 [1983]); transferência de genes mediada por esperma (Lavitrano et al., *Cell* 57, 717-73 [1989]). Para uma revisão, ver, por exemplo, Patente dos E.U.A. N.º 4 736 866.

Para o propósito do presente invento, os animais transgénicos incluem aqueles que apenas são portadores do transgene em parte das suas células ("animais mosaico"). O transgene pode ser integrado, quer como um transgene simples, quer em concatâmeros, e.g., tandem cabeça-cabeça ou cabeça-cauda. É também possível a introdução selectiva de um transgene num tipo de célula particular, por exemplo, pela seguinte técnica de Lasko et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 623-636 (1992).

A expressão do transgene em animais transgénicos pode ser monitorizada por técnicas padrão. Por exemplo, podem-se utilizar análise *Southern blotting* ou amplificação por PCR para verificar a integração do transgene. O nível de expressão de ARNm pode depois ser analisado utilizando técnicas tais

como hibridação *in situ*, análise *Northern blotting*, PCR ou imunocitoquímica.

Os animais podem ser adicionalmente examinados quanto a sinais de patologia da doença imunitária, por exemplo por exame histológico, para determinar a infiltração de células imunitárias em tecidos específicos. Podem-se também realizar experiências de bloqueio nas quais os animais transgênicos são tratados com os compostos do invento para determinar a extensão da estimulação ou inibição da proliferação de células T pelos compostos. Nestas experiências, anticorpos bloqueadores que se ligam ao polipéptido do invento, preparados como acima descrito, são administrados ao animal e é determinado o efeito sobre na função imunitária.

Alternativamente, podem ser construídos animais "knockout" que têm um gene codificante de um polipéptido aqui identificado deficiente ou alterado como resultado de recombinação homóloga entre o gene endógeno codificante do polipéptido e ADN genómico alterado codificante do mesmo polipéptido, introduzido numa linha de células embrionária do animal. Por exemplo, ADNc que codifica um polipéptido particular pode ser utilizado para clonar ADN genómico que codifica esse polipéptido, de acordo com técnicas estabelecidas. Uma porção do ADN genómico que codifica um polipéptido particular pode ser eliminada ou substituída por outro gene, tal como um gene que codifica um marcador seleccionável, que pode ser utilizado para monitorar a integração. Tipicamente, são incluídas no vector várias quilobases de ADN flanqueador não alterado (em ambas as extremidades 5' e 3') [ver e.g., Thomas e Capecchi, *Cell*, 51:503 (1987) para uma descrição de vectores de recombinação homólogos]. O vector é introduzido numa linha de células estaminais embrionárias (e.g., por electroporação) e são seleccionadas as células nas quais o ADN introduzido se recombinau homologamente com o ADN endógeno [ver e.g., Li et al., *Cell*, 69:915 (1992)]. As células seleccionadas são depois injectadas num blastocisto de um animal (e.g., um ratinho ou rato) para formar quimeras de agregação [ver e.g., Bradley, em *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E.J. Robertson, ed. (IRL. Oxford, 1987), págs. 113-152]. Um embrião quimérico pode depois ser implantado num animal de acolhimento fêmea pseudo-grávida e o embrião é desenvolvido até ao termo para criar um animal "knockout". A progénie, albergando o ADN recombinado homologamente nas suas



células germinais, pode ser identificada por técnicas padrão e utilizada para criar animais nos quais todas as células do animal contêm o ADN recombinado homologamente. Os animais "knockout" podem ser caracterizados, por exemplo, pela sua capacidade de defesa contra certas condições patológicas e quanto ao seu desenvolvimento de condições patológicas devido à ausência do polipéptido.

## **6. Terapia imunoadjuvante**

Numa concretização, compostos do invento com um efeito imunoestimulante podem ser utilizados em terapia imunoadjuvante para o tratamento de tumores (cancro). Está agora bem estabelecido que células T reconhecem antigénios específicos de tumores humanos. Um grupo de antigénios tumorais, codificados pelas famílias de genes MAGE, BAGE e GAGE, estão silenciosos em todos os tecidos normais de adulto, mas são expressos em quantidades significativas em tumores, tais como melanomas, tumores do pulmão, tumores de cabeça e pescoço e carcinomas da bexiga. DeSmet, C. et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:7149. Foi mostrado que a co-estimulação de células T induz a regressão do tumor e uma resposta antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo*. Melero, I. et al., *Nature Medicine* (1997) 3:682; Kwon, E.D. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) 94:8099; Lynch, D.H. et al., *Nature Medicine* (1997) 3:625; Finn, O.J. e Lotze, M.T., *J. Immunol.* (1998) 21:114. Os compostos estimulantes do invento podem ser administrados como adjuvantes, sozinhos ou em conjunto com um agente regulador do crescimento, um agente citotóxico ou um agente quimioterapêutico, para estimular a proliferação/ativação de células T e uma resposta antitumoral a antigénios tumorais. O agente regulador do crescimento, citotóxico ou quimioterapêutico pode ser administrado em quantidades convencionais utilizando regimes de administração conhecidos. A actividade imunoestimulante dos compostos do invento permite quantidades reduzidas dos agentes de regulação do crescimento, citotóxicos ou quimioterapêuticos, diminuindo desse modo potencialmente a toxicidade para o paciente.

O cancro é caracterizado pelo aumento no número de células anormais ou neoplásicas, derivadas de um tecido normal que proliferam para formar uma massa tumoral, pela invasão de tecidos adjacentes por estas células tumorais neoplásicas, e pela geração de células malignas que eventualmente se espalham através do sangue ou do sistema linfático, para nódulos

linfáticos regionais e para locais distantes (metástase). Num estado canceroso, uma célula prolifera sob condições nas quais as células normais não cresceriam. O cancro manifesta-se ele próprio numa vasta variedade de formas, caracterizadas por diferentes graus de invasão e agressividade.

A alteração da expressão génica está intimamente relacionada com o crescimento celular descontrolado e indiferenciação, que são uma característica comum de todos os cancros. Tem-se constatado que os genomas de certos tumores bem estudados apresentam uma expressão diminuída de genes recessivos, usualmente designados por genes de supressão tumoral, que normalmente funcionariam para impedir o crescimento de células malignas, e/ou a sobre-expressão de certos genes dominantes, tais como os oncogenes, que actuam para promover o crescimento maligno. Cada uma destas alterações genéticas parece ser responsável pela importação de algumas das ameaças que, como um todo, representam o fenótipo neoplásico completo (Hunter, *Cell* 64, 1129 [1991]; Bishop, *Cell* 64, 235-248 [1991]).

Um mecanismo bem conhecido da sobre-expressão génica (e.g. oncogene) em células de cancro é a amplificação génica. Este é um processo onde, no cromossoma na célula ancestral, são produzidas múltiplas cópias de um gene particular. O processo envolve a replicação não programada da região de cromossoma compreendendo o gene, seguida por recombinação dos segmentos replicados de novo para o cromossoma (Alitalo et al., *Adv. Cancer Res.* 47, 235-281 [1986]). Crê-se que a sobre-expressão do gene está em paralelo com a amplificação do gene, i.e. é proporcional ao número de cópias efectuado.

Foram identificados proto-oncogenes que codificam factores de crescimento e receptores de factor de crescimento que desempenham papéis importantes na patogénese de várias malignidades humanas, incluindo cancro da mama. Por exemplo, constatou-se que o gene ErbB2 humano (*erbB2*, também conhecido por *her2* ou *c-erbB-2*), que codifica um receptor de glicoproteína transmembranar de 185 kd (p185<sup>HER3</sup>, HER2) relacionado com o receptor de factor de crescimento epidérmico (EGFR), é sobre-expresso em cerca de 25% a 30% dos cancros da mama (Slamon et al., *Science* 235:177-182 [1987]; Slamon et al., *Science* 244:707-712 [1989]).

Foi recentemente noticiado que a amplificação génica de um proto-oncogene é um evento tipicamente envolvido nas formas mais malignas de cancro, e podia actuar como indicativo do desfecho clínico (Schwab et al., *Genes Chromosomes Cancer* 1, 181-193 [1990]; Alitalo et al., *supra*). Assim, a sobre-expressão de *erbB2* é normalmente encarada como indicativa de um prognóstico reservado, especialmente em pacientes com doença primária envolvendo nódulos linfáticos axilares (Slamon et al., [1987] e [1989], *supra*; Ravdin e Chamness, *Gene* 159:19-27 [1995]; e Hynes e Stem, *Biochim. Biophys. Acta* 1198:165-184 [1994]), e tem sido associada a sensibilidade e/ou resistência a regimes de terapia hormonal e quimioterapêuticos, incluindo CMF (ciclofosfamida, metotrexato e fluorouracilo) e antraciclinas (Baselga et al., *Oncology* 11(3 Supl 1):43-48 [1997]). Contudo, apesar da associação da sobre-expressão de *erbB2* a um prognóstico reservado, as probabilidades de pacientes HER2-positivos responderem clinicamente a tratamento com taxanos eram três vezes superiores às de pacientes HER2-negativos (*Ibid.*). Um anticorpo monoclonal recombinante humanizado anti-ErbB2 (anti-HER2) (uma versão humanizada do anticorpo murino anti-ErbB2, 4D5, denominada rhuMab HER2 ou Herceptin<sup>7</sup>) tem sido clinicamente activo em pacientes com cancros da mama metastáticos, que sobre-expressam ErbB2, que tinham recebido previamente extensa terapia anticancerosa. (Baselga et al., *J. Clin. Oncol.* 14:737-744 [1996]).

## **7. Ensaios de rastreio para candidatos a fármacos**

São concebidos ensaios de rastreio para candidatos a fármacos para identificar compostos que se ligam ou complexam com os polipéptidos codificados pelos genes aqui identificados, ou um seu fragmento biologicamente activo fragmento, ou que de outro modo interferem com a interacção dos polipéptidos codificados com outras proteínas celulares. Estes ensaios de rastreio incluirão ensaios utilizáveis em rastreio de elevado rendimento de bibliotecas químicas, tornando-os particularmente adequados para identificação de candidatos a fármacos de moléculas pequenas. Moléculas pequenas contempladas incluem compostos sintéticos orgânicos ou inorgânicos, incluindo péptidos, preferivelmente péptidos solúveis, fusões de (poli)péptido-imunoglobulina, e, em particular, anticorpos incluindo, sem limitação, anticorpos policlonais e monoclonais e fragmentos de anticorpo, anticorpos de cadeia simples, anticorpos anti-idiotípicos, e

versões quiméricas ou humanizadas destes anticorpos ou fragmentos, bem como anticorpos e fragmentos de anticorpo humanos. Os ensaios podem ser realizados numa variedade de formatos, incluindo ensaios de ligação proteína-proteína, ensaios de rastreio bioquímicos, imunoensaios e ensaios baseados em células, que estão bem caracterizados na especialidade.

Todos os ensaios são comuns pelo facto de envolverem o contacto do candidato a fármaco com um polipéptido codificado por um ácido nucleico aqui identificado sob condições e durante um tempo suficiente para permitir que estes dois componentes interactuem.

Em ensaios de ligação, a interacção é a ligação e o complexo formado pode ser isolado ou detectado na mistura reaccional. Numa concretização particular, o polipéptido codificado pelo gene aqui identificado ou o candidato a fármaco é imobilizado sobre uma fase sólida, e.g., sobre uma placa de microtitulação, por ligações covalentes ou não covalentes. A ligação não covalente é geralmente realizada por revestimento da superfície sólida com uma solução do polipéptido e secagem. Alternativamente, pode-se utilizar um anticorpo imobilizado, e.g. um anticorpo monoclonal, específico para o polipéptido a imobilizar, para o ancorar a uma superfície sólida. O ensaio é realizado por adição do componente não imobilizado, que pode estar marcado por um marcador detectável, ao componente imobilizado, e.g., a superfície revestida contendo o componente ancorado. Quando a reacção está completa, removem-se os componentes não reagidos, e.g. por lavagem, e detectam-se os complexos ancorados sobre a superfície sólida. Quando o componente originalmente não imobilizado transporta um marcador detectável, a detecção do marcador imobilizado sobre a superfície indica que a complexação ocorreu. Quando o componente originalmente não imobilizado não transporta um marcador, a complexação pode ser detectada, por exemplo, utilizando um anticorpo marcado que se liga especificamente ao complexo imobilizado.

Se o composto candidato interactua mas não se liga a uma proteína particular codificada por um gene aqui identificado, a sua interacção com essa proteína pode ser ensaiada por métodos bem conhecidos para detecção de interacções proteína-proteína. Estes ensaios incluem abordagens tradicionais, tais como, ligação cruzada, co-imunoprecipitação e co-purificação

através de gradientes ou colunas cromatográficas. Para além disso, as interações proteína-proteína podem ser monitoradas utilizando um sistema genético baseado em leveduras descrito por Fields e colaboradores [Fields e Song, *Nature* (London) 340, 245-246 (1989); Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9578-9582 (1991)] como revelado por Chevray e Nathans [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5789-5793 (1991)]. Muitos activadores da transcrição, tais como GAL4 de levedura, consistem em dois domínios modulares fisicamente distintos, um que actua como o domínio de ligação ao ADN, enquanto o outro funciona como o domínio de activação da transcrição. O sistema de expressão de levedura descrito nas publicações precedentes (geralmente designado pelo "sistema de dois híbridos") tira vantagem desta propriedade, e utiliza duas proteínas híbridas, uma em que a proteína alvo está fundida com o domínio de ligação de ADN de GAL4, e a outra em que as proteínas de activação do candidato estão fundidas com o domínio de activação. A expressão de um gene repórter GAL1-lacZ sob controlo de um promotor activado por GAL4 depende da reconstituição da actividade GAL4 através de interacção proteína-proteína. As colónias contendo polipéptidos interactuantes são detectadas com um substrato cromogénico para  $\beta$ -galactosidase. Um kit completo (MATCHMAKER™) para identificação de interações proteína-proteína entre duas proteínas específicas, utilizando a técnica dos dois híbridos, está disponível comercialmente na Clontech. Este sistema pode também ser alargado para mapear domínios de proteína envolvidos em interações de proteínas específicas bem como para assinalar resíduos de aminoácido que são cruciais para estas interações.

De modo a identificar compostos que interferem com a interacção de um gene aqui identificado e de modo a poderem ser testados outros componentes intracelulares ou extracelulares, prepara-se usualmente uma mistura reaccional contendo o produto génico e o componente intracelular ou extracelular, sob condições e durante um tempo que permitam a interacção e a ligação dos dois produtos. Para testar a capacidade de um composto de teste para inibir a ligação, a reacção é realizada na ausência e na presença do composto de teste. Adicionalmente, pode-se adicionar um placebo a uma terceira mistura reaccional, para servir como controlo positivo. A ligação (formação de complexo) entre o composto de teste e o componente intracelular ou extracelular presente na mistura é monitorada como acima descrito. A formação de um

complexo nas reacções de controlo, mas não na mistura reaccional contendo o composto de teste, indica que o composto de teste interfere na interacção do composto de teste com o seu parceiro de reacção.

## **8. Composições e métodos para o tratamento de doenças imuno-relacionadas**

As composições úteis no tratamento de doenças imuno-relacionadas incluem, sem limitação, anticorpos, moléculas pequenas orgânicas e inorgânicas, péptidos, fosfopéptidos, moléculas anti-sentido e de ribozima, moléculas de hélice tripla, etc., que inibem ou estimulam a função imunitária, por exemplo, proliferação/activação de células T, libertação de linfoquina, ou infiltração de células imunitárias.

Por exemplo, moléculas de ARN e de ARN anti-sentido actuam para bloquear directamente a tradução de ARNm hibridando com o ARNm pretendido e impedindo a tradução das proteínas. Quando se utiliza ADN anti-sentido, preferem-se oligodesoxirribonucleótidos obtidos a partir do local de início da tradução, e.g., entre cerca de -10 e +10 posições da sequência de nucleótidos do gene alvo.

As ribozimas são moléculas de ARN enzimáticas capazes de catalisar a clivagem específica de ARN. As ribozimas actuam por hibridação específica da sequência com o ARN alvo complementar, seguida por clivagem endonucleolítica. Locais específicos de clivagem para ribozima, dentro de um alvo de ARN potencial, podem ser identificados por técnicas conhecidas. Para mais detalhes, ver e.g. Rossi, *Current Biology* 4, 469-471 (1994), e publicação PCT N.º WO 97/33551 (publicada em 18 de Setembro de 1997).

As moléculas de ácido nucleico com formação em hélice tripla, utilizadas para inibir a transcrição, deverão ser de cadeia simples e compostas por desoxinucleótidos. A composição de base destes oligonucleótidos é concebida de modo promover a formação da hélice tripla através das regras de emparelhamento de bases de Hoogsteen, que geralmente requerem extensões bastante grandes de purinas ou pirimidinas numa cadeia de um dúplex. Para mais detalhes ver, e.g. publicação PCT N.º WO 97/33551, *supra*.

Estas moléculas podem ser identificadas por qualquer um ou por qualquer combinação dos ensaios de rastreio acima descritos e/ou por quaisquer outras técnicas de rastreio bem conhecidas dos peritos na especialidade.

## **9. Anticorpos**

Entre os candidatos a fármacos mais promissores, de acordo com o presente invento, incluem-se anticorpos e fragmentos de anticorpo que podem inibir (antagonistas) ou estimular (agonistas) a proliferação de células T, a infiltração de leucócitos, etc. Exemplos de anticorpos incluem anticorpos policlonais, monoclonais, humanizados, biespecíficos e heteroconjugados.

### **a. Anticorpos policlonais**

Os métodos de preparação de anticorpos policlonais são conhecidos do técnico especialista. Os anticorpos policlonais podem ser criados num mamífero, por exemplo, por uma ou mais injeções de um agente de imunização, e, se desejado, de um adjuvante. Tipicamente, o agente de imunização e/ou adjuvante serão injectados no mamífero por múltiplas injeções subcutâneas ou intraperitoneais. O agente de imunização pode incluir o polipéptido PRO301, PRO362 ou PRO245 do invento ou uma sua proteína de fusão. Pode ser útil conjugar o agente de imunização a uma proteína conhecida como imunogénica no mamífero que está a ser imunizado. Exemplos destas proteínas imunogénicas incluem mas não estão limitadas a hemocianina de lapa *Fissurella*, albumina de soro, tiroglobulina de bovino e inibidor de tripsina de soja. Exemplos de adjuvantes que podem ser utilizados incluem adjuvante completo de Freund e adjuvante MPL-TDM (monofosforil-Lípido A, dicorinomicolato de trealose sintético). O protocolo de imunização pode ser seleccionado por um perito na especialidade sem a indevida experimentação.

### **b. Anticorpos monoclonais**

Anticorpos que reconhecem e se ligam aos polipéptidos do invento, ou que actuam como seus antagonistas, podem ser alternativamente anticorpos monoclonais. Podem-se preparar anticorpos monoclonais utilizando métodos de hibridoma, tais como os descritos por Kohler e Milstein, *Nature*, 256:495

(1975). Num método de hibridoma, um ratinho, *hamster* ou outro animal hospedeiro apropriado, é tipicamente imunizado com um agente de imunização para induzir linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que se ligarão especificamente ao agente de imunização. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*.

O agente de imunização incluirá tipicamente o polipéptido PRO301, PRO362 ou PRO245 do invento, um seu fragmento antigénico ou uma sua proteína de fusão. Geralmente, utilizam-se linfócitos de sangue periférico (PBL) se se desejam células de origem humana, ou células de baço ou células de nódulo linfático se se desejam fontes não humanas. Os linfócitos são depois fundidos com uma linha de células imortalizada utilizando um agente de fusão adequado, tal como polietilenoglicol, para formar uma célula de hibridoma [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. Academic Press. (1986) págs. 59-103]. As linhas de células imortalizadas são usualmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma com origem em roedor, bovino e humano. Usualmente, utilizam-se linhas de células de mieloma de rato ou ratinho. As células de hibridoma podem ser cultivadas num meio de cultura adequado que preferivelmente contém uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou a sobrevivência das células imortalizadas não fundidas. Por exemplo, se as células parentais são deficientes na enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas incluirá tipicamente hipoxantina, aminopterina e timidina ("meio HAT"), substâncias que impedem o crescimento de células deficientes em HGPRT.

Linhas de células imortalizadas preferidas são aquelas que se fundem eficientemente, suportam a expressão estável de anticorpo, com um nível elevado, pelas células produtoras de anticorpo seleccionadas, e são sensíveis a um meio tal como meio HAT. Linhas de células imortalizadas mais preferidas são as linhas de mieloma murino, que podem ser obtidas, por exemplo, no Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Califórnia e na American Type Culture Collection. Rockville, Maryland. Foram também descritas linhas de células de mieloma humano e de heteromieloma de ratinho-humano para a produção de anticorpos monoclonais humanos [Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody*



*Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker. Inc., New York. (1987) págs. 51-63].

O meio de cultura no qual as células de hibridoma são cultivadas pode ser depois ensaiado quanto à presença de anticorpos monoclonais dirigidos contra o polipéptido do invento ou possuindo actividade similar ao polipéptido do invento. Preferivelmente, a especificidade de ligação de anticorpos monoclonais produzidos pelas células de hibridoma é determinada por imunoprecipitação ou por um ensaio de ligação *in vitro*, tal como radioimunoensaio (RIA) ou ensaio de imunossorvente com enzima ligada (ELISA). Estas técnicas e ensaios são conhecidos na especialidade. A afinidade de ligação do anticorpo monoclonal pode ser determinada, por exemplo, pela análise Scatchard de Munson e Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Após serem identificadas as células de hibridoma desejadas, os clones podem ser subclonados por procedimentos de diluição limitante e cultivados por métodos padrão [Goding, *supra*]. Meios de cultura adequados para este propósito incluem, por exemplo. Meio de Eagle Modificado por Dulbecco e meio RPMI-1640. Alternativamente, as células de hibridoma podem ser cultivadas *in vivo* na forma de ascites num mamífero.

Os anticorpos monoclonais segregados pelos subclones podem ser isolados ou purificados a partir do meio de cultura ou de fluido ascítico por procedimentos convencionais de purificação de imunoglobulina, tais como, por exemplo, proteína A-Sepharose, cromatografia de hidroxapatite, electroforese em gel, diálise ou cromatografia de afinidade.

Os anticorpos monoclonais podem também ser preparados por métodos de ADN recombinante, tais como os descritos na Patente dos E.U.A. N.º 4 816 567. Os ADN que codificam os anticorpos monoclonais do invento podem ser facilmente isolados e sequenciados utilizando procedimentos convencionais (*e.g.*, utilizando sondas oligonucleotídicas que são capazes de se ligarem especificamente a genes codificando as cadeias pesada e leve de anticorpos murinos). As células de hibridoma do invento servem como uma fonte preferida deste ADN. Uma vez isolado, o ADN pode ser colocado em vectores de expressão, que são depois transfectados para células hospedeiras, tais como células COS de símio, células de ovário de *hamster* chinês (CHO) ou células de mieloma, que de outro modo não produzem

proteína imunoglobulina, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. O ADN pode também ser modificado, por exemplo, utilizando a sequência de codificação para os domínios constantes de cadeia pesada e leve humanas em substituição das sequências homólogas de murino [Patente dos E.U.A. N.º 4 816 567; Morrison *et al.*, *supra*], ou ligando covalentemente à sequência de codificação da imunoglobulina a totalidade ou parte da sequência de codificação de um polipéptido que não imunoglobulina. Um tal polipéptido que não imunoglobulina pode ser utilizado em substituição dos domínios constantes de um anticorpo do invento, ou pode ser utilizado em substituição dos domínios variáveis de um local de combinação de antigénio de um anticorpo do invento para criar um anticorpo bivalente quimérico.

Os anticorpos são preferivelmente anticorpos monovalentes. São bem conhecidos na especialidade métodos para a preparação de anticorpos monovalentes. Por exemplo, um método envolve a expressão recombinante da cadeia pesada modificada e da cadeia leve de imunoglobulina. A cadeia pesada está truncada geralmente em qualquer ponto na região Fc de modo a impedir a reticulação da cadeia pesada. Alternativamente, os resíduos cisteína relevantes são substituídos por outro resíduo de aminoácido ou são eliminados de modo a prevenir a reticulação.

Os métodos *in vitro* são também adequados para preparação de anticorpos monovalentes. A digestão de anticorpos para produzir seus fragmentos, particularmente fragmentos Fab, pode ser efectuada utilizando técnicas de rotina conhecidas na especialidade.

### ***c. Anticorpos humanos e humanizados***

Os anticorpos do invento podem compreender adicionalmente anticorpos humanizados ou anticorpos humanos. As formas humanizadas de anticorpos não humanos (*e.g.*, de murino) são imunoglobulinas quiméricas, cadeias de imunoglobulina ou seus fragmentos (tais como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> ou outras subsequências de anticorpos de ligação a antigénio) que contêm uma sequência mínima derivada de imunoglobulina não humana. Anticorpos humanizados incluem imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor) nas quais resíduos de uma região determinante complementar (CDR) do receptor estão substituídos

por resíduos de uma CDR de uma espécie não humana (anticorpo doador), tal como ratinho, rato ou coelho, possuindo a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Em alguns casos, resíduos estruturais de Fv da imunoglobulina humana estão substituídos por resíduos não humanos correspondentes. Os anticorpos humanizados podem também compreender resíduos que não se encontram nem no anticorpo receptor nem nas sequências CDR ou estruturais importadas. Em geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente a totalidade de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, nos quais a totalidade ou substancialmente a totalidade das regiões CDR correspondem às de uma imunoglobulina não humana e a totalidade ou substancialmente a totalidade das regiões FR são as de uma sequência de consenso de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado compreenderá também optimamente pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de uma imunoglobulina humana [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)].

Métodos para humanização de anticorpos não humanos são bem conhecidos na especialidade. Geralmente, um anticorpo humanizado possui um ou mais resíduos de aminoácido nele introduzidos a partir de uma fonte que é não humana. Estes resíduos de aminoácido não humanos são frequentemente referidos por resíduos de "importação", que são tipicamente retirados de um domínio variável de "importação". A humanização pode ser essencialmente realizada de acordo com o método de Winter e colaboradores (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)], utilizando CDR ou sequências CDR de roedor em substituição das sequências correspondentes de um anticorpo humano. Deste modo, estes anticorpos "humanizados" são anticorpos quiméricos (Patente dos E.U.A. N.º 4 816 567), onde substancialmente menos do que um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente de uma espécie não humana. Na prática, anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos nos quais alguns resíduos de CDR, e possivelmente alguns resíduos de FR estão substituídos por resíduos de locais análogos em anticorpos de roedor.

Anticorpos humanos podem também se produzidos utilizando várias técnicas conhecidas na especialidade, incluindo

bibliotecas de exibição em fagos [Hoogenboom e Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)]. As técnicas de Cole et al. e de Boerner et al. estão também disponíveis para a preparação de anticorpos monoclonais humanos (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pág. 77 (1985); Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991); patente dos E.U.A. N.º 5 750 373]. Similarmente, anticorpos humanos podem ser preparados introduzindo loci de imunoglobulina humana em animais transgênicos, e.g., ratinhos, cujos genes de imunoglobulina endógenos foram parcialmente ou completamente inactivados. Por provocação, observa-se a produção de anticorpos humanos, que se assemelham em muito aos observados em humanos em todos os aspectos, incluindo rearranjo de genes, montagem e reportório de anticorpos. Esta abordagem é descrita, por exemplo, nas Patentes dos E.U.A. N.ºs 5 545 807; 5 545 806; 5 569 825; 5 625 126; 5 633 425; 5 661 016, e nas publicações científicas seguintes: Marks et al., *Bio/Technology* 10, 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); Lonberg e Huszar. *Intern. Rev. Immunol.* 13, 65-93 (1995).

#### **d. Anticorpos biespecíficos**

Os anticorpos biespecíficos são anticorpos monoclonais, preferivelmente humanos ou humanizados, que possuem especificidades de ligação para com pelo menos dois antígenos diferentes. No presente caso, uma das especificidades de ligação pode ser para com o polipéptido do invento, e a outra é para com qualquer outro antígeno e, preferivelmente, uma proteína ou receptor, ou subunidade de receptor, da superfície celular.

São conhecidos na especialidade métodos para preparação de anticorpos biespecíficos. Tradicionalmente, a produção recombinante de anticorpos biespecíficos é baseada na co-expressão de dois pares cadeia pesada/cadeia leve de imunoglobulina, onde as duas cadeias pesadas têm especificidades diferentes (Milstein e Cuello, *Nature*, 305:537-539 [1983]). Por causa da combinação aleatória das cadeias pesada e leve de imunoglobulina, estes hibridomas (quadromas) produzem uma mistura potencial de dez moléculas

anticorpo diferentes, das quais apenas uma tem a estrutura biespecífica correcta. A purificação da molécula correcta é usualmente realizada por passos de cromatografia de afinidade. Procedimentos similares são revelados em WO 93/08829, publicado em 13 de Maio de 1993 e em Traunecker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

Domínios variáveis de anticorpo com as especificidades de ligação desejadas (locais de combinação anticorpo-antigénio) podem ser fundidos com sequências de domínio constante de imunoglobulina. A fusão é preferivelmente com um domínio constante de cadeia pesada de imunoglobulina, compreendendo pelo menos parte das regiões charneira, CH2 e CH3. Prefere-se ter a primeira região constante de cadeia pesada (CH1), contendo o local necessário para ligação da cadeia leve, presente em pelo menos uma das fusões. Os ADN que codifica as fusões de cadeia pesada de imunoglobulina e, se desejado, a cadeia leve de imunoglobulina, são inseridos em vectores de expressão separados, e são co-transfectados num organismo hospedeiro adequado. Para mais detalhes sobre a geração de anticorpos biespecíficos ver, por exemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

#### **e. Anticorpos heteroconjugados**

Os anticorpos heteroconjugados são compostos por dois anticorpos ligados covalentemente. Estes anticorpos têm sido propostos, por exemplo, para direccionar células do sistema imunitário para células indesejadas [Patente dos E.U.A. N.º 4 676 980], e para tratamento de infecção por HIV [WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089]. Está contemplado que os anticorpos possam ser preparados *in vitro* utilizando métodos conhecidos na química da síntese de proteínas, incluindo métodos envolvendo agentes de reticulação. Por exemplo, podem-se construir imunotoxinas por utilização de uma reacção de permuta de dissulfureto ou por formação de uma ligação tioéter. Exemplos de reagentes adequados para este propósito incluem iminotiolato e 4-mercaptobutirimidato de metilo e os revelados, por exemplo, na Patente dos E.U.A. N.º 4 676 980.

#### **f. Manipulação da função efectora**

Pode ser desejável modificar o anticorpo do invento no que se refere à função efectora, de modo a melhorar a eficácia do anticorpo no tratamento de uma doença imuno-relacionada,

por exemplo. Por exemplo, podem ser introduzidos resíduos cisteína na região Fc, permitindo desse modo a formação de ligações dissulfureto intercadeias nesta região. O anticorpo homodimérico assim gerado pode ter capacidade de internalização melhorada e/ou morte celular mediada por complemento e citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) aumentadas. Ver Caron *et al.*, *J. Exp Med.* 176:1191-1195 (1992) e Shopes, B., *J. Immunol.* 148:2918-2922 (1992). Podem também ser preparados anticorpos homodiméricos com actividade antitumoral melhorada utilizando agentes de reticulação heterobifuncionais como descrito em Wolff *et al.*, *Cancer Research* 53:2560-2565 (1993). Alternativamente, pode-se construir por engenharia um anticorpo que tenha regiões Fc duplas e que possa por isso ter capacidades melhoradas de lise de complemento e de ADCC. Ver Stevenson *et al.*, *Anti-Cancer Drug Design*, 3:219-230 (1989).

#### **g. Imunoconjugados**

O invento refere-se também a imunoconjugados compreendendo um anticorpo conjugado com um agente citotóxico, tal como um agente quimioterapêutico, toxina (e.g. uma toxina enzimaticamente activa de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, ou seus fragmentos), ou com um isótopo radioactivo (*i.e.*, um radioconjugado).

Foram acima descritos agentes quimioterapêuticos úteis na geração destes imunoconjugados. Toxinas enzimaticamente activas e seus fragmentos que podem ser utilizados, incluem cadeia A de difteria, fragmentos activos não ligantes de toxina da difteria, cadeia A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia A de ricina, cadeia A de abrina, cadeia A de modecina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII e PAP-S), inibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogilina, restrictocina, fenomicina, enomicina e os tricotecenos. Estão disponíveis vários radionuclídeos para a produção de anticorpos radioconjugados. Exemplos incluem <sup>212</sup>Bi, <sup>131</sup>I, <sup>131</sup>In, <sup>90</sup>Y e <sup>126</sup>Re.

Os conjugados do anticorpo e agente citotóxico são preparados utilizando uma variedade de agentes de acoplamento de proteínas bifuncionais tais como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados

bifuncionais de imidoésteres (tais como adipimidato de dimetilo.HCl), ésteres activos (tais como suberato de di-succinimidilo), aldeídos (tais como glutaraldeído), compostos de bis-azido (tais como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazónio (tais como bis-(p-diazoniobenzoil)etilenodiamina), di-isocianatos (tais como 2,6-di-isocianato-tolueno) e compostos de flúor bis-activos (tais como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por exemplo, uma imunotoxina de ricina pode ser preparada como descrito em Vitetta et al., *Science* 238: 1098 (1987). O ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietilenotriaminapenta-acético marcado com carbono 14 (MX-DTPA) é um exemplo de um agente quelante para conjugação de radionucleótidos ao anticorpo. Ver WO94/11026.

Noutra concretização, o anticorpo pode ser conjugado com um "receptor" (tal como estreptavidina), para utilização no pré-direccionamento a tecidos, onde o conjugado de anticorpo-receptor é administrado ao paciente, seguindo-se a remoção do conjugado não ligado da circulação utilizando um agente de depuração e depois administração de um "ligando" (e.g. avidina) que está conjugado com um agente citotóxico (e.g. um radionucleótido).

#### ***h. Imunolipossomas***

As proteínas, anticorpos, etc. aqui revelados podem ser formulados como imunolipossomas. Os lipossomas contendo o anticorpo são preparados por métodos conhecidos na especialidade, tal como descrito em Epstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688 (1985); Hwang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4030 (1980); e Patentes dos E.U.A. N.ºs 4 485 045 e 4 544 545. Na Patente dos E.U.A. N.º 5 013 556 são revelados lipossomas com tempo na circulação aumentado.

Lipossomas particularmente úteis podem ser gerados pelo método de evaporação de fase inversa com uma composição de lípido compreendendo fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina derivatizada com PEG (PEG-PE). Os lipossomas são extrudidos através de filtros de tamanho de poro definido para produzir lipossomas com o diâmetro desejado. Fragmentos Fab' do anticorpo do presente invento podem ser conjugados com os lipossomas como descrito em Martin et al., *J. Biol. Chem.* 257: 286-288 (1982) através de uma

reação de permuta de dissulfureto. Um agente quimioterapêutico (tal como doxorubicina) pode estar opcionalmente contido dentro do lipossoma. Ver Gabizon *et al.*, *J. National Cancer Inst.* 81(19) 1484 (1989).

#### **10. Composições farmacêuticas**

As moléculas activas do invento, polipéptidos e anticorpos, bem como outras moléculas identificadas pelos ensaios de rastreio acima revelados, podem ser administradas para o tratamento de doenças inflamatórias, na forma de composições farmacêuticas.

Preparam-se formulações terapêuticas da molécula activa, preferivelmente um anticorpo contra PRO245 do invento, para armazenamento, por mistura da molécula activa com o grau de pureza desejado com transportadores, excipientes ou estabilizantes farmacêuticamente aceitáveis opcionais (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16.<sup>a</sup> Edição, Osol, A. Ed. [1980]), na forma de formulações liofilizadas ou de soluções aquosas. Os transportadores, excipientes ou estabilizantes aceitáveis são não tóxicos para os beneficiários nas dosagens e concentrações utilizadas, e incluem tampões tais como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes, incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de octadecildimetilbenzilamónio; cloreto de hexametónio; cloreto de benzalcónio, cloreto de benzetónio; fenol; álcool butílico ou benzílico; alquilparabenos tais como metilparabeno ou propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipéptidos de baixo peso molecular (menos do que cerca de 10 resíduos), proteínas, tais como albumina de soro, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrófilos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina ou lisina; monossacáridos, dissacáridos e outros hidratos de carbono incluindo glucose, manose ou dextrinas; agentes quelantes tais como EDTA; açúcares tais como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; contra-íões formadores de sal tais como sódio; complexos de metal (e.g. complexos de Zn-proteína); e/ou tensioactivos não iónicos tais como TWEEN™, PLURONICS™ ou polietilenoglicol (PEG).

Os compostos identificados pelos ensaios de rastreio do presente invento podem ser formulados de um modo análogo, utilizando técnicas padrão bem conhecidas na especialidade.



Podem-se também utilizar lipofecções ou lipossomas para entregar o polipéptido, anticorpo, ou um fragmento de anticorpo, às células. Quando se utilizam fragmentos de anticorpo, prefere-se o fragmento inibidor mais pequeno que especificamente se liga ao domínio de ligação da proteína alvo. Por exemplo, com base nas sequências da região variável de um anticorpo, podem-se conceber moléculas de péptidos que mantêm a capacidade de se ligarem à sequência da proteína alvo. Estes péptidos podem ser sintetizados quimicamente e/ou produzidos por tecnologia de ADN recombinante (ver, e.g. Marasco *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7889-7893 [1993]).

A formulação aqui referida pode também conter mais do que um composto activo, conforme necessário para a indicação particular que está a ser tratada, preferivelmente aqueles com actividades complementares que não se afectam adversamente uns aos outros. Alternativamente, ou para além disso, a composição pode compreender um agente citotóxico, uma citoquina ou um agente inibidor de crescimento. Estas moléculas estão adequadamente presentes em combinação em quantidades que são eficazes para o fim em vista.

As moléculas activas podem também estar aprisionadas em microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial, por exemplo, hidroximetilcelulose ou microcápsulas de gelatina e microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, em sistemas coloidais de entrega de fármacos (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Estas técnicas são divulgadas em *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16.<sup>a</sup> Edição. Osol, A. Ed. (1980).

As formulações para serem utilizadas para administração *in vivo* têm de ser estéreis. Isto é facilmente conseguido por filtração através de membranas de filtração asséptica.

Podem ser preparadas formulações de libertação sustentada. Exemplos adequados de preparações de libertação sustentada incluem matrizes semi-permeáveis de polímeros hidrófobos sólidos contendo o anticorpo, matrizes que estão na forma de artigos com uma determinada forma, e.g. películas, ou de microcápsulas. Exemplos de matrizes de libertação

sustentada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato), ou poli(álcool vinílico)), polilactidos (Patente dos E.U.A. N.º 3 773 919), copolímeros de ácido L-glutâmico e L-glutamato de etilo  $\gamma$ , copolímeros não degradáveis de etileno-acetato de vinilo, copolímeros degradáveis de ácido láctico-ácido glicólico tais como o LUPRON DEPOT™ (microesferas injectáveis compostas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolida), e poli(ácido D-(-)-3-hidroxibutírico). Embora polímeros tais como etileno-acetato de vinilo e ácido láctico-ácido glicólico permitam a libertação de moléculas durante mais de 100 dias, certos hidrogéis libertam proteínas durante períodos de tempo mais curtos. Quando anticorpos encapsulados permanecem no corpo durante um período longo, podem-se desnaturar ou agregar como resultado de exposição a humidade a 37°C, resultando numa perda de actividade biológica e em possíveis alterações em imunogenicidade. Podem ser idealizadas estratégias racionais para estabilização dependendo do mecanismo envolvido. Por exemplo, se se constata que o mecanismo de agregação é a formação intermolecular de ligações S-S através da permuta de tiodissulfureto, a estabilização pode ser conseguida por modificação de resíduos sulfidrílo, liofilização a partir de soluções ácidas, controlo do teor em humidade, utilização de aditivos apropriados, e desenvolvimento de composições específicas de matriz polimérica.

## **II. Métodos de tratamento**

É contemplado que os polipéptidos, anticorpos e outros compostos activos do presente invento possam ser utilizados para tratar várias doenças e condições inflamatórias, tais como doenças mediadas por células T, incluindo doenças caracterizadas por infiltração de células leucocitárias num tecido, estimulação da proliferação de células T, inibição da proliferação de células T, permeabilidade vascular aumentada ou diminuída ou a sua inibição.

Os compostos aqui revelados e na WO99/27098 (e.g., PRO301, PRO362, PRO245) codificam novos membros de uma família de proteínas caracterizada por homologia em relação ao antígeno A33. A natureza pró-inflamatória dos compostos do invento é indicada nos ensaios *in vitro* adiante.

As proteínas codificadas pelos compostos DNA40628, DNA45416 e DNA35638 aqui revelados e na WO99/27088 [(SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:9), respectivamente], partilham homologia com identidade com a molécula de adesão de junção (JAM), Martin-Padura *et al.*, *J. Cell Biol.* 1998 142(1): 117-27.

A JAM está envolvida no recrutamento de monócitos em resposta a MCP-1, MCP-3 e LPS *in vivo*. Os anticorpos contra a JAM bloqueiam a transmigração de monócitos *in vivo*. A JAM está localizada nos epitélios e endotélios murinos como uma molécula de adesão de junção para transmigração de monócitos. Outros leucócitos podem também utilizar a JAM, mas nenhuma informação suporta esta noção. A JAM está elevada no cólon de ratinhos com colite e desempenha provavelmente um papel no recrutamento de monócitos ou leucócitos na lesão do cólon.

Exemplos de condições ou desordens a tratar com os polipéptidos, anticorpos e outros compostos do invento, incluem, mas não estão limitadas a, doença inflamatória do intestino (*i.e.*, colite ulcerosa, doença de Crohn), lúpus eritematoso sistémico, artrite reumatóide, artrite crónica juvenil, espondiloartropatias, esclerose sistémica (esclerodermia), miopatias inflamatórias idiopáticas (dermatomiosite, polimiosite), síndrome de Sjögren, vasculite sistémica, sarcoidose, anemia hemolítica auto-imune (pancitopenia imune, hemoglobínúria paroxística nocturna), trombocitopenia auto-imune (púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia imunomediada), tiroidite (doença de Grave, tiroidite de Hashimoto, tiroidite linfocítica juvenil, tiroidite atrófica), diabetes *mellitus*, doença renal imunomediada (glomerulonefrite, nefrite túbulo-intersticial), doenças desmielinizantes dos sistemas nervosos central e periférico tais como esclerose múltipla, polineuropatia desmielinizante idiopática ou síndrome de Guillain-Barré, e polineuropatia desmielinizante inflamatória crónica, doenças hepatobiliares tais como hepatite infecciosa (hepatites A, B, C, D, E e outros vírus não hepatotrópicos), hepatite activa crónica auto-imune, cirrose biliar primária, hepatite granulomatosa e colangite esclerosante, doenças inflamatórias e fibróticas do pulmão tais como fibrose cística, enteropatia sensível ao glúten e doença de Whipple, doenças de pele auto-imunes ou mediadas imunitariamente incluindo doenças bolhosas de pele, eritema multiforme e dermatite de contacto, psoríase, doenças alérgicas tais como asma, rinite alérgica, dermatite

atópica, hipersensibilidade a alimentos e urticária, doenças imunológicas do pulmão tais como pneumonias eosinófilas, fibrose pulmonar idiopática e pneumonite de hipersensibilidade, doenças associadas a transplantação incluindo rejeição de transplantes e doença de enxerto-versus-hospedeiro.

No lúpus eritematoso sistémico, o mediador central da doença é a produção de anticorpos auto-reactivos em relação a proteínas/tecidos próprios e a subsequente geração de inflamação imunomediada. Os anticorpos medeiam, quer directamente quer indirectamente, lesões de tecido. Ainda que não tenha sido mostrado que os linfócitos T estão directamente envolvidos na danificação de tecido, os linfócitos T são requeridos para o desenvolvimento de anticorpos auto-reactivos. A génese da doença está assim dependente dos linfócitos T. São afectados clinicamente múltiplos órgãos e sistemas, incluindo rim, pulmão, sistema musculo-esquelético, mucocutâneo, olho, sistema nervoso central, sistema cardiovascular; tracto gastrintestinal, medula óssea e sangue.

A artrite reumatóide (AR) é uma doença inflamatória auto-imune sistémica crónica que envolve principalmente a membrana sinovial de múltiplas articulações com lesão resultante na cartilagem articular. A patogénese está dependente de linfócitos T e está associada à produção de factores reumatóides, auto-anticorpos dirigidos contra IgG própria, com a formação resultante de imunocomplexos que atingem níveis elevados no fluido articular e no sangue. Estes complexos na articulação podem induzir a infiltração acentuada de linfócitos e monócitos na sinóvia e as alterações sinoviais acentuadas subsequentes; o espaço/fluido da articulação é infiltrado por células similares com a adição de numerosos neutrófilos. Os tecidos afectados são principalmente as articulações, frequentemente com um padrão simétrico. No entanto, ocorre também doença extra-articular em duas formas principais. Uma forma é o desenvolvimento de lesões extra-articulares com doença progressiva persistente da articulação e lesões típicas de fibrose pulmonar, vasculite e úlceras cutâneas. A segunda forma de doença extra-articular é a assim denominada síndrome de Felty que ocorre tardiamente no decurso da doença de AR, por vezes após a doença da articulação se ter tornado quiescente, e envolve a presença de neutropenia, trombocitopenia e esplenomegalia. Isto pode ser acompanhado por vasculite em múltiplos órgãos com formação de enfartes,

úlceras de pele e gangrena. Os pacientes desenvolvem também frequentemente nódulos reumatóides no tecido da subderme que cobre as articulações afectadas; numa fase tardia os nódulos possuem centros necróticos rodeados por um infiltrado misto de células inflamatórias. Outras manifestações que podem ocorrer na AR incluem: pericardite, pleurite, arterite coronária, pneumonite intersticial com fibrose pulmonar, queratoconjuntivite seca, e nódulos reumatóides.

A artrite crónica juvenil é uma doença inflamatória idiopática crónica que começa muitas vezes em idades inferiores aos 16 anos. O seu fenótipo tem algumas semelhanças com a AR; alguns pacientes com factor reumatóide positivo são classificados como tendo artrite reumatóide juvenil. A doença é subclassificada em três categorias principais: pauciarticular, poliarticular e sistémica. A artrite pode ser grave e é tipicamente destrutiva, e conduz a anquilose da articulação e a atraso de crescimento. Outras manifestações podem incluir uveíte anterior crónica e amiloidose sistémica.

As espondiloartropatias são um grupo de desordens com traços clínicos comuns e associação comum com a expressão do produto génico HLA-B27. As desordens incluem: espondilite anquilosante, síndrome de Reiter (artrite reactiva), artrite associada com doença inflamatória do intestino, espondilite associada com psoríase, espondiloartropatia de aparecimento juvenil e espondiloartropatia indiferenciada. Traços distintivos incluem sacroileite com ou sem espondilite; artrite assimétrica inflamatória; associação com HLA-B27 (um alelo definido serologicamente do locus HLA-B de MHC classe I); inflamação ocular, e ausência de auto-anticorpos associados com outras doenças reumatóides. A célula mais implicada como chave na indução da doença é o linfócito T CD8+, uma célula que direcciona o antigénio apresentado por moléculas de MHC classe I. As células T CD8+ podem reagir contra o alelo de MHC classe I HLA-B27 como se este fosse um péptido estranho expresso por moléculas de MHC classe I. Tem sido colocada a hipótese de um epítipo de HLA-B27 poder mimetizar um epítipo antigénico bacteriano, ou de qualquer outro microrganismo, e assim induzir uma resposta de células T CD8+.

A esclerose sistémica (esclerodermia) tem uma etiologia desconhecida. Um traço distintivo da doença é a induração da pele; isto é provavelmente induzido por um processo

inflamatório activo. A esclerodermia pode ser localizada ou sistémica; são comuns lesões vasculares e a lesão de células endoteliais na microvasculatura é um evento precoce e importante no desenvolvimento de esclerose sistémica; a lesão vascular pode ser imunomediada. Está implícita uma base imunológica, pela presença de infiltrados de células mononucleares nas lesões cutâneas e pela presença de anticorpos antinucleares em muitos pacientes. A ICAM-1 está frequentemente supra-regulada sobre a superfície celular de fibroblastos em lesões de pele, sugerindo que a interacção de células T com estas células pode ter um papel na patogénese da doença. Outros órgãos envolvidos incluem: o tracto gastrointestinal: atrofia do músculo liso e fibrose resultando em peristalse/motilidade anómalas; rim: proliferação da íntima subendotelial concêntrica afectando pequenas artérias arqueadas e inter-lobulares com fluxo sanguíneo cortical renal resultante reduzido, resulta em proteinúria, azotemia e hipertensão; músculo-esquelético: atrofia, fibrose intersticial; inflamação; pulmão: pneumonite intersticial e fibrose intersticial; e coração: necrose da banda de contracção, cicatrizes/fibrose.

As miopatias inflamatórias idiopáticas, incluindo dermatomiosite, polimiosite e outras, são desordens de inflamação crónica do músculo de etiologia desconhecida que resultam em fraqueza muscular. A lesão/inflamação do músculo é muitas vezes simétrica e progressiva. Estão associados auto-anticorpos à maioria das formas. Estes auto-anticorpos específicos de miólise são dirigidos contra e inibem a função de componentes, proteínas e ARN, envolvidos na síntese de proteínas.

A síndrome de Sjögren é devida a inflamação imunomediada e à destruição funcional subsequente das glândulas lacrimais e das glândulas salivares. A doença pode estar associada ou ser acompanhada por doenças inflamatórias do tecido conjuntivo. A doença está associada à produção de auto-anticorpos contra os antígenos Ro e La, que são ambos pequenos complexos de ARN-proteína. As lesões resultam em queratoconjuntivite seca, xerostomia, com outras manifestações ou associações incluindo cirrose biliar, neuropatia periférica ou sensorial, e púrpura palpável.

As vasculites sistémicas são doenças nas quais a lesão principal é a inflamação e danificação subsequente dos vasos

sanguíneos, o que resulta em isquemia/ necrose/degeneração de tecidos fornecidos pelos vasos afectados e em eventual disfunção dos órgãos finais em alguns casos. As vasculites podem também ocorrer como uma lesão ou sequela secundária de outras doenças inflamatórias imunomediadas tais como artrite reumatóide, esclerose sistémica, etc., particularmente em doenças também associadas à formação de imunocomplexos. Doenças no grupo principal da vasculite sistémica incluem: vasculite necrotizante sistémica, poliartrite nodosa, angeíte alérgica e granulomatose, poliangeíte, granulomatose de Wegener, granulomatose linfomatóide e artrite de células gigantes. Vasculites várias incluem: síndrome do nódulo linfático mucocutâneo (MLNS ou doença de Kawasaki), vasculite isolada do SNC, doença de Behet, tromboangeíte obliterante (doença de Buerger) e venulite necrotizante cutânea. Crê-se que o mecanismo patogénico da maioria dos tipos de vasculite listados é devido principalmente à deposição de complexos de imunoglobulina na parede do vaso e à indução subsequente de uma resposta inflamatória através de ADCC, de activação de complemento, ou de ambas.

A sarcoidose é uma condição de etiologia desconhecida que é caracterizada pela presença de granulomas epitelióides em praticamente qualquer tecido no corpo; o envolvimento do pulmão é muito comum. A patogénese envolve a persistência de macrófagos activados e de células linfóides nos locais da doença, com sequelas crónicas subsequentes resultantes da libertação de produtos localmente e sistemicamente activos libertados por esses tipos de células.

A anemia hemolítica auto-imune, incluindo anemia hemolítica auto-imune, pancitopenia imune e hemoglobinúria paroxística nocturna, é um resultado da produção de anticorpos que reagem com antigénios expressos sobre a superfície dos glóbulos vermelhos (e em alguns casos, também noutras células sanguíneas incluindo plaquetas) e é um reflexo da remoção dessas células revestidas de anticorpo através de lise mediada por complemento e/ou ADCC/mecanismos mediados por Fc-receptor.

Em trombocitopenia auto-imune, incluindo púrpura trombocitopénica, e trombocitopenia imunomediada, noutros cenários clínicos, a destruição/remoção de plaquetas ocorre como resultado da ligação de anticorpo ou de complemento a plaquetas e subsequente remoção por lise de complemento, ADCC ou mecanismos mediados por Fc-receptor.

A tiroidite, incluindo doença de Grave, tiroidite de Hashimoto, tiroidite linfocítica juvenil e tiroidite atrófica, é o resultado de resposta auto-imune contra antigénios da tiróide, com produção de anticorpos que reagem com proteínas presentes e muitas vezes específicas da glândula tiróide. Existem modelos experimentais incluindo modelos espontâneos: ratos (ratos BUF e BB) e galinhas (estirpe de galinhas obesas); e modelos indutíveis: imunização de animais com tiroglobulina ou antigénio microssómico da tiróide (peroxidase da tiróide).

A diabetes *mellitus* do tipo I, ou diabetes dependente de insulina é a destruição auto-imune de células  $\beta$  de ilhéu pancreático; esta destruição é mediada por auto-anticorpos e por células T auto-reactivas. Anticorpos para a insulina ou para o receptor de insulina podem também produzir o fenótipo de não responsividade à insulina.

Doenças renais imunomediadas, incluindo glomerulonefrite e nefrite túbulo-intersticial, são o resultado de lesão mediada por anticorpos ou linfócitos T no tecido renal, quer directamente como resultado da produção de células T ou de anticorpos auto-reactivos contra antigénios renais, quer indirectamente como resultado da deposição de anticorpos e/ou de imunocomplexos no rim que são reactivos contra outros antigénios não renais. Assim, outras doenças imunomediadas que resultam na formação de imunocomplexos podem também induzir doença renal imunomediada como uma sequela indirecta. Ambos os mecanismos imunitários directo e indirecto resultam em resposta inflamatória que produz/induz desenvolvimento de lesão em tecidos renais, com a resultante diminuição da função do órgão e, nalguns casos, progressão até à falência renal. Ambos os mecanismos imunitários humoral e celular podem estar envolvidos na patogénese de lesões.

Crê-se que doenças desmielinizantes dos sistemas nervosos central e periférico, incluindo esclerose múltipla; polineuropatia desmielinizante idiopática ou síndrome de Guillain-Barré, e polineuropatia desmielinizante inflamatória crónica, têm uma base auto-imune e resultam em desmielinização do nervo como resultado de danos causados a oligodendrócitos ou à mielina directamente. Na EM existe evidência para sugerir que a indução e a progressão da doença são dependentes de linfócitos T. A esclerose múltipla é uma doença



desmielinizante que é dependente de linfócitos T e que tem quer um curso recorrente-remitente quer um curso progressivo crónico. A etiologia é desconhecida; porém, infecções virais, predisposição genética, ambiente e auto-imunidade contribuem todos. As lesões contêm infiltrados de células microgliais, predominantemente mediadas por linfócitos T, e macrófagos infiltrantes; os linfócitos T CD4+ são o tipo de célula predominante nas lesões. O mecanismo de morte da célula de oligodendrócito, e subsequente desmielinização, não é conhecido mas é provavelmente guiado por linfócitos T.

Doenças do pulmão inflamatória e fibrótica, incluindo pneumonias eosinófilas, fibrose pulmonar idiopática e pneumonite de hipersensibilidade, podem envolver uma resposta imunoinflamatória desregulada. A inibição dessa resposta teria benefício terapêutico.

Doenças de pele auto-imunes ou imunomediadas, incluindo doenças bolhosas da pele, eritema multiforme e dermatite de contacto, são mediadas por auto-anticorpos, cuja génese é dependente de linfócitos T.

A psoríase é uma doença inflamatória mediada por linfócitos T. As lesões contêm infiltrados de linfócitos T, macrófagos e células de processamento de antígeno, e alguns neutrófilos.

As doenças alérgicas, incluindo asma; rinite alérgica; dermatite atópica; hipersensibilidade a alimentos; e urticária, são dependentes de linfócitos T. Estas doenças são predominantemente mediadas por inflamação induzida por linfócitos T, inflamação mediada por IgE ou uma combinação de ambas.

Doenças associadas a transplantação, incluindo rejeição de enxerto e doença de enxerto-versus-hospedeiro (GVHD) são dependentes de linfócitos T; a inibição da função de linfócitos T contribui para a melhoria.

Outras doenças em que a intervenção da resposta imunitária e/ou inflamatória tem benefícios são as doenças infecciosas incluindo, mas não limitadas a, infecções virais (incluindo mas não limitadas a SIDA, hepatites A, B, C, D, E) infecções bacterianas, infecções fúngicas e infecções por protozoários e parasitas (moléculas (ou derivados/agonistas)

que estimulam a MLR podem ser utilizadas terapeuticamente para melhorar a resposta imunitária a agentes infecciosos), doenças de imunodeficiência (moléculas/derivados/agonistas que estimulam a MLR podem ser utilizados terapeuticamente para melhorar a resposta imunitária para condições de imunodeficiência hereditárias, adquiridas, induzidas por infecção (como na infecção por HIV) ou iatrogénicas (i.e. tais como as resultantes de quimioterapia)), e neoplasia.

Foi demonstrado que alguns pacientes humanos de cancro desenvolvem uma resposta de anticorpos e/ou linfócitos T a antígenos em células neoplásicas. Foi também mostrado em modelos animais de neoplasia que uma melhoria da resposta imunitária pode resultar em rejeição ou regressão desse neoplasma particular. Moléculas que melhoram a resposta de linfócitos na MLR têm utilidade *in vivo* na melhoria da resposta imunitária contra neoplasia. Moléculas que melhoram a resposta proliferativa de linfócitos T na MLR (ou agonistas de molécula pequena ou anticorpos que afectaram o mesmo receptor de um modo agonista) podem ser utilizadas terapeuticamente para tratar o cancro. Moléculas que inibem a resposta de linfócitos na MLR funcionam também *in vivo* durante a neoplasia para suprimir a resposta imunitária a um neoplasma; estas moléculas podem ser expressas pelas próprias células neoplásicas ou a sua expressão pode ser induzida pelo neoplasma noutras células. Antagonismo destas moléculas inibidoras (com anticorpos, antagonistas de molécula pequena ou outros meios) melhora a rejeição do tumor imunomediada.

Adicionalmente, a inibição de moléculas com propriedades pró-inflamatórias pode ter benefício terapêutico em lesão de reperfusão; acidente vascular cerebral; enfarte do miocárdio; aterosclerose; lesão aguda do pulmão; choque hemorrágico; queimadura; sepsia/choque séptico; necrose tubular aguda; endometriose; doença articular degenerativa e pancreatite.

Os compostos de PRO245 do presente invento, e.g. anticorpos, são administrados a um mamífero, preferivelmente um ser humano, de acordo com métodos conhecidos, tais como administração intravenosa como um *bolus* ou por perfusão contínua durante um período de tempo, pelas vias intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutânea, intra-articular, intra-sinovial, intratecal, oral, tópica ou por inalação (intranasal, intrapulmonar). Prefere-se

a administração intravenosa ou inalada de polipéptidos e anticorpos.

Em terapia de imunoadjuvante, outros regimes terapêuticos, tais como administração de um agente anticanceroso, podem ser combinados com a administração das proteínas, anticorpos ou compostos do presente invento. Por exemplo, o paciente a ser tratado com os imunoadjuvantes do invento pode também receber um agente anticanceroso (agente quimioterapêutico) ou terapia de radiação. A preparação e os programas de dosagem para estes agentes quimioterapêuticos podem ser utilizados de acordo com as instruções dos fabricantes ou conforme determinado empiricamente pelo técnico especialista. A preparação e os programas de dosagem para esta quimioterapia estão também descritos em *Chemotherapy Service* Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992). O agente quimioterapêutico pode preceder, ou seguir-se à administração do imunoadjuvante ou pode ser dado simultaneamente com este. Adicionalmente, pode-se administrar um composto antiestrogénio tal como tamoxifeno ou uma antiprogesterona tal como onapristona (ver, EP 616 812) em dosagens conhecidas para estas moléculas.

Pode ser desejável administrar também anticorpos contra outros antigénios associados a doenças imunitárias ou associados a tumores, tais como anticorpos que se ligam a CD20, CD11a, CD18, ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4, ou factor endotelial vascular (VEGF). Alternativamente, ou adicionalmente, podem ser co-administrados ao paciente dois ou mais anticorpos que se ligam ao mesmo ou a dois ou mais antigénios diferentes aqui revelados. Por vezes, pode ser benéfico administrar também uma ou mais citocinas ao paciente. Numa concretização, os polipéptidos do invento são co-administrados com um agente inibidor de crescimento. Por exemplo, o agente inibidor de crescimento pode ser administrado primeiro, seguido por um polipéptido do invento. Contudo, é também contemplada a administração simultânea ou a administração em primeiro lugar de um polipéptido do invento. Dosagens adequadas para o agente inibidor de crescimento são aquelas presentemente utilizadas e podem ser diminuídas devido à acção combinada (sinergia) do agente inibidor de crescimento e do polipéptido do invento.

Para o tratamento ou redução na gravidade da doença imuno-relacionada, a dosagem apropriada de um composto do

invento dependerá do tipo de doença a ser tratada, como acima definida, da gravidade e do curso da doença, seja o agente administrado para fins preventivos ou terapêuticos, da terapia anterior, da história clínica do paciente e da resposta ao composto, e do critério do médico assistente. O composto é adequadamente administrado ao paciente de uma só vez ou durante uma série de tratamentos. Preferivelmente, é desejável determinar a curva dose-resposta e ensaiar a composição farmacêutica do invento primeiro *in vitro*, e depois em modelos animais úteis, antes do ensaio em humanos.

Por exemplo, dependendo do tipo e da gravidade da doença, cerca de 1 µg/kg a 15 mg/kg (e.g. 0,1-20 mg/kg) de polipéptido ou anticorpo é uma dosagem candidata inicial para administração ao paciente, por exemplo, numa ou mais administrações separadas, ou por perfusão contínua. Uma dosagem diária típica pode estar na gama de cerca de 1 µg/kg a 100 mg/kg ou mais, dependendo dos factores acima mencionados. Para administrações repetidas durante vários dias ou mais, dependendo da condição, o tratamento é mantido até que ocorra uma supressão desejada de sintomas da doença. Contudo, podem ser úteis outros regimes de dosagem. O progresso desta terapia é facilmente monitorizado por técnicas e ensaios convencionais.

## **12. Artigos fabricados**

Noutra concretização do invento, é proporcionado um artigo fabricado contendo materiais úteis para o diagnóstico ou tratamento das desordens acima descritas. O artigo fabricado compreende um recipiente e um rótulo. Recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos, seringas e tubos de ensaio. Os recipientes podem ser formados de uma variedade de materiais tais como vidro ou plástico. O recipiente contém uma composição que é eficaz para diagnóstico ou tratamento da condição e pode ter uma abertura de acesso asséptico (por exemplo o recipiente pode ser um saco para solução intravenosa ou um frasco possuindo uma rolha perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica). O agente activo na composição é usualmente um polipéptido ou um anticorpo do invento. O rótulo no recipiente, ou associado ao recipiente, indica que a composição é utilizada para diagnóstico ou tratamento da condição escolhida. O artigo fabricado pode compreender adicionalmente um segundo recipiente compreendendo um tampão farmacêuticamente

aceitável, tal como solução salina tamponada com fosfato, solução de Ringer e solução de dextrose. Pode incluir adicionalmente outros materiais desejáveis do ponto de vista comercial e do utilizador, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas e folhetos de embalagem com as instruções de utilização.

### **13. Diagnóstico e prognóstico de doença imuno-relacionada**

As proteínas da superfície celular, tais como proteínas que são sobre-expressas em certas doenças imuno-relacionadas, são alvos excelentes para candidatos a fármacos ou para tratamento da doença. As mesmas proteínas, conjuntamente com proteínas segregadas codificadas pelos genes amplificados em estados de doença imuno-relacionada, encontram utilização adicional no diagnóstico e prognóstico destas doenças. Por exemplo, anticorpos dirigidos contra os produtos de proteína de genes amplificados em esclerose múltipla, artrite reumatóide, outra doença imuno-relacionada, podem ser utilizados como agentes de diagnóstico e prognóstico.

Por exemplo, anticorpos, incluindo fragmentos de anticorpo, podem ser utilizados para detectar qualitativamente ou quantitativamente a expressão de proteínas codificadas por genes amplificados ou sobre-expressos ("produtos génicos marcadores"). O anticorpo está preferivelmente equipado com um marcador detectável, e.g. fluorescente, e a ligação pode ser monitorizada por microscopia óptica, citometria de fluxo, fluorimetria ou outras técnicas conhecidas na especialidade. Estas técnicas são particularmente adequadas, se o gene sobre-expresso codificar uma proteína de superfície celular. Estes ensaios de ligação são realizados essencialmente como descrito acima.

A detecção *in situ* da ligação de anticorpo aos produtos génicos marcadores pode ser realizada, por exemplo, por imunofluorescência ou microscopia imunoelectrónica. Para este fim, remove-se um espécime histológico do paciente, e aplica-se a este um anticorpo marcado, preferivelmente por deposição do anticorpo sobre uma amostra biológica. Este procedimento permite também determinar a distribuição do produto génico marcador no tecido examinado. Será evidente para os peritos na especialidade que está facilmente disponível uma ampla variedade de métodos histológicos para detecção *in situ*.

Os exemplos seguintes são apresentados apenas para fins ilustrativos, e não pretendem limitar de modo algum o âmbito do presente invento.

### **EXEMPLOS**

Os reagentes disponíveis comercialmente referidos nos exemplos foram utilizados de acordo com as instruções dos fabricantes a não ser onde indicado de outro modo. A fonte das células identificadas nos exemplos seguintes, e ao longo do fascículo, por números de acesso ATCC é a American Type Culture Collection, Rockville, Maryland.

#### **EXEMPLO 1**

##### **Isolamento de clones de ADNc que codificam PRO245 humano**

Utilizaram-se as sequências de domínio extracelular (ECD) (incluindo o sinal secreção, caso exista) de cerca de 950 proteínas segregadas, conhecidas da base de dados de proteínas Swiss-Prot pública, para pesquisar bases de dados de marcadores de sequência expressa (EST, "expressed sequence tags"). As bases de dados de EST incluíram bases de dados EST públicas (e.g., GenBank) e uma base de dados de ADN EST privada (LIFESEQ\*, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA). A pesquisa foi realizada, utilizando o programa de computador BLAST ou BLAST-2 (e.g., Altshul et al., *Methods in Enzymology* 266: 460-480 (1996)), como uma comparação das sequências de proteína ECD com uma tradução de 6 quadros (6 *frame translation*) da sequência EST. As comparações que resultaram numa pontuação BLAST de 70 (ou em alguns casos 90) ou superior, que não codificavam proteínas conhecidas, foram agrupadas e montadas em sequências de ADN de consenso com o programa "phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington).

A sequência de ADN de consenso foi montada em relação a outras sequências EST, onde a sequência de consenso é aqui designada DNA30954 (SEQ ID NO:27). Com base na sequência de consenso DNA30954, foram sintetizados oligonucleótidos para identificar por PCR um biblioteca de ADNc que continha a sequência de interesse e para utilização como sondas para

isolar um clone da sequência de codificação de comprimento completo para o PRO245.

Foi sintetizado um par de iniciadores de PCR (directo e inverso):

iniciador de PCR directo

5'-ATCGTTGTGAAGTTAGTGCCCC-3' (SEQ ID NO:28)

iniciador de PCR inverso

5'-ACCTGCGATATCCAACAGAATTG-3' (SEQ ID NO:29)

Os iniciadores de PCR inverso e directo estão geralmente na gama de 20 a 30 nucleótidos e são frequentemente concebidos para dar um produto de PCR de cerca de 100-1000 pb de comprimento. As sequências sonda têm tipicamente 40-55 pb de comprimento. Nalguns casos, são sintetizados oligonucleótidos adicionais quando a sequência de consenso é maior do que cerca de 1-1,5 kpb. De modo a rastrear várias bibliotecas para um clone de comprimento completo, o ADN das bibliotecas foi rastreado por amplificação de PCR, como descrito por Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, com o par de iniciadores de PCR.

Adicionalmente, construiu-se uma sonda de hibridação oligonucleotídica sintética a partir das sequências DNA30954 de consenso que tinha a sequência de nucleótidos seguinte:

sonda de hibridação:

5'-GGAAGAGGATACAGTCACTCTGGAAGTATTAGTGGCTCCAGCAGTTCC-3'  
(SEQ ID NO:30)

De modo a rastrear várias bibliotecas quanto a uma fonte de um clone de comprimento completo, o ADN das bibliotecas foi rastreado por amplificação de PCR com o par de iniciadores de PCR acima identificado. Utilizou-se depois uma biblioteca positiva para isolar clones codificando o gene de PRO245, utilizando a sonda oligonucleotídica e um dos iniciadores de PCR.

O ARN para construção das bibliotecas de ADNc foi isolado a partir de tecido de fígado fetal humano. As bibliotecas de ADNc utilizadas para isolar os clones de ADNc foram construídas por métodos padrão utilizando reagentes disponíveis comercialmente, tais como os da Invitrogen, San

Diego, CA. O ADNc foi iniciado com oligo dT contendo um local NotI, ligado com extremidades lisas a adaptadores SalI tratados com hemoquinase, clivado com NotI, calibrado apropriadamente por electroforese em gel, e clonado numa orientação definida, num vector de clonagem adequado (tal como pRKB ou pRKD; o pRK5B é um precursor de pRK5D que não contém o local SfiI; ver Holmes et al., *Science* 253: 1278-1280 (1991)), nos locais XhoI e NotI únicos.

A sequenciação do ADN dos clones isolados como acima descrito proporciona a sequência de ADN de comprimento completo para um PRO245 de sequência nativa [aqui designado por UNQ219 (DNA35638) (SEQ ID NO:8)] e a sequência da proteína derivada (SEQ ID NO:9).

A sequência de nucleótidos completa de UNQ219 (DNA35638) é apresentada na Figura 2 (SEQ ID NO:8). O clone UNQ219 (DNA35638) (SEQ ID NO:8) contém um único quadro de leitura aberto (*open reading frame*) com um local de início da tradução evidente nas posições de nucleótido 89-91 [Kozak et al., *supra*] e terminando no codão de paragem nas posições de nucleótido 1025-1027 (Figura 2, SEQ ID NO:8). O precursor polipeptídico previsto tem 312 aminoácidos de comprimento (Fig. 3) (SEQ ID NO:9). O clone UNQ219 (DNA35638) foi depositado na ATCC em 17 de Setembro de 1997 e foi-lhe atribuído o número de depósito ATCC N.º 209265.

## **EXEMPLO 2 (ANTECEDENTES)**

### **Inibição da proliferação estimulada por VEGF do crescimento de células endoteliais**

Células endoteliais capilares adrenocorticais (ACE) de (de uma cultura primária, máximo 12-14 passagens) foram plaqueadas em placas de microtitulação de 96 poços (Amersham Life Science) com uma densidade de 500 células/poço por 100 µL em DMEM de baixo teor em glucose, 10% de soro de vitelo, glutamina 2 mM, pen/estrept 1x e fungizona, suplementado com VEGF 3 ng/mL. Os controlos foram plaqueados do mesmo modo mas alguns não incluíram VEGF. Adicionou-se uma amostra de teste dos polipéptidos PRO301 e PRO245 num volume de 100 µL para um volume final de 200 µL. Incubaram-se as células durante 6-7 dias a 37°C. Aspiraram-se os meios e lavaram-se as células 1x com PBS. Adicionou-se uma mistura reaccional de fosfatase



ácida (100  $\mu$ L, acetato de sódio 0,1 M, pH 5,5, 0,1% de Triton X-100, fosfato de p-nitrofenilo 10 mM). Após incubação durante 2 horas a 37°C, parou-se a reacção por adição de 10  $\mu$ L de NaOH 1 N. Mediu-se a DO num leitor de placas de microtitulação a 405 nm. Os controlos foram: sem células, apenas células, células + FGF (5 ng/mL), células + VEGF (3 ng/mL), células + VEGF (3 ng/mL) + TGF- $\beta$  (1 ng/mL), e células + VEGF (3 ng/mL) + LIF (5 ng/mL). (É conhecido que o TGF- $\beta$  numa concentração de 1 ng/mL bloqueia 70-90% da proliferação celular estimulada por VEGF.)

Os resultados foram avaliados calculando a percentagem de inibição da proliferação celular estimulada por VEGF (3 ng/mL), determinada por medição da actividade de fosfatase ácida a DO<sub>405</sub> nm, (1) em relação a células sem estimulação e (2) em relação à inibição por TGF- $\beta$  de referência da actividade estimulada por VEGF. Os resultados, apresentados na Tabela 1, são indicativos da utilidade do polipéptido PRO245 na inibição do crescimento celular, especialmente em terapia do cancro e, especificamente, na inibição da angiogénese tumoral.

**Tabela 1**

Composto testado	Concentração	% de proliferação relativamente ao controlo
Proteína de DNA35638 (SEQ ID NO:9)	0,01%	0,76
Proteína de DNA35638 (SEQ ID NO:9)	0,1%	0,35
Proteína de DNA35638 (SEQ ID NO:9)	1,0%	0,11
Proteína de DNA35638 (SEQ ID NO:9)	0,48 nM	1,03
Proteína de DNA35638 (SEQ ID NO:9)	4,8 nM	0,95
Proteína de DNA35638 (SEQ ID NO:9)	48,0 nM	0,49

### **EXEMPLO 3**

#### **Actividade estimulante em ensaio de reacção linfocitária mista (MLR)**

Este exemplo mostra que os polipéptidos do invento são activos como estimulantes da proliferação de linfócitos T estimulados. Os compostos que estimulam a proliferação de linfócitos são úteis terapeuticamente quando a melhoria de uma resposta inflamatória é benéfica. Os compostos que inibem a

proliferação de linfócitos são úteis terapêuticamente quando supressão da resposta inflamatória é benéfica. Um agente terapêutico pode tomar a forma de antagonistas do polipéptido do invento, por exemplo, anticorpos quiméricos murino-humano, humanizados ou humanos contra o polipéptido.

O protocolo básico para este ensaio está descrito em *Current Protocols in Immunology*, Unidade 3.12, J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Marglies, E.M. Shevach e W. Strober. Eds. National Institute of Health, publicado pela John Wiley & Sons, Inc.

Mais especificamente, numa variante do ensaio, células mononucleares de sangue periférico (PBMC) são isoladas a partir de indivíduos mamíferos, por exemplo, um voluntário humano, por leucoferese (um dador fornecerá PBMC estimulantes, o outro doador fornecerá PBMC respondedores). Se desejado, as células são congeladas em soro fetal bovino e DMSO após isolamento. As células congeladas podem ser descongeladas de um dia para o outro em meio de ensaio (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) e depois lavadas e de novo suspensas a  $3 \times 10^6$  células/ml de meio de ensaio (RPMI; 10% de soro fetal de bovino, 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de glutamina, 1% de HEPES, 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de piruvato).

Os PBMC estimulantes são preparados por irradiação das células (cerca de 3000 rad). O ensaio é preparado por plaqueamento em poços triplicados de uma mistura de: 100 µl de amostra de teste diluída a 1% de 0,1%; 50 µl de células estimulantes irradiadas e 50 µl de células PBMC respondedoras. Como controlos utilizam-se 100 µL de meio de cultura de células ou 100 µl de CD4-IgG. Os poços são depois incubados a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 4 dias. No dia 5, cada poço é pulsado com timidina tritiada (1,0 mCi/poço; Amersham). Decorridas horas, lavam-se as células 3 vezes e depois avalia-se a incorporação do marcador.

Noutra variante deste ensaio, os PBMC são isolados a partir dos baços de ratinhos Balb/c e ratinhos C57B6. As células são provocadas a partir de baços colhidos de fresco em meio de ensaio (RPMI; 10% de soro fetal de bovino, 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de glutamina, 1% de HEPES, 1% aminoácidos não essenciais, 1% de piruvato) e os PBMC são isolados por espalhamento destas células sobre Lympholyte M (Organon Teknika), centrifugação a 2000 rpm durante

20 minutos, recolha e lavagem da camada de células mononucleares em meio de ensaio e ressuspensão das células a  $1 \times 10^7$  células/ml de meio de ensaio. O ensaio é depois conduzido como acima descrito. Os resultados deste ensaio para compostos do invento são adiante apresentados na Tabela 2. Aumentos positivos em relação ao controlo são considerados positivos preferindo-se aumentos superiores ou iguais a 180%. Porém, qualquer valor superior ao controlo indica um efeito estimulante para a proteína de teste.

**Tabela 2**

Composto testado	Concentração	% de aumento em relação ao controlo
	o	
Proteína de DNA35638 (SEQ ID NO:9)	0,1%	189,7
Proteína de DNA35638 (SEQ ID NO:9)	0,1%	193,7
Proteína de DNA35638 (SEQ ID NO:9)	1,0%	212,5
Proteína de DNA35638 (SEQ ID NO:9)	1,0%	300,5

**EXEMPLO 4****Infiltrados de células inflamatórias na pele de porquinho-da-índia**

O exemplo seguinte mostra que os polipéptidos invento são pró-inflamatórios pelo facto de estimularem infiltrados de células inflamatórias (*i.e.*, neutrófilos, eosinófilos, monócitos ou linfócitos) na pele do porquinho-da-índia. O ensaio aqui descrito monitora a capacidade de cada proteína para induzir um infiltrado de células inflamatórias na pele de um porquinho-da-índia. Compostos que estimulam a infiltração inflamatória são úteis terapeuticamente quando a melhoria de uma resposta inflamatória é benéfica. Compostos que inibem a proliferação de linfócitos são úteis terapeuticamente quando a supressão de uma resposta inflamatória é benéfica. Um agente terapêutico pode tomar a forma de antagonistas dos polipéptidos do invento, por exemplo, anticorpos quiméricos murino-humano, humanizados ou humanos contra o polipéptido.

Porquinhos-da-índia pelados (Charles River Labs), pesando 350 gramas ou mais, são anestesiadas com cetamina (75-80 mg/kg de peso corporal) e xilazina (5 mg/kg de peso corporal) intramuscularmente. As amostras de proteína são injectadas intradermicamente nos dorsos de cada animal com um volume de

100 µl por local de injeção. Existem aproximadamente 16-24 locais de injeção por animal. Injecta-se endocardialmente um mL de pigmento azul de Evans (1% em solução salina tamponada fisiológica). Submetem-se os animais a eutanásia após 6 horas. Realiza-se a biopsia de cada local de injeção de pele e fixa-se em formalina. Preparam-se as peles para avaliação histopatológica. Avalia-se cada local quanto a infiltração de células inflamatórias na pele. Os locais com células inflamatórias visíveis são registados como positivos. As amostras que induzem um infiltrado de células inflamatórias são pontuadas como substâncias pró-inflamatórias.

**Tabela 3**

Composto	Actividade pró-inflamatória
Proteína de DNA35638 (SEQ ID NO:9)	+
Controlo negativo	-

## **EXEMPLO 5**

### **Sobre-expressão do produto génico**

Este exemplo mostra que genes codificando várias proteínas indicados na Figura 7 são sobre-expressos em cólon colítico de ratinhos "knockout" CRF2-4 -/-. Os agentes terapêuticos podem tomar a forma de antagonistas dos produtos génicos indicados, por exemplo, anticorpos quiméricos murino-humano, humanizados ou humanos contra eles.

Os ratinhos Os CRF2-4 -/- (Spencer et al., *J. Exp. Med.* 187, 571-578 (1998)) são animais que têm removida uma subunidade do gene que codifica o receptor de IL-10. Os ratinhos são não responsivos às funções infra-reguladoras da IL-10 para activação de macrófagos, e não podem infra-regular a resposta ao desencadear da secreção de TNF- $\alpha$  de macrófagos por lipopolissacáridos. Desenvolvem uma colite crónica que pode conduzir a adenocarcinoma do cólon.

As sondas para as proteínas indicadas na Figura 7 foram criadas a partir de moldes de ARNm para os produtos génicos indicados e utilizadas no ensaio de 5'-nuclease (e.g., TaqMan™) e PCR quantitativa em tempo real (e.g., ABI Prizm 7700 Sequence Detection System™ (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA). Os resultados são

apresentados em unidades delta CT. Uma unidade corresponde a 1 ciclo de PCR ou a aproximadamente uma amplificação de 2 vezes em relação ao normal, duas unidades correspondem a 4 vezes, 3 unidades a 8 vezes, etc. A quantificação foi obtida utilizando iniciadores e um ARNm marcado fluorescente TaqMan™ obtido a partir dos produtos génicos testados relacionados com a inflamação indicados na Figura 7. As regiões dos produtos génicos indicados, que contêm muito provavelmente sequências de ácido nucleico únicas e que pelo menos provavelmente têm os intrões eliminados (*spliced out*), são preferidas para a obtenção de iniciadores, e.g. região não traduzida 3'.

A reacção de ensaio de 5'-nuclease é uma técnica baseada em PCR fluorescente que faz uso da actividade de 5'-exonuclease da enzima ADN-polimerase Taq para monitorizar a amplificação em tempo real. Utilizam-se dois iniciadores oligonucleotídicos para gerar um amplicão típico de uma reacção de PCR. Um terceiro oligonucleótido, ou sonda, é concebido para detectar a sequência de nucleótidos localizada entre os dois iniciadores de PCR. A sonda não é extensível pela enzima ADN-polimerase Taq, e está marcada com um pigmento fluorescente repórter e um pigmento fluorescente de extinção. Qualquer emissão induzida por laser a partir do pigmento repórter é extinta pelo pigmento de extinção quando os dois pigmentos estão localizados na proximidade um do outro, como acontece na sonda. Durante a reacção de amplificação, a sonda é clivada pela enzima ADN-polimerase Taq de um modo dependente do molde. Os fragmentos de sonda resultantes dissociam-se em solução, e o sinal do pigmento repórter solto está livre do efeito de extinção do segundo fluoróforo. Uma molécula de pigmento repórter é libertada por cada nova molécula sintetizada, e a detecção do pigmento repórter não extinto proporcionou a base para a interpretação quantitativa dos dados.

O procedimento de 5'-nuclease é realizado num dispositivo de PCR quantitativa em tempo real, tal como o ABI Prism 7700™ Sequence Detection. O sistema consiste num *thermocycler*, um *laser*, uma câmara CCD (*charge-coupled device*) e um computador. O sistema amplifica amostras num formato de 96 poços num *thermocycler*. Durante a amplificação, um sinal fluorescente induzido por laser é recolhido em tempo real através de cabos de fibra óptica para todos os 96 poços, e detectado na CCD. O sistema inclui *software* para operação dos instrumentos e para análise dos dados.

Os dados do ensaio de 5'-nuclease são inicialmente expressos por Ct, ou ciclo limite (*threshold cycle*). Este é definido como o ciclo para o qual o sinal do repórter se acumula acima do nível de fluorescência de fundo. Os valores de Ct são utilizados como medição quantitativa do número relativo de cópias iniciais de uma sequência alvo particular numa amostra de ácido nucleico. 7

Os resultados da amplificação de ARNm são apresentados na Figura 7. A expressão em animais do tipo selvagem foi comparada com a expressão em animais KO CRF2-4, com beta-actina como o padrão de referência. Foram medidos quatro animais em cada grupo. Todos os quatro animais foram diagnosticados com colite e, para além disso, três desses tinham adenocarcinoma do cólon.

A Figura 7 mostra que o ARNm de JAM está aumentado 3,3 vezes no cólon de ratinhos CRF2-4 -/- com colite. Estes ratinhos são "knockout" para o receptor de IL-10 que desenvolvem uma colite espontânea mediada por linfócitos, monócitos e neutrófilos. A IL-10 suprime a resposta inflamatória por modulação da expressão de certas citocinas inflamatórias.

Como resultado, é provável que o PRO245 tenha também uma expressão elevada em doenças inflamatórias humanas, tais como doença inflamatória do intestino e outras doenças inflamatórias intestinais.

## **EXEMPLO 6 (ANTECEDENTES)**

### **Indução de apoptose de células endoteliais**

A capacidade dos polipéptidos do invento para induzir apoptose em células endoteliais foi testada em células endoteliais da veia umbilical venosa humana (HUVEC, Cell Systems). No primeiro dia, as células foram plaqueadas sobre placas de microtitulação de 96 poços (Amersham Life Sciences, microplacas de cintilação Cytostar-T, RPNQ 160, esterilizadas, tratadas para cultura de tecidos, embrulhadas individualmente), em soro a 10% (meio CSG, Cell Systems), com uma densidade de  $2 \times 10^4$  células por poço, num volume de 100 µl. No segundo dia seguinte, adicionou-se polipéptido PRO245 codificado por DNA35638 em triplicado em diluições de

1%, 0,33% e 0,11%. No terceiro dia, determinou-se a capacidade do polipéptido PRO245 para induzir apoptose utilizando um *kit* disponível comercialmente, Apoptosis Detection Kit (R&D Systems, Minnesota), no qual se utiliza anexina V, um membro da família de proteínas de ligação de cálcio e fosfolípido, para detectar a apoptose, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Adicionaram-se às células anexina V marcada com fluoresceína e iodeto de propídio. A análise foi realizada com citómetros equipados com uma única luz de excitação de emissão de laser a 488 nm. Neste teste, as células vivas não corarão com qualquer fluoróculo, as células necróticas corarão com ambos os fluoróculos e as células que estão a sofrer apoptose apenas corarão com o reagente de anexina V-FITC. O sinal gerado por anexina V-FITC foi detectado no detector de sinal de FITC. Os resultados estão indicados na Tabela 4 seguinte.

**TABELA 4**

Composto testado	Concentração	% acima da fluorescência de fundo
DNA35638 proteína (SEQ ID NO:9)	0,11%	77,6
DNA35638 proteína (SEQ ID NO:9)	0,33%	143,7
DNA35638 proteína (SEQ ID NO:9)	1,0%	146,0
DNA35638 proteína (SEQ ID NO:9)	6,82 nM	67,2
DNA35638 proteína (SEQ ID NO:9)	20,46 nM	102,6
DNA35638 proteína (SEQ ID NO:9)	62,0 nM	118,8

A capacidade dos compostos de proteína do invento para induzir apoptose de células endoteliais, particularmente em combinação com a ruptura da formação de junções entre células como indicado no Exemplo 2, é indicativa de que os compostos desempenham papéis na adesão e transmigração celulares. Similarmente à JAM de murino, os compostos são provavelmente moléculas de adesão celular em epitélios e endotélios, o que explica a sua vasta distribuição nos tecidos. A quebra da indução de apoptose de células endoteliais está de acordo com um papel no crescimento e apoptose celulares.

#### **EXEMPLO 7 (ANTECEDENTES)**

##### **Ensaio antitumoral *in vitro***

A actividade antiproliferativa dos polipéptidos PRO245 do invento foi determinada no ensaio de investigação *in vitro*

para identificação de drogas anticancerosas, orientadas para a doença, do National Cancer Institute (NCI), utilizando o ensaio de ligação do pigmento sulfo-rodamina B (SRB) essencialmente como descrito por Skehan et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 1107-1112 (1990). As 60 linhas de células tumorais utilizadas neste estudo ("o painel NCI"), bem como as condições para a sua manutenção e cultura *in vitro*, foram descritas por Monks et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 83: 757-766 (1991). O propósito deste rastreio era avaliar inicialmente a actividade citotóxica e/ou citostática dos compostos de teste contra diferentes tipos de tumores (Monks et al., *supra*, Boyd, *Cancer: Princ. Pract. Oncol. Update* 3(10): 1-12 (1989)).

Colheram-se células de aproximadamente 60 linhas de células de tumores humanos com tripsina/EDTA (Gibco), lavaram-se uma vez, suspenderam-se de novo em IMEM e determinou-se a sua viabilidade. As suspensões de células foram adicionadas por pipeta (volume de 100 µL) a placas de microtitulação de 96 poços separadas. A densidade de células para a incubação de 60 dias foi inferior à densidade para a incubação de 20 dias para prevenir o crescimento excessivo. Permitiu-se aos inoculados um período de pré-incubação de 24 horas a 37°C para estabilização. No instante zero, aos poços de placas de microtitulação, adicionaram-se diluições de duas vezes das concentrações de teste pretendidas em alíquotas 100 µl (diluição 1:2). Os compostos foram avaliados para diluições semi-log definidas (1000 a 100 000 vezes). As incubações decorreram durante dois dias e seis dias numa atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 100% de humidade.

Após incubação, removeu-se o meio e fixaram-se as células em 0,1 ml de ácido tricloroacético a 10% a 40°C. Enxaguaram-se as placas cinco vezes com água desionizada, secaram-se, coraram-se durante 30 minutos com 0,1 ml de 0,4% de pigmento sulfo-rodamina B (Sigma) dissolvido em ácido acético a 1%, enxaguaram-se quatro vezes com ácido acético a 1% para remover o pigmento não ligado, secaram-se e extraiu-se o corante durante cinco minutos com 0,1 ml de base Tris 10 mM [tris(hidroximetil)aminometano], pH 10,5. Mediu-se a absorvância (DO) de sulfo-rodamina B a 492 nm utilizando um leitor de placas de microtitulação de 96 poços, com interface para computador.

Uma amostra de teste é considerada positiva se apresenta um efeito inibidor de crescimento de pelo menos 50% em uma ou



mais concentrações. Os resultados são apresentados na tabela seguinte, onde as abreviaturas são como se segue:

CPNP = carcinoma do pulmão de células não pequenas

SNC = sistema nervoso central

Leuc = leucemia

**Tabela 5**

Composto de teste	Concentração	Duração do ensaio	Linha de células tumorais	
			Tipo	Designação
DNA35638 proteína (SEQ ID NO:9)	0,35 nM	2	CPNP Ovariano	HOP92 OVCAR-4
DNA35638 proteína (SEQ ID NO:9)	0,35 nM	2	Leuc	SR
DNA35638 proteína (SEQ ID NO:9)	0,35 nM	6	Cólon	HCC-2998
DNA35638 proteína (SEQ ID NO:9)	3,5 nM	6	Leuc Cólon	SR SW-620
DNA35638 proteína (SEQ ID NO:9)	6,2 nM	6	Cólon	HCT-116
DNA35638 proteína (SEQ ID NO:9)	6,2 nM	6	Leuc	RPMI-8226

## **EXEMPLO 8**

### **Utilização de PRO245 como sonda de hibridação**

O método seguinte descreve a utilização de uma sequência de nucleótidos que codifica um PRO245 como sonda de hibridação.

ADN compreendendo a sequência de codificação de PRO245 de sequência nativa (como se mostra na Fig. 2, SEQ ID NO:8) é utilizado como sonda para rastrear ADN homólogos (tais como os que codificam variantes de PRO245 de ocorrência natural) em bibliotecas de ADNc de tecido humano ou bibliotecas genómicas de tecido humano.

A hibridação e a lavagem de filtros contendo ADN de qualquer das bibliotecas são realizadas sob as condições de rigor elevado seguintes. A hibridação da sonda radiomarcada derivada de PRO245 com os filtros é realizada numa solução de formamida a 50%, SSC 5x, 0,1% de SDS, 0,1% de pirofosfato de sódio, fosfato de sódio 50 mM, pH 6,8, solução de Denhardt 2x e 10% de sulfato de dextrano, a 42°C durante 20 horas. A

lavagem dos filtros é realizada numa solução aquosa de SSC 0,1x e 0,1% de SDS a 42°C.

Os ADN possuindo uma identidade de sequência desejada com o ADN que codifica PRO245 de sequência nativa de comprimento completo, podem depois ser identificados utilizando técnicas padrão conhecidas na especialidade.

## **EXEMPLO 9**

### **Expressão de PRO245 em *E. coli***

Este exemplo ilustra a preparação de uma forma não glicosilada de PRO245 por expressão recombinante em *E. coli*.

A sequência de ADN codificando PRO245 é inicialmente amplificada utilizando iniciadores de PCR seleccionados. Os iniciadores deverão conter locais para enzimas de restrição que correspondem aos locais de enzimas de restrição no vector de expressão seleccionado. Pode-se utilizar uma variedade de vectores de expressão. Um exemplo de um vector adequado é o pBR322 (derivado de *E. coli*; ver Bolivar et al., *Gene*, 2:95 (1977)) que contém genes para resistência a ampicilina e tetraciclina. O vector é digerido com enzima de restrição e desfosforilado. As sequências amplificadas por PCR são depois ligadas no vector. O vector incluirá preferivelmente sequências que codificam um gene de resistência a antibiótico, um promotor trp, um comando de poli-His (incluindo os primeiros seis codões STII, sequência de poli-His e local de clivagem de enteroquinase), a região de codificação de PRO245, terminador de transcrição lambda e um gene argU.

A mistura de ligação é depois utilizada para transformar uma estirpe de *E. coli* seleccionada utilizando os métodos descritos em Sambrook et al., *supra*. Os transformantes são identificados pela sua capacidade para crescerem em placas de LB e seleccionam-se depois as colónias resistentes a antibióticos. O ADN plasmídico pode ser isolado e confirmado por análise de restrição e sequenciação de ADN.

Os clones seleccionados podem ser cultivados de um dia para o outro em meio de cultura líquido tal como caldo LB suplementado com antibióticos. Pode-se utilizar subsequentemente a cultura de um dia para o outro para inocular uma cultura em maior escala. As células são depois

desenvolvidas em cultura até uma densidade óptica desejada, durante a qual o promotor de expressão é activado.

Após cultura das células várias horas mais, as células podem ser colhidas por centrifugação. O sedimento celular obtido pela centrifugação pode ser solubilizado, utilizando várias agentes conhecidos na especialidade, e a proteína PRO245 solubilizada pode depois ser purificada utilizando uma coluna de quelação de metal sob condições que permitam a forte ligação da proteína.

O PRO301 foi expresso em *E. coli* numa forma marcada com poli-His, como revelado em WO99/27098.

## **EXEMPLO 10**

### **Expressão de PRO245 em células de mamífero**

Este exemplo ilustra a preparação de uma forma glicosilada de um PRO245 por expressão recombinante em células de mamífero.

Como vector expressão, utiliza-se o vector pRK5 (ver EP 307 247, publicado em 15 de Março de 1989). Opcionalmente, o ADN de PRO245 é ligado no pRK5 com enzimas de restrição seleccionadas para permitir a inserção do ADN de PRO245 utilizando métodos de ligação, tal como descrito em Sambrook *et al.*, *supra*. O vector resultante é denominado pRK5-PRO245.

Numa concretização, as células hospedeiras seleccionadas podem ser células 293. Células 293 humanas (ATCC CCL 1573) são cultivadas até à confluência em placas de cultura de tecidos em meio tal como DMEM suplementado com soro fetal de vitelo e, opcionalmente, componentes nutrientes e/ou antibióticos. Misturam-se cerca de 10 µg de ADN pRK5-PRO245 com cerca de 1 µg de ADN codificando o gene de ARN VA (Thimmappaya *et al.*, *Cell*. 31:543 (1982)] e dissolve-se em 500 µl de Tris-HCl 1 mM, EDTA 0,1 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,227 M. A esta mistura, adicionam-se gota-a-gota 500 µl de HEPES 50 mM (pH 7,35), NaCl 280 mM, NaPO<sub>4</sub> 1,5 mM e deixa-se formar um precipitado durante 10 minutos a 25°C. Suspende-se o precipitado e adiciona-se às células 293, e deixa-se assentar durante cerca de quatro horas a 37°C. Aspira-se o meio de cultura e adicionam-se 2 ml de glicerol a 20% em PBS durante 30 segundos. Lavam-se depois as células 293

com meio isento de soro, adiciona-se meio fresco e incubam-se as células durante cerca de 5 dias.

Aproximadamente 24 horas após as transfecções, remove-se o meio de cultura e substitui-se por meio de cultura (sozinho) ou meio de cultura contendo 200 µCi/ml de <sup>35</sup>S-cisteína e 200 µCi/ml de <sup>35</sup>S-metionina. Após uma incubação de 12 horas, recolhe-se o meio condicionado, concentra-se sobre um filtro rotativo e carrega-se sobre um gel de SDS a 15%. O gel processado pode ser seco e exposto a película, durante um período de tempo seleccionado, para revelar a presença de polipéptido PRO245. As culturas contendo células transfectadas pode ser submetidas a incubação adicional (em meio isento de soro) e o meio é testado em bioensaios seleccionados.

Numa técnica, ADN de PRO245 pode ser introduzido transientemente em células 293 utilizando o método do sulfato de dextrano descrito por Somparyrac *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 12:7575 (1981). Cultivam-se as células 293 até à máxima densidade num balão rotativo e adicionam-se 700 µg ADN de pRK5-PRO245. Primeiro, concentram-se as células por centrifugação a partir do balão rotativo e lavam-se com PBS. O precipitado de ADN-dextrano é incubado sobre o sedimento celular durante quatro horas. As células são tratadas com glicerol a 20% durante 90 segundos, lavadas com meio de cultura de tecidos, e reintroduzidas no balão rotativo contendo meio de cultura de tecidos, 5 µg/ml de insulina de bovino e 0,1 µg/ml de transferrina de bovino. Após cerca de quatro dias, o meio condicionado é centrifugado e filtrado para remover células e resíduos. A amostra contendo PRO245 expresso pode depois ser concentrada e purificada por qualquer método seleccionado, tal como diálise e/ou cromatografia de coluna.

Noutra concretização, o PRO245 pode ser expresso em células CHO. O pRK5-PRO245 pode ser transfectado em células CHO utilizando reagentes conhecidos tais como CaPO<sub>4</sub> ou DEAE-dextrano. Como acima descrito, as culturas de células podem ser incubadas, e o meio substituído por meio de cultura (sozinho) ou meio contendo um radiomarcador tal como <sup>35</sup>S-metionina. Após determinar a presença de polipéptido PRO245, o meio de cultura pode ser substituído por meio isento de soro. Preferivelmente, incubam-se as culturas durante cerca de 6 dias, e depois colhe-se o meio condicionado. O meio contendo

o PRO245 expresso pode depois ser concentrado e purificado por qualquer método seleccionado.

O PRO245 marcado com epítopo pode também ser expresso em células CHO hospedeiras. O PRO245 pode ser subclonado a partir do vector pRK5. A inserção do subclone pode ser submetida a PCR para se fundir em enquadramento com um epítopo marcador seleccionado, tal como um marcador poli-His, num vector de expressão de baculovírus. A inserção de PRO245 marcada com poli-His pode depois ser subclonada num vector guiado de SV40 contendo um marcador de selecção tal como DHFR para selecção de clones estáveis. Finalmente, as células CHO podem ser transfectadas (como descrito acima) com o vector guiado de SV40. A marcação pode ser realizada, como acima descrito, para verificar a expressão. O meio de cultura contendo o PRO245 expresso marcado com poli-His pode depois ser concentrado e purificado por qualquer método seleccionado, tal como por cromatografia de afinidade de quelato de  $\text{Ni}^{2+}$ .

Os PRO245 são expressos em células CHO por procedimentos de expressão transiente e estável.

A expressão estável em células CHO foi realizada utilizando o procedimento seguinte. As proteínas foram expressas como uma construção de IgG (imunoadesina), na qual as sequências de codificação para as formas solúveis (e.g. domínios extracelulares) das proteínas respectivas foram fundidas com uma sequência da região constante de IgG1 contendo os domínios charneira, CH2 e CH2 e/ou como uma forma marcada com poli-His.

Após a amplificação por PCR, os ADN respectivos foram subclonados num vector de expressão de CHO utilizando técnicas padrão como descrito em Ausubel et al., *Current Protocols of Molecular Biology*. Unidade 3.16, John Wiley and Sons (1997). Os vectores de expressão de CHO são construídos para terem locais de restrição compatíveis a 5' e a 3' do ADN de interesse, para permitir o vaivém conveniente dos ADNc. O vector utilizado na expressão em células CHO é como descrito em Lucas et al., *Nucl. Acids Res.* 24: 9 (1774-1779 (1996)), e utiliza o promotor precoce/potenciador de SV40 para conduzir a expressão do ADNc de interesse e de di-hidrofolato-redutase (DHFR). A expressão de DHFR permite a selecção para manutenção estável do plasmídeo após transfecção.

Introduziram-se doze microgramas do ADN plasmídico desejado em aproximadamente 10 milhões de células CHO utilizando reagentes de transfecção disponíveis comercialmente Superfect (Quiagen), Dosper™ ou Fugene™ (Boehringer Mannheim). Cultivaram-se as células como descrito em Lucas et al., *supra*. Aproximadamente  $3 \times 10^7$  células são congeladas numa ampola para crescimento e produção posteriores como adiante descrito.

As ampolas contendo o ADN plasmídico foram descongeladas por colocação num banho de água e mistura em vórtice. Pipetou-se o conteúdo para um tubo de centrífuga contendo 10 mL de meio e centrifugou-se a 1000 rpm durante 5 minutos. Aspirou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células em 10 mL de meio selectivo (PS20 filtrado a 0,2 µm com 5% de soro fetal de bovino tratado por diafiltração a 0,2 µm). As células foram depois colocadas em meio líquido num balão rotativo de 100 mL contendo 90 mL de meio selectivo. Após 1-2 dias, transferiram-se as células para um balão rotativo de 250 mL cheio com 150 mL de meio de crescimento selectivo e incubou-se a 37°C. Após outros 2-3 dias, semearam-se balões rotativos de 250 mL, 500 mL e 2000 mL com  $3 \times 10^5$  células/mL. Os meios celulares foram trocados por meios frescos por centrifugação e ressuspensão em meio de produção. Ainda que se possam utilizar quaisquer meios adequados para células CHO, utilizou-se realmente um meio de produção descrito na Patente dos E.U.A. N.º 5 122 469, concedida em 16 de Junho de 1992. Semeou-se um balão rotativo de produção de 3 L com  $1,2 \times 10^6$  células/mL. No dia 0, determinaram-se o número de células e o pH. No dia 1, colheu-se uma amostra do balão e iniciou-se o fornecimento de ar filtrado. No dia 2, colheu-se uma amostra do balão, alterou-se a temperatura para 33°C e adicionaram-se 30 mL de glucose 500 g/L e 0,6 mL de antiespuma a 10% (e.g., emulsão de polidimetilsiloxano a 35%, Dow Coming 365 Medical Grade Emulsion). Ao longo da produção, ajustou-se o pH conforme necessário para o manter à volta de 7,2. Após 10 dias, ou até a viabilidade cair para um valor abaixo de 70%, colheu-se a cultura de células por centrifugação e filtração através de um filtro de 0,22 µm. O filtrado foi armazenado a 4°C ou carregado de imediato em colunas para purificação.

Para as construções marcadas com poli-His, as proteínas foram purificadas utilizando uma coluna Ni-NTA (Qiagen). Antes da purificação, adicionou-se imidazole ao meio condicionado

até uma concentração de 5 mM. O meio condicionado foi bombeado para uma coluna Ni-NTA de 6 ml equilibrada em tampão Hepes 20 mM, pH 7,4, contendo NaCl 0,3 M e imidazole 5 mM, com um caudal de 4-5 ml/minuto a 4°C. Após carregamento, lavou-se a coluna com tampão de equilíbrio adicional e eluiu-se a proteína com tampão de equilíbrio contendo imidazole 0,25 M. A proteína altamente purificada foi subsequentemente dessalinizada para um tampão de armazenamento contendo Hepes 10 mM, NaCl 0,14 M e 4% de manitol, pH 6,8, com uma coluna de 25 ml G25 Superfine (Pharmacia), e armazenada a -80°C.

As construções de imunoadesina (contendo Fc) foram purificadas a partir dos meios condicionados como se segue. Bombeou-se o meio condicionado para uma coluna de 5 ml de Proteína A (Pharmacia), que tinha sido equilibrada em tampão fosfato de Na 20 mM, pH 6,8. Após carregamento, lavou-se a coluna extensivamente com tampão de equilíbrio antes da eluição com ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. A proteína eluída foi de imediato neutralizada recolhendo fracções de ml para tubos contendo 275 µL de tampão Tris 1 M, pH 9. A proteína altamente purificada foi subsequente dessalinizada em tampão de armazenamento como acima descrito para as proteínas marcadas com poli-His. A homogeneidade foi avaliada por géis de SDS-poliacrilamida e por sequenciação de aminoácidos N-terminal por degradação de Edman. O PRO245 foi também produzido por expressão transiente em células COS.

## **EXEMPLO 11**

### **Expressão de PRO245 em levedura**

O método seguinte descreve a expressão recombinante de PRO245 em levedura.

Primeiro, constroem-se vectores de expressão de levedura para produção intracelular ou secreção de PRO245 a partir do promotor ADH2/GAPDH. ADN que codifica PRO245, um péptido de sinal seleccionado e o promotor, é inserido em locais de enzimas de restrição adequados no plasmídeo seleccionado para dirigir a expressão intracelular de PRO245. Para secreção, o ADN codificando PRO245 pode ser clonado no plasmídeo seleccionado, conjuntamente com ADN codificando o promotor ADH2/GAPDH, o sinal secretor/sequência de comando de factor alfa de levedura, e sequências ligantes (se necessário), para expressão de PRO245.

Células de levedura, tais como levedura da estirpe AB110, podem depois ser transformadas com os plasmídeos de expressão acima descritos e cultivadas em meios de fermentação seleccionados. Os sobrenadantes de levedura transformada podem ser analisados por precipitação com 10% de ácido tricloroacético e separação por SDS-PAGE, seguida por coloração dos géis com corante azul de Coomassie.

O PRO245 recombinante pode ser subsequentemente isolado e purificado por remoção das células de levedura do meio fermentação por centrifugação e depois concentração do meio utilizando cartuchos de filtração seleccionados. O concentrado contendo PRO245 pode ser adicionalmente purificado utilizando resinas de cromatografia de coluna seleccionadas.

## **EXEMPLO 12**

### **Expressão de PRO245 em células de insecto infectadas com baculovírus**

O método descreve a expressão recombinante de PRO245 em células de insecto infectadas com baculovírus.

O PRO245 é fundido a montante de um marcador epitópico contido num vector de expressão de baculovírus. Estes marcadores epitópicos incluem marcadores poli-His e marcadores imunoglobulina (tais como as regiões Fc de IgG). Pode-se utilizar uma variedade de plasmídeos, incluindo plasmídeos derivados de plasmídeos disponíveis comercialmente tais como pVL1393 (Novagen). Resumidamente, o PRO245 ou a porção desejada do PRO245 (tal como a sequência que codifica o domínio extracelular de uma proteína transmembranar) é amplificado por PCR com iniciadores complementares às regiões 5' e 3'. O iniciador 5' pode incorporar locais de enzimas de restrição (seleccionados) flanqueadores. O produto é depois digerido com essas enzimas de restrição seleccionadas e subclonado no vector de expressão.

O baculovírus recombinante é gerado por co-transfecção do plasmídeo acima e de ADN viral BaculoGold™ (Pharmingen) em células *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC CRL 1711) utilizando Lipofectin (disponível comercialmente na GIBCO-BRL). Após 4 - 5 dias de incubação a 28°C, os vírus libertados são colhidos e utilizados para amplificações posteriores. A



infecção viral e a expressão de proteína são realizadas como descrito por O'Reilley et al., *Baculovirus expression vectors: A laboratory Manual*, Oxford; Oxford University Press (1994).

O PRO245 expresso, marcado com poli-His, pode ser depois purificado, por exemplo, por cromatografia de afinidade de quelato de  $\text{Ni}^{2+}$  como se segue. Preparam-se extractos a partir de células Sf9 infectadas com vírus recombinantes como descrito por Rupert et al., *Nature*, 362: 175-179 (1993). Resumidamente, as células Sf9 são lavadas, de novo suspensas em tampão para tratamento com ultra-sons (25 mL de Hepes, pH 7,9;  $\text{MgCl}_2$  12,5 mM; EDTA 0,1 mM; 10% de glicerol; 0,1% de NP-40; KCl 0,4 M), e tratadas com ultra-sons duas vezes durante 20 segundos em gelo. A suspensão tratada com ultra-sons é clarificada por centrifugação e o sobrenadante é diluído 50 vezes em tampão de carga (fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, 10% de glicerol, pH 7,8) e filtrado através de um filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ . Prepara-se uma coluna de agarose  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA (disponível comercialmente na Qiagen) com um volume de leito de 5 mL, lava-se com 25 mL de água e equilibra-se com 25 mL de tampão de carga. O extracto celular filtrado é carregado na coluna a 0,5 mL por minuto. Lava-se a coluna até à linha de base de  $A_{280}$  com tampão de carga, momento após o qual se inicia a colheita de fracções. Em seguida, lava-se a coluna com um tampão de lavagem secundário (fosfato 50 mM; NaCl 300 mM, 10% de glicerol, pH 6,0), que elui proteína não especificamente ligada. Após atingir de novo a linha de base de  $A_{280}$ , a coluna é desenvolvida com um gradiente de imidazole de 0 a 500 mM no tampão de lavagem secundário. Colhem-se fracções de um mL e analisam-se por SDS-PAGE e coloração com prata ou *Western blot* com  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA conjugado a fosfatase alcalina (Qiagen). Fracções eluídas contendo PRO245 marcado com  $\text{His}_{10}$  são reunidas e dialisadas contra tampão de carga.

Alternativamente, a purificação do PRO245 marcado com IgG (ou marcado com Fc) pode ser realizada utilizando técnicas de cromatografia conhecidas, incluindo por exemplo, cromatografia de coluna de Proteína A ou Proteína G.

O PRO245 foi expresso em células de insecto Sf9 infectadas com baculovírus. Embora a expressão fosse realmente realizada a uma escala de 0,5-2 L, esta pode ser facilmente aumentada para preparações maiores (e.g. 8 L). As proteínas foram expressas como uma construção de IgG (imunoadesina), na qual a região extracelular de proteína estava fundida com uma

sequência de região constante de IgG1 contendo os domínios de charneira, CH2 e CH3 e/ou em formas marcadas com poli-His.

Após amplificação por PCR, as sequências de codificação respectivas foram subclonadas num vector de expressão de baculovírus (pb.PH.IgG para fusões de IgG e pb.PH.His.c para proteínas marcadas com poli-His), e o vector e ADN de baculovírus BaculoGold® (Pharmingen) foram co-transfectados em 105 células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC CRL 1711), utilizando Lipofectin (Gibco BRL). pb.PH.IgG e pb.PH.His são modificações do vector de expressão de baculovírus pVL1393 disponível comercialmente (Pharmingen), com regiões de poli-ligante modificadas para incluírem as sequências marcadoras His ou Fc. As células foram cultivadas em meio TNM-FH de Hink suplementado com 10% de FBS (Hyclone). Incubaram-se as células durante 5 dias a 28°C. Colheu-se o sobrenadante e utilizou-se subsequentemente para a primeira amplificação viral, por infecção de células Sf9 em meio TNM-FH de Hink suplementado com 10% de FBS para uma multiplicidade de infecção (MOI) aproximada de 10. Incubaram-se as células durante 3 dias a 28°C. Colheu-se o sobrenadante e determinou-se a expressão das construções no vector de expressão de baculovírus por ligação descontínua de 1 ml de sobrenadante a 25 mL de pérolas Ni-NTA (QIAGEN), para proteínas marcadas com histidina, ou de pérolas de Proteína A-Sepharose CL-4B (Pharmacia), para proteínas marcadas com IgG, seguindo-se análise em SDS-PAGE por comparação com uma concentração conhecida de proteína padrão por coloração com azul de Coomassie.

Utilizou-se o sobrenadante da primeira amplificação viral para infectar uma cultura em balão rotativo (500 ml) de células Sf9 cultivadas em meio ESF-921 (Expression Systems LLC) com uma MOI aproximada de 0,1. Incubaram-se as células durante 3 dias a 28°C. Colheu-se o sobrenadante e filtrou-se. Repetiram-se a ligação em descontínuo e a análise SDS-PAGE, conforme necessário, até ser confirmada a expressão da cultura em balão rotativo.

O meio condicionado a partir das células transfectadas (0,5 a 3 L) foi colhido por centrifugação para remover as células e filtrado através de filtros de 0,22 micron. Para as construções marcadas com poli-His, a construção de proteína foi purificada utilizando uma coluna Ni-NTA (Qiagen). Antes da purificação, adicionou-se imidazole aos meios condicionados até uma concentração de 5 mM. Os meios condicionados foram

bombeados para uma coluna de 6 ml Ni-NTA, equilibrada em tampão Hepes 20 mM, pH 7,4, contendo NaCl 0,3 M e imidazole 5 mM com um caudal de 4-5 ml/minuto a 4°C. Após carregamento, lavou-se a coluna com tampão de equilíbrio adicional e eluiu-se a proteína com tampão de equilíbrio contendo imidazole 0,25 M. A proteína altamente purificada foi subsequentemente dessalinizada para um tampão de armazenamento contendo Hepes 10 mM, NaCl 0,14 M e 4% de manitol, pH 6,8, com uma coluna de 25 ml G25 Superfine (Pharmacia) e armazenada a -80°C.

As construções de imunoadesina (contendo Fc) de proteínas foram purificadas a partir dos meios condicionados como se segue. Os meios condicionados foram bombeados para uma coluna de Proteína A de 5 ml (Pharmacia) que tinha sido equilibrada em tampão de fosfato de Na 20 mM, pH 6,8. Após carregamento, lavou-se a coluna extensivamente com tampão de equilíbrio antes da eluição com ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. A proteína eluída foi de imediato neutralizada colhendo fracções de 1 ml para tubos contendo 275 mL de tampão Tris 1 M, pH 9. A proteína altamente purificada foi subsequente dessalinizada em tampão de armazenamento como acima descrito para as proteínas marcadas com poli-His. A homogeneidade das proteínas foi verificada por electroforese em SDS-gel de poliacrilamida (PAGE) e sequenciação de aminoácidos N-terminal por degradação de Edman.

O PRO245 foi também expresso em células High-5 infectadas com baculovírus utilizando um procedimento análogo. Cultivaram-se células High-5 até uma confluência de 50% a 27°C, sem CO<sub>2</sub>, sem penicilina e sem estreptomicina. Para cada placa de 150 mm, misturaram-se 30 µg de vector baseado em pIE contendo PRO245 com 1 ml de meio Ex-Cell (Meio: Ex-Cell 401, 1/100 L-Glu JRH Biosciences, # 14401-78P, nota: o meio é sensível à luz), e, num tubo separado, misturaram-se 100 µl de Cellfectin (GibcoBRL # 10362-010) com 1 ml de meio Ex-Cell. Os vectores pIE1-1 e pIE1-2 estão concebidos para expressão constitutiva de proteínas recombinantes a partir do promotor iel de baculovírus em células de insecto transformadas estavelmente (Cartier, J.L., et al., *J. Virol.* 68, 7728-7737)(1994). Os plasmídeos diferem apenas na orientação dos múltiplos locais de clonagem e contêm todas as sequências de promotor conhecidas como importantes para expressão génica mediada por iel em células de insecto não infectadas bem como o elemento potenciador hr5. pIE1-1 e pIE1-2 incluem o local de

início de tradução de iel e podem ser utilizados para produzir proteínas de fusão.

Combinaram-se as duas soluções e deixaram-se incubar à temperatura ambiente durante 15 minutos. Adicionaram-se 8 ml de meio Ex-Cell aos 2 ml de mistura ADN/Cellfectin e espalharam-se sobre células High-5 previamente lavadas com meio Ex-Cell. Incubou-se a placa no escuro durante 1 hora à temperatura ambiente. Aspirou-se a mistura ADN/Cellfectin, e lavaram-se as células uma vez com Ex-Cell para remover o Cellfectin em excesso. Adicionou-se meio Ex-cell fresco (30 ml) e incubaram-se as células durante 3 dias a 28°C. Colheu-se o sobrenadante e determinou-se a expressão de PRO245 por ligação em descontinuo de um modo similar ao descrito para células Sf9.

### **EXEMPLO 13**

#### **Preparação de anticorpos que se ligam a PRO245**

Este exemplo ilustra a preparação de anticorpos monoclonais que se podem ligar especificamente a PRO245.

São conhecidas na especialidade técnicas para a produção de anticorpos monoclonais e estas estão descritas, por exemplo, em Goding, *supra*. Imunogénios que podem ser utilizados incluem PRO245 purificado, proteínas de fusão contendo PRO245 e células que expressam PRO245 recombinante sobre a superfície celular. A selecção do imunogénio pode ser efectuada pelo técnico especialista sem experimentação indevida.

Imunizam-se ratinhos, tais como Balb/c, com o imunogénio PRO245 emulsionado em adjuvante completo de Freund e injectaram-se subcutaneamente ou intraperitonealmente numa quantidade de 1-100 microgramas. Alternativamente, o imunogénio é emulsionado em adjuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research. Hamilton, MT) e injectado nas almofadas das patas traseiras do animal. Os ratinhos imunizados recebem depois um reforço 10 a 12 dias mais tarde com imunogénio adicional emulsionado no adjuvante seleccionado. Depois, durante várias semanas, os ratinhos podem receber reforços com injeções de imunização adicionais. Podem-se obter amostras de soro periodicamente a partir dos

ratinhos por sangria retro-orbital para avaliação em ensaios ELISA para detectar anticorpos de PRO245.

Após ter sido detectado um título de anticorpos adequado, os animais "positivos" em anticorpos podem ser injectados com uma injeção intravenosa final de PRO245. Três a quatro dias mais tarde, sacrificam-se os ratinhos e colhem-se as células de baço. As células de baço são depois fundidas (utilizando 35% de polietilenoglicol) com uma linha de células de mieloma de murino seleccionada, tal como P3X63AgU.1, disponível na ATCC, N.º CRL 1597. As fusões geram células de hibridoma que podem ser depois plaqueadas em placas de cultura de tecidos de 96 poços contendo meio HAT (hipoxantina, aminopterina e timidina) para inibir a proliferação de células não fundidas, de híbridos de mieloma e de híbridos de célula de baço.

As células de hibridoma serão rastreadas num ensaio ELISA quanto à reactividade contra PRO245. A determinação de células de hibridoma "positivas", segregando os anticorpos monoclonais desejados contra PRO245, está dentro das competências da especialidade.

As células de hibridoma positivas podem ser injectadas intraperitonealmente em ratinhos Balb/c singénicos para produzir ascites contendo os anticorpos monoclonais anti-PRO245. Alternativamente, as células de hibridoma podem ser cultivadas em balões de cultura de tecidos ou frascos rotativos. A purificação dos anticorpos monoclonais produzidos nas ascites pode ser realizada utilizando precipitação por sulfato de amónio, seguida por cromatografia de exclusão em gel. Alternativamente, pode-se utilizar cromatografia de afinidade baseada na ligação de anticorpo a Proteína A ou a Proteína G.

### **Depósito de material**

Os materiais seguintes foram depositados na American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, E.U.A. (ATCC):

Designação	N.º de depósito ATCC	Data do depósito
DNA35638-1141	209265	16 de Setembro de 1997

Estes depósitos foram realizados ao abrigo das disposições do Tratado de Budapeste sobre o Reconhecimento

Internacional do Depósito de Microrganismos para Efeitos do Procedimento em Matéria de Patentes e regulamentação subjacente (Tratado de Budapeste). Isto assegura a manutenção de uma cultura viável do depósito durante 30 anos a partir da data do depósito. O depósito será disponibilizado pela ATCC nos termos do Tratado de Budapeste, e por acordo entre a Genentech, Inc. e a ATCC, o que assegura a permanente disponibilidade ao público, e sem restrições, da progénie da cultura do depósito, por concessão da patente dos E.U.A. pertinente, ou aquando da disponibilização ao público de qualquer pedido de patente dos E.U.A. ou estrangeiro, o que ocorrer em primeiro lugar, e assegura a disponibilidade da progénie a quem for determinado pelo Commissioner of Patents and Trademarks dos E.U.A. que a ela tem direito de acordo com a 35 USC 122 e com a regulamentação do Commissioner subjacente (incluindo 37 CFR § 1.14 com referência particular a 886 OG 638).

O cessionário do presente pedido de patente concordou que se uma cultura dos materiais no depósito morrer ou se perder ou destruir, quando cultivada sob condições adequadas, os materiais serão prontamente substituídos após notificação por outros iguais. A disponibilidade do material depositado não deve ser entendida como uma licença para praticar o invento em contravenção dos direitos concedidos pela autoridade de qualquer governo, de acordo com a sua legislação sobre patentes.

A descrição escrita anterior é considerada suficiente para permitir a um perito na especialidade praticar o invento. O presente invento não deve estar limitado em âmbito pela construção depositada, uma vez que a construção depositada pretende ser uma simples ilustração de certos aspectos do invento, e construções que são funcionalmente equivalentes podem estar no âmbito deste invento conforme definido nas reivindicações. O presente depósito de material não constitui uma admissão de que a presente descrição escrita aqui contida é inadequada para permitir a prática de qualquer aspecto do invento, incluindo o seu melhor modo, nem deve ser entendida como limitante do âmbito das reivindicações às ilustrações específicas que representa. De facto, várias modificações, para além das aqui apresentadas e descritas, tornar-se-ão evidentes para os peritos na especialidade a partir da descrição anterior e caem dentro do âmbito das reivindicações apensas.

**Listagem de Sequências**

- <110> Genentech, Inc.  
 Avi J.Ashkenazi  
 Sherman Fong  
 Audrey Goddard,  
 Austin L. Gurney  
 Mary A. Napier  
 Daniel Tumas,  
 William I. Wood
- <120> COMPOSTOS, COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS  
 CARACTERIZADAS POR ANTIGÉNIOS RELACIONADOS COM A33
- <130> P1216R1PCT
- <141> 1998-11-20
- <150> US 60/066,364  
 <151> 1997-11-21
- <150> US 60/078,936  
 <151> 1998-03-20
- <150> PCT/US98/19437  
 <151> 1998-09-17
- <160> 30
- <210> 1  
 <211> 299  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*
- <400> 1
- |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Gly | Thr | Lys | Ala | Gln | Val | Glu | Arg | Lys | Leu | Leu | Cys | Leu | Phe |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |
| Ile | Leu | Ala | Ile | Leu | Leu | Cys | Ser | Leu | Ala | Leu | Gly | Ser | Val | Thr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |
| Val | His | Ser | Ser | Glu | Pro | Glu | Val | Arg | Ile | Pro | Glu | Asn | Asn | Pro |
|     |     |     | 35  |     |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |
| Val | Lys | Leu | Ser | Cys | Ala | Tyr | Ser | Gly | Phe | Ser | Ser | Pro | Arg | Val |
|     |     |     | 50  |     |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |
| Glu | Trp | Lys | Phe | Asp | Gln | Gly | Asp | Thr | Thr | Arg | Leu | Val | Cys | Tyr |
|     |     |     | 65  |     |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |
| Asn | Asn | Lys | Ile | Thr | Ala | Ser | Tyr | Glu | Asp | Arg | Val | Thr | Phe | Leu |
|     |     |     | 80  |     |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |
| Pro | Thr | Gly | Ile | Thr | Phe | Lys | Ser | Val | Thr | Arg | Glu | Asp | Thr | Gly |
|     |     |     | 95  |     |     |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |
| Thr | Tyr | Thr | Cys | Met | Val | Ser | Glu | Glu | Gly | Gly | Asn | Ser | Tyr | Gly |
|     |     |     | 110 |     |     |     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |
| Glu | Val | Lys | Val | Lys | Leu | Ile | Val | Leu | Val | Pro | Pro | Ser | Lys | Pro |
|     |     |     | 125 |     |     |     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |

Thr Val Asn Ile	Pro Ser Ser Ala Thr	Ile Gly Asn Arg Ala Val
140		145 150
Leu Thr Cys Ser	Glu Gln Asp Gly Ser	Pro Pro Ser Glu Tyr Thr
155		160 165
Trp Phe Lys Asp	Gly Ile Val Met Pro	Thr Asn Pro Lys Ser Thr
170		175 180
Arg Ala Phe Ser	Asn Ser Ser Tyr Val	Leu Asn Pro Thr Thr Gly
185		190 195
Glu Leu Val Phe	Asp Pro Leu Ser Ala	Ser Asp Thr Gly Glu Tyr
200		205 210
Ser Cys Glu Ala	Arg Asn Gly Tyr Gly	Thr Pro Met Thr Ser Asn
215		220 225
Ala Val Arg Met	Glu Ala Val Glu Arg	Asn Val Gly Val Ile Val
230		235 240
Ala Ala Val Leu	Val Thr Leu Ile Leu	Leu Gly Ile Leu Val Phe
245		250 255
Gly Ile Trp Phe	Ala Tyr Ser Arg Gly	His Phe Asp Arg Thr Lys
260		265 270
Lys Gly Thr Ser	Ser Lys Lys Val Ile	Tyr Ser Gln Pro Ser Ala
275		280 285
Arg Ser Glu Gly	Glu Phe Lys Gln Thr	Ser Ser Phe Leu Val
290		295 299

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 2

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



Asp	Asp	Arg	Ser	His	Tyr	Thr	Cys	Glu	Val	Thr	Trp	Gln	Thr	Pro	110	115	120
Asp	Gly	Asn	Gln	Val	Val	Arg	Asp	Lys	Ile	Thr	Glu	Leu	Arg	Val	125	130	135
Gln	Lys	Leu	Ser	Val	Ser	Lys	Pro	Thr	Val	Thr	Thr	Gly	Ser	Gly	140	145	150
Tyr	Gly	Phe	Thr	Val	Pro	Gln	Gly	Met	Arg	Ile	Ser	Leu	Gln	Cys	155	160	165
Gln	Ala	Arg	Gly	Ser	Pro	Pro	Ile	Ser	Tyr	Ile	Trp	Tyr	Lys	Gln	170	175	180
Gln	Thr	Asn	Asn	Gln	Glu	Pro	Ile	Lys	Val	Ala	Thr	Leu	Ser	Thr	185	190	195
Leu	Leu	Phe	Lys	Pro	Ala	Val	Ile	Ala	Asp	Ser	Gly	Ser	Tyr	Phe	200	205	210
Cys	Thr	Ala	Lys	Gly	Gln	Val	Gly	Ser	Glu	Gln	His	Ser	Asp	Ile	215	220	225
Val	Lys	Phe	Val	Val	Lys	Asp	Ser	Ser	Lys	Leu	Leu	Lys	Thr	Lys	230	235	240
Thr	Glu	Ala	Pro	Thr	Thr	Met	Thr	Tyr	Pro	Leu	Lys	Ala	Thr	Ser	245	250	255
Thr	Val	Lys	Gln	Ser	Trp	Asp	Trp	Thr	Thr	Asp	Met	Asp	Gly	Tyr	260	265	270
Leu	Gly	Glu	Thr	Ser	Ala	Gly	Pro	Gly	Lys	Ser	Leu	Pro	Val	Phe	275	280	285
Ala	Ile	Ile	Leu	Ile	Ile	Ser	Leu	Cys	Cys	Met	Val	Val	Phe	Thr	290	295	300
Met	Ala	Tyr	Ile	Met	Leu	Cys	Arg	Lys	Thr	Ser	Gln	Gln	Glu	His	305	310	315
Val	Tyr	Glu	Ala	Ala	Arg										320	321	

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 390

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; sequência artificial

&lt;222&gt; 1-390

&lt;223&gt; sequência artificial

&lt;400&gt; 3

cttcttgcca actggtatca cttcaagtc cgtgacacgg gaagacactg 50

ggacatacac ttgtatggtc tctgaggaag gcggcaacag ctatggggag 100

gtcaagggtca agctcatcgt gcttgtgcct ccatccaagc ctacagttaa 150

cateccctcc tctgccacca ttggaaccg ggcagtgtg acatgtcag 200  
aacaagatgg tccccacct tctgaatata cctgggtcaa agatgggata 250  
gtgatgccta cgaatcccaa aagcaccgt gccttcagca actcttccta 300  
tgtctgaa' cccacaacag gagagctgg cttgatccc ctgtcagcct 350  
ctgatactgg agaatacagc tgtgaggcac ggaatgggta 390

<210> 4  
<211> 726  
<212> ADN  
<213> artificial

<220>  
<221> sequência artificial  
<222> 1-726  
<223> sequência artificial

<400> 4  
tctcagtcct ctcgtgtag tcgcggagct gtgttctgt tcccaggagt 50  
ccttcggcgg ctgttgtgt caggtgcgcc tgatecgcgat ggggacaaag 100  
gcgcaagctc gagaggaaac tgttgtgcct cttcatattg gcgatcctgt 150  
tgtgtccctt ggcattgggc agtggtacag ttgcactctt ctgaacctga 200  
agtcagaatt cctgagaata atcctgtgaa gttgtctgt gcctactcgg 250  
gcttttcttc tccccgtgtg gagtggaagt ttgaccaagg agacaccacc 300  
agactcgttt gctataataa caagatcaca gcttcctatg aggaccgggt 350  
gaccttcttg ccaactggta tcacctcaa gtccgtgaca cgggaagaca 400  
ctgggacata cacttgtatg gtctctgagg aaggcggcaa cagctatggg 450  
gaggtcaagg tcaagctcat cgtgcttgtg cctccatcca agcctacagt 500  
taacatcccc tcctctgcca ccattgggaa ccgggcagtg ctgacatgct 550  
cagaacaaga tggttcccca ccttctgaat acacctggtt caaagatggg 600  
atagtgatgc ctacgaatcc caaaagcacc cgtgccttca gcaactcttc 650  
ctatgtcctg aatcccacaa caggagagct ggtctttgat ccctgtcag 700  
cctctgatac tggagaatac agctgt 726

<210> 5  
<211> 1503  
<212> ADN  
<213> artificial

<220>  
<221> sequência artificial  
<222> 1-1503  
<223> sequência artificial

&lt;400&gt; 5

gcaggcaaaag taccaggggcc gcctgcatgt gagccacaag gttccaggag 50  
 atgtatccct ccaattgagc accctggaga tggatgaccg gagccactac 100  
 acgtgtgaag tcacctggca gactcctgat ggcaaccaag tcgtgagaga 150  
 taagattact gagctccgtg tccagaaact ctctgtctcc aagcccacag 200  
 tgacaactgg cagcgggttat ggcttcacgg tgccccaggg aatgaggatt 250  
 agccttcaat gccaggggtc ggggttctcc tcccatcagt tatatttgg 300  
 ataagcaaca gactaataac caggaaccc atcaaagtag caaccctaag 350  
 taccttactc ttcaagcctg cggatgagc cgactcaggc tcctatttct 400  
 gcaactgcaa gggccagggt ggctctgagc agcacagcga cattgtgaag 450  
 tttgtggtca aagactctc aaagctactc aagaccaaga ctgaggcacc 500  
 tacaacatg acataccctc tgaaagcaac atctacagt aagcagtcct 550  
 gggactggac cactgacatg gatggtacc ttggagagac cagtgtggg 600  
 ccaggaaaga gcctgcctgt ctttgccatc atctcatca tctcttgtg 650  
 ctgtatggtg gtttttacca tggcctatat catgctctgt cggaagacat 700  
 cccaacaaga gcatgtctac gaagcagcca gggcacatgc cagagaggcc 750  
 aacgactctg gagaaccat gagggtgcc atcttcgcaa gtggctgctc 800  
 cagtgtgag ccaacttccc agaactctgg gcaacaacta ctctgatgag 850  
 ccctgcatag gacaggagta ccagatcac gccagatca atggcaacta 900  
 cggccgctg ctggacacag ttctctgga ttatgagttt ctggccactg 950  
 agggcaaaaag tgtctgttaa aaatgcccc ttaggccagg atctgctgac 1000  
 ataattgcct agtcagtcct tgcctctgc atggccttct tccctgctac 1050  
 ctctcttctt ggatagccca aagtgtccgc ctaccaaac tggagccgct 1100  
 gggagtcaat ggctttgccc tggaatttgc cagatgcac tcaagtaagc 1150  
 cagctgctgg atttgctct gggcccttct agtatctcty cgggggctt 1200  
 ctggtactcc tctctaaata ccagaggga gatgccata gcactaggac 1250  
 ttggtcatca tgcctacaga cactattcaa ctttggcac ttgccaccag 1300  
 aagaccgag gggaggctca gctctgccag ctccaggag cagctatata 1350  
 caggatcatt tctctttctt cagggccaga cagcttttaa ttgaaattgt 1400  
 tatttcacag gccaggggtc agttctgctc ctccactata agtetaatgt 1450  
 tctgactctc tctggtgct caataaatat ctaatcataa cagcaaaaaa 1500

aaa 1503

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 319

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 6

Met	Val	Gly	Lys	Met	Trp	Pro	Val	Leu	Trp	Thr	Leu	Cys	Ala	Val	
1				5					10					15	
Arg	Val	Thr	Val	Asp	Ala	Ile	Ser	Val	Glu	Thr	Pro	Gln	Asp	Val	
				20					25					30	
Leu	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Lys	Ser	Val	Thr	Leu	Pro	Cys	Thr	Tyr	
				35					40					45	
His	Thr	Ser	Thr	Ser	Ser	Arg	Glu	Gly	Leu	Ile	Gln	Trp	Asp	Lys	
				50					55					60	
Leu	Leu	Leu	Thr	His	Thr	Glu	Arg	Val	Val	Ile	Trp	Pro	Phe	Ser	
				65					70					75	
Asn	Lys	Asn	Tyr	Ile	His	Gly	Glu	Leu	Tyr	Lys	Asn	Arg	Val	Ser	
				80					85					90	
Ile	Ser	Asn	Asn	Ala	Glu	Gln	Ser	Asp	Ala	Ser	Ile	Thr	Ile	Asp	
				95					100					105	
Gln	Leu	Thr	Met	Ala	Asp	Asn	Gly	Thr	Tyr	Glu	Cys	Ser	Val	Ser	
				110					115					120	
Leu	Met	Ser	Asp	Leu	Glu	Gly	Asn	Thr	Lys	Ser	Arg	Val	Arg	Leu	
				125					130					135	
Leu	Val	Leu	Val	Pro	Pro	Ser	Lys	Pro	Glu	Cys	Gly	Ile	Glu	Gly	
				140					145					150	
Glu	Thr	Ile	Ile	Gly	Asn	Asn	Ile	Gln	Leu	Thr	Cys	Gln	Ser	Lys	
				155					160					165	
Glu	Gly	Ser	Pro	Thr	Pro	Gln	Tyr	Ser	Trp	Lys	Arg	Tyr	Asn	Ile	
				170					175					180	
Leu	Asn	Gln	Glu	Gln	Pro	Leu	Ala	Gln	Pro	Ala	Ser	Gly	Gln	Pro	
				185					190					195	
Val	Ser	Leu	Lys	Asn	Ile	Ser	Thr	Asp	Thr	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Ile	
				200					205					210	
Cys	Thr	Ser	Ser	Asn	Glu	Glu	Gly	Thr	Gln	Phe	Cys	Asn	Ile	Thr	
				215					220					225	
Val	Ala	Val	Arg	Ser	Pro	Ser	Met	Asn	Val	Ala	Leu	Tyr	Val	Gly	
				230					235					240	
Ile	Ala	Val	Gly	Val	Val	Ala	Ala	Leu	Ile	Ile	Ile	Gly	Ile	Ile	
				245					250					255	
Ile	Tyr	Cys	Cys	Cys	Cys	Arg	Gly	Lys	Asp	Asp	Asn	Thr	Glu	Asp	
				260					265					270	
Lys	Glu	Asp	Ala	Arg	Pro	Asn	Arg	Glu	Ala	Tyr	Glu	Glu	Pro	Pro	
				275					280					285	
Glu	Gln	Leu	Arg	Glu	Leu	Ser	Arg	Glu	Arg	Glu	Glu	Glu	Asp	Asp	
				290					295					300	
Tyr	Arg	Gln	Glu	Glu	Gln	Arg	Ser	Thr	Gly	Arg	Glu	Ser	Pro	Asp	
				305					310					315	
His	Leu	Asp	Gln												
				319											

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 2181

&lt;212&gt; ADN

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 7

```
cccacgcgtc cgcccacgcg tccgccacg ggtccgccca cgcgtccggg 50
ccaccagaag tttagacctc ttggtagca ggaggctgga agaaaggaca 100
gaagtagctc tggctgtgat ggggatctta ctgggcctgc tactcctggg 150
gcacctaaca gtggacactt atggccgtcc catcctggaa gtgccagaga 200
gtgtaacagg accttggaag ggggatgtga atcttccctg cacctatgac 250
cccctgcaag gctacaccca agtcttggtg aagtggctgg tacaacgtgg 300
ctcagaccct gtcaccatct ttctacgtga ctcttctgga gaccatatac 350
agcaggcaaa gtaccagggc cgcctgcatg tgagccacaa ggttccagg 400
gatgtatccc tccaattgag caccctggag atggatgacc ggagccacta 450
cacgtgtgaa gtcacctggc agactcctga tggcaaccaa gtcgtgagag 500
ataagattac tgagctccgt gtccagaaac tctctgtctc caagcccaca 550
gtgacaactg gcagcgggta tggcttcacg gtgcccagg gaatgaggat 600
tagccttcaa tgccaggctc ggggttctcc tccatcagt tatatttgg 650
ataagcaaca gactaataac caggaaccca tcaaagtagc aaccctaagt 700
accttactct tcaagcctgc ggtgatagcc gactcaggct cctatttctg 750
cactgccaa ggcagggttg gctctgagca gcacagcgac attgtgaagt 800
ttgtggtcaa agactcctca aagctactca agaccaagac tgaggcacct 850
acaacatga catacccctt gaaagcaaca tctacagtga agcagtcctg 900
ggactggacc actgacatgg atggctacct tggagagacc agtgctgggc 950
caggaaagag cctgcctgtc ttgcatca tcctcatcat ctcttgtgc 1000
tgtatgggtg tttttacat ggcctatata atgctctgtc ggaagacatc 1050
```

ccaacaagag catgtctacg aagcagccag gtaagaaagt ctctcctctt 1100  
ccatttttga ccccgtcctt gccctcaatt ttgattactg gcaggaaatg 1150  
tggaggaagg ggggtgtggc acagaccaa tcctaaggcc ggaggccttc 1200  
agggtcagga catagctgcc ttccctctct caggcacctt ctgaggttgt 1250  
tttgccctc tgaacacaaa ggataattta gatccatctg ccttctgctt 1300  
ccagaatccc tgggtggtag gatcctgata attaatggc aagaattgag 1350  
gcagaagggt gggaaaccag gaccacagcc ccaagtcctt tcttatgggt 1400  
ggtgggctct tgggcatag ggcacatgcc agagaggcca acgactctgg 1450  
agaaaccatg agggtggcca tcttcgcaag tggctgctcc agtgatgagc 1500  
caacttccca gaatctgggc aacaactact ctgatgagcc ctgcatagga 1550  
caggagtacc agatcatgc ccagatcaat ggcaactacg cccgcctgct 1600  
ggacacagtt cctctggatt atgagtttct ggccactgag ggcaaaagt 1650  
tctgttaaaa atgccccatt aggccaggat ctgctgacat aattgcctag 1700  
tcagtccctg ccttctgcat ggccttcttc cctgctacct ctcttcctgg 1750  
atagcccaaa gtgtccgcct accaactctg gagccgctgg gagtactgg 1800  
ctttgcctg gaatttgcca gatgcatctc aagtaagcca gctgctggat 1850  
ttggtcttg gcccttctag tatctctgcc gggggcttct ggtactctc 1900  
tctaaatacc agagggaaga tgcccatagc actaggactt ggtcatcatg 1950  
cctacagaca ctattcaact ttggcatctt gccaccagaa gacccgaggg 2000  
aggctcagct ctgccagctc agaggaccag ctatatccag gatcatttct 2050  
ctttcttcag ggccagacag cttttaattg aaattgttat ttcacaggcc 2100  
agggttcagt tctgtcctc cactataagt ctaatgttct gactctctcc 2150  
tggtgctcaa taaatatcta atcataacag c 2181

<210> 8

<211> 1295

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

cccagaagtt caagggcccc cggcctcctg cgctcctgcc gccgggaccc 50  
tcgacctcct cagagcagcc ggctgccgcc ccgggaagat ggcgaggagg 100  
agccgccacc gcctcctcct gctgctgctg cgctacctgg tggtcgcct 150  
gggctatcat aaggcctatg ggttttctgc cccaaaagac caacaagtag 200

tcacagcagt agagtaccaa gaggtatatt tagcctgcaa aaccccaaag 250  
 aagactgttt cctccagatt agagtggaag aaactgggtc ggagtgtctc 300  
 ctttgtctac tatcaacaga ctcttcaagg tgattttaaa aatcgagctg 350  
 agatgataga tttcaatatc cggatcaaaa atgtgacaag aagtgatgcg 400  
 gggaaatatac gttgtgaagt tagtgcccca tctgagcaag gccaaaacct 450  
 ggaagaggat acagtcactc tggaagtatt agtgggtcca gcagttccat 500  
 catgtgaagt accctcttct gctctgagtg gaactgtggt agagctacga 550  
 tgtaagaca aagaaggga tccagctcct gaatacacat ggtttaagga 600  
 tggcatccgt ttgctagaaa atcccagact tggctccaa agcaccaaca 650  
 gtcatacac aatgaataca aaaactggaa ctctgcaatt taatactgtt 700  
 tccaaactgg acaactggaga atattctctgt gaagcccgca attctgttgg 750  
 atatcgagg tgctctggga aacgaatgca agtagatgat ctcaacataa 800  
 gtggcatcat agcagccgta gtagttgtgg ccttagtgat ttccgtttgt 850  
 ggcttgggtg tatgctatgc tcagaggaaa ggctactttt caaaagaaac 900  
 ctcttccag aagagtaatt cttcatctaa agccacgaca atgagtgaag 950  
 atgtgcagtg gctcacgcct gtaatcccag cactttggaa ggccgcggcg 1000  
 ggcgatcac gaggtcagga gttctagacc agtctggcca atatggtgaa 1050  
 acccatctc tactaaaata caaaaattag ctgggcatgg tggcatgtgc 1100  
 ctgcagtcc agctgcttgg gagacaggag aatcacttga acccgggagg 1150  
 cggaggttgc agtgagctga gatcacgcca ctgcagtcca gcctgggtaa 1200  
 cagagcaaga ttccatctca aaaaataaaa taaataaata aataaatact 1250  
 ggtttttacc tgtagaattc ttacaataaa tatagcttga tatte 1295

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 312

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 9

Met	Ala	Arg	Arg	Ser	Arg	His	Arg	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Arg
1				5				10					15
Tyr	Leu	Val	Val	Ala	Leu	Gly	Tyr	His	Lys	Ala	Tyr	Gly	Phe
				20					25				30
Ala	Pro	Lys	Asp	Gln	Gln	Val	Val	Thr	Ala	Val	Glu	Tyr	Gln
				35				40					45
Ala	Ile	Leu	Ala	Cys	Lys	Thr	Pro	Lys	Lys	Thr	Val	Ser	Ser
				50				55					60

```

Leu Glu Trp Lys Lys Leu Gly Arg Ser Val Ser Phe Val Tyr Tyr
      65              70              75

Gln Gln Thr Leu Gln Gly Asp Phe Lys Asn Arg Ala Glu Met Ile
      80              85              90

Asp Phe Asn Ile Arg Ile Lys Asn Val Thr Arg Ser Asp Ala Gly
      95              100             105

Lys Tyr Arg Cys Glu Val Ser Ala Pro Ser Glu Gln Gly Gln Asn
      110             115             120

Leu Glu Glu Asp Thr Val Thr Leu Glu Val Leu Val Ala Pro Ala
      125             130             135

Val Pro Ser Cys Glu Val Pro Ser Ser Ala Leu Ser Gly Thr Val
      140             145             150

Val Glu Leu Arg Cys Gln Asp Lys Glu Gly Asn Pro Ala Pro Glu
      155             160             165

Tyr Thr Trp Phe Lys Asp Gly Ile Arg Leu Leu Glu Asn Pro Arg
      170             175             180

Leu Gly Ser Gln Ser Thr Asn Ser Ser Tyr Thr Met Asn Thr Lys
      185             190             195

Thr Gly Thr Leu Gln Phe Asn Thr Val Ser Lys Leu Asp Thr Gly
      200             205             210

Glu Tyr Ser Cys Glu Ala Arg Asn Ser Val Gly Tyr Arg Arg Cys
      215             220             225

Pro Gly Lys Arg Met Gln Val Asp Asp Leu Asn Ile Ser Gly Ile
      230             235             240

Ile Ala Ala Val Val Val Val Ala Leu Val Ile Ser Val Cys Gly
      245             250             255

Leu Gly Val Cys Tyr Ala Gln Arg Lys Gly Tyr Phe Ser Lys Glu
      260             265             270

Thr Ser Phe Gln Lys Ser Asn Ser Ser Ser Lys Ala Thr Thr Met
      275             280             285

Ser Glu Asn Val Gln Trp Leu Thr Pro Val Ile Pro Ala Leu Trp
      290             295             300

Lys Ala Ala Ala Gly Gly Ser Arg Gly Gln Glu Phe
      305             310             312

```

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 300

&lt;212&gt; PRT

<213> *Mus musculus*

&lt;400&gt; 10

```

Met Gly Thr Glu Gly Lys Ala Gly Arg Lys Leu Leu Phe Leu Phe
  1              5              10              15

```



Thr	Ser	Met	Ile	Leu	Gly	Ser	Leu	Val	Gln	Gly	Lys	Gly	Ser	Val	20	25	30
Tyr	Thr	Ala	Gln	Ser	Asp	Val	Gln	Val	Pro	Glu	Asn	Glu	Ser	Ile	35	40	45
Lys	Leu	Thr	Cys	Thr	Tyr	Ser	Gly	Phe	Ser	Ser	Pro	Arg	Val	Glu	50	55	60
Trp	Lys	Phe	Val	Gln	Gly	Ser	Thr	Thr	Ala	Leu	Val	Cys	Tyr	Asn	65	70	75
Ser	Gln	Ile	Thr	Ala	Pro	Tyr	Ala	Asp	Arg	Val	Thr	Phe	Ser	Ser	80	85	90
Ser	Gly	Ile	Thr	Phe	Ser	Ser	Val	Thr	Arg	Lys	Asp	Asn	Gly	Glu	95	100	105
Tyr	Thr	Cys	Met	Val	Ser	Glu	Glu	Gly	Gly	Gln	Asn	Tyr	Gly	Glu	110	115	120
Val	Ser	Ile	His	Leu	Thr	Val	Leu	Val	Pro	Pro	Ser	Lys	Pro	Thr	125	130	135
Ile	Ser	Val	Pro	Ser	Ser	Val	Thr	Ile	Gly	Asn	Arg	Ala	Val	Leu	140	145	150
Thr	Cys	Ser	Glu	His	Asp	Gly	Ser	Pro	Pro	Ser	Glu	Tyr	Ser	Trp	155	160	165
Phe	Lys	Asp	Gly	Ile	Ser	Met	Leu	Thr	Ala	Asp	Ala	Lys	Lys	Thr	170	175	180
Arg	Ala	Phe	Met	Asn	Ser	Ser	Phe	Thr	Ile	Asp	Pro	Lys	Ser	Gly	185	190	195
Asp	Leu	Ile	Phe	Asp	Pro	Val	Thr	Ala	Phe	Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	200	205	210
Tyr	Cys	Gln	Ala	Gln	Asn	Gly	Tyr	Gly	Thr	Ala	Met	Arg	Ser	Glu	215	220	225
Ala	Ala	His	Met	Asp	Ala	Val	Glu	Leu	Asn	Val	Gly	Gly	Ile	Val	230	235	240
Ala	Ala	Val	Leu	Val	Thr	Leu	Ile	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Ile	Phe	245	250	255
Gly	Val	Trp	Phe	Ala	Tyr	Ser	Arg	Gly	Tyr	Phe	Glu	Thr	Thr	Lys	260	265	270
Lys	Gly	Thr	Ala	Pro	Gly	Lys	Lys	Val	Ile	Tyr	Ser	Gln	Pro	Ser	275	280	285
Thr	Arg	Ser	Glu	Gly	Glu	Phe	Lys	Gln	Thr	Ser	Ser	Phe	Leu	Val	290	295	300

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 2181

&lt;212&gt; ADN

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 11

ccccacgctc cgcccacgcg tccgcccacg ggtccgcca cgcgtccggg 50  
ccaccagaag tttgagcctc tttggtagca ggaggetgga agaaaggaca 100  
gaagtagctc tggtgtgat ggggatctta ctgggcctgc tactcctggg 150  
gcacctaaca gtggacactt atggccgtcc catcctggaa gtgccagaga 200  
gtgtaacagg accttgaaa ggggatgtga atcttcctg cacctatgac 250  
cccctgcaag gctacacca agtcttggtg aagtggctgg tacaacgtgg 300  
ctcagaccct gtcaccatct ttctacgtga ctcttctgga gaccatatcc 350  
agcaggcaaa gtaccagggc cgcctgcatg tgagccacaa ggttccagga 400  
gatgtatccc tccaattgag caccctggag atggatgacc ggagccacta 450  
cacgtgtgaa gtcacctggc agactcctga tggcaaccaa gtcgtgagag 500  
ataagattac tgagctccgt gtccagaaac tctctgtctc caagcccaca 550  
gtgacaactg gcagcggtta tggcttcacg gtgccccagg gaatgaggat 600  
tagccttcaa tgccaggctc ggggttctcc tcccatcagt tatatttggg 650  
ataagcaaca gactaataac caggaaccca tcaaagtagc aaccctaagt 700  
accttactct tcaagcctgc ggtgatagcc gactcaggct cctatttctg 750  
cactgccaag ggcaggttg gctctgagca gcacagcgac attgtgaagt 800  
ttgtgggtcaa agactcctca aagctactca agaccaagac tgaggcacct 850  
acaacatga cataccctt gaaagcaaca tctacagtga agcagtcctg 900  
ggactggacc actgacatgg atggctacct tggagagacc agtgcctggc 950  
caggaaagag cctgcctgtc ttggccatca tctcatcat ctcttgtgc 1000  
tgtatggtgg tttttaccat ggcctatata atgctctgtc ggaagacata 1050  
ccaacaagag catgtctacg aagcagccag gtaagaaagt ctctcctctt 1100  
ccatttttga ccccgctcct gccctcaatt ttgattactg gcaggaaatg 1150  
tgaggaaggg ggggtgtggc acagaccaa tcctaaggcc ggaggccttc 1200  
agggtcagga catagctgcc ttcctctctc caggcacctt ctgaggttgt 1250  
tttggccctc tgaacacaaa ggataattta gatccatctg ccttctgctt 1300  
ccagaatccc tgggtggtag gatcctgata attaattggc aagaattgag 1350  
gcagaagggt gggaaaccag gaccacagcc ccaagtcctt tcttatgggt 1400  
ggtgggctct tgggcatag ggcacatgcc agagaggcca acgactctgg 1450  
agaaacatg aggggtggcca tcttcgcaag tggctgctcc agtgatgagc 1500

caacttccca gaatctgggc aacaactact ctgatgagcc ctgcatagga 1550  
 caggagtacc agatcatcgc ccagatcaat ggcaactacg cccgcctgct 1600  
 ggacacagtt cctctggatt atgagtttct ggccactgag ggcaaaagtg 1650  
 tctgttaaaa atgccccatt aggccaggat ctgctgacat aattgcctag 1700  
 teagtccttg ccttctgcat ggcttcttc cctgctaect ctcttcttg 1750  
 atagcccaaa gtgtccgctt accaactctg gagccgctgg gactcactgg 1800  
 ctttgccctg gaatttgcca gatgcatctc aagtaagcca gctgctggat 1850  
 ttggtctctg gccctcttag tatctctgcc gggggcttct ggtactcctc 1900  
 tctaaatacc agaggaaga tgcccatagc actaggactt ggtcatcatg 1950  
 cctacagaca ctattcaact ttggcatctt gccaccagaa gacccgaggg 2000  
 aggctcagct ctgccagctc agaggaccag ctatatccag gatcatttct 2050  
 ctttcttcag ggccagacag cttttaattg aaattgttat ttcacaggcc 2100  
 aggggttcagt tctgctcctc cactataagt ctaatgttct gactctctcc 2150  
 tgggtgctcaa taaatatcta atcataacag c 2181

<210> 12  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> sequência artificial

<220>  
 <221> sequência artificial  
 <222> 1-24  
 <223> sequência artificial

<400> 12  
**tcgcggagct gtgttctgtt tccc 24**

<210> 13  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> sequência artificial

<220>  
 <221> sequência artificial  
 <222> 1-50  
 <223> sequência artificial

<400> 13  
**tgatcgcat ggggacaaag gcgcaagctc gagaggaaac tgttgtgcct 50**

<210> 14  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> sequência artificial

<220>  
<221> sequência artificial  
<222> 1-20  
<223> sequência artificial

<400> 14  
**acacctgggtt caaagatggg 20**

<210> 15  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> sequência artificial

<220>  
<221> sequência artificial  
<222> 1-24  
<223> sequência artificial

<400> 15  
**taggaagagt tgctgaaggc acgg 24**

<210> 16  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> sequência artificial

<220>  
<221> sequência artificial  
<222> 1-20  
<223> sequência artificial

<400> 16  
**ttgccttact caggtgctac 20**

<210> 17  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> sequência artificial

<220>  
<221> sequência artificial  
<222> 1-20  
<223> sequência artificial

<400> 17  
**actcagcagt ggtaggaaag 20**

<210> 18  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> sequência artificial

<220>  
<221> sequência artificial  
<222> 1-24  
<223> sequência artificial

<400> 18  
**tatccctcca attgagcacc ctgg 24**

<210> 19  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> sequência artificial

<220>  
<221> sequência artificial  
<222> 1-21  
<223> sequência artificial

<400> 19  
**gtcgggaagac atcccaacaa g 21**

<210> 20  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> sequência artificial

<220>  
<221> sequência artificial  
<222> 1-24  
<223> sequência artificial

<400> 20  
**cttcacaatg tcgctgtgct gctc 24**

<210> 21  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> sequência artificial

<220>  
<221> sequência artificial  
<222> 1-24  
<223> sequência artificial

<400> 21  
**agccaaatcc agcagctggc ttac 24**

<210> 22  
<211> 50  
<212> ADN  
<213> sequência artificial

<220>  
<221> sequência artificial  
<222> 1-50  
<223> sequência artificial

<400> 22  
**tggtatgaccg gagccactac acgtgtgaag tcacctggca gactcctgat 50**

<210> 23  
<211> 260  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 23

Leu Ala Leu Gly Ser Val Thr Val His Ser Ser Glu Pro Glu Val  
 1 5 10 15

Arg Ile Pro Glu Asn Asn Pro Val Lys Leu Ser Cys Ala Tyr Ser  
 20 25 30

Gly Phe Ser Ser Pro Arg Val Glu Trp Lys Phe Asp Gln Gly Asp  
 35 40 45

Thr Thr Arg Leu Val Cys Tyr Asn Asn Lys Ile Thr Ala Ser Tyr  
 50 55 60

Glu Asp Arg Val Thr Phe Leu Pro Thr Gly Ile Thr Phe Lys Ser  
 65 70 75

Val Thr Arg Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Thr Cys Met Val Ser Glu  
 80 85 90

Glu Gly Gly Asn Ser Tyr Gly Glu Val Lys Val Lys Leu Ile Val  
 95 100 105

Leu Val Pro Pro Ser Lys Pro Thr Val Asn Ile Pro Ser Ser Ala  
 110 115 120

Thr Ile Gly Asn Arg Ala Val Leu Thr Cys Ser Glu Gln Asp Gly  
 125 130 135

Ser Pro Pro Ser Glu Tyr Thr Trp Phe Lys Asp Gly Ile Val Met  
 140 145 150

Pro Thr Asn Pro Lys Ser Thr Arg Ala Phe Ser Asn Ser Ser Tyr  
 155 160 165

Val Leu Asn Pro Thr Thr Gly Glu Leu Val Phe Asp Pro Leu Ser  
 170 175 180

Ala Ser Asp Thr Gly Glu Tyr Ser Cys Glu Ala Arg Asn Gly Tyr  
 185 190 195

Gly Thr Pro Met Thr Ser Asn Ala Val Arg Met Glu Ala Val Glu  
 200 205 210

Arg Asn Val Gly Val Ile Val Ala Ala Val Leu Val Thr Leu Ile  
 215 220 225

Leu Leu Gly Ile Leu Val Phe Gly Ile Trp Phe Ala Tyr Ser Arg  
 230 235 240

Gly His Phe Asp Arg Thr Lys Lys Gly Thr Ser Ser Lys Lys Val  
 245 250 255

Ile Tyr Ser Gln Pro  
 260

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 270

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 24

Val Arg Val Thr Val Asp Ala Ile Ser Val Glu Thr Pro Gln Asp  
 1 5 10 15

Val Leu Arg Ala Ser Gln Gly Lys Ser Val Thr Leu Pro Cys Thr  
 20 25 30

Tyr His Thr Ser Thr Ser Ser Arg Glu Gly Leu Ile Gln Trp Asp  
 35 40 45  
 Lys Leu Leu Leu Thr His Thr Glu Arg Val Val Ile Trp Pro Phe  
 50 55 60  
 Ser Asn Lys Asn Tyr Ile His Gly Glu Leu Tyr Lys Asn Arg Val  
 65 70 75  
 Ser Ile Ser Asn Asn Ala Glu Gln Ser Asp Ala Ser Ile Thr Ile  
 80 85 90  
 Asp Gln Leu Thr Met Ala Asp Asn Gly Thr Tyr Glu Cys Ser Val  
 95 100 105  
 Ser Leu Met Ser Asp Leu Glu Gly Asn Thr Lys Ser Arg Val Arg  
 110 115 120  
 Leu Leu Val Leu Val Pro Pro Ser Lys Pro Glu Cys Gly Ile Glu  
 125 130 135  
 Gly Glu Thr Ile Ile Gly Asn Asn Ile Gln Leu Thr Cys Gln Ser  
 140 145 150  
 Lys Glu Gly Ser Pro Thr Pro Gln Tyr Ser Trp Lys Arg Tyr Asn  
 155 160 165  
 Ile Leu Asn Gln Glu Gln Pro Leu Ala Gln Pro Ala Ser Gly Gln  
 170 175 180  
 Pro Val Ser Leu Lys Asn Ile Ser Thr Asp Thr Ser Gly Tyr Tyr  
 185 190 195  
 Ile Cys Thr Ser Ser Asn Glu Glu Gly Thr Gln Phe Cys Asn Ile  
 200 205 210  
 Thr Val Ala Val Arg Ser Pro Ser Met Asn Val Ala Leu Tyr Val  
 215 220 225  
 Gly Ile Ala Val Gly Val Val Ala Ala Leu Ile Ile Ile Gly Ile  
 230 235 240  
 Ile Ile Tyr Cys Cys Cys Cys Arg Gly Lys Asp Asp Asn Thr Glu  
 245 250 255  
 Asp Lys Glu Asp Ala Arg Pro Asn Arg Glu Ala Tyr Glu Glu Pro  
 260 265 270

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 263

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 25

Leu Cys Ser Leu Ala Leu Gly Ser Val Thr Val His Ser Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Pro Glu Val Arg Ile Pro Glu Asn Asn Pro Val Lys Leu Ser Cys  
 20 25 30  
 Ala Tyr Ser Gly Phe Ser Ser Pro Arg Val Glu Trp Lys Phe Asp

	35		40		45
Gln Gly Asp Thr	Thr Arg Leu Val Cys	Tyr Asn Asn Lys Ile Thr			
	50	55			60
Ala Ser Tyr Glu Asp Arg Val Thr Phe	Leu Pro Thr Gly Ile Thr				
	65	70			75
Phe Lys Ser Val Thr Arg Glu Asp Thr	Gly Thr Tyr Thr Cys Met				
	80	85			90
Val Ser Glu Glu Gly Gly Asn Ser Tyr	Gly Glu Val Lys Val Lys				
	95	100			105
Leu Ile Val Leu Val Pro Pro Ser Lys	Pro Thr Val Asn Ile Pro				
	110	115			120
Ser Ser Ala Thr Ile Gly Asn Arg Ala	Val Leu Thr Cys Ser Glu				
	125	130			135
Gln Asp Gly Ser Pro Pro Ser Glu Tyr	Thr Trp Phe Lys Asp Gly				
	140	145			150
Ile Val Met Pro Thr Asn Pro Lys Ser	Thr Arg Ala Phe Ser Asn				
	155	160			165
Ser Ser Tyr Val Leu Asn Pro Thr Thr	Gly Glu Leu Val Phe Asp				
	170	175			180
Pro Leu Ser Ala Ser Asp Thr Gly Glu	Tyr Ser Cys Glu Ala Arg				
	185	190			195
Asn Gly Tyr Gly Thr Pro Met Thr Ser	Asn Ala Val Arg Met Glu				
	200	205			210
Ala Val Glu Arg Asn Val Gly Val Ile	Val Ala Ala Val Leu Val				
	215	220			225
Thr Leu Ile Leu Leu Gly Ile Leu Val	Phe Gly Ile Trp Phe Ala				
	230	235			240
Tyr Ser Arg Gly His Phe Asp Arg Thr	Lys Lys Gly Thr Ser Ser				
	245	250			255
Lys Lys Val Ile Tyr Ser Gln Pro					
	260	263			

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 273

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*



&lt;400&gt; 26

```

Leu Cys Ala Val Arg Val Thr Val Asp Ala Ile Ser Val Glu Thr
 1           5           10           15

Pro Gln Asp Val Leu Arg Ala Ser Gln Gly Lys Ser Val Thr Leu
          20           25           30

Pro Cys Thr Tyr His Thr Ser Thr Ser Ser Arg Glu Gly Leu Ile
          35           40           45

Gln Trp Asp Lys Leu Leu Leu Thr His Thr Glu Arg Val Val Ile
          50           55           60

Trp Pro Phe Ser Asn Lys Asn Tyr Ile His Gly Glu Leu Tyr Lys
          65           70           75

Asn Arg Val Ser Ile Ser Asn Asn Ala Glu Gln Ser Asp Ala Ser
          80           85           90

Ile Thr Ile Asp Gln Leu Thr Met Ala Asp Asn Gly Thr Tyr Glu
          95          100          105

Cys Ser Val Ser Leu Met Ser Asp Leu Glu Gly Asn Thr Lys Ser
          110          115          120

Arg Val Arg Leu Leu Val Leu Val Pro Pro Ser Lys Pro Glu Cys
          125          130          135

Gly Ile Glu Gly Glu Thr Ile Ile Gly Asn Asn Ile Gln Leu Thr
          140          145          150

Cys Gln Ser Lys Glu Gly Ser Pro Thr Pro Gln Tyr Ser Trp Lys
          155          160          165

Arg Tyr Asn Ile Leu Asn Gln Glu Gln Pro Leu Ala Gln Pro Ala
          170          175          180

Ser Gly Gln Pro Val Ser Leu Lys Asn Ile Ser Thr Asp Thr Ser
          185          190          195

Gly Tyr Tyr Ile Cys Thr Ser Ser Asn Glu Glu Gly Thr Gln Phe
          200          205          210

Cys Asn Ile Thr Val Ala Val Arg Ser Pro Ser Met Asn Val Ala
          215          220          225

Leu Tyr Val Gly Ile Ala Val Gly Val Val Ala Ala Leu Ile Ile
          230          235          240

Ile Gly Ile Ile Ile Tyr Cys Cys Cys Cys Arg Gly Lys Asp Asp
          245          250          255

Asn Thr Glu Asp Lys Glu Asp Ala Arg Pro Asn Arg Glu Ala Tyr
          260          265          270

Glu Glu Pro
          273

```

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 413

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; sequência artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; sequência artificial

&lt;222&gt; 1-413

&lt;223&gt; sequência artificial

&lt;400&gt; 27

ctcgagccgc tcgagccgtg cggggaaata tcgttgtgaa gttagtgcc 50  
catctgagca aggccaaaac ctggaagagg atacagtcac tctggaagta 100  
ttagtggctc cagcagttcc atcatgtgaa gtaccctctt ctgctctgag 150  
tggaactgtg gtagagctac gatgtcaaga caaagaaggg aatccagctc 200  
ctgaatacac atggtttaag gatggcatcc gtttgctaga aaatcccaga 250  
cttggtctcc aaagcaccaa cagctcatac acaatgaata caaaaactgg 300  
aactctgcaa ttttaactg ttccaaact ggacactgga gaatattcct 350  
gtgaagcccg caattctgtt ggatatcgca ggtgtcctgg ggaaacgaat 400  
gcaagtagat gat 413

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; sequência artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; sequência artificial

&lt;222&gt; 1-22

&lt;223&gt; sequência artificial

&lt;400&gt; 28

**atcgttgtga agttagtgcc cc 22**

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; sequência artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; sequência artificial

&lt;222&gt; 1-23

&lt;223&gt; sequência artificial

&lt;400&gt; 29

**acctgcgata tccaacagaa ttg 23**

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 48

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; sequência artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; sequência artificial

&lt;222&gt; 1-48

&lt;223&gt; sequência artificial

&lt;400&gt; 30

**ggaagaggat acagtcactc tggaagtatt agtggctcca gcagttcc 48**

Lisboa,

### REIVINDICAÇÕES

1. Antagonista do polipéptido cuja sequência de aminoácidos se mostra na Fig. 3 (SEQ ID NO:9), para utilização num método de tratamento médico, onde o antagonista é:

um anticorpo contra o referido polipéptido, que, parcial ou totalmente, bloqueia, inibe ou neutraliza a actividade do referido polipéptido de estimulação da proliferação de linfócitos T estimulados e/ou a actividade do referido polipéptido de estimulação de infiltrados de células inflamatórias na pele de porquinho-da-índia; ou

uma molécula anti-sentido, de ribozima ou em hélice tripla dirigida contra a sequência de ácido nucleico que se mostra na Fig. 2 (SEQ ID NO:8).

2. Antagonista de acordo com a reivindicação 1, que é um anticorpo.

3. Antagonista de acordo com a reivindicação 2, que é um anticorpo monoclonal.

4. Antagonista de acordo com a reivindicação 3, que possui resíduos da região determinante de complementaridade (CDR) não humana e que contém resíduos da região estrutural (FR, *framework*) humana.

5. Utilização de um polipéptido na fabricação de um medicamento para melhoria da resposta inflamatória, onde o polipéptido:

(i) compreende os aminoácidos 1 a 312 da Figura 3 (SEQ ID NO:9), ou uma sua forma truncada ou segregada de ocorrência natural, uma sua forma variante de ocorrência natural ou uma sua variante alélica de ocorrência natural; ou

(ii) tem pelo menos 80% de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos da Figura 3 (SEQ ID NO:9), com ou sem a sua metionina de iniciação, onde a referida identidade de sequência é determinada ao longo de todo o comprimento da referida sequência;

e onde o polipéptido estimula a proliferação de linfócitos T estimulados e/ou estimula infiltrados de células inflamatórias na pele de porquinho-da-índia.

6. Utilização de acordo com a reivindicação 5, onde o nível de identidade é de pelo menos 85%.

7. Utilização de acordo com a reivindicação 5, onde o nível de identidade é de pelo menos 90%.

8. Utilização de acordo com a reivindicação 5, onde o nível de identidade é de pelo menos 95%.

9. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 8, onde o medicamento é para o tratamento de doença infecciosa ou imunodeficiência.

Lisboa,

1 WVGKWPV LWT LCAVRVT VDAI SVETPOOVL RAS QGKSVTL PCTYHTSTS  
1 WGTKAQVERK LCL FICAIL CSLALGSVTVHSSE . . . . . PEVRIPE  
1 . . . . . MGIL GLLLLGHLT VDTYGRPILEVPESTGPWKGDVNL PCTYOPL  
1 WARRSRMR LLLLLRYLVVA GYHXYGFSAPKO . . . . . QVVTAYE  
1 . MGTEGKAGRK LLLFLFTSMIL GSVQKGSVYTAQ . . . . . SDVQVPE

51 SREGLIQWOKLL LTHTERVYI WFFSNKNYIHGELYXNRYSI SHNAEOD DA  
43 NNPVK LLSAYSGFSSPRVEWK FQGGDTTRL VCYNNKITASYE D RVTFLPT  
47 QGYTVLYKWL VQRGSDPTI FLRDSSGDHIQQA KYQGRLHYSHKYPG OV  
43 YQEA I LA CKTPKKT VSSRL EWKKL GRYSVF VY YQQT LQGOKH RAEMI DF  
42 NESIK LTC TYS GFSSPRVEWK FVQGSTTAL VCYNSQITAPYAD RVTFSSS

101 SITIOQLT WAD HGT YEC SVSL . M . . . . . SDEGNTKSRVRLL VLVPPSK  
93 GITFKSVTRED TGT YTCMVSE . . . . . EGNSYGE VKVKLI VLVPPSK  
97 SLQLSTLEWDR SHYTC EYTWOTPOGNQVYRDKITELRYOKLS VSKPTVT  
93 N I R I K H V T R S O A G K Y R C E V S A P S . . . . . EOGHLEE DTVTLE VLVAPAY  
92 GITFSSSVTRKON GEYTCMVSE . . . . . EGGONYGE VSIHLIT VLVPPSK

144 PECGIEGET I I G N H I Q L T C Q S K E G S P T P Q Y S W K R Y N I L N Q E Q . . . . .  
135 PTVNI PSSATI GNR A V L T C S E O D G S P P S E Y T W F K D G I V M P T N . P K S T R A F  
147 TGS G Y G F T V P O G W R I S L C C Q A R . G S P P I S Y I W Y K Q O O T N H O E P . . . . .  
137 P S C E V P S S A L S G T V V E L R C Q D X E G N P A P E Y T W F K D G I R L L E N . P R L G S Q S  
134 P T I S V P S S V T I G N R A V L T C S E H D G S P P S E Y S W F K D G I S M L T A D A K K T R A F

**FIG. 1A**

```

SEQ ID NO: 6   A33   186   . . . P L A Q P A S G Q P V S L K H I S T D T S G Y Y I C T S S N E E G . . . . . T Q F C N I T V
SEQ ID NO: 1   40628 184   S N S S Y V L N P T T G E L V F D P L S A S D T G E Y S C E A R N G Y G . . . . . T P M T S N A V
SEQ ID NO: 2   45416 188   . . . . . I K V A T L S T L L F K P A V I A D S G S Y F C T A K G Q V G S E Q H S D I V K F V V K D
SEQ ID NO: 9   35638 186   T N S S Y T M N T K T G T L Q F H T V S K L D T G E Y S C E A R N S V G . . . . . Y R R C P G K R
SEQ ID NO: 10  JAM   184   M N S S F T I D P K S G O L I F D P V T A F D S G E Y Y C I A Q N G Y G . . . . . T A M R S E A A

A33   227   A V R S P S M N V A L Y V G I A V G V V A A L I I I G I I I Y C C C C R G K D D N T E D K E D A . .
40628 228   R M E A V E R N V G V I V A A V L V T L I L L G I L V F G I W F A Y S R G H F D R T K K G T S . . .
45416 233   S S K L L K T K T E A P T T M T Y P L K A T S T V K Q S W D W T T D M D G Y L G E T S A G P G K S L
35638 230   M Q V D D L N I S G I I J A A V V V V A L V I S V C G L G V C Y A Q R K G Y F S K E T S F Q K S . .
JAM   228   H M D A V E L N V G G I V A A V L V T L I L L G L L I F G V W F A Y S R G Y F E T T K K G T A P . .

A33   275   . R P N R E A Y E E P P E Q L R E L S R E R E E E D D Y R Q E E Q R S T G R E S P D H L D Q
40628 275   . . . . . S K K V I Y S Q P S A R S E G E F K Q T S S F L V . . . . .
45416 283   P V F A I I L I I S L C C M V V F T M A Y I M L C R K T S Q E H V Y E A A R . . . . .
35638 277   . N S S S K A T T M . S E N V Q W L T P V I P A L W K A A A G G S R G Q E F . . . . .
JAM   276   . . . . . G K K V I Y S Q P S T R S E G E F K Q T S S F L V . . . . .

```

FIG. 1B

SEQ ID NO:8

CCCAGAAAGTTCAAGGGCCCCCGGCCTCCTGCGCTCCTGCCGCCGGGACCCCTCGACCTCCT  
CAGAGCAGCCGGCTGCCGCCCCGGGAAGATGGCGAGCAGGAGCCGCCACCGCCTCCTCCT  
GCTGCTGCTGCGCTACCTGGTGGTCGCCCTGGGCTATCATAAGGCCTATGGGTTTTCTGC  
CCCCAAAGACCAACAAGTAGTCACAGCAGTAGAGTACCAAGAGGCTATTTTAGCCTGCAA  
AACCCCAAAGAAGACTGTTTCTCCAGATTAGAGTGGAAGAACTGGGTGCGAGTGTCTC  
CTTTGTCTACTATCAACAGACTCTTCAAGGTGATTTTAAAAATCGAGCTGAGATGATAGA  
TTTCAATATCCGGATCAAAAATGTGACAAGAAGTGATGCGGGGAAATATCGTTGTGAAGT  
TAGTGCCCCATCTGAGCAAGGCCAAAACCTGGAAGAGGATACAGTCACTCTGGAAGTATT  
AGTGGCTCCAGCAGTTCATCATGTGAAGTACCCTCTTCTGCTCTGAGTGGAAGTGTGGT  
AGAGCTACGATGTCAAGACAAAGAAGGGAATCCAGCTCCTGAATACACATGGTTTAAAGGA  
TGGCATCCGTTTGCTAGAAAATCCCAGACTTGGCTCCCAAAGCACCAACAGCTCATACAC  
AATGAATACAAAACCTGGAAGTCTGCAATTTAATACTGTTTCCAAACTGGACACTGGAGA  
ATATTCTGTGAAGCCCGCAATTCTGTTGGATATCGCAGGTGTCTGGGAAACGAATGCA  
AGTAGATGATCTCAACATAAGTGGCATCATAGCAGCCGTAGTAGTTGTGGCCTTAGTGAT  
TTCCGTTTGTGGCCTTGGTGTATGCTATGCTCAGAGGAAAGGCTACTTTTCAAAGAAAC  
CTCCTTCCAGAAGAGTAATTCTTCATCTAAAGCCACGACAATGAGTGAAAATGTGCAGTG  
GCTCAGCCTGTAATCCAGCACTTTGGAAGGCCGCGCGGGCGGATCACGAGGTCAGGA  
GTTCTAGACCACTCTGGCCAATATGGTGAAACCCCATCTCTACTAAAATACAAAATTAG  
CTGGGCATGGTGGCATGTGCTGCAGTTCAGCTGCTTGGGAGACAGGAGAAATCACTTGA  
ACCCGGGAGGCGGAGGTTGCAGTGAGCTGAGATCACGCCACTGCAGTCCAGCCTGGGTAA  
CAGAGCAAGATTCCATCTCAAAAAATAAAATAAATAAATAAATAAATACTGGTTTTTACC  
GTAGAATTCTTACAATAAATATAGCTTGATATTC

**FIG. 2**

SEQ ID NO:9

MARRSRHRLLLLLLRYLVVALGYHKAYGFSAPKDQQVVTAVEYQEAILACKTPKKTVSSR  
LEWKKLGRSVSVFVYYQOTLQGDfKNRAEMIDFNIRIKNVTRSDAGKYRCEVSAPSEQGQN  
LEEDTVTLEVLVAPAVPSCEVPSSALSGTVVELRCQDKEGNPAPEYTWFKDGIRLLENPR  
LGSQSTNSSYTMNTKTGTLQFNTVSKLDTGEYSCEARNVGYRRCPGKRMQVDDLNISGI  
IAAVVVVALVISVCGLGVCYAQRKGYFSKETSFQKSNSSSKATTMSENVQWLTVPVIALW  
KAAAGGSRGQEF

**FIG. 3**

SEQ ID NO: 6	A33_hum	1	..MVGKMPV	L	W	T	L	C	A	V	R	V	T	V	D	...	A	I	S	V	E	T	P	Q	D	V	L	R	A	S	Q	G	K	S	V	T	L	P	C								
SEQ ID NO: 9	35638	1	MARRSRHRL	L	L	L	L	R	Y	L	V	V	A	L	G	Y	H	K	A	Y	G	F	S	A	P	K	D	Q	Q	V	V	T	A	V	E	Y	Q	E	A	I	L	A	C				
	A33_hum	44	T	Y	H	T	S	S	R	E	G	L	I	Q	W	D	K	L	L	T	H	T	E	R	V	V	I	W	F	S	N	X	N	Y	I	H	G	E	L	Y	K	N	R	V	S	I	S
	35638	51	..K	T	P	X	K	T	V	S	S	R	L	E	W	K	K	L	...	G	R	S	V	S	F	V	Y	Y	Q	T	..L	O	G	D	..F	K	N	R	...	...	...	...	...				
	A33_hum	94	N	A	E	Q	S	O	A	S	I	T	I	D	Q	L	T	M	A	D	N	G	T	Y	E	C	S	V	S	L	W	S	D	L	E	G	N	..T	K	S	R	V	R	L	L		
	35638	87	..A	E	M	I	O	F	N	I	R	I	K	N	V	T	R	S	D	A	G	K	Y	R	C	E	V	S	A	P	S	E	Q	Q	N	L	E	E	D	T	V	T	L	E	V	L	
	A33_hum	143	K	P	E	C	G	I	E	G	E	T	I	I	G	N	I	Q	L	T	C	Q	S	K	E	G	S	P	T	P	Q	Y	S	W	K	R	Y	N	I	L	N	O	E	Q	P	L	A
	35638	136	V	P	S	C	E	V	P	S	S	A	L	S	G	T	V	E	L	R	C	Q	D	K	E	G	N	P	A	P	E	Y	T	W	F	K	D	G	I	R	L	L	E	N	P	R	
	A33_hum	193	G	O	P	V	S	L	K	N	I	S	T	O	T	S	G	Y	I	C	T	S	S	N	E	E	G	T	O	F	C	N	I	T	V	A	V	...	R	I	S	P	S	M	N	V	
	35638	186	T	N	S	S	Y	T	M	N	T	K	T	G	T	L	O	F	N	T	..V	S	K	L	D	T	G	E	Y	S	C	E	A	R	N	S	V	G	Y	R	R	C	P	G	K	R	
	A33_hum	240	G	I	A	V	G	V	V	A	L	I	I	I	G	I	I	I	Y	C	C	...	C	R	G	K	O	D	N	T	E	O	K	E	D	A	R	P	N	R	E	A	Y	E	E		
	35638	235	L	N	I	S	G	I	I	A	A	V	V	V	A	L	V	I	S	V	C	G	L	G	V	C	Y	A	O	R	K	G	Y	F	S	K	E	T	S	F	O	K	S	N			
	A33_hum	287	Q	L	R	E	L	S	..E	R	E	E	E	D	D	Y	R	Q	E	E	E	Q	R	S	T	G	R	E	S	P	D	H	L	D	Q												
	35638	285	M	S	E	N	V	Q	W	L	T	P	V	I	P	A	L	W	X	A	A	G	G	S	R	G	O	E	F																		

FIG. 4



SEQ ID NO: 10 jam 1 M G T E G K A G R K L L F L F T S M I L G S L V O G K G S V Y T A Q S D V Q V . . . P E N E S I K L  
SEQ ID NO: 29 35638 1 . . . M A R R S R H R L L L L R Y L V V A L G Y H K A Y G F S A P K Q Q Q V V T A V E Y O E A I L

jam 48 T C . T Y S G F S S P R V E W K F V Q G S T T A L V C Y N S Q I T A P Y A D R V T F S S S G I T F S  
35638 49 A C K T T P K X T V S S R L E W K K L . G R S V S F V Y Y Q Q T L O G D F K N R A E N I D F N I R I K

jam 97 S V T R K O N G E Y T C M V S . . E G G Q N Y G E V S I H L T V L V P P S K P T I S V P S S V T I  
35638 98 N V T R S O A G K Y R C E V S A P S E O G Q N L E E D T V T L E V L V A P A V P S C E V P S S A L S

jam 145 G N R A V L T C S E H D G S P P S E Y S W F K D G I S M L T A D A K K T R A F M N S S F T I D P K S  
35638 148 G T V V E L R C O D X E G N P A P E Y T W F K D G I R L L . E N P R L G S O S T N S S Y T M N T K T

jam 195 G D L I F D P V T A F D S G E Y Y C O A Q M G Y G T A M R S E A A H M D A V E L N V G G I V A A V L  
35638 197 G T L Q F N T V S K L D T G E Y S C E A R N S V G . Y R R C P G K R M Q V D D L N I S G I I A A V V

jam 245 V T L I L L G L L I F G V W F A Y S R G Y F E T T K K G T A P G K K V I Y S Q P S T R S E G E F K O  
35638 246 V V A L V I S V C G L G V C Y A O R K G Y F . . . S K E T S F O K S N S S S K A T T M S E N V Q W L

jam 295 T S S F L V  
35638 293 T P V I P A L W X A A A G G S R G O E F

FIG. 5

SEQ ID NO: 6 A33\_hum  
 SEQ ID NO: 10 jam

1 . . . . . M V G K M W P V L W T . L C A V R V T V D A I S V E T P Q D V L R A S Q G K S V T L P C T  
 1 M G T E G K A G R K L L F L F T S M I L G S L V O G K G S V Y T A Q S D V O V P E N E S I K L T C T

A33\_hum  
 jam

45 Y H T S T S I R E G L I Q W D K L L L T H T E R V V I W P F S N K N Y I H G E L Y K N R V S I S N N  
 51 Y S G F S S P R . . . . . Y E W . K F Y O G S T T A L V C . . . . . Y N S Q . . . . . I T A P . Y A D R V T F S S .

A33\_hum  
 jam

95 A E Q S D A S I T I D Q L T M A O N G T Y E C S V S L M S D L E G N T K S R V R L L V L V P P S K P  
 91 . . . . . S G I T F S S V T R K D N G E Y T C M V S E E G G . O N Y G E V S I H L T T V L V P P S K P

A33\_hum  
 jam

145 E C G I E G E T I I G N N I O L T C O S K E G S P T P Q Y S W K R Y N I L N O E Q P L A Q P A S G O  
 135 T I S V P S S V T I G N R A V L T C S E H D G S P S E Y S W F K D G I I S M L T A D A K K T R A F M

A33\_hum  
 jam

195 P V S L K N I S T D T S G Y Y I C T S S N E E G T Q F C N . . . . . I T V A V R S P S M N . . . . . V A L L  
 185 N S S F T I D P K S G D L I F D P V T A F D S G E Y Y C Q A O N G Y G T A W R S E A A H M D A V E L

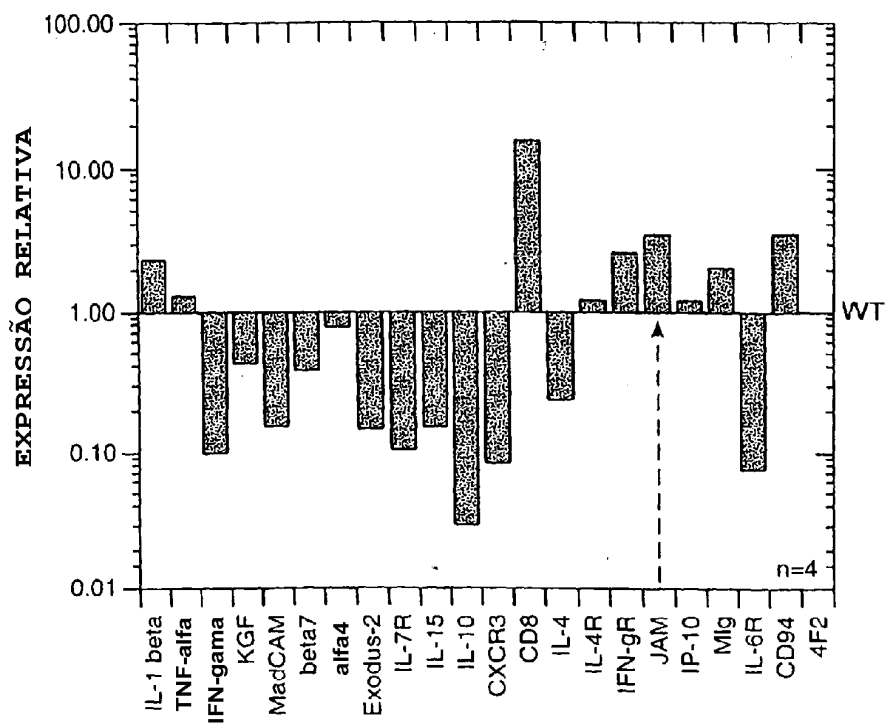
A33\_hum  
 jam

238 Y V . G I A V G V V A A L I I I G I I I Y C . . . . . C C C R G K D D N T E D K E D A R P N R E A Y E E  
 235 N V G G I V A A V L V T L I L L G L L I F G V W F A Y S R G Y F E . T T K K G T A P G K K V I Y S Q

A33\_hum  
 jam

284 P P E O L R E L S R E R E E E D D Y R O E E O R S T G R E S P O H L D Q  
 284 P S T R S E G E F K O T S S F L V

FIG.- 6

**FIG. 7**