

(11) Número de Publicação: **PT 1481989 E**

(51) Classificação Internacional:

**C07K 14/705** (2007.10) **G01N 33/577** (2007.10)  
**C12N 15/12** (2007.10) **C07K 16/28** (2007.10)  
**C12Q 1/68** (2007.10)

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

(22) Data de pedido: **1998.11.20**

(30) Prioridade(s): **1997.11.21 US 66364 P**  
**1998.03.20 US 78936 P**  
**1998.09.17 WO**

**PCT/US98/19437**

(43) Data de publicação do pedido: **2004.12.01**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.04.30**  
**155/2008**

(73) Titular(es):

**GENENTECH, INC.**

**1 DNA WAY SOUTH SAN FRANCISCO, CA**  
**94080-4990**

**US**

(72) Inventor(es):

**SHERMAN FONG**

**US**

**WILLIAM I. WOOD**

**US**

**AUSTIN L. GURNEY**

**US**

**AUDREY GODDARD**

**US**

**AVI ASHKENAZI**

**US**

(74) Mandatário:

**ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA**  
**R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA**

**PT**

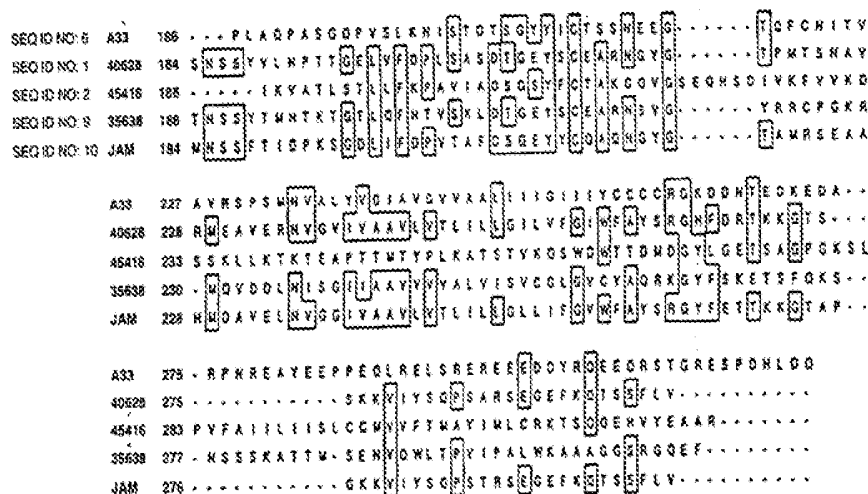
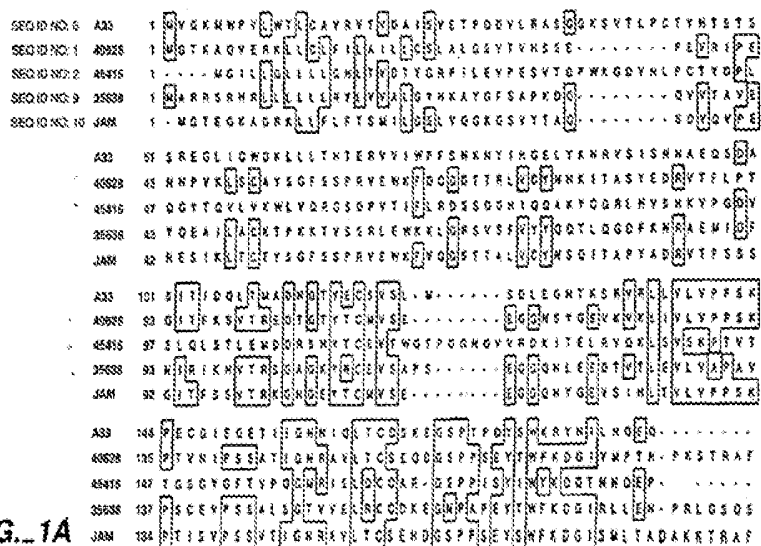
(54) Epígrafe: **ANTIGÉNIOS RELACIONADOS COM A-33 E SUAS UTILIZAÇÕES**  
**FARMACOLÓGICAS**

(57) Resumo:

## 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 antigénios 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 antigénios PRO301, PRO362 ou PRO245.



## DESCRIÇÃO

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

#### **CAMPO DO INVENTO**

O presente invento refere-se genericamente 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 atractor. 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 uma expressão utilizada 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 identificado 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.

Certas EST, tais como as disponíveis com os números de acesso F02373.1, W17367.1 e AA228697.1, apresentaram alguma semelhança com a sequência de ácido nucleico do PR0362, aqui revelada.

## **SUMÁRIO DO INVENTO**

O presente invento refere-se adicionalmente a composições e métodos para o diagnóstico 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.

Numa concretização como definida nas reivindicações, o invento refere-se a agonistas de um PRO362 ou um polipéptido que mimetizam uma ou mais das funções ou actividades de PRO362 ou do polipéptido.

Noutra concretização, o invento refere-se a um método para determinação da presença de um polipéptido PRO362 compreendendo a exposição de uma célula que se suspeita que contenha o polipéptido a um anticorpo anti-PRO362 e a determinação da ligação do anticorpo à célula.

Noutra concretização, o presente invento refere-se a um método de diagnóstico de uma doença relacionada com doença inflamatória num mamífero, compreendendo a detecção do nível de expressão de um gene que codifica um polipéptido PRO362 (a) numa amostra de teste de células de tecido obtidas do mamífero, e (b) numa amostra de controlo de células de tecido normal conhecidas do mesmo tipo celular, em que um maior nível de expressão na amostra de teste indica a presença de uma doença inflamatória no mamífero.

Noutra concretização, o presente invento refere-se a um método de diagnóstico de uma doença inflamatória num mamífero, compreendendo (a) o contacto de um anticorpo anti-PRO362 com uma amostra de teste de células de cultura de tecidos obtida do mamífero, e (b) a detecção da formação de um complexo entre o anticorpo e o polipéptido PRO362. A detecção pode ser qualitativa ou quantitativa, e pode ser realizada em comparação com a monitoração da formação do complexo numa amostra de controlo de células de tecido normal conhecidas do

mesmo tipo celular. Uma maior quantidade de complexos formados na amostra de teste indica a presença de um tumor no mamífero do qual foram obtidas as células de tecido de teste. O anticorpo preferivelmente possui um marcador detectável. A formação do complexo pode ser monitorada, por exemplo, por microscopia óptica, citometria de fluxo, fluorimetria ou outras técnicas conhecidas na especialidade. A amostra de teste é usualmente obtida de um indivíduo de que se suspeita ter uma deficiência ou anomalia relacionadas com a resposta inflamatória.

O presente invento pode ser utilizado num *kit* de diagnóstico, contendo um anticorpo anti-PR0362 e um transportador (e.g., um tampão) numa embalagem adequada. O *kit* pode conter instruções para a utilização do anticorpo para detectar o polipéptido PR0362.

O invento pode ser utilizado num artigo de fabrico, compreendendo:  
um recipiente;  
um rótulo no recipiente; e  
uma composição compreendendo um agente activo contido no interior do recipiente;  
em que a composição é eficaz para estimular ou inibir uma resposta inflamatória num mamífero, o rótulo no recipiente indica que a composição pode ser utilizada para tratar uma doença inflamatória, e o agente activo na composição é um agente que estimula ou inibe a expressão e/ou a actividade do PR0362 ou do polipéptido. Num aspecto, o agente activo é um polipéptido PR0362 ou um anticorpo anti-PR0362.

O invento pode ser utilizado num método para identificação de um composto capaz de inibir a expressão e/ou a actividade de um polipéptido PR0362 através do contacto de um composto candidato com um polipéptido PR0362 sob condições e durante um tempo suficientes para permitir que estes dois compostos interactuem. Num aspecto específico, o composto candidato ou o polipéptido PR0362 estão imobilizados num suporte sólido. Noutro aspecto, o componente não imobilizado possui um marcador detectável.

Ainda num outro aspecto, o invento pode ser utilizado no tratamento de uma doença inflamatória, por administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um antagonista de PR0362 a um paciente que o necessita 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.

Numa outra concretização, o presente invento pode ser utilizado num método de diagnóstico de um tumor num mamífero, compreendendo a detecção do nível de expressão de um gene que codifica um polipéptido PRO362 (a) numa amostra de teste de células de tecido obtidas do mamífero, e (b) numa amostra de controlo de células de tecido normal conhecidas do mesmo tipo celular, em que um maior nível de expressão na amostra de teste indica a presença de tumor no mamífero do qual foram obtidas as células de tecido de teste.

Noutra concretização, o presente invento pode ser utilizado num método de diagnóstico de um tumor num mamífero, compreendendo (a) o contacto de um anticorpo anti-PRO362 com uma amostra de teste das células de tecido obtidas do mamífero, e (b) a detecção da formação de um complexo entre o

anti-PRO362 e o polipéptido PRO362 na amostra de teste. A detecção pode ser qualitativa ou quantitativa, e pode ser realizada em comparação com a monitoração da formação do complexo numa amostra de controlo de células de tecido normal conhecidas do mesmo tipo celular. Uma maior quantidade de complexos formados na amostra de teste indica a presença de tumor no mamífero do qual foram obtidas as células de tecido de teste. O anticorpo preferivelmente possui um marcador detectável. A formação do complexo pode ser monitorada, por exemplo, por microscopia óptica, citometria de fluxo, fluorimetria ou outras técnicas conhecidas na especialidade. Preferivelmente, a amostra de teste é obtida de um indivíduo mamífero de que se suspeita ter crescimento ou proliferação celulares neoplásicos (e.g., células cancerosas).

Noutra concretização, o presente invento pode ser utilizado num *kit* de diagnóstico de cancro, compreendendo um anticorpo anti-PRO362 e um transportador (e.g. um tampão) numa embalagem adequada. O *kit* pode conter instruções para utilização do anticorpo para detectar o polipéptido PRO362.

Ainda noutra concretização, o invento pode ser utilizado num método para inibir o crescimento de células tumorais compreendendo a exposição de uma célula que sobre-expressa um polipéptido PRO362 a uma quantidade eficaz de um agente que inibe a expressão e/ou a actividade do polipéptido PRO362. O agente é preferivelmente um anti-polipéptido PRO362, um péptido pequeno orgânico e inorgânico, um fosfopéptido, uma molécula anti-sentido ou de ribozima, ou uma hélice tripla. Num aspecto específico, o agente, e.g., um anticorpo anti-PRO362 induz morte celular. Num outro aspecto, as células tumorais são ainda expostas a tratamento de radiação e/ou a uma agente citotóxico ou quimioterapêutico.

O invento pode ser utilizado num artigo de fabrico, compreendendo:

um recipiente;

um rótulo no recipiente, e

uma composição compreendendo um agente activo contido no interior do recipiente;

em que a composição é eficaz para inibir o crescimento de células tumorais, o rótulo no recipiente indica que a composição pode ser utilizada para o tratamento de condições

caracterizadas pela sobre-expressão de polipéptido PRO362, e o agente activo na composição é um agente que inibe a expressão e/ou a actividade do polipéptido PRO362. Num aspecto, o agente activo é um anti-PRO362 ou um anticorpo.

Noutra concretização, como definido nas reivindicações, o invento proporciona uma molécula de ácido nucleico isolada compreendendo ADN que codifica um polipéptido PRO362. Num aspecto, o ácido nucleico isolado compreende ADN que codifica o polipéptido PRO362 possuindo os resíduos de aminoácido 1 a 321 da Figura 3 (SEQ ID NO:2), ou é complementar a essa sequência de ácido nucleico de codificação, e permanece-lhe ligado de forma estável sob condições de rigor pelo menos moderado, e opcionalmente, de rigor elevado. Noutro aspecto, o ácido nucleico isolado compreende ADN que codifica o polipéptido PRO362 possuindo os resíduos de aminoácido 1 a X da Figura 3 (SEQ ID NO:2), onde X é qualquer resíduo de aminoácido de 271 a 280, ou é complementar a esta sequência de ácido nucleico de codificação, e permanece-lhe ligado de forma estável sob condições de rigor pelo menos moderado, e opcionalmente, de rigor elevado. A sequência de ácido nucleico isolada pode compreender a inserção de ADNc do vector DNA45416-1251 depositado em 5 de Fevereiro de 1998 como ATCC 209620, que inclui a sequência nucleotídica que codifica PRO362.

Ainda noutra concretização, como definido nas reivindicações, o invento proporciona moléculas de ácido nucleico isoladas que hibridam com o complemento das moléculas de ácido nucleico que codificam os polipéptidos PRO362. O ácido nucleico é preferivelmente ADN e a hibridação ocorre sob condições rigorosas. Estas moléculas de ácido nucleico podem actuar como moléculas anti-sentido dos antigénios associados a inflamação aqui identificados, que por sua vez, podem ser utilizadas na modulação de antigénios associados a inflamação ou como iniciadores anti-sentido em reacções de amplificação. Adicionalmente, estas sequências podem ser utilizadas **as pan of** ribozima e/ou sequência de hélice tripla que, por sua vez, podem ser utilizadas na regulação dos antigénios associados a inflamação.

Ainda numa outra concretização, como definido nas reivindicações, o invento proporciona um vector compreendendo ADN que codifica polipéptido PRO362. É igualmente proporcionada uma célula hospedeira compreendendo um destes

vectores. A título de exemplo, as células hospedeiras podem ser células CHO, de *E. coli* ou de levedura. É ainda proporcionado um processo para a produção de polipéptidos PRO362 que compreende a cultura de células hospedeiras sob condições adequadas para a expressão de PRO301 ou PRO362 e a recuperação dos mesmos a partir da cultura celular.

Ainda numa outra concretização, como definido nas reivindicações, o invento proporciona polipéptido PRO362 isolado. Em particular, o invento proporciona uma sequência de PRO362 nativa isolada, que, num aspecto, inclui uma sequência de aminoácidos compreendendo os resíduos 1 a 321 da Figura 3 (SEQ ID NO:2). Uma concretização adicional do presente invento é dirigida a um domínio extracelular isolado de um polipéptido PRO362 compreendendo os aminoácidos 1 a X da Figura 3 (SEQ ID NO:2), em que X é qualquer resíduo de aminoácido 271-280. Opcionalmente, o polipéptido PRO362 é obtido ou é obtenível por expressão do polipéptido codificado pela inserção de ADNc do vector DNA45416-1251 depositado em 5 de Fevereiro de 1998 com o número de Depósito na ATCC 209620.

Ainda noutra concretização, o invento proporciona molécula quiméricas compreendendo um polipéptido PRO362 fundido com um polipéptido ou uma sequência de aminoácidos heterólogos. Um exemplo destas moléculas quiméricas compreende um polipéptido PRO362 fundido com uma sequência marcadora epitópica ou uma região Fc de uma imunoglobulina.

É também aqui descrito um marcador de sequência expressa (EST) compreendendo as sequências nucleotídicas identificadas como: DNA35936 (SEQ ID NO:3) na Figura 4A, consen01 (SEQ ID NO:4) na Figura 4B e consen02 (DNA42257) (SEQ ID NO: 5).

Noutra concretização, o presente invento proporciona um anticorpo isolado que se liga a um polipéptido PRO362. Este anticorpo pode mimetizar a actividade de um polipéptido PRO362 (um anticorpo agonista) ou, pelo contrário, outro destes anticorpos pode inibir ou neutralizar a actividade de um polipéptido PRO362 (anticorpo antagonista). Noutro aspecto, o anticorpo é um anticorpo monoclonal, que contém preferivelmente resíduos de uma região determinante de complementaridade (CDR) não humana e resíduos da região estrutural (FR, *framework*) humana. O anticorpo pode ser marcado e/ou imobilizado num suporte sólido. Num outro aspecto, o anticorpo é maturado por afinidade, um fragmento de

anticorpo ou um anticorpo de cadeia simples. O invento proporciona também um anticorpo anti-idiotípico, que é dirigido contra um anticorpo anti-PR0362.

O invento pode ser utilizado numa composição contendo um polipéptido PR0362 ou um anticorpo agonista ou antagonista em mistura com um transportador ou um excipiente. Num aspecto, a composição contém uma quantidade terapeuticamente eficaz do péptido ou do anticorpo. Noutro aspecto, quando a composição contém uma molécula estimulante de inflamação, a composição é útil para: (a) aumentar a infiltração de células inflamatórias num tecido de um mamífero disso necessitado, (b) estimular ou melhorar uma resposta imunitária num mamífero disso necessitado, ou (c) aumentar a proliferação de linfócitos T num mamífero disso necessitado em resposta a um antigénio. Num outro aspecto, quando a composição contém uma molécula inibidora da inflamação, a composição é útil para: (a) diminuir a infiltração de célula inflamatórias num tecido de um mamífero disso necessitado, (b) inibir ou reduzir uma resposta inflamatória num mamífero disso necessitado, ou (c) diminuir a proliferação de linfócitos T num mamífero disso necessitado em resposta a um antigénio. Noutro aspecto, a composição contém um outro ingrediente activo, que pode ser, por exemplo, um outro anticorpo ou um agente citotóxico ou quimioterapêutico. Preferivelmente, a composição é estéril.

O invento pode ser utilizado para proporcionar ácido nucleico que codifica um anticorpo anti-PR0362, e vectores e células hospedeiras recombinantes compreendendo esses ácido nucleico, e num método para produzir esse anticorpo através de cultura de uma célula hospedeira transformada com ácido nucleico que codifica o anticorpo sob condições tais que o anticorpo seja expresso, e recuperação do anticorpo a partir da cultura celular.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

A Figura 1 mostra uma comparação entre os polipéptidos codificados por antigénio 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).

A Figura 2 mostra a sequência de aminoácidos derivada (SEQ ID NO:1) de um polipéptido PR0301 de sequência nativa. Este polipéptido tem 299 aminoácidos de comprimento, possuindo

uma sequência de sinal nos resíduos 1 a 27, um domínio extracelular nos resíduos 28 a cerca de 235, homologia com a superfamília das Ig nos resíduos 94 a 235, um domínio transmembranar potencial nos resíduos 236 a cerca de 258, e um domínio intracelular a cerca dos resíduos 259 a 299.

A Figura 3 mostra a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:2) derivada dos nucleótidos 119-1081 da sequência nucleotídica apresentada na Figura 6A e 6B (DNA45416, SEQ ID NO:7). Está também mostradas na Figura 3 sublinhadas as localizações de um local de glicosaminoglicano e um domínio transmembranar.

A Figura 4A mostra a montagem de consenso DNA35936 (SEQ ID NO:3), e a Figura 4B mostra consen01 (SEQ ID NO:4) que são ambas utilizadas no isolamento de DNA40628. A Figura 4C mostra consen02 (DNA42257) (SEQ ID NO:5) que foi utilizada no isolamento de DNA45416 (SEQ ID NO: 7).

A Figura 5 mostra a sequência nucleotídica de um ADNc de DNA40628 de sequência nativa, que é um ADNc de PRO301 de sequência nativa também designado por "UNQ264" e/ou "DNA40628-1216".

As Figuras 6A & B mostram uma sequência nucleotídica DNA45416 (SEQ ID NO: 7) que é um ADNc de PRO362 de sequência nativa também designado por "UNQ317" e/ou "DNA45416-1251". Está também apresentada a metionina iniciadora e a tradução para proteína para um polipéptido PRO362 de comprimento completo (SEQ ID NO: 2).

A Figura 7 mostra a sequência nucleotídica (SEQ ID NO:8) de um ADNc de PRO245 de sequência nativa, em que a sequência nucleotídica é designada por "UNQ219" e/ou "DNA35638".

A Figura 8 mostra as sequências oligonucleotídicas OLI2162 (35936.f1) (SEQ ID NO:12), OLI2163 (35936.pl) (SEQ ID NO:13), OLI2164 (35936.f2) (SEQ ID NO:14), OLI2165 (35936.r1) (SEQ ID NO:15), OLI2166 (35936.f3) (SEQ ID NO:16), OLI2167 (35936.r2) (SEQ ID NO:17), que foram utilizadas no isolamento de DNA40628.

A Figura 9 mostra uma representação em cadeia dupla do DNA42257 (consen02) (SEQ ID NO:5) juntamente com as localizações de cinco iniciadores oligonucleotídicos,

apresentados sublinhados, todos utilizados no isolamento de DNA45416 (SEQ ID NO:7). Os oligonucleótidos representados são: 42257.f1 (SEQ ID NO:18), 42257.f2 (SEQ ID NO:19), 42257.r1 (SEQ ID NO:20), 42257.r2 (SEQ ID NO:21) e 42257.p1 (SEQ ID NO:22).

A Figura 10 descreve a classificação Blast, correspondência e percentagem de homologia no alinhamento entre 2 fragmentos coalescentes de DNA40628 e A33\_HUMAN, um precursor do antígeno A33 humano. A Figura 10A compara os resíduos codificados começando na posição de nucleótido 121 a 816 de DNA40628 (SEQ ID NO:23) com os resíduos codificados começando nos nucleótidos 17 a 284 de A33\_HUMAN (SEQ ID NO:24); A Figura 10B compara os resíduos codificados começando nos nucleótidos 112 a 810 (SEQ ID NO:25) com os resíduos codificados começando nos nucleótidos 12 a 284 (SEQ ID NO:26), respectivamente.

A Figura 11 mostra a sequência de aminoácidos derivada de um polipéptido PRO245 de sequência nativa (SEQ ID NO:9) codificado pela sequência nucleotídica da Figura 7 (DNA35638, SEQ ID NO: 8).

A Figura 12 indica uma identidade de 25,3% entre a sequência de aminoácidos codificada por DNA40628 (SEQ ID NO:1) e o antígeno A33 (SEQ ID NO:6).

A Figura 13 indica uma identidade de 20,8% entre a sequência de aminoácidos codificada por DNA45416 (SEQ ID NO:2) e o antígeno A33 (SEQ ID NO:6).

A Figura 14 indica 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 15 indica uma identidade de 67,6% entre a sequência de aminoácidos codificada por DNA40628 (SEQ ID NO:1) e JAM (SEQ ID NO:10).

A Figura 16 indica uma identidade de 23,3% entre a sequência de aminoácidos codificada por DNA45416 (SEQ ID NO:2) e JAM (SEQ ID NO:10).

A Figura 17 indica uma identidade de 34,2% entre a sequência de aminoácidos codificada por DNA35638 (SEQ ID NO:9) e JAM (SEQ ID NO:10).

A Figura 18 indica uma identidade de 26% entre a sequência de aminoácidos codificada pelo antigénio A33 (SEQ ID NO:6) e JAM (SEQ ID NO:10).

A Figura 19 mostra os resultados do procedimento de hibridação *dot blot* descrito no Exemplo 8.

A Figura 20 mostra os resultados do ensaio de expressão de ARNm Taqman descrito no Exemplo 9.

A Figura 21 mostra a ligação da proteína codificada por DNA40628 com neutrófilos humanos como descrito no Exemplo 7.

## **DESCRIÇÃO DETALHADA DAS CONCRETIZAÇÕES PREFERIDAS**

### **1. Definições**

As expressões "PR0362" ou "polipéptido PR0362" e "antigénio associado a cancro", quando aqui utilizadas, abrangem respectivamente PR0362 de sequência nativa e suas variantes (que são adicionalmente aqui definidas). O PR0362 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.

A expressão "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. Estão também incluídas doenças nas quais a estimulação ou intervenção da resposta inflamatória tem um efeito de melhoria na progressão da doença. Estão incluídas nesta expressão as doenças inflamatórias imunomediadas.

A expressão 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, 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), 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.

"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 gastrointestinal, 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.

A expressão "agente citotóxico" como aqui utilizada refere-se a uma substância que inibe ou impede o funcionamento de células e/ou causa a destruição de células. a expressão 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 citoquina inclui proteínas de fontes naturais ou de culturas de células recombinantes e equivalentes biologicamente activos das citoquinas de sequência nativa.

"Quantidade terapeuticamente eficaz" é a quantidade de PR0362 activo ou de agonista que é necessária para conseguir uma estimulação mensurável da resposta inflamatória.

Um "PR0362 de sequência nativa" compreende um polipéptido possuindo a mesma sequência de aminoácidos que o PR0362 obtido da natureza. Este PR0362 de sequência nativa pode ser isolado

da natureza ou pode ser produzido por meios recombinantes ou de síntese. A expressão "PR0362 de sequência nativa" abrange especificamente formas truncadas ou segregadas de ocorrência natural, respectivamente, de PR0362 (e.g., uma sequência de domínio extracelular), formas variantes de ocorrência natural (e.g., formas originárias de *splicing* alternativo) e variantes alélicas de ocorrência natural de PR0362.

Noutra concretização, o polipéptido PR0362 de sequência nativa é um domínio extracelular da proteína PR0362 de comprimento completo compreendendo os aminoácidos 1 a X da sequência de aminoácidos apresentada na Figura 3 (SEQ ID NO:2), onde X é qualquer resíduos de aminoácido 271-280. Opcionalmente, o polipéptido PR0362 é obtido ou obtenível por expressão do polipéptido codificado pela inserção de ADNc do vector DNA45416-1251 depositado em 5 de Fevereiro de 1998 na ATCC com o número de Depósito 209620.

O "domínio extracelular" de PR0362 ou "ECD" de PR0362 referem-se a uma forma do polipéptido PR0362 que está essencialmente isenta dos domínios transmembranar e citoplasmático das moléculas respectivas de comprimento completo. Normalmente, o ECD de PR0362 terá menos de 1% destes domínios transmembranar e/ou citoplasmático e, preferivelmente, terá menos de 0,5% destes domínios. Opcionalmente, o ECD do polipéptido PR0362 compreenderá os resíduos de aminoácido 1 a X da Figura 3 (SEQ ID NO:2), onde X é qualquer aminoácido de 271-280. Entender-se-á que qualquer domínio transmembranar identificado para os polipéptidos PR0362 do presente invento é identificado segundo critérios empregues rotineiramente na especialidade para a identificação deste tipo de domínios hidrófobos. As fronteiras exactas de um domínio transmembranar podem variar mas muito provavelmente em não mais de cerca de 5 aminoácidos em cada extremidade do domínio como inicialmente identificado. Assim, o ECD do polipéptido PR0362 pode compreender opcionalmente os aminoácidos 1 a X da Figura 3 (SEQ ID NO:2), onde X é qualquer um dos resíduos de aminoácido 271 a 280 da Figura 3 (SEQ ID NO:2).

Uma "variante de PR0362" significa um polipéptido PR0362 activo como definido adiante possuindo pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência de aminoácidos com o polipéptido PR0362 com a sequência de aminoácidos deduzida apresentada na Figura 3 (SEQ ID NO:2) para um polipéptido PR0362 de sequência

nativa de comprimento completo. Estas variantes de polipéptido PRO362 incluem, por exemplo, polipéptidos PRO362 onde um ou mais resíduos de aminoácido estão adicionados, ou eliminados, no terminal N ou C da sequência da Figura 3 (SEQ ID NO:2). Normalmente, uma variante de polipéptido PRO362 terá pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência de aminoácidos, preferivelmente pelo menos cerca de 85% de identidade de sequência de aminoácidos, mais preferivelmente pelo menos cerca de 90% de identidade de sequência de aminoácidos e ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 95% de identidade de sequência de aminoácidos, com a sequência de aminoácidos da Figura 3 (SEQ ID NO:2).

"Porcentagem (%) de identidade de sequência de aminoácidos", em relação às sequências de PRO362 aqui identificadas, é definida como a percentagem de resíduos de aminoácido numa sequência candidata que são idênticos aos resíduos de aminoácido na sequência de PRO362, após alinhamento das sequências e introdução de hiatos, se necessário, para conseguir a percentagem máxima de identidade de sequências, 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 PRO362 aqui identificadas (DNA45416), é definida como a percentagem de nucleótidos numa sequência candidata que são idênticos aos nucleótidos na sequência que codifica PRO362, respectivamente, após alinhamento das sequências e introdução de hiatos, se necessário, para conseguir a percentagem máxima de identidade de sequências. 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 PRO362. 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 PRO362 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 PRO362. Uma molécula isolada de ácido nucleico que codifica polipéptido PRO362 está numa outra forma que não na forma ou configuração em que se encontra na natureza. Deste modo, as moléculas isoladas de ácido nucleico que codificam polipéptido PRO362 distinguem-se da molécula de ácido nucleico DNA40628 como esta existe em células naturais. Contudo, uma molécula isolada de ácido nucleico que codifica polipéptido PRO362 inclui moléculas de ácido nucleico que codificam polipéptido PRO362 contidas em células que normalmente expressam polipéptido PRO362 codificado onde, por exemplo, a molécula de ácido nucleico está numa localização cromossómica diferente da das células naturais.

A expressão "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 anti-PR0362 individuais (incluindo anticorpos agonistas, antagonistas e neutralizantes) e composições de anticorpos anti-PR0362 com especificidade poliepitópica. A expressão "anticorpo monoclonal", conforme aqui utilizada, refere-se a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogéneos, i.e., os anticorpos individuais que constituem a população são idênticos com excepção de possíveis mutações de ocorrência natural que podem estar presentes em quantidades mínimas.

"Activo" ou "actividade" para os presentes propósitos referem-se a formas de PR0362 que retêm as actividades biológica e/ou imunológica do PR0362 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 actividade de regulação antigénios associados a cancro e/ou vírus.

O "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, segue-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 sobre o rigor de reacções de hibridação, veja-se 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/dodecilsulfato de sódio a 0,1%, a 50°C; (2) utilizam durante a hibridação um agente desnaturante, tal como formamida, por exemplo, formamida a 50% (v/v) com albumina sérica de bovino a 0,1%/Ficoll a 0,1%/ polivinilpirrolidona a 0,1%/tampão de fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5, com cloreto de sódio 750 mM, citrato de sódio 75 mM a 42°C; ou (3) utilizam formamida a 50%, SSC 5x (NaCl 0,75 M, citrato de sódio 0,075 M), fosfato de sódio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sódio a 0,1%, solução de Denhardt 5x, ADN de esperma de salmão tratado por ultra-sons (50 µg/ml), SDS a 0,1% e sulfato de dextrano a 10%, a 42°C, com lavagens a 42°C em SSC 0,2x (cloreto de sódio/citrato de sódio) e formamida a 50%, 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: formamida a 20%, SSC 5x (NaCl 150 mM, citrato trissódico 15 mM), fosfato de sódio 50 mM (pH 7,6), solução de Denhardt 5x, sulfato de dextrano a 10% e ADN de esperma de salmão desnaturado por corte a 20 mg/mL, seguida por lavagem dos filtros em SSC 1x a cerca de 37-50°C. O perito na especialidade saberá como ajustar a temperatura, a força iónica, etc. conforme necessário para ter em consideração factores tais como o comprimento da sonda e outros.

A expressão "marcado com epítopo", quando aqui utilizada, 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 francamente único para que o anticorpo não reaja substancialmente de modo cruzado com outros epítopos. Os 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 de outra molécula que possam ser identificados pelos ensaios de rastreio aqui revelados (e.g. uma molécula pequena orgânica ou inorgânica, péptido, etc.) é utilizada 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 antigénio específico, as imunoglobulinas incluem tanto anticorpos como outras moléculas do tipo anticorpo que não possuem especificidade para com um antigénio. 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 variáveis das cadeias 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 para com o 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 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 juntas em estreita proximidade pelas regiões FR e, com as CDR da outra cadeia, contribuem para a formação do local de ligação ao antigénio dos 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 anticorpos.

"Fragmentos de anticorpo" compreendem uma porção de um anticorpo intacto, preferivelmente a região variável ou de ligação ao antigénio do anticorpo intacto. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem fragmentos Fab, Fab',  $F(ab')_2$  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 de ligação ao antígeno idênticos, denominados fragmentos "Fab", cada um com um único local de ligação ao antígeno, e um fragmento "Fc" residual. A designação "Fc" reflecte a capacidade para cristalizar rapidamente. O tratamento com pepsina proporciona um fragmento  $F(ab')_2$  que possui dois locais de combinação com o antígeno e que é ainda capaz de ligação cruzada com o antígeno.

"Fv" é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um local completo de reconhecimento e ligação ao antígeno. 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 interactivam 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 para 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 completo.

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 de 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.

A expressão "anticorpo monoclonal", conforme aqui utilizada, refere-se a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, i.e., os anticorpos individuais que constituem a população são idênticos com excepção de possíveis mutações de ocorrência natural que podem estar presentes em quantidades mínimas. Os anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo dirigidos contra um local antigénico único. Adicionalmente, em contraste com preparações de anticorpos convencionais (policlonal), 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 hibridomas, não contaminados por outras imunoglobulinas. O adjectivo "monoclonal" indica o carácter do anticorpo como sendo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogénea, 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 descrito pela primeira vez por Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975), ou podem ser preparados por métodos de ADN recombinante (veja-se, 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. Vejam-se também as 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 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, veja-se 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 no contexto do invento. Vejam-se, por exemplo, as Patentes dos E.U.A. N.<sup>os</sup> 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 única cadeia polipeptídica. 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 veja-se 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 ( $V_H-V_L$ ). Utilizando um ligante que é demasiado curto para permitir o emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia, os domínios são forçados a emparelhar com os domínios complementares de outra cadeia e a criar 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 detectáveis que são conjugados directa ou indirectamente ao composto, e.g. anticorpo ou polipéptido, 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 parcial 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 no poço de uma placa de ensaio; noutras, é uma coluna de purificação (e.g., uma coluna de cromatografia de afinidade). Esta expressão 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 PRO362**

#### **1. Polipéptidos PRO362 de comprimento completo**

O presente pedido de patente identifica e isola sequências nucleotídicas que codificam polipéptidos designados no presente pedido de patente por PRO301, PRO362 ou PRO245. Em particular, os requerentes identificaram e isolaram ADNc que codifica um polipéptido PRO301, PRO362 ou PRO245, conforme revelado com mais detalhes nos Exemplos adiante. Utilizando os programas de computador para alinhamento de sequências BLAST e FastA, os Requerentes constataram que um PRO301 (Figura 2, SEQ ID NO:1), um PRO362 (Figura 3, SEQ ID NO:2) e um PRO245 (Figura 11, SEQ ID NO:9), de sequência nativa e de comprimento completo, têm homologia significativa tanto com o antigénio A33 como com JAM. (Vejam-se as Figuras 1, 12-18). Assim, crê-se presentemente que o PRO362 revelado no presente pedido de patente é um membro identificado pela primeira vez da família de proteínas do antigénio A33 e pode estar associado a desordens inflamatórias, tais como a doença inflamatória do intestino assim como a doenças neoplásicas humanas tais como o cancro colorrectal.

#### **2. Variantes de PRO362**

Para além do PRO362 de sequência nativa de comprimento completo aqui descrito, está contemplado que possam ser preparadas variantes de PRO362. As variantes de PRO362 podem ser preparadas por introdução de alterações de nucleótidos apropriadas no ADN de PRO362, respectivamente, ou por síntese dos polipéptidos PRO362 desejados. Os peritos na especialidade notarão que alterações de aminoácidos podem alterar processos pós-tradução do PRO362, tais como a alteração do número ou posição de locais de glicosilação ou alteração das características de ancoragem à membrana.

As variações no PR0362 de sequência nativa de comprimento completo ou em vários domínios do PR0362 aqui descritas, podem ser efectuadas, por exemplo, utilizando qualquer das técnicas e orientações 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 PR0362 que resultam numa alteração na sequência de aminoácidos do PR0362 comparativamente com o PR0362 de sequência nativa. Opcionalmente, a variação é por substituição de pelo menos um aminoácido por qualquer outro aminoácido num ou mais dos domínios do PR0362. A orientação para determinar que resíduo de aminoácido pode ser inserido, substituído ou eliminado sem afectar adversamente a actividade desejada, pode ser encontrada comparando a sequência do PR0362 com a de moléculas de proteínas homólogas conhecidas e minimizando o número de alterações da 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, tal 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 o ADN de variantes de PR0301, podem-se realizar no ADN clonado mutagénese dirigida ao local [Carter *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 13:4331 (1986); Zoller *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 10:6487 (1987)], mutagénese por cassette [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 PRO362**

Modificações covalentes de PRO362 estão incluídas no âmbito do presente invento. Um tipo de modificação covalente inclui fazer reagir resíduos de aminoácido alvo do PRO362 com um agente de derivatização orgânico que é capaz de reagir com cadeias laterais seleccionadas ou com os resíduos N- ou C-terminais do PRO362. A derivatização com agentes bifuncionais é útil, por exemplo, para reticulação do PRO362 a uma matriz ou superfície de suporte insolúvel em água, para utilização no método de purificação de anticorpos, e vice-versa. Os agentes de reticulação normalmente utilizados incluem, e.g., 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldeído, ésteres de N-hidroxissuccinimida, por exemplo, ésteres com ácido 4-azidossalicílico, imidoésteres homobifuncionais, incluindo ésteres de dissuccinimidilo tais como 3,3'-ditiobis-(succinimidilpropionato), 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 PRO362 incluída no âmbito do presente 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 PR0362 de sequência nativa e/ou a adição de um ou mais locais de glicosilação que não estão presentes no PR0362 de sequência nativa e/ou alteração da proporção e/ou composição dos resíduos de açúcar ligados ao(s) local(ais) de glicosilação.

A adição de locais de glicosilação ao polipéptido PR0362 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 de serina ou treonina no PR0362 de sequência nativa (para locais de glicosilação ligada a O). A sequência de aminoácidos de PR0362 pode ser opcionalmente alterada através de alterações ao nível do ADN, particularmente por mutação do ADN que codifica o polipéptido PR0362 em bases pré-seleccionadas, de modo a serem gerados codões que se traduzirão nos aminoácidos desejados.

Outro meio para aumentar o número de porções hidrato de carbono no polipéptido PR0362 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 PR0362 pode ser realizada química ou enzimaticamente ou por substituição, por mutação, de codões que codificam para resíduos de aminoácido que servem como alvos para glicosilação. As técnicas de glicosilação química são conhecidas na especialidade e estão 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 exo-glicosidases como descrito por Thotakura et al., *Meth. Enzymol.*, 138:350 (1987).

Outro tipo de modificação covalente de PR0362 compreende a ligação do polipéptido PR0301, PR0362 ou PR0245 a um de uma variedade de polímeros não proteicos, e.g., polietilenoglicol, polipropilenoglicol ou polioxialquilenos, do modo descrito 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 PRO362 do presente invento pode também ser modificado de modo a formar uma molécula quimérica compreendendo PRO362 fundido com outra sequência heteróloga polipeptídica ou de aminoácidos. Numa concretização, uma tal molécula quimérica compreende uma fusão do PRO362 com um polipéptido marcador que proporciona um epítipo ao qual um anticorpo anti-marcador se pode ligar selectivamente. O marcador epitópico está geralmente colocado no terminal amino ou carboxilo do PRO362. A presença destas formas marcadas com epítipo do PRO362 pode ser detectada utilizando um anticorpo contra o polipéptido marcador. Também, a provisão do marcador epitópico permite que o PRO362 seja prontamente purificado por purificação de afinidade utilizando um anticorpo anti-marcador ou outro tipo de matriz de afinidade que se ligue ao marcador epitópico. Numa concretização alternativa, a molécula quimérica pode compreender uma fusão do PRO362 com uma imunoglobulina ou com uma região particular de uma imunoglobulina. Para uma forma bivalente da molécula quimérica, esta fusão pode 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 PRO362**

A descrição adiante refere-se principalmente à produção de PRO362 por cultura de células transformadas ou transfectadas com um vector contendo ácido nucleico de PRO362. Está obviamente contemplado que se possam utilizar métodos alternativos, que são bem conhecidos na especialidade, para

preparar PRO362. Por exemplo, a sequência de PRO362, ou suas porções, podem ser produzidas por síntese peptídica directa utilizando técnicas de fase sólida [veja-se, 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 proteínas *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 PRO362 podem ser sintetizadas quimicamente em separado e combinadas utilizando métodos químicos ou enzimáticos para produzir o PRO362 de comprimento completo.

#### **a. Isolamento de ADN que codifica PRO362**

O ADN que codifica PRO362 pode ser obtido a partir de uma biblioteca de ADNc preparada a partir de tecido que se crê possuir o ARNm de PRO362 e expressá-lo num nível detectável. Deste modo, o ADN de PRO362 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 que codifica PRO362 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 PRO362 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 PRO362 consiste em 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 sequências (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 alongamento 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 de clonagem aqui descritos, para produção de PR0301, PR0362 ou PR0245 e cultivadas em meios nutrientes convencionais, modificados conforme 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 pelo 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 policatiões, 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 PRO362. A *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo eucariota inferior normalmente utilizado.

As células hospedeiras adequadas para a expressão de PRO362 glicosilado são derivadas 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 CV de rim de macaco transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); a linha de rim embrionário 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 de tumor mamário de ratinho (MMT 060562, ATCC CCL51). Considera-se que a selecção da célula hospedeira apropriada faz parte dos conhecimentos da especialidade.

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

Pode-se inserir o ácido nucleico (e.g. ADNc ou ADN genómico) que codifica PRO362 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, um cosmídeo, uma partícula viral ou um fago. A sequência de ácido nucleico apropriada pode ser inserida no vector por uma variedade de procedimentos. Em geral, o ADN é inserido num local ou locais para endonucleases de restrição apropriadas 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 PRO301, o PRO362 ou o PRO245 podem ser produzidos 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 ou

polipéptido maduros. Em geral, a sequência de sinal pode ser um componente do vector, ou pode ser uma parte do ADN de PR0362 que é inserido no vector. A sequência de sinal pode ser uma sequência de sinal procariota seleccionada, por exemplo, do grupo dos comandos de fosfatase alcalina, penicilinase, Ipp ou enterotoxina II estável ao calor. Para secreção em levedura, a sequência de sinal pode ser e.g., o comando da invertase de levedura, o comando do factor alfa (incluindo os comandos do factor alfa de *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*, este último descrito na Patente dos E.U.A. N.º 5 010 182), ou o comando da fosfatase ácida, o comando da 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 de polipéptidos segregados da mesma espécie ou de espécies relacionadas, bem como comandos de secreção virais.

Os vectores de expressão e de 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 2 $\mu$  é adequada para levedura, e várias origens virais (SV40, políoma, adenovírus, VSV ou BPV) são úteis para vectores de clonagem em células de mamífero.

Os vectores de expressão e de clonagem conterão tipicamente um gene de selecção, também denominado um 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*.

Um exemplo de marcadores seleccionáveis adequados para células de mamífero são aqueles que permitem a identificação de células competentes para incorporar o ácido nucleico de PR0362, 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 de crescer em triptofano, por exemplo, ATCC N.º 44076 ou PEP4-1 [Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)].

Os vectores de expressão e de clonagem contêm usualmente um promotor ligado operativamente à sequência de ácido nucleico de PR0362 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)], da 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 PR0362.

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, fosfoglucoase-isomerase 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 PRO362 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 da 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 PRO362 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. Muitas sequências potenciadoras são actualmente conhecidas, de genes de mamífero (globina, elastase, albumina,  $\alpha$ -fetoproteína e insulina). Tipicamente, utilizar-se-á no entanto um potenciador de um vírus de célula eucariota. Exemplos incluem o potenciador de SV40 no lado tardio da origem de replicação (pb 100-270), o potenciador do promotor precoce de citomegalovírus, o potenciador de polioma no lado tardio da origem de replicação e potenciadores de adenovírus. O potenciador pode ser originário de *splicing* no vector numa posição a 5' ou 3' em relação à sequência de codificação de PRO362, mas está preferivelmente localizado num local a 5' do promotor.

Os vectores de expressão utilizados em células hospedeiras eucariotas (células de levedura, fungos, insectos, planta, animal, humano ou células nucleadas 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 nucleotídicos transcritos na forma de fragmentos poliadenilados na porção não traduzida do ARNm que codifica PRO362.

Ainda outros métodos, vectores e células hospedeiras, adequados para adaptação à síntese de PRO362 em cultura 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 específicas, 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 cópulo é ligado a uma superfície, tal que, por formação do cópulo sobre a superfície, se pode detectar a presença de anticorpo ligado ao cópulo.

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 celular ou de fluidos corporais, para quantificar directamente a expressão do produto génico. Os anticorpos úteis para coloração imuno-histoquímica e/ou ensaio de fluidos de amostra podem ser monoclonais ou policlonais, e podem ser preparados em qualquer mamífero. Convenientemente, os anticorpos podem ser preparados contra um polipéptido PRO362 de sequência nativa ou contra um péptido sintético baseado nas sequências de ADN aqui proporcionadas ou contra uma sequência exógena fundida com ADN de PRO362 e codificando um epítipo de anticorpo específico.

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

As formas de PRO362 podem ser recuperadas a partir do meio de cultura ou a partir de lisados de células hospedeiras. quando 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 PRO362 PRO326 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 PR0362 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 PR0362. 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). O passo ou passos de purificação seleccionados dependerão, por exemplo, da natureza do processo de produção utilizado e do PR0362 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 mais 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 em vários tecidos pode ser medida por métodos imunológicos, tais como coloração imuno-histoquímica de secções de tecido e ensaio de cultura de células ou de fluidos corporais, para quantificar directamente a expressão do produto génico. Os anticorpos úteis para coloração imuno-histoquímica e/ou ensaio de fluidos de amostra podem ser monoclonais ou 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 que codificam o polipéptido do invento ou contra uma sequência exógena fundida com um ADN que codifica um polipéptido do invento e codifica um epítopo de anticorpo específico. São adiante proporcionadas 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 anti-PR0362 inibirem o efeito dos polipéptidos PR0362 em células de tecido. Os 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 de resposta neste ensaio reflectem em parte diferenças na produção de IL-2 pelas células respondedoras. Os resultados de MLR podem ser verificados através de 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 antigénio 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. 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, assim 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 doenças 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 PR0362 ou um seu anticorpo agonista. A terapia com imunoadjuvantes para tratamento de tumores, descrita adiante com mais detalhes, é um exemplo desta utilização dos compostos estimulantes do invento. Os 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 sensibilizadas 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. Ocorrem inchaço e inflamação, fazendo deste um modelo excelente de dermatite de contacto alérgica humana. Um procedimento adequado é descrito com detalhes em *Current Protocols in Immunology*, Eds. J.E.

Cologan, 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 dador reconhecem e respondem a antigénios 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 antigénios do MHC e antigénios de transplante menores. Um procedimento adequado é descrito com detalhes 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 com detalhes 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 antigénio. Estas reacções ocorrem também em doenças auto-imunes específicas de tecidos 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 seres 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 imunomediadas 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-reactividade 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]); direccionamento de genes para células estaminais embrionárias (Thompson et al., *Cell* 56, 313-321 [1989]); electroporação de embriões (Lo, *Mol. Cell. 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., tandens 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 flaqueador 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 recombina 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 interacções 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 interacções 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 interacções de proteínas específicas bem como para assinalar resíduos de aminoácido que são cruciais para estas interacções.

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 linfoquinas 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, através de uma ou mais injecções de um agente imunizante, e, se desejado, um adjuvante. Tipicamente, o agente imunizante e/ou o adjuvante serão injectados no mamífero por múltiplas injecções subcutâneas ou intraperitoneais. O agente imunizante pode incluir o polipéptido PR0362 do invento ou uma sua proteína de fusão. Pode ser útil conjugar o agente imunizante a uma proteína que sabe ser imunogénica no mamífero que está a ser imunizado. Exemplos destas proteínas imunogénicas incluem, mas não lhes estão limitadas, hemocianina de lapa *Fissurella*, albumina sérica, tiroglobulina bovina 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, um *hamster* ou

outro animal hospedeiro apropriado, é tipicamente imunizado com um agente imunizante para induzir linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que se ligarão especificamente ao agente imunizante. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*.

O agente imunizante incluirá tipicamente o polipéptido PRO362 do invento, um seu fragmento antigénico ou uma sua proteína de fusão. Geralmente, utilizam-se linfócitos de sangue periférico (PBL) quando se pretendem células de origem humana, ou células de baço ou células dos nódulos linfáticos quando se pretendem fontes de mamífero não humano. 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 progenitoras não possuem a 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.

As linhas de células imortalizadas preferidas são aquelas que se fundem eficientemente, suportam a expressão estável de anticorpo a nível elevado pelas células produtoras de anticorpo seleccionadas, e são sensíveis a um meio tal como meio HAT. As 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 de 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); Verhoeyen *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 transgénicos, 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 antigénios 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 antigénio e, preferivelmente, uma proteína ou um 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 pesadas e leves 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-antígeno) 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 codificam 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 de 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, uma 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 de anticorpo e agente citotóxico são preparados utilizando uma variedade de agentes de acoplamento de proteínas bifuncionais tais como N-sucinimidil-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-azidobenzoíl)hexanodiamina),

derivados de bis-diazónio (tais como bis-(p-diazónio-benzoíl)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 lipídica 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 reacção 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 ou um polipéptido PRO362 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 não são 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 sérica, 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 sais tais como sódio; complexos metálicos (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 sulfidrilo, 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.g., PRO301, PRO362, PRO245) codificam novos membros de uma família de proteínas caracterizada por homologia em relação ao antigénio 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 [(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 identidade mais substancial é partilhada pela proteína PRO301 codificada

por DNA40628 (SEQ ID NO:1) a 67%. A JAM está envolvida no recrutamento de monócitos em resposta a MCP-1, MCP-3 e LPS *in vivo*. Os anticorpos contra JAM bloqueiam a transmigração de monócitos *in vivo*. A JAM está localizada nos epitélios e endotélios murinos na forma de uma molécula de adesão de junção para transmigração de monócitos. Outros leucócitos podem também utilizar 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 para a 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 atrofica), 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 directa quer indirectamente, lesões no tecido. Ainda que não tenha sido mostrado que os linfócitos T estão directamente envolvidos na danificação do 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 músculo-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 no sinóvio 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 gastrintestinal: 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 antigénios 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, aneíte alérgica e granulomatose, polianeíte, granulomatose de Wegener, granulomatose linfomatóide e artrite de células gigantes. Vasculites várias incluem: síndrome do nóculo linfático mucocutâneo (MLNS ou doença de Kawasaki), vasculite isolada do SNC, doença de Behet, tromboaneíte 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 antígenos 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 antígenos 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  $\beta$  dos ilhéus pancreáticos; 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 terapêuticamente para melhorar a resposta imunitária a agentes infecciosos), doenças de imunodeficiência (moléculas/derivados/agonistas que estimulam a MLR podem ser utilizados terapêuticamente 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 antigénios 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 PR0362 do presente invento, *e.g.* polipéptidos ou anticorpos, são administrados a um mamífero, preferivelmente um ser humano, de acordo com métodos conhecidos, tais como administração intravenosa na forma de *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 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, está também contemplada a administração simultânea ou a administração em primeiro lugar de um polipéptido do invento. Dosagens adequadas para o agente inibidor do 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 da 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**

Os compostos do invento, podem ser utilizados num 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 qualitativa 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 imunoeléctronica. 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 (ANTECEDENTES)**

#### **Isolamento de clones de ADNc que codificam PRO301 humano**

Utilizaram-se as sequências de domínio extracelular (ECD) (incluindo a sequência de sinal de secreção, caso exista) de cerca de 950 proteínas segregadas conhecidas da base de dados pública Swiss-Prot, para pesquisar bases de dados de EST. As bases de dados de EST incluíram bases de dados de EST públicas (e.g., GenBank) e uma base de dados de EST patenteada (LIFESEQ®, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA). A pesquisa foi realizada, utilizando o programa de computador BLAST ou BLAST2 [e.g., Altschul et al., *Methods in Enzymology* 266: 460-480 (1996); <http://blast.wustl.edu/blast/README.html>], como comparação das sequências de proteína de ECD com uma tradução de 6 quadros (6 *frame translation*) das sequências EST. As comparações que resultam 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; <http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>).

Montou-se uma sequência de ADN de consenso que codifica DNA35936 utilizando phrap. Em alguns casos, a sequência de ADN de consenso foi alongada utilizando ciclos repetidos de blast e phrap para alongar a sequência de consenso tanto quanto possível utilizando as três fontes de sequências EST acima enumeradas.

Com base nesta sequência de consenso, sintetizaram-se oligonucleótidos: 1) para identificar por PCR uma biblioteca de ADNc que continha a sequência de interesse, e 2) para utilizar como sondas para isolar um clone da sequência de codificação de comprimento completo. Os iniciadores de PCR

directo e inverso (indicados como \*.f e \*.r, respectivamente) podem variar de 20 a 30 nucleótidos (tipicamente cerca de 24), e são desenhados para originar um produto de PCR de 100-1000 pb de comprimento. As sequências sonda (indicadas como \*.p) têm tipicamente 40-55 pb (tipicamente cerca de 50) de comprimento. Em alguns casos, sintetizam-se oligonucleótidos adicionais quando a sequência de consenso é maior que 1-1,5 kpb. De modo a rastrear várias bibliotecas quanto a uma fonte de um clone de comprimento completo, o ADN das bibliotecas foi rastreado por amplificação por PCR, como em Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, com o par de iniciadores de PCR. Utilizou-se uma biblioteca positiva para isolar clones que codificam o gene de interesse pelo procedimento de clonagem *in vivo* utilizando a sonda oligonucleotídica e um dos iniciadores de PCR.

De modo a rastrear várias bibliotecas quanto a uma fonte de um clone de comprimento completo, o ADN das bibliotecas foi rastreado por amplificação por PCR com o par de iniciadores de PCR acima identificado. Utilizou-se então uma biblioteca positiva para isolar clones que codificam o gene de PR0301 utilizando a sonda oligonucleotídica e um dos iniciadores de PCR.

O ARN para a construção das bibliotecas de ADNc foi isolado de rim fetal humano. As bibliotecas de ADNc utilizadas para isolar os clones de ADNc foram construídas por métodos padrão utilizando reagentes comercialmente disponíveis (e.g., Invitrogen, San Diego, CA; Clontech, etc.). O ADNc foi iniciado com oligo dT contendo um local NotI, ligado com extremidades lisas a adaptadores SalI tratados com hemiquinase, clivado com NotI, calibrado apropriadamente por electroforese em gel, e clonado numa orientação definida num vector de clonagem adequado (tal como pRKB ou pRKD; pRK5B é um precursor de pRK5D que não contém o local SfiI; veja-se, Holmes et al., *Science*, 253:1278-1280 (1991)) nos locais XhoI e NotI únicos.

Sequenciou-se um clone de ADNc na sua totalidade. A sequência nucleotídica de comprimento completo de DNA40628 de sequência nativa está apresentada na Figura 5. O clone DNA40628 contém um único quadro de leitura aberto (*open reading frame*) com um local de início da tradução evidente nas posições de nucleótido 52-54 (Fig. 5). O precursor polipeptídico previsto tem 299 aminoácidos de comprimento com

um peso molecular previsto de 32583 daltons e um pI de 8,29. O clone DNA40628 foi depositado na ATCC e foi-lhe atribuído o número de depósito ATCC N.º 209432.

Com base numa análise de alinhamento de sequências BLAST e FastA da sequência de comprimento completo, o PRO301 codificado por DNA40628 apresenta identidade de sequência de aminoácidos com o precursor do antígeno A33 (30%) e a proteína receptora do vírus coxsackie e adenovírus (29%).

As sequências oligonucleotídicas utilizadas no procedimento anterior foram as seguintes:

OL12162 (35936.f1) (SEQ ID NO:12)

TCGCGGAGCTGTGTTCTGTTTCCC

OL12163 (35936.p1) (SEQ ID NO:13)

TGATCGCGATGGGGACAAAGGCGCAAGCTCGAGAGGAACTGTTGTGCCT

OL12164 (35936.f2) (SEQ ID NO:14)

ACACCTGGTTCAAAGATGGG

OL12165 (35936.r1) (SEQ ID NO:15)

TAGGAAGAGTTGCTGAAGGCACGG

OL12166 (35936.f3) (SEQ ID NO:16)

TTGCCTTACTCAGGTGCTAC

OL12167 (35936.r2) (SEQ ID NO:17)

ACTCAGCAGTGGTAGGAAAG

## **EXEMPLO 2**

### **Isolamento de clones de ADNc que codificam PRO362 humano**

Utilizaram-se as sequências de domínio extracelular (ECD) (incluindo o sinal de secreção, se existir) de cerca de 950 proteínas segregadas conhecidas da base de dados de proteínas pública Swiss-Prot para pesquisar bases de dados de marcadores de sequência expressa (EST). As bases de dados de EST incluíram bases de dados de EST públicas (e.g., GenBank) e uma base de dados de ADN de EST privada (LIFESEQ®, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA). A pesquisa foi realizada utilizando o programa de computador BLAST ou BLAST-3 (e.g., Altshul et al., Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)) como comparação das sequências de proteínas de ECD com uma tradução de 6 quadros (6 frame translation) da sequência EST. As comparações que resultam numa pontuação BLAST de 70 (ou em



alguns casos 90) ou mais que não codificam proteínas conhecidas foram agrupadas e montadas em sequências de ADN de consenso com o programa "phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington).

Montou-se uma sequência de ADN de consenso relativamente a outras sequências EST utilizando phrap. Esta sequência de consenso é aqui designada DNA42257 (SEQ ID NO:5) (veja-se a Figura 4C). Com base na sequência de consenso de DNA42257 (SEQ ID NO:5) mostrada na Figura 4C, sintetizaram-se oligonucleótidos: 1) para identificar por PCR uma biblioteca de ADNc que continha a sequência de interesse, e 2) para utilizar como sondas para isolar um clone da sequência de codificação de comprimento completo para PRO362. Os iniciadores de PCR directo e inverso geralmente variam de 20 a 30 nucleótidos e são frequentemente desenhados para originar um produto de PCR com cerca de 100-1000 pb de comprimento. As sequências sonda têm tipicamente 40-55 pb de comprimento. Em alguns casos, sintetizam-se oligonucleótidos adicionais quando a sequência de consenso é maior que cerca de 1-1,5 kpb. De modo a rastrear várias bibliotecas quanto a um clone de comprimento completo, o ADN das bibliotecas foi rastreado por amplificação por PCR, como em Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, com o par de iniciadores de PCR. Utilizou-se então uma biblioteca positiva para isolar clones que codificam o gene de interesse utilizando a sonda oligonucleotídica e um dos pares de iniciadores.

Sintetizaram-se os iniciadores de PCR (directo e inverso):

iniciador de PCR 1 directo (42257.f1)

5'-TATCCCTCCAATTGAGCACCTGG-3' (SEQ ID NO:18)

iniciador de PCR 2 directo (42257.f2)

5'-GTCGGAAGACATCCCAACAAG-3' (SEQ ID NO:19)

iniciador de PCR 1 inverso (42257.r1)

5'-CTTACAATGTCGCTGTGCTGCTC-3' (SEQ ID NO: 20)

iniciador de PCR 2 inverso (42257.r2)

5'-AGCCAAATCCAGCAGCTGGCTTAC-3' (SEQ ID NO:21)

Adicionalmente, construiu-se uma sonda de hibridação oligonucleotídica sintética a partir da sequência de consenso de DNA42257 que tinha a seguinte sequência de nucleótidos:

Sonda de hibridação (42257.p1)

5'-TGGATGACCGGAGCCACTACACGTGTGAAGTCACCTGGCAGACTCCTGAT-3'  
(SEQ ID NO: 22).

De modo a rastrear várias bibliotecas quanto a uma fonte de um clone de comprimento completo, o ADN das bibliotecas foi rastreado por amplificação por PCR com os pares de iniciadores de PCR acima identificados. Utilizou-se então uma biblioteca positiva para isolar clones que codificam o gene de PRO362 utilizando a sonda oligonucleotídica e um dos iniciadores de PCR:

O ARN para a construção das bibliotecas de ADNc foi isolado de tecido cerebral fetal humano (LIB 153). As bibliotecas de ADNc utilizadas para isolar os clones de ADNc foram construídas por métodos padrão utilizando reagentes comercialmente disponíveis 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 hemiquinase, clivado com NotI, calibrado apropriadamente por electroforese em gel, e clonado numa orientação definida num vector de clonagem adequado (tal como pRKB ou pRKD; pRK5B é um precursor de pRK5D que não contém o local SfiI; veja-se Holmes et al., *Science* 253: 1278-1280 (1991)) nos locais XhoI e NotI únicos.

A sequenciação do ADN dos clones isolados como descrito originou a sequência de ADN de comprimento completo para um PRO362 isolado [aqui designada por UNQ317 (DNA45416-1251) (SEQ ID NO:7)].

A totalidade da sequência nucleotídica de UNQ317 (DNA45416-1251) está apresentada na Figura 6 (SEQ ID NO:7). O clone UNQ367 (DNA45416-1251) (SEQ ID NO: 7) contém um único quadro de leitura aberto (*open reading frame*) com um local de início da tradução evidente nas posições de nucleótido 1082-1084 (Figura 6, SEQ ID NO:7). O precursor polipeptídico previsto tem 321 aminoácidos de comprimento (Figura 3, SEQ ID NO:2). A proteína PRO362 de comprimento completo mostrada na Figura 3 tem um peso molecular estimado de cerca de 35 544 daltons e um pI de cerca de 8,51. A análise do polipéptido PRO362 de comprimento completo como mostrado na Figura 3 (SEQ ID NO:2) evidencia a presença de um local de fixação de glicosaminoglicano de cerca do aminoácido 149 a cerca do aminoácido 152 e um domínio transmembranar de cerca do aminoácido 276 a cerca do aminoácido 306. O clone UNQ317

(DNA45416-1251) foi depositado na ATCC com o número de depósito N.º 209620.

### **EXEMPLO 3 (ANTECEDENTES)**

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

Utilizaram-se as sequências de domínio extracelular (ECD) (incluindo o sinal de secreção, se existir) de cerca de 950 proteínas segregadas conhecidas da base de dados de proteínas pública Swiss-Prot para pesquisar bases de dados de marcadores de sequência expressa (EST). As bases de dados de EST incluíram bases de dados de EST públicas (e.g., GenBank) e uma base de dados de ADN de EST patenteada (LIFESEQ<sup>®</sup>, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA). A pesquisa foi realizada utilizando o programa de computadores BLAST ou BLAST-2 (e.g., Altshul et al., Methods In Enzymology 266:460-480 (1996)) como comparação das sequências de proteína de ECD com uma tradução de 6 quadros (*6 frame translation*) da sequência de EST. As comparações que resultaram numa pontuação BLAST de 70 (ou em alguns casos 90) ou mais 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 relativamente a outras sequências EST, onde a sequência de consenso é aqui designada por DNA30954 (SEQ ID NO:27). Com base na sequência de consenso DNA30954, sintetizaram-se oligonucleótidos para identificar por PCR uma biblioteca de ADNc que continha a sequência de interesse e para utilizar como sondas para isolar um clone da sequência de codificação de comprimento completo para o PRO245.

Sintetizou-se 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 directo e inverso variam geralmente de 20 a 30 nucleótidos e são frequentemente desenhados para

originar um produto de PCR de cerca de 100-1000 pb de comprimento. As sequências sonda têm tipicamente 40-55 pb de comprimento. Em alguns casos, sintetizam-se oligonucleótidos adicionais quando a sequência de consenso é maior que cerca de 1-1,5 kpb. De modo a rastrear várias bibliotecas quanto a um clone de comprimento completo, o ADN das bibliotecas foi rastreado por amplificação por PCR, como em 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 de consenso de DNA30954 que tinha a seguinte sequência de nucleótidos:

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 por PCR com o par de iniciadores de PCR acima identificado. Utilizou-se então uma biblioteca positiva para isolar clones que codificam o gene de PR0245, 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 proporcionou a sequência de ADN de comprimento completo para um PR0245 de sequência nativa [aqui designado

por UNQ219 (DNA35638) (SEQ ID NO:8)] e a sequência da proteína derivada (SEQ ID NO:9).

A totalidade da sequência nucleotídica de UNQ219 (DNA35638) está apresentada na Figura 7 (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 7, SEQ ID NO:8). O precursor polipeptídico previsto tem 312 aminoácidos de comprimento (Fig. 11) (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 4 (ANTECEDENTES)**

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

Células endoteliais capilares adrenocorticais (ACE) de bovino (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, soro de vitelo a 10%, glutamina 2 mM, pen/estrept 1x e fungizona, suplementado com VEGF a 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 µL, acetato de sódio 0,1 M, pH 5,5, Triton X-100 a 0,1%, fosfato de p-nitrofenilo 10 mM). Após incubação durante 2 horas a 37°C, parou-se a reacção por adição de 10 µL 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-β (1 ng/mL), e células + VEGF (3 ng/mL) + LIF (5 ng/mL). (É conhecido que o TGF-β 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>405nm</sub>, (1) relativamente a células sem estimulação e (2) relativamente à inibição por TGF- $\beta$  de referência da actividade estimulada por VEGF. Os resultados, apresentados na Tabela 1, são indicativos da utilidade dos polipéptidos PRO301 e 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 DNA40628 (SEQ ID NO:1)	7,0 nM	1,02
Proteína de DNA40628 (SEQ ID NO:1)	70,0 nM	0,88
Proteína de DNA40628 (SEQ ID NO:1)	700,0 nM	0,44
Proteína de DNA40628 (SEQ ID NO:1)	0,01%	0,92
Proteína de DNA40628 (SEQ ID NO:1)	0,1%	0,85
Proteína de DNA40628 (SEQ ID NO:1)	1,0%	0,68
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 5****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 terapêuticamente quando a melhoria de uma resposta inflamatória é benéfica. Os compostos que inibem a proliferação de linfócitos são úteis terapêuticamente quando a 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).

As PBMC estimulantes são preparadas 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, as PBMC são isoladas 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 as PBMC são isoladas 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	
Proteína de DNA40628 (SEQ ID NO:1)	0,1%	181,7
Proteína de DNA40628 (SEQ ID NO:1)	1,0%	187,3
Proteína de DNA40628 (SEQ ID NO:1)	0,1%	193,4
Proteína de DNA40628 (SEQ ID NO:1)	1,0%	204,1
Proteína de DNA45416 (SEQ ID NO:2)	0,1%	87,4
Proteína de DNA45416 (SEQ ID NO:2)	1,0%	180,2
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 6

### 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 DNA40628 (SEQ ID NO:1)	+
Proteína de DNA45416 (SEQ ID NO:2)	+
Proteína de DNA35638 (SEQ ID NO:9)	+
Controlo negativo	-

**EXEMPLO 7 (ANTECEDENTES)****Interacção com neutrófilos humanos**

O exemplo que se segue mostra a capacidade dos polipéptidos do invento se ligarem a neutrófilos humanos, uma molécula associada a inflamação e à resposta inflamatória.

Neutrófilos isolados do sangue de dadores humanos (PMN) como descrito em Scan. *J. Clin. Lab Invest.* Suppl. 97: 51-76 (1968), foram incubados com uma fusão com Ig de proteína codificada por DNA40628 (preparada como discutido nos exemplos seguintes) ou um anticorpo humanizado de controlo negativo.

Os PMN foram ressuspensos num tubo de microcentrífuga em PBS a uma densidade de  $2 \times 10^6$  equivalentes de células por condição. Lavaram-se as células duas vezes com PBS gelado e sedimentaram-se a 400 x g entre lavagens. Bloquearam-se as células PMN com BSA a 0,5% em PBS (reagente de bloqueio) a 4°C

durante 1 hora. Após a incubação, lavaram-se adicionalmente as células mais duas vezes com reagente de bloqueio. Sedimentaram-se os PMN após a lavagem final e ressuspendeu-se em 1 ml de tampão de bloqueio a 0,1 µg/ml em proteína de DNA40628 e em anticorpo de controlo. A incubação foi realizada durante 2 horas a 4°C. As células PMN foram suavemente ressuspensas de 15 em 15 minutos em gelo, depois foram lavadas e sedimentadas 5 vezes em tampão de bloqueio, com cada lavagem a demorar 5 minutos a 4°C e a sedimentação efectuada a 400 x g. Aplicou-se então às células PMN uma diluição de 1:1000 de Fc de IgG de cabra e anti-humana conjugada com fosfatase alcalina específica no tampão de bloqueio. Incubaram-se as células PMN durante 1 hora a 4°C, com mistura suave de 15 em 15 minutos em gelo. Lavaram-se então as células PMN 5 vezes com tampão de bloqueio, ressuspenderam-se no substrato apropriado para fosfatase alcalina e distribuíram-se em 4 alíquotas iguais de 100 µl sobre uma placa de microtitulação. O desenvolvimento de cor foi lido a D.O. 405. Os resultados estão mostrados na Figura 21.

#### **EXEMPLO 8 (ANTECEDENTES)**

##### **Hibridação de tecidos dot blot**

Um *blot* matriz de ARN humano (Clontech) foi hibridado durante a noite a 65°C em tampão Expresshyb® (Clontech) seguindo as instruções do fabricante com 100 nM de sonda de ADNc de DNA40628 (SEQ ID NO:7) marcada com psoraleno-biotina. Utilizou-se estreptavidina-fosfatase alcalina para detectar a sonda biotinilada. Desenvolveu-se o *blot* com substrato CDP-star (Ambion) e expôs-se durante vários tempos a filme Biomax (Kodak). Uma análise de hibridação de ADNc de tecidos humanos mostra que o ARNm de DNA40628 é expresso em muitos tecidos excepto no cerebelo e na medula espinal, Figure 19. O ARNm de DNA40628 é altamente expresso no cólon, na próstata, no estômago, no ovário, na glândula salivar, no rim, no pulmão, na traqueia e na placenta.

#### **EXEMPLO 9**

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

Este exemplo mostra que genes codificando várias proteínas indicados na Figura 20 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 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 não são 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 20 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 CT delta. 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 20. As regiões dos produtos génicos indicados, que contêm muito provavelmente sequências de ácido nucleico únicas e que pouco provavelmente têm os intrões eliminados (*spliced out*), são preferidas para a obtenção de iniciadores, e.g. região não traduzida a 3'.

A reacção do 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 monitorar 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 alongável pela enzima ADN-polimerase Taq, e está marcada com um pigmento fluorescente repórter e um pigmento fluorescente de extinção. Qualquer emissão induzida por laser pelo 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 libertado 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 da 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 em 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.

Os resultados da amplificação de ARNm são apresentados na Figura 20. 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 18 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 PRO301, o PRO362 e o PRO245 tenham também uma expressão elevada em doenças inflamatórias humanas, tais como doença inflamatória do intestino e outras doenças inflamatórias intestinais.

#### **EXEMPLO 10 (ANTECEDENTES)**

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

A capacidade dos polipéptidos do invento induzirem 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), a uma densidade de  $2 \times 10^4$  células por poço, num volume de 100 µl. No segundo dia seguinte, adicionaram-se polipéptido PRO301 e PRO245 codificados respectivamente por DNA40628 e DNA35638, em triplicado, em diluições de 1%, 0,33% e 0,11%. No terceiro dia, determinou-se a capacidade dos polipéptidos PRO301 e PRO245 induzirem apoptose utilizando um kit comercialmente disponível, Apoptosis Detection Kit (R&D Systems, Minnesota), no qual se utiliza anexina V, um membro das proteínas de ligação de cálcio e fosfolípidos, 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 um único laser que emite luz de excitação a 488 nm. Neste teste, as células vivas não corarão com nenhum fluoróculo, as células necróticas corarão com ambos os fluoróculos e as células que sofrem apoptose apenas corarão com o reagente 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
proteína de DNA40628 (SEQ ID NO:1)	0,11%	115,8
proteína de DNA40628 (SEQ ID NO:1)	0,33%	199,3
proteína de DNA40628 (SEQ ID NO:1)	1,0%	335,6
proteína de DNA35638 (SEQ ID NO:9)	0,11%	77,6
proteína de DNA35638 (SEQ ID NO:9)	0,33%	143,7
proteína de DNA35638 (SEQ ID NO:9)	1,0%	146,0
proteína de DNA35638 (SEQ ID NO:9)	6,82 nM	67,2
proteína de DNA35638 (SEQ ID NO:9)	20,46 nM	102,6
proteína de DNA35638 (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 4, 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 11**

### **Ensaio antitumoral in vitro**

A actividade antiproliferativa dos polipéptidos PR0301 e PR0362 do invento foi determinada no ensaio de investigação *in vitro* para identificação de fármacos anticancerosos, orientado 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 é 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)).

Recolheram-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
Proteína de DNA40628 (SEQ ID NO:1)	0,075 nM	6	Cólon Melanoma	HCC-2998 M14
Proteína de DNA40638 (SEQ ID NO:1)	700 nM	6	Melanoma	M14
Proteína de DNA40628 (SEQ ID NO:1)	152 nM	6	Cólon Melanoma	SR LOX IMVI
Proteína de DNA40628 (SEQ ID NO:1)	15,2 nM	6	Melanoma	LOX IMVI
Proteína de DNA40628 (SEQ ID NO:1)	0.85 nM	6	NSCL Ovariano Próstata	HOP62 OVCAR-3 PC3
Proteína de DNA45416 (SEQ ID NO:2)	15 nM	2	Ovariano	SK-OV-3
Proteína de DNA45416 (SEQ ID NO:2)	15 nM	6	NSCL Próstata	NCI-H323M PC-3
Proteína de DNA45416 (SEQ ID NO:2)	4,7 nM	6	Melanoma	LOX IMVI
Proteína de DNA45416 (SEQ ID NO:2)	47 nM	6	NSCL Cólon	NCI-H322M Colo 205
Proteína de DNA45416 (SEQ ID NO:2)	152 nM	2	SNC Mama	SR-295 T047D
Proteína de DNA45416 (SEQ ID NO:2)	152 nM	6	Leuc  NSCL Cólon SNC Melanoma	SR, HL-60 (TB), MOLT-4, K-562 NCI-H23, EKVX HCC-2998 U251 UACC.62, UACC-257, LOX IMVI
Proteína de DNA35638 (SEQ ID NO:9)	0,35 nM	2	NSCL Ovariano	HOP92 OVCAR-4
Proteína de DNA35638 (SEQ ID NO:9)	0,35 nM	2	Leuc	SR



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

**EXEMPLO 12****Utilização de PRO362 como sonda de hibridação**

O método seguinte descreve a utilização de uma sequência nucleotídica que codifica um PRO362 como sonda de hibridação.

Utiliza-se ADN compreendendo a sequência de codificação de PRO362 de sequência nativa (como se mostra na Figura 6, SEQ ID NO:7) como sonda para rastrear ADN homólogos (tais como os que codificam variantes de PRO362 de ocorrência natural) em bibliotecas de ADNc de tecido humano ou bibliotecas genómicas de tecido humano.

A hibridação e a lavagem de filtros contendo os ADN das bibliotecas são realizadas sob as seguintes condições de rigor elevado. A hibridação da sonda radiomarcada derivada de PRO362 com os filtros é realizada numa solução de formamida a 50%, SSC 5x, SDS a 0,1%, pirofosfato de sódio a 0,1%, fosfato de sódio 50 mM, pH 6,8, solução de Denhardt 2x e sulfato de dextrano a 10%, a 42°C durante 20 horas. A lavagem dos filtros é realizada numa solução aquosa de SSC 0,1x e SDS a 0,1% a 42°C.

Os ADN possuindo uma identidade de sequência desejada com o ADN que codifica PRO362 de sequência nativa de comprimento completo, podem então ser identificados utilizando técnicas padrão conhecidas na especialidade.

**EXEMPLO 13****Expressão de PRO362 em *E. coli***

Este exemplo ilustra a preparação de uma forma não glicosilada de PRO362 por expressão recombinante em *E. coli*.

A sequência de ADN que codifica PRO362 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 PRO362, 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 o que o promotor de expressão é activado.

Após cultura das células durante mais várias horas, as células podem ser recolhidas por centrifugação. O sedimento celular obtido pela centrifugação pode ser solubilizado, utilizando vários agentes conhecidos na especialidade, e a proteína PRO301, PRO362 ou PRO245 solubilizada pode depois ser

purificada utilizando uma coluna quelante de metais sob condições que permitem uma ligação forte da proteína.

O PRO301 foi expresso em *E. coli* numa forma marcada com poli-His, utilizando o procedimento seguinte. O ADN que codifica PRO301 foi inicialmente amplificado utilizando iniciadores de PCR seleccionados. Os iniciadores continham locais para enzimas de restrição que correspondem aos locais de enzimas de restrição no vector de expressão seleccionado, e outras sequências úteis que proporcionam uma iniciação de tradução eficiente e fiável, uma rápida purificação numa coluna quelante de metais, e a remoção proteolítica com enteroquinase. As sequências marcadas com poli-His, amplificadas por PCR, foram então ligadas num vector de expressão, que foi utilizado para transformar um hospedeiro *E. coli* baseado na estirpe 52 (W3110 fuhA(tonA) Ion galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)). Os transformantes foram primeiro crescidos em LB contendo 50 mg/ml de carbenicilina a 30°C com agitação até se atingir uma D.O. 600 de 3-5. As culturas foram então diluídas 50-100 vezes em meio CRAP (preparado por mistura de 3,57 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,71 g de citrato de sódio·2H<sub>2</sub>O, 1,07 g de KCl, 5,36 g de extracto de levedura Difco, 5,36 g de hicasa SF da Sheffield em 500 mL de água, assim como MPOS 110 mM, pH 7,3, glucose a 0,55% (p/v) e MgSO<sub>4</sub> 7 mM) e crescidas durante aproximadamente 20-30 horas a 30°C com agitação. Removeram-se amostras para verificar a expressão por análise SDS-PAGE, e centrifugou-se a cultura para sedimentar as células. O sedimento de células foi congelado até à purificação e redobragem.

Ressuspendeu-se pasta de *E. coli* de fermentações de 0,5 a 1 L (sedimentos de 6-10 g) em 10 volumes (p/v) em guanidina 7 M, Tris 20 mM, tampão de pH 8. Adicionam-se sulfito de sódio e tetrationato de sódio sólidos para perfazer as concentrações finais de 0,1 M e 0,02 M, respectivamente, e agitou-se a solução durante a noite a 4°C. Este passo resulta numa proteína desnaturada com todos os resíduos de cisteína bloqueados por sulfitolização. Centrifugou-se a solução a 40 000 rpm numa Ultracentrífuga Beckman durante 30 min. Diluiu-se o sobrenadante com 3-5 volumes de tampão da coluna de quelato metálico (guanidina 6 M, Tris 20 mM, pH 7,4) e filtrou-se através de filtros de 0,22 micron para clarificar. Dependendo do extracto clarificado foi carregado numa coluna de quelato metálico de Ni-NTA de 5 ml da Qiagen equilibrada no tampão da coluna de quelato metálico. Lavou-se a coluna com

tampão adicional contendo imidazole 50 mM (Calbiochem, qualidade Utrol), pH 7,4. Eluiu-se a proteína com tampão contendo imidazole 250 mM. Reuniram-se as fracções contendo a proteína desejada e armazenaram-se a 4°C. Estimou-se a concentração da proteína através da sua absorvância a 280 nm utilizando o coeficiente de extinção calculado com base na sua sequência de aminoácidos.

Redobrou-se a proteína diluindo lentamente uma amostra em tampão de redobragem recentemente preparado consistindo em: Tris 20 mM, pH 8,6, NaCl 0,3 M, ureia 2,5 M, cisteína 5 mM, glicina 20 mM e EDTA 1 mM. Os volumes de redobragem foram escolhidos de modo a que a concentração final de proteína estar entre 50 a 100 microgramas/ml. Agitou-se a solução de redobragem suavemente a 4°C durante 12-36 horas. Extinguiu-se a reacção de redobragem através da adição de TFA até uma concentração final de 0,4% (pH de aproximadamente 3). Antes de outra purificação da proteína, filtrou-se a solução através de um filtro de 0,22 micron e adicionou-se acetonitrilo até uma concentração final de 2-10%. Cromatografou-se a proteína redobrada numa coluna de fase inversa Poros RI/H utilizando um tampão móvel de TFA a 0,1% com eluição com um gradiente de acetonitrilo de 10 até 80%. Analisaram-se alíquotas de fracções com absorvância A280 em géis de poliacrilamida-SDS e reuniram-se as fracções contendo proteína redobrada homogénea. Geralmente, as espécies correctamente redobradas da maioria das proteínas são eluídas com as menores concentrações de acetonitrilo pois essas espécies são as mais compactas com os seus interiores hidrófobos protegidos da interacção com a resina de fase inversa. As espécies agregadas são usualmente eluídas com maiores concentrações de acetonitrilo. Em adição à resolução de formas mal dobradas de proteínas com a forma desejada, o passo de fase inversa também remove endotoxina das amostras.

As fracções contendo a proteína PR0301 dobrada desejada, respectivamente, foram reunidas e o acetonitrilo foi removido utilizando uma corrente suave de azoto dirigida para a solução. As proteínas foram formuladas em Hepes 20 mM, pH 6,8 com cloreto de sódio 0,14 M e manitol a 4% por diálise ou por filtração em gel utilizando resinas G25 Superfine (Pharmacia) equilibradas com o tampão de formulação e esterilizadas por filtração.

**EXEMPLO 14****Expressão de PRO362 em células de mamífero**

Este exemplo ilustra a preparação de uma forma glicosilada de um PRO362 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 PRO362 é ligado no pRK5 com enzimas de restrição seleccionadas para permitir a inserção do ADN de PRO362 utilizando métodos de ligação, tal como descrito em Sambrook *et al.*, *supra*. O vector resultante é denominado pRK5-PRO362.

Numa concretização, as células hospedeiras seleccionadas podem ser células 293. Células 293 humanas (ATCC CCL 1573) são crescidas 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-PRO362 com cerca de 1 µg de ADN que codifica 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 um filme, durante um período de tempo seleccionado, para revelar a presença de polipéptido PRO362. As culturas contendo células transfectadas podem ser submetidas a outra incubação (em meio isento de soro) e o meio é testado em bioensaios seleccionados.

Numa técnica alternativa, o ADN de PR0362 pode ser introduzido transientemente em células 293 utilizando o método do sulfato de dextrano descrito por Sompanyrac *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 12:7575 (1981). Crescem-se as células 293 até à densidade máxima num balão rotativo e adicionam-se 700 µg de pRK5-PR0362 ou ADN. Primeiro, concentram-se as células do balão rotativo por centrifugação e lavam-se com PBS. Incuba-se o precipitado de ADN-dextrano 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 bovina e 0,1 µg/ml de transferrina bovina. Após cerca de quatro dias, o meio condicionado é centrifugado e filtrado para remover células e resíduos. A amostra contendo PR0362 expresso pode depois ser concentrada e purificada por qualquer método seleccionado, tal como diálise e/ou cromatografia em coluna.

Noutra concretização, o PR0362 pode ser expresso em células CHO. O pRK5-PR0362 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 PR0362, o meio de cultura pode ser substituído por meio isento de soro. Preferivelmente, incubam-se as culturas durante cerca de 6 dias, e depois recolhe-se o meio condicionado. O meio contendo o PR0362 expresso pode depois ser concentrado e purificado por qualquer método seleccionado.

PR0362 marcado com epítipo pode também ser expresso em células CHO hospedeiras. O PR0362 pode ser subclonado a partir do vector pRK5. A inserção do subclone pode ser submetida a PCR para se fundir em enquadramento com um epítipo marcador seleccionado, tal como um marcador poli-His, num vector de expressão de baculovírus. A inserção de PR0362 marcada com poli-His pode depois ser subclonada num vector conduzido por 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 conduzido por SV40. A marcação pode ser realizada, como acima descrito, para verificar a expressão. O meio de cultura contendo o PR0362 marcado com poli-His expresso pode depois ser

concentrado e purificado por qualquer método seleccionado, tal como por cromatografia de afinidade em quelato de  $\text{Ni}^{2+}$ .

O PR0362 foi expresso em células CHO tanto pelo procedimento de expressão transiente como pelo 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 para 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 quanto a 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 (Qiagen), Dosper<sup>TM</sup> ou Eugene<sup>TM</sup> (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  $\mu\text{m}$  com 5% de soro fetal de bovino tratado por diafiltração a 0,2  $\mu\text{m}$ ). 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 com tampão fosfato de Na 20 mM, pH 6,8. Após a carga, 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



imediatamente neutralizada recolhendo fracções de 1 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 PRO362 foi também produzido por expressão transiente em células COS.

## **EXEMPLO 15**

### **Expressão de PRO362 em levedura**

O método seguinte descreve a expressão recombinante de PRO362 em levedura.

Primeiro, constroem-se vectores de expressão de levedura para produção intracelular ou secreção de PRO362 a partir do promotor ADH2/GAPDH. Um ADN que codifica PRO362, 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 PRO362. Para secreção, o ADN que codifica PRO362 pode ser clonado no plasmídeo seleccionado, conjuntamente com ADN que codifica o promotor ADH2/GAPDH, o sinal de secreção/sequência de comando de factor alfa de levedura, e sequências ligantes (se necessário), para expressão de PRO362.

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

O PRO362 recombinante pode ser subsequentemente isolado e purificado por remoção das células de levedura do meio fermentação por centrifugação e depois concentração do meio utilizando filtros de cartucho seleccionados. O concentrado contendo PRO362 pode ser adicionalmente purificado utilizando resinas de cromatografia em coluna seleccionadas.

**EXEMPLO 16****Expressão de PRO362 em células de insecto infectadas com baculovírus**

O método que se segue descreve a expressão recombinante de PRO362 em células de insecto infectadas com baculovírus.

O PRO362 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 PRO362 ou a porção desejada do PRO362 (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 para enzimas de restrição (seleccionadas) 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 anterior e ADN do vírus 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 recolhidos e utilizados para amplificações adicionais. 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 PRO362 marcado com poli-His expresso pode ser então purificado, por exemplo, por cromatografia de afinidade em quelato de Ni<sup>2+</sup> 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, lavam-se as células Sf9, ressuspendem-se em tampão para ultra-sons (25 mL de Hepes, pH 7,9; MgCl<sub>2</sub> 12,5 mM; EDTA 0,1 mM; glicerol a 10%; NP-40 a 0,1%; KCl 0,4 M), e tratam-se 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, glicerol a 10%, pH 7,8) e

filtrado através de um filtro de 0,45 µm. Prepara-se uma coluna de agarose Ni<sup>2+</sup>-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<sub>280</sub> com tampão de carga, momento em que se inicia a recolha de fracções. Em seguida, lava-se a coluna com um tampão de lavagem secundário (fosfato 50 mM; NaCl 300 mM, glicerol a 10%, pH 6,0), que elui a proteína ligada não especificamente. Após atingir de novo a linha de base de A<sub>280</sub>, a coluna é desenvolvida com um gradiente de imidazole de 0 a 500 mM no tampão de lavagem secundário. Recolhem-se fracções de um mL e analisam-se por SDS-PAGE e coloração com prata ou *Western blot* com Ni<sup>2+</sup>-NTA conjugado a fosfatase alcalina (Qiagen). As fracções contendo o PRO362 marcado com His<sub>10</sub> eluído são reunidas e dialisadas contra tampão de carga.

Alternativamente, a purificação do PRO362 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 PRO362 foi expresso em células de insecto Sf9 infectadas com baculovírus. Embora a expressão fosse realmente realizada a uma escala de 0,5-2 L, a escala pode ser prontamente aumentada para preparações maiores (e.g. 8 L). As proteínas foram expressas na forma de uma construção de IgG (imunoadesina), na qual a região extracelular da proteína estava fundida com uma sequência da 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). O pb.PH.IgG e o 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. Recolheu-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 a uma multiplicidade de infecção (MOI) aproximada de 10. Incubaram-se as células durante 3 dias a 28°C. Recolheu-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 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) a uma MOI aproximada de 0,1. Incubaram-se as células durante 3 dias a 28°C. Recolheu-se o sobrenadante e filtrou-se. Repetiram-se a ligação em descontinuo 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 recolhido 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 de Ni-NTA, equilibrada com tampão Hepes 20 mM, pH 7,4, contendo NaCl 0,3 M e imidazole 5 mM a um caudal de 4-5 ml/minuto a 4°C. Após a carga, 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 manitol a 4%, pH 6,8, com uma coluna G25 Superfine de 25 ml (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 a carga, 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 1 ml para tubos contendo 275  $\mu$ L de tampão Tris 1 M, pH 9. A proteína altamente purificada foi subsequente dessalinizada para tampão de armazenamento como acima descrito para as proteínas marcadas com poli-His. A homogeneidade das proteínas foi verificada por electroforese em gel de SDS-poliacrilamida (PAGE) e sequenciação de aminoácidos N-terminal por degradação de Edman.

O PRO362 foi também expresso em células High-5 infectadas com baculovírus utilizando um procedimento análogo. Cresceram-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  $\mu$ g de vector baseado em pIE contendo PRO362 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  $\mu$ L de CellFectin (GibcoBRL # 10362-010) com 1 ml de meio Ex-Cell. Os vectores pIE1-1 e pIE1-2 são desenhados 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 promotoras que se sabe serem importantes para expressão génica mediada por iel em células de insecto não infectadas assim como o elemento potenciador hr5. O pIE1-1 e o 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 em camada 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 excesso de CellFectin em. Adicionou-se meio Ex-Cell fresco (30 ml) e incubaram-se as células durante 3 dias a 28°C. Recolheu-se o sobrenadante e determinou-se a expressão de PRO362 por ligação em descontínuo de um modo similar ao descrito para as células Sf9.

**EXEMPLO 17****Preparação de anticorpos que se ligam a PR0362**

Este exemplo ilustra a preparação de anticorpos monoclonais que se podem ligar especificamente a PR0362.

São conhecidas na especialidade técnicas para a produção de anticorpos monoclonais que estão descritas, por exemplo, em Goding, *supra*. Os imunogénios que podem ser utilizados incluem PR0362 purificado, proteínas de fusão contendo PR0362 e células que expressam PR0362 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 de PR0362 emulsionado em adjuvante completo de Freund que se injecta subcutânea 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 também receber reforços com injeções de imunização adicionais. Podem-se obter periodicamente amostras de soro dos ratinhos por sangria retro-orbital para teste em ensaios ELISA para detectar anticorpos contra PR0362.

Depois de ter sido detectado um título de anticorpos adequado, os animais "positivos" para anticorpos podem ser injectados com uma injeção intravenosa final de PR0362. Três a quatro dias mais tarde, sacrificam-se os ratinhos e colhem-se as células de baço. As células de baço são então fundidas (utilizando polietilenoglicol a 35%) com uma linha celular de mieloma 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 células de baço.

As células de hibridoma serão rastreadas num ELISA quanto a reactividade contra PR0362. A determinação de células de hibridoma "positivas", que segregam os anticorpos monoclonais desejados contra PR0362, faz parte dos conhecimentos na especialidade.

As células de hibridoma positivas podem ser injectadas intraperitonealmente em ratinhos Balb/c singénicos para produzir ascites contendo os anticorpos monoclonais anti-PR0362. Alternativamente, as células de hibridoma podem ser crescidas em balões de cultura de tecidos ou frascos rotativos. A purificação dos anticorpos monoclonais produzidos nas ascites pode ser realizada utilizando precipitação com 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
DNA40628-1216, plasmídeo baseado no pRK5	209432	7 de Novembro, 1997
DNA45416-1251	209620	5 de Fevereiro, 1998
DNA35638-1141	209265	16 de Setembro, 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 sua regulamentação (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. a ela ter 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 for destruída, 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 quaisquer construções que sejam 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

```

<210> 2  
 <211> 321  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

```

<400> 2
Met Gly Ile Leu Leu Gly Leu 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 ccttcaagtc cgtgacacgg gaagacactg 50

ggacatacac ttgtatggtc tctgaggaag gcggcaacag ctatggggag 100

gtcaagggtca agctcatcgt gcttgtgcct ccatccaagc ctacagttaa 150

cateccctcc tctgccacca ttgggaaccg ggcagtgtctg acatgtctcag 200  
 aacaagatgg ttccccacct tctgaataca cctggttcaa agatgggata 250  
 gtgatgccta cgaatcccaa aagcaccctg gccttcagca actcttccta 300  
 tgtcctgaat cccacaacag gagagctggt ctttgatccc 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  
 tctcagtcctc ctcgctgtag tcgcggagct gtgttctgtt tcccaggagt 50  
 ccttcggcgg ctgttgtgct caggtgcgcc tgatcgcgat ggggacaaag 100  
 gcgcaagctc gagaggaaac tgttgtgcct ctccatattg gcgatcctgt 150  
 tgtgtctcct ggcatggggc agtggttacag ttgcactctt ctgaacctga 200  
 agtcagaatt cctgagaata atcctgtgaa gttgtcctgt gcctactcgg 250  
 gcttttcttc tcccgtgtg gagtgggaagt ttgaccaagg agacaccacc 300  
 agactcgttt gctataataa caagatcaca gcttcctatg aggaccgggt 350  
 gaccttcttg ccaactggta tcaccttcaa gtccgtgaca cgggaagaca 400  
 ctgggacata cacttgtatg gtctctgagg aaggcggcaa cagctatggg 450  
 gaggtcaagg tcaagctcat cgtgcttggt cctccatcca agcctacagt 500  
 taacatcccc tctctgcca ccattgggaa ccgggcagtg ctgacatgct 550  
 cagaacaaga tggttcccca cttctgaat acacctggtt caaagatggg 600  
 atagtgatgc ctacgaatcc caaaagcacc cgtgccttca gcaactcttc 650  
 ctatgtcctg aatcccacaa caggagagct ggtctttgat cccctgtcag 700  
 cctctgatac tggagaatac agctgt 726

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

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

<400> 5

gcaggcaaag taccagggcc 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 gccagggttc ggggttctcc tcccatcagt tatatttggg 300  
 ataagcaaca gactaataac cagggaaccc atcaaagtag caaccctaag 350  
 taccttactc ttcaagcctg cgggtgatagc cgactcaggc tcctatttct 400  
 gcactgccaa gggccagggt ggctctgagc agcacagcga cattgtgaag 450  
 tttgtggtca aagactcctc aaagctactc aagaccaaga ctgaggcacc 500  
 tacaaccatg acatacccct tgaaagcaac atctacagtg aagcagtcct 550  
 gggactggac cactgacatg gatggctacc ttggagagac cagtgtctgg 600  
 ccaggaaaga gcctgcctgt ctttgccatc atcctcatca tctccttgtg 650  
 ctgtatgggtg gtttttacca tggcctatat catgtctctg cggaagacat 700  
 cccaacaaga gcatgtctac gaagcagcca gggcacatgc cagagaggcc 750  
 aacgactctg gagaaacat gaggggtggcc atcttcgcaa gtggctgtctc 800  
 cagtgatgag ccaacttccc agaactctggg gcaacaacta ctctgatgag 850  
 ccctgcatag gacaggagta ccagatcatc gccagatca atggcaacta 900  
 cgcccgctg ctggacacag ttcctctgga ttatgagttt ctggccactg 950  
 agggcaaaaag tgtctgttaa aaatgcccc ttaggccagg atctgtctgac 1000  
 ataattgctt agtcagtcct tgccttctgc atggccttct tccctgctac 1050  
 ctctcttctt ggatagccca aagtgtccgc ctaccaacac tggagccgct 1100  
 gggagtcact ggctttgccc tggaaattgc cagatgcac tcaagtaagc 1150  
 cagctgtctg atttggctct gggcccttct agtatctctg ccgggggctt 1200  
 ctggtactcc tctctaaata ccagagggaa gatgcccata gcactaggac 1250  
 ttggtcatca tgcttacaga cactattcaa ctttggcatc ttgccaccag 1300  
 aagacccgag gggaggctca gctctgccag ctccagaggac cagctatatc 1350  
 caggatcatt tctctttctt cagggccaga cagcttttaa ttgaaattgt 1400  
 tatttcacag gccagggttc agttctgtct ctccactata agtctaattgt 1450  
 tctgactctc tcctgggtgt caataaatat ctaatcataa cagcaaaaaa 1500

aaa 1503

<210> 6  
 <211> 319  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 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			

<210> 7  
<211> 2181  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 7  
cccacgcgtc cgcccacgcg tccgcccacg ggtccgccca cgcgtccggg 50  
ccaccagaag tttgagcctc tttggttagca ggaggctgga agaaaggaca 100  
gaagtagctc tggctgtgat ggggatctta ctgggcctgc tactcctggg 150  
gcacctaaac gtggacactt atggccgtcc catcctggaa gtgccagaga 200  
gtgtaacagg accttggaac ggggatgtga atcttcctg cacctatgac 250  
cccctgaag gctacaccca 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 gcagcgggta tggcttcacg gtgccccagg gaatgaggat 600  
tagccttcaa tgccaggctc ggggttctcc tcccatcagt tatatttggt 650  
ataagcaaca gactaataac caggaaccca tcaaagtagc aaccctaagt 700  
accttactct tcaagcctgc ggtgatagcc gactcaggct cctatttctg 750  
cactgccaag ggccagggtg gctctgagca gcacagcgac attgtgaagt 800  
ttgtggtcaa agactcctca aagctactca agaccaagac tgaggcacct 850  
acaaccatga catacccctt gaaagcaaca tctacagtga agcagtcctg 900  
ggactggacc actgacatgg atggctacct tggagagacc agtgcctggc 950  
caggaaagag cctgcctgtc tttgccatca tctcatcat ctccttgtgc 1000  
tgtatggtgg tttttacat ggccatatatc atgctctgtc ggaagacatc 1050

ccaacaagag catgtctacg aagcagccag gtaagaaagt ctctcctctt 1100  
 ccatttttga ccccgctccct gccctcaatt ttgattactg gcaggaaatg 1150  
 tggaggaagg ggggtgtggc acagacccaa tcctaaggcc ggaggccttc 1200  
 agggtcagga catagctgcc ttccctctct caggcacctt ctgaggttgt 1250  
 tttggccctc tgaacacaaa ggataattta gatccatctg ccttctgctt 1300  
 ccagaatccc tgggtggtag gatcctgata attaatggc aagaattgag 1350  
 gcagaagggt gggaaaccag gaccacagcc ccaagtcctt tcttatgggt 1400  
 ggtgggctct tgggccatag ggcacatgcc agagaggcca acgactctgg 1450  
 agaaaccatg aggggtggcca tcttcgcaag tggctgctcc agtgatgagc 1500  
 caacttccca gaatctgggc aacaactact ctgatgagcc ctgcatagga 1550  
 caggagtacc agatcatcgc ccagatcaat ggcaactacg cccgcctgct 1600  
 ggacacagtt cctctggatt atgagtttct ggccactgag ggcaaaagt 1650  
 tctgttaaaa atgccccatt aggccaggat ctgctgacat aattgcctag 1700  
 tcagtccttg ccttctgcat ggccttcttc cctgctacct ctcttcttg 1750  
 atagcccaaa gtgtccgctt accaactact gagccgctgg gagtactgg 1800  
 ctttgccctg gaatttgcca gatgcatctc aagtaagcca gctgctggat 1850  
 ttggctcttg gcccttctag tatctctgcc gggggcttct ggtactctc 1900  
 tctaaatacc agagggaaga tgcccatagc actaggactt ggtcatcatg 1950  
 cctacagaca ctattcaact ttggcatctt gccaccagaa gaccgaggg 2000  
 aggtcagct ctgccagctc agaggaccag ctatatccag gatcatttct 2050  
 ctttcttcag ggccagacag cttttaattg aaattgttat ttcacaggcc 2100  
 agggttcagt tctgctctc cactataagt ctaatgttct gactctctcc 2150  
 tgggtgctcaa taaatatcta atcataacag c 2181

<210> 8

<211> 1295

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

cccagaagtt caagggtccc cggcctcctg cgctcctgcc gccgggaccc 50  
 tcgacctcct cagagcagcc ggctgccgcc ccgggaagat ggcgaggagg 100  
 agccgccacc gcctcctcct gctgctgctg cgctacctgg tggctgccct 150  
 gggctatcat aaggcctatg gggtttctgc cccaaaagac caacaagtag 200



tcacagcagt agagtaccaa gaggcatttt tagcctgcaa aaccccaaag 250  
 aagactgttt cctccagatt agagtggaag aaactgggtc ggagtgtctc 300  
 ctttgtctac tatcaacaga ctcttcaagg tgattttaaa aatcgagctg 350  
 agatgataga tttcaatata cggatcaaaa atgtgacaag aagtgatgcg 400  
 gggaaatata gttgtgaagt tagtgcccca tctgagcaag gccaaaacct 450  
 ggaagaggat acagtcactc tggaaagtatt agtggctcca gcagttccat 500  
 catgtgaagt accctcttct gctctgagtg gaactgtggt agagctacga 550  
 tgtcaagaca aagaaggga tccagctcct gaatacacat ggtttaagga 600  
 tggcatcctg ttgctagaaa atcccagact tggctccaa agcaccaaca 650  
 gctcatacac aatgaatata aaaactggaa ctctgcaatt taatactgtt 700  
 tccaaactgg acactggaga atattcctgt gaagcccgca attctgttgg 750  
 atatcgcagg tgcctggga aacgaatgca agtagatgat ctcaacataa 800  
 gtggcatcat agcagccgta gtagttgtgg ccttagtgat ttccgtttgt 850  
 ggccttggtg tatgctatgc tcagaggaaa ggctactttt caaaagaaac 900  
 ctcttccag aagagtaatt ctctatctaa agccacgaca atgagtgaag 950  
 atgtgcagtg gctcacgcct gtaatcccag cactttggaa ggccgcggcg 1000  
 ggcggatcac gaggtcagga gttctagacc agtctggcca atatggtgaa 1050  
 accccatctc tactaaaata caaaaattag ctgggcatgg tggcatgtgc 1100  
 ctgcagttcc agctgcttgg gagacaggag aatcacttga acccgggagg 1150  
 cggaggttgc agtgagctga gatcacgcca ctgcagtcca gcctgggtaa 1200  
 cagagcaaga ttccatctca aaaaataaaa taaataaata aataaatact 1250  
 gggttttacc tgtagaattc ttacaataaa tatagcttga tattc 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	Leu	Arg
1				5				10						15
Tyr	Leu	Val	Val	Ala	Leu	Gly	Tyr	His	Lys	Ala	Tyr	Gly	Phe	Ser
				20					25					30
Ala	Pro	Lys	Asp	Gln	Gln	Val	Val	Thr	Ala	Val	Glu	Tyr	Gln	Glu
				35					40					45
Ala	Ile	Leu	Ala	Cys	Lys	Thr	Pro	Lys	Lys	Thr	Val	Ser	Ser	Arg
				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

cccacgcgtc cgccacgcg tccgcccacg ggtccgccc cgcgtccggg 50  
ccaccagaag tttgagctc tttggtagca ggaggctgga agaaaggaca 100  
gaagtagctc tggtgtgat ggggatctta ctgggcctgc tactcctggg 150  
gcacctaaaca gtggacactt atggccgtcc catcctggaa gtgccagaga 200  
gtgtaacagg accttggaag ggggatgtga atcttccctg cacctatgac 250  
cccctgcaag gctacaccca 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 tgagctcctg gtccagaaac tctctgtctc caagcccaca 550  
gtgacaactg gcagcgggta tggcttcacg gtgccccagg gaatgaggat 600  
tagccttcaa tgccaggctc ggggttctcc tcccatcagt tatatttggg 650  
ataagcaaca gactaataac cagggaaccca tcaaagtagc aaccctaagt 700  
accttactct tcaagcctgc ggtgatagcc gactcaggct cctatttctg 750  
cactgccaaag ggccagggtg gctctgagca gcacagcgac attgtgaagt 800  
ttgtgggcaa agactcctca aagctactca agaccaagac tgaggcacct 850  
acaaccatga cataccccctt gaaagcaaca tctacagtga agcagtcctg 900  
ggactggacc actgacatgg atggctacct tggagagacc agtgctgggc 950  
caggaaagag cctgcctgtc tttgccatca tcctcatcat ctcttctgtc 1000  
tgtatggtgg tttttaccat ggcctatata atgctctgtc ggaagacata 1050  
ccaacaagag catgtctacg aagcagccag gtaagaaagt ctctcctctt 1100  
ccatttttga ccccgctcct gccctcaatt ttgattactg gcaggaaatg 1150  
tgagggaagg ggggtgtggc acagacccaa tcctaaggcc ggaggccttc 1200  
agggtcagga catagctgcc ttccctctct caggcacctt ctgaggttgt 1250  
tttggccctc tgaacacaaa ggataattta gatccatctg ccttctgctt 1300  
ccagaatccc tgggtggtag gatcctgata attaatggc aagaattgag 1350  
gcagaagggt gggaaaccag gaccacagcc ccaagtcctt tcttatgggt 1400  
ggtgggctct tgggccatag ggcacatgcc agagaggcca acgactctgg 1450  
agaaaccatg aggggtggca 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  
 tcagtccttg ccttctgcat ggccctcttc cctgctacct ctcttcctgg 1750  
 atagcccaaa gtgtccgcct accaactctg gagccgctgg gagtcaactg 1800  
 ctttgccctg gaatttgcca gatgcatctc aagtaagcca gctgctggat 1850  
 ttggctctgg gcccttctag tatctctgcc gggggcttct ggtactcttc 1900  
 tctaaatacc agaggggaaga tgcccatagc actaggactt ggtcatcatg 1950  
 cctacagaca ctattcaact ttggcatctt gccaccagaa gaccgcaggg 2000  
 aggctcagct ctgccagctc agaggaccag ctatatccag gatcatttct 2050  
 ctttcttcag ggccagacag cttttaattg aaattgttat ttcacaggcc 2100  
 agggttcagt tctgctcttc 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  
 tgatcgcgat ggggacaaag gcgcaagctc gagaggaaac tggtgtgcct 50

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

<220>  
<221> sequência artificial  
<222> 1-20  
<223> sequência artificial  
<400> 14  
    **acacctggtt 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  
**tggatgaccg 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

<220>  
 <221> sequência artificial  
 <222> 1-413  
 <223> sequência artificial  
 <400> 27  
     **ctcgagccgc tcgagccgtg cggggaaata tcgttgtaga gttagtgcc 50**

**catctgagca aggccaaaac ctggaagagg atacagtcac tctggaagta 100**  
     **ttagtggtctc cagcagttcc atcatgtgaa gtaccctctt ctgctctgag 150**  
     **tggaaactgtg gtagagctac gatgtcaaga caaagaaggg aatccagctc 200**  
     **ctgaatacac atggtttaag gatggcatcc gtttgctaga aaatcccaga 250**  
     **cttggtctccc aaagcaccaa cagctcatatc acaatgaata caaaaactgg 300**  
     **aactctgcaa ttaataactg ttcccaaact ggacactgga gaatattcct 350**  
     **gtgaagcccg caattctgtt ggatatcgca ggtgtcctgg ggaaacgaat 400**  
     **gcaagtagat gat 413**

<210> 28  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> sequência artificial

<220>  
 <221> sequência artificial  
 <222> 1-22  
 <223> sequência artificial

<400> 28  
     **atcgttgtga agttagtgc cc 22**

<210> 29  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> sequência artificial

<220>  
 <221> sequência artificial  
 <222> 1-23  
 <223> sequência artificial

<400> 29  
     **acctgcgata tccaacagaa ttg 23**

<210> 30  
 <211> 48  
 <212> ADN  
 <213> sequência artificial

<220>  
 <221> sequência artificial  
 <222> 1-48  
 <223> sequência artificial

<400> 30

**ggaagaggat acagtcactc tggaagtatt agtggctcca gcagttcc 48**

Lisboa, 2008-07-29

REIVINDICAÇÕES**1.** Ácido nucleico isolado que:

- (i) codifica um polipéptido compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na Fig. 3 (SEQ ID NO:2);
- (ii) codifica uma forma de ocorrência natural truncada ou segregada do polipéptido cuja sequência de aminoácidos é apresentada na Fig. 3 (SEQ ID NO:2), em que a referida forma truncada ou segregada é capaz de estimular a proliferação de linfócitos T estimulados e/ou é capaz de estimular infiltrados de células inflamatórias na pele de porquinhos-da-índia e/ou possui actividade antitumoral *in vitro*;
- (iii) codifica uma forma de *splicing* alternativo de ocorrência natural do polipéptido cuja sequência de aminoácidos é apresentada na Fig. 3 (SEQ ID NO:2), em que a referida forma de *splicing* alternativo é capaz de estimular a proliferação de linfócitos T estimulados e/ou é capaz de estimular infiltrados de células inflamatórias na pele de porquinhos-da-índia e/ou possui actividade antitumoral *in vitro*;
- (iv) codifica o domínio extracelular do polipéptido que possui a sequência de aminoácidos apresentada na Fig. 3 (SEQ ID NO:2), em que o referido domínio extracelular é capaz de estimular a proliferação de linfócitos T estimulados e/ou é capaz de estimular infiltrados de células inflamatórias na pele de porquinhos-da-índia e/ou possui actividade antitumoral *in vitro*;
- (v) codifica um polipéptido compreendendo os resíduos 1 a 229 apresentados na Fig. 3 (SEQ ID NO:2);
- (vi) codifica um polipéptido possuindo pelo menos 80% de identidade de sequência de aminoácidos com o polipéptido de (i), em que o polipéptido é capaz de estimular a proliferação de linfócitos T estimulados e/ou é capaz de estimular infiltrados de células inflamatórias na pele de porquinhos-da-índia e/ou possui actividade antitumoral *in vitro*;
- (vii) possui a sequência de ácido nucleico apresentada na Fig. 6 (SEQ ID NO:7);
- (viii) possui a sequência de ácido nucleico dos nucleótidos 119-1081 da sequência de ácido nucleico apresentada na Fig. 6 (SEQ ID NO:7);

(ix) possui a sequência da inserção de ADNc contida no vector DNA45416-1251, depositado como ATCC 209320;

(x) codifica o mesmo polipéptido maduro que é codificado pela inserção de ADNc contida no vector DNA45416-1251, depositado como ATCC 209320;

(xi) possui pelo menos 80% de identidade de sequência de ácido nucleico com o ácido nucleico de (vii) ou (viii) e codifica um polipéptido que é capaz de estimular a proliferação de linfócitos T estimulados e/ou é capaz de estimular infiltrados de células inflamatórias na pele de porquinhos-da-índia e/ou possui actividade antitumoral *in vitro*;

(xii) possui pelo menos 80% de identidade de sequência de ácido nucleico com a porção da sequência de ácido nucleico da Fig. 6 (SEQ ID NO: 7) que codifica a sequência de aminoácidos dos resíduos 1 a X da Figura 3 (SEQ ID NO:2), em que X é qualquer um dos resíduos de aminoácido 271 a 280, e codifica um polipéptido que é capaz de estimular a proliferação de linfócitos T estimulados e/ou é capaz de estimular infiltrados de células inflamatórias na pele de porquinhos-da-índia e/ou possui actividade antitumoral *in vitro*; ou

(xiii) hibrida sob condições de hibridação e de lavagem rigorosas com o complemento da sequência de ácido nucleico apresentada na Figura 6 (SEQ ID NO:7) e codifica um polipéptido que é capaz de estimular a proliferação de linfócitos T estimulados e/ou é capaz de estimular infiltrados de células inflamatórias na pele de porquinhos-da-índia e/ou possui actividade antitumoral *in vitro*,

em que a identidade de sequências é determinada ao longo da totalidade do comprimento da sequência de referência.

**2.** Ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1, em que o referido domínio extracelular é do aminoácido 1 a X, em que X é qualquer um dos resíduos de aminoácido 271 a 280.

**3.** Ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2, em que o nível de identidade de aminoácidos é de pelo menos 85%.

**4.** Ácido nucleico de acordo com a reivindicação 3, em que o nível de identidade de aminoácidos é de pelo menos 90%.

**5.** Ácido nucleico de acordo com a reivindicação 4, em que o nível de identidade de aminoácidos é de pelo menos 95%.

6. Vector compreendendo o ácido nucleico de acordo com qualquer reivindicação anterior.

7. Célula hospedeira compreendendo o vector de acordo com a reivindicação 6.

8. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 7, que é uma célula CHO.

9. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 7, que é uma *E. coli*.

10. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 7, que é uma célula de levedura.

11. Processo para produção de um polipéptido codificado pelo ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, o processo compreendendo a cultura da célula hospedeira de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 10, sob condições adequadas para a expressão do referido polipéptido e recuperação do referido polipéptido a partir da cultura celular.

12. Polipéptido isolado que:

(i) compreende a sequência de aminoácidos apresentada na Fig. 3 (SEQ ID NO:2);

(ii) é uma forma de ocorrência natural truncada ou segregada do polipéptido cuja sequência de aminoácidos é apresentada na Fig. 3 (SEQ ID NO:2) e é capaz de estimular a proliferação de linfócitos T estimulados e/ou é capaz de estimular infiltrados de células inflamatórias na pele de porquinhos-da-índia e/ou possui actividade antitumoral *in vitro*;

(iii) é uma forma de *splicing* alternativo de ocorrência natural do polipéptido cuja sequência de aminoácidos é apresentada na Fig. 3 (SEQ ID NO:2) e é capaz de estimular a proliferação de linfócitos T estimulados e/ou é capaz de estimular infiltrados de células inflamatórias na pele de porquinhos-da-índia e/ou possui actividade antitumoral *in vitro*;

(iv) compreende o domínio extracelular do polipéptido possuindo a sequência de aminoácidos apresentada na Fig. 3 (SEQ ID NO:2) e é capaz de estimular a proliferação de linfócitos T estimulados e/ou é capaz de estimular infiltrados



de células inflamatórias na pele de porquinhos-da-índia e/ou possui actividade antitumoral *in vitro*;

(v) compreende os resíduos 1 a 229 apresentados na Fig. 3 (SEQ ID NO:2);

(vi) possui pelo menos 80% de identidade de sequência de aminoácidos com o polipéptido de (i), e é capaz de estimular a proliferação de linfócitos T estimulados e/ou é capaz de estimular infiltrados de células inflamatórias na pele de porquinhos-da-índia e/ou possui actividade antitumoral *in vitro*, em que a identidade de sequências é determinada ao longo da totalidade do comprimento da sequência de referência; ou

(vii) é codificado pela inserção de ADNc contida no vector DNA45416-1251, depositado como ATCC 209320.

**13.** Polipéptido de acordo com a reivindicação 12, em que o referido domínio extracelular é dos aminoácidos 1 a X, em que X é qualquer um dos resíduos de aminoácido 271 a 280.

**14.** Polipéptido de acordo com a reivindicação 12 ou a reivindicação 13, que consiste no domínio extracelular do polipéptido possuindo a sequência de aminoácidos apresentada na Fig. 3 (SEQ ID NO:2).

**15.** Polipéptido de acordo com a reivindicação 12, em que o nível de identidade é de 85%.

**16.** Polipéptido de acordo com a reivindicação 15, em que o nível de identidade é de 90%.

**17.** Polipéptido de acordo com a reivindicação 16, em que o nível de identidade é de 95%.

**18.** Molécula quimérica compreendendo um polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 17 fundida com uma sequência de aminoácidos heteróloga.

**19.** Molécula quimérica de acordo com a reivindicação 18, em que a referida sequência de aminoácidos heteróloga é uma sequência marcadora epitópica.

**20.** Molécula quimérica de acordo com a reivindicação 18, em que a referida sequência de aminoácidos heteróloga é uma região Fc de uma imunoglobulina.

**21.** Anticorpo que se liga especificamente a um polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 17.

**22.** Anticorpo de acordo com a reivindicação 21, que se liga especificamente a um polipéptido de acordo com a reivindicação 12, parte (i), (ii), (iii), (iv) ou (v) ou com a reivindicação 13 ou a reivindicação 14.

**23.** Anticorpo de acordo com a reivindicação 21 ou a reivindicação 22, que é um anticorpo monoclonal.

**24.** Anticorpo de acordo com a reivindicação 23, que contém resíduos da região determinante de complementaridade (CDR) não humanos e resíduos estruturais (FR, *framework*) humanos.

**25.** Anticorpo de acordo com a reivindicação 24 que está marcado.

**26.** Anticorpo de acordo com a reivindicação 25, que está imobilizado num suporte sólido.

**27.** Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 24 que é um anticorpo de cadeia simples ou um fragmento de anticorpo.

**28.** Anticorpo que é um anticorpo anti-idiotípico dirigido contra o anticorpo de acordo com a reivindicação 21 ou a reivindicação 22.

**29.** Polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 17, ou molécula quimérica de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 20, para utilização num método de tratamento.

**30.** Polipéptido ou molécula quimérica de acordo com a reivindicação 29, para utilização no tratamento do cancro.

**31.** Utilização de um polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 17, ou molécula quimérica de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 20, na preparação de um medicamento para o tratamento do cancro.

**32.** Método *in vitro* para detecção da presença de um polipéptido como definido em qualquer uma das reivindicações 12 a 17 compreendendo a exposição de uma célula que se suspeita que contenha o polipéptido a um anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 20 a 26 e a determinação da ligação do anticorpo à célula.

**33.** Composição compreendendo um polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 17, em mistura com um transportador ou um excipiente farmacêuticamente aceitáveis.

**34.** Composição de acordo com a reivindicação 33, que é estéril.

Lisboa, 2008-07-29

**FIG. 1A**

```

SEQ ID NO: 6   A33   186   . . . P L A Q P A S G Q 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
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 H 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 N T Y 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  184   M N S S F T I O P K S G D L I F D P V T A F D S G E Y Y C Q A Q N G Y G . . . . . T A M R S E A A

A33   227   A Y R S P S M N V A L Y V G I A V G V Y A A L I I I G I I I Y C C C C R G K D O N T E D K E D A . .
40628 228   R M E A Y E R N V G V I Y 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 O 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 A A 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 O K S . .
JAM   228   M M O A Y 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 K K G T A P . .

A33   275   R P N R E A Y E E P P E O 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 O Q
40628 275   . . . . . S K K V I Y S Q P S A R S E G E F K O T S S F L V . . . . .
45416 283   P Y 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 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 O T S S F L V . . . . .

```

FIG.-1B

SEQ ID NO:1

Met Gly Thr Lys Ala Gln Val Glu Arg Lys Leu Leu Cys Leu Phe Ile Leu Ala Ile Leu Leu Cys Ser Leu Ala Leu Gly Ser Val Thr	1	5	10	15	20	25	30
Val His Ser Ser Glu Pro Glu Val Arg Ile Pro Glu Asn Asn Pro Val Lys Leu Ser Cys Ala Tyr Ser Gly Phe Ser Ser Pro Arg Val	35	40	45	50	55	60	
Glu Trp Lys Phe Asp Gln Gly Asp Thr Thr Arg Leu Val Cys Tyr Asn Asn Lys Ile Thr Ala Ser Tyr Glu Asp Arg Val Thr Phe Leu	65	70	75	80	85	90	
Pro Thr Gly Ile Thr Phe Lys Ser Val Thr Arg Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Thr Cys Met Val Ser Glu Glu Gly Asn Ser Tyr Gly	95	100	105	110	115	120	
Glu Val Lys Val Lys Leu Ile Val Leu Val Pro Pro Ser Lys Pro Thr Val Asn Ile Pro Ser Ser Ala Thr Ile Gly Asn Arg Ala Val	125	130	135	140	145	150	
Leu Thr Cys Ser Glu Gln Asp Gly Ser Pro Pro Ser Glu Tyr Thr Trp Phe Lys Asp Gly Ile Val Met Pro Thr Asn Pro Lys Ser Thr	155	160	165	170	175	180	
Arg Ala Phe Ser Asn Ser Ser Tyr Val Leu Asn Pro Thr Thr Gly Glu Leu Val Phe Asp Pro Leu Ser Ala Ser Asp Thr Gly Glu Tyr	185	190	195	200	205	210	
Ser Cys Glu Ala Arg Asn Gly Tyr Gly Thr Pro Met Thr Ser Asn Ala Val Arg Met Glu Ala Val Glu Arg Asn Val Gly Val Ile Val	215	220	225	230	235	240	
Ala Ala Val Leu Val Thr Leu Ile Leu Leu Gly Ile Leu Val Phe Gly Ile Trp Phe Ala Tyr Ser Arg Gly His Phe Asp Arg Thr Lys	245	250	255	260	265	270	
Lys Gly Thr Ser Ser Lys Lys Val Ile Tyr Ser Ser Gln Pro Ser Ala Arg Ser Glu Gly Glu Phe Lys Gln Thr Ser Ser Phe Leu Val	275	280	285	290	295	299	

**FIG.\_2**

SEQ ID NO:2

1 MCILLGULLL GHLYVDYGR PILEVPESVT GPMKGDVNL P CTYDPLQCYT QVLVKHLVQR GSDPTIFLR DSSGDHIQQA KYQGRLVSH KVPGDVSLQL

101 STLEMDRSH YTCEVTWQTP DGNQVVRDKI TELRVQKLSV SKPTVTGSG YGFTVPOGMR ISLQCCARGS PPTSYIWKQ QTNQEPKIV ATLSLTLFKP

201 AVIADSGSYF CTAKGQVGSE QHSDIVKFW KDSSKLLKTK TEAPTTMTYP LKATSTVKQS WDWTTDMDGY LGETSAGPGK SLPVFAIILI ISLCCMVVFT

^Local de fixação de glicosaminoglicano

^Dominio transmembranar

FIG.--3

101 MAYIMLCRKT SQEHVYEA R

OLI2162 (35936.f1)  
SEQ ID NO:12  
TCGCGGAGCTGTGTTCTGTTTCCC

OLI2163 (35936.p1)  
SEQ ID NO:13  
TGATCGCGATGGGGACAAAGGCGCAAGCTCGAGAGGAACTGTTGTGCCT

OLI2164 (35936.f2)  
SEQ ID NO:14  
ACACCTGGTTCAAAGATGGG

OLI2165 (35936.r1)  
SEQ ID NO:15  
TAGGAAGAGTTGCTGAAGGCACGG

OLI2166 (35936.f3)  
SEQ ID NO:16  
TTGCCCTTACTCAGGTGCTAC

OLI2167 (35936.f2)  
SEQ ID NO:17  
ACTCAGCAGTGGTAGGAAAG

FIG.--8

DNA35936 SEQ ID NO:3

CTTCTTGCCA ACTGGTATCA CCTTCAAGTC CGTGACACGG GAAGACACTG 50  
GGACATACAC TTGTATGGTC TCTGAGGAAG GCGGCAACAG CTATGGGGAG 100  
GTCAAGGTCA AGCTCATCGT GCTTGTGCCT CCATCCAAGC CTACAGTTAA 150  
CATCCCCTCC TCTGCCACCA TTGGGAACCG GGCAGTGCTG ACATGCTCAG 200  
AACAAGATGG TTCCCCACCT TCTGAATACA CCTGGTTCAA AGATGGGATA 250  
GTGATGCCTA CGAATCCCAA AAGCACCCGT GCCTTCAGCA ACTCTTCCTA 300  
TGTCTGAAT CCCACAACAG GAGAGCTGGT CTTTGATCCC CTGTCAGCCT 350  
CTGATACTGG AGAATACAGC TGTGAGGCAC GGAATGGGTA 390

**FIG.\_4A**

consen01 SEQ ID NO:4

TCTCAGTCCC CTCGCTGTAG TCGCGGAGCT GTGTTCTGTT TCCCAGGAGT 50  
CCTTCGGCGG CTGTTGTGCT CAGGTGCGCC TGATCGCGAT GGGGACAAAG 100  
GCGCAAGCTC GAGAGGAAAC TGTGTGCCT CTTCATATTG GCGATCCTGT 150  
TGTGCTCCCT GGCATTGGGC AGTGTTACAG TTGCACTCTT CTGAACCTGA 200  
AGTCAGAATT CCTGAGAATA ATCCTGTGAA GTTGTCTGTG GCCTACTCGG 250  
GCTTTTCTTC TCCCCGTGTG GAGTGGAAGT TTGACCAAGG AGACACCACC 300  
AGACTCGTTT GCTATAATAA CAAGATCACA GCTTCCTATG AGGACCGGGT 350  
GACCTTCTTG CCAACTGGTA TCACCTTCAA 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 CCCCTGTCAG 700  
CCTCTGATAC TGGAGAATAC AGCTGT 726

**FIG.\_4B**



consen02 SEQ ID NO:5

GCAGGCAAAG TACCAGGGCC GCCTGCATGT GAGCCACAAG GTTCCAGGAG 50  
ATGTATCCCT CCAATTGAGC ACCCTGGAGA TGGATGACCG GAGCCACTAC 100  
ACGTGTGAAG TCACCTGGCA GACTCCTGAT GGCAACCAAG TCGTGAGAGA 150  
TAAGATTACT GAGCTCCGTG TCCAGAAACT CTCTGTCTCC AAGCCCACAG 200  
TGACAACTGG CAGCGGTTAT GGCTTCACGG TGCCCCAGGG AATGAGGATT 250  
AGCCTTCAAT GCCAGGGTTC GGGGTTCTCC TCCCATCAGT TATATTTGGT 300  
ATAAGCAACA GACTAATAAC CAGGGAACCC ATCAAAGTAG CAACCCTAAG 350  
TACCTTACTC TTCAAGCCTG CGGTGATAGC CGACTCAGGC TCCTATTTCT 400  
GCACTGCCAA GGGCCAGGTT GGCTCTGAGC AGCACAGCGA CATTGTGAAG 450  
TTTGTGGTCA AAGACTCCTC AAAGCTACTC AAGACCAAGA CTGAGGCACC 500  
TACAACCATG ACATACCCCT TGAAAGCAAC ATCTACAGTG AAGCAGTCCT 550  
GGGACTGGAC CACTGACATG GATGGCTACC TTGGAGAGAC CAGTGCTGGG 600  
CCAGGAAAGA GCCTGCCTGT CTTTGCCATC ATCCTCATCA TCTCCTTG 650  
CTGTATGGTG GTTTTACCA TGGCCTATAT CATGCTCTGT CGGAAGACAT 700  
CCCAACAAGA GCATGTCTAC GAAGCAGCCA GGGCACATGC CAGAGAGGCC 750  
AACGACTCTG GAGAAACCAT GAGGGTGGCC ATCTTCGCAA GTGGCTGCTC 800  
CAGTGATGAG CCAACTTCCC AGAATCTGGG GCAACAATA CTCTGATGAG 850  
CCCTGCATAG GACAGGAGTA CCAGATCATC GCCCAGATCA ATGGCAACTA 900  
CGCCCGCCTG CTGGACACAG TTCCTCTGGA TTATGAGTTT CTGGCCACTG 950  
AGGGCAAAAG TGTCTGTTAA AAATGCCCA TTAGGCCAGG ATCTGCTGAC 1000  
ATAATGCTT AGTCAGTCCT TGCCTTCTGC ATGGCCTTCT TCCCTGCTAC 1050  
CTCTCTTCTT GGATAGCCCA AAGTGTCCGC CTACCAACAC TGGAGCCGCT 1100  
GGGAGTCACT GGCTTTGCCC TGAATTTCG CAGATGCATC TCAAGTAAGC 1150  
CAGCTGCTGG ATTTGGCTCT GGGCCCTTCT AGTATCTCTG CCGGGGGCTT 1200  
CTGGTACTCC TCTCTAAATA CCAGAGGGAA GATGCCATA GCACTAGGAC 1250  
TTGGTCATCA TGCCTACAGA CACTATTCAA CTTTGGCATC TTGCCACCAG 1300  
AAGACCCGAG GGGAGGCTCA GCTCTGCCAG CTCAGAGGAC CAGCTATATC 1350  
CAGGATCATT TCTCTTTCTT CAGGGCCAGA CAGCTTTTAA TTGAAATTGT 1400  
TATTTACAG GCCAGGGTTC AGTTCTGCTC CTCCACTATA AGTCTAATGT 1450  
TCTGACTCTC TCCTGGTGCT CAATAAATAT CTAATCATAA CAGCAAAAAA 1500  
AAA 1503

**FIG.\_4C**

GGAGTCTCTT CCGCGGCTGT TGTGTAGTG GCCTGATCC GATGGGACA AAGCGCAAG TCGAGAGGAA ACTGTTGTGC CTCCTCATAT 100  
 TGGCGATCCT GTTGTGCTCC CTGGCATTGG GCAGTGTAC AGTGCACCTT TCTGAACCTG AGTCAGAAAT TCCTGAGAAAT AATCCTGTGA AGTTGTCTTG 200  
 TGCTACTCG GGCCTTTCTT CTCCCGCTGT GGAGTGGAG TTGACCAAG GAGACACCAC CAGACTCGTT TGTATATA ACAAGATCAC AGCTTCTAT 300  
 GAGGACCGG TGACCTCTT GCCAAGTGT ATCAGCTTCA AGTCCGTGAC ACGGGAGAC ACTGGACAT ACACCTGTAT GGTCTCTGAG GAAGGGGCA 400  
 ACAGCTATGG GGAGTCAAG GTCAGCTCA TCGTGTGT GTCTCCATCC AAGCCTACAG TTAACATCCC CTCTCTGCC ACCATTGGGA ACCGGGCAGT 500  
 GCTGACATGC TCAGAACAAAG ATGGTTCCCC ACCTTCTGAA TACACCTGGT TCAAAGATGG GATAGTAGT CTAAGAACAC CCGTGCCTTC 600  
 AGCAACTCTT CCTATGTCTT GAATCCACA ACAGGAGGC TGTCTTTGA TCCCTGTCA GCCTGTGATA CTGGAGATA CAGCTGTGAG GCACGGAATG 700  
 GGTATGGAC ACCCATGACT TCAAAATGCTG TGGCATGGA AGCTGTGAG CGGAATGTGG GGTTCATCCT GGCAGCCGTC CTGTAAACC TGATTCTCT 800  
 GGGAACTTGG GTTTTGGCA TCTGGTTTGC CTATAGCCGA GGCACCTTG ACAGAACAAA GAAAGGGAAT TCGAGTAAGA AGTGATTTA CAGCCAGCCT 900  
 AGTGCCCGAA GTGAAGGAGA ATTCAACAG ACCTGTCTAT TCTGTGTG AGCCTGTG GCTCAGGCG TATCATCTGC ATTTGCCCTTA CTCAGGTGCT 1000  
 ACCGGACTCT GGGCCCTGAT GTCTGTAGTT TCACAGGATG CCTTATTTGT CTCTACACC CCACAGGCG CCTACTTCT TCGGATGTGT TTTTAATAAT 1100  
 GTCAGCTATG TGCCCCATCC TCTTCATGC CCTCCCTGCC TTTCCTACCA CTGCTGATG GCCTGGAAT TGTAAAGT GTTTATTCCT CATTTCTTTG 1200  
 AGGATCAGG AAGGAATCCT GGTATGCCA TTGACTTCCC TTCTAAGTAG ACAGCAAAA TGGGGGGGT GGCAGGAATC TGCACACAC TGCCACCTG 1300  
 GCTGGCAGG ATCTTTGAAT AGGTATCTTG AGCTTGTTC TGGGCTCTT CTGTGTATC TGACGACAG GCCAGCTGT TCTAGAGCGG GAATTAGAG 1400  
 CTAGAGCGC TGAATGGTT GTTGGTGTAT GACACTGGG TCTTCCATC TCTGGGCC ACTCTCTCT CTCTTCCC GGAAGTGCC ACTGGGATCC 1500  
 CTCTGCCCTG TCTCTCTGAA TACAGCTGA CTGTGTCTGT GGAATATGG AGCTCTTGT GTGAGAGCA TAGTAATTT TCAGAGAACT 1600  
 TGAAGCCAA AGGNTTAA ACCGTGCTC TAAAGAAAG AAACCTGGAG GTGGCCGA CTGTCTCAG GTGGTATCC CAGAGGCTGA GGCAGGCGGA 1700  
 TCACCTGAG TCGGAGTTC GGGATCAGC TGACCAACAT GGAGAAACC TACTGGAAAT ACAAGTTAG CCAGCATGG TGGTCATGC CTGTAGTCCC 1800  
 AGCTGCTCAG GAGCCTGGCA ACAAGAGCA AACTCCAGCT CA 1842

**FIG. 5**

SEQ ID NO:7

1 CCCACGGTC CCGCCACGGC TCCGCCACG GGTCCGCCA CCGTCCGG CCACCAGAG TTGAGCTC TTGCTAGCA GGAGCTGGA AGAAGGACA  
GGGTCCGAG CCGGTCCG AGCGGTCC CCAGGGTCC CCGAGGGGT CCGAGGCC GGTGCTTC AACTCGAG AAACCATGGT CCTCCAGCT TCTTCTCT

101 GAATAGTTC TGGCTGTGAT GGGATCTTA CTGGGCTGC TACTCTGG GCACCTAACA GTGACACTT ATGCCGCTCC CATCTGGAA GTGCCAGAGA  
CTTCATCGAG ACCGACACTA CCCCTAGAAAT GACCCGACG ATCAGGACCC CTTGATTTCT CACTGTGAA TACCGCAGG GTAGGACCTT CACGCTCTCT  
1 SEQ ID NO:2 H G I L L G L L L G L L L G H L T V D T Y G R P I L E V P E S  
"MET

201 GTCTAACAGG ACCTTGGAAA GGGATCTGA ATCTTCCCTG CACCTATGAC CCCCCTCAAG GCTACACCA AGTCTTGGTG AAGTGGCTGG TACAACTGG  
CACATTTCTCC TCGAACCTTT CCCCTACACT TAGAAGGAC GTGCTACTG GGGAGCTTC CGATGTGGT TCAGAACCA TTCACCGACC ATCTTGCACC  
29 V T G P W K G D V N L P C T Y D P L Q G Y T Q V L V K W L V Q R G

301 CTCAGACCCT GTCACCATCT TTCTAGTGA CTCTTCTGGA GACCATATCC AGCAGGCAAA GTACCAGGGC CCGCTGCATG TGAGCCACAA GGTTCACAGA  
GAGTCTGGGA CAGTGTGAGA AAGATGCACT GAGAAGACCT CTGCTATAGG TCGTCCGTTT CATGCTCCG CCGAGCTAC ACTGGTCTT CCAAGGTCTT  
62 S D P V T I F L R D S S G D H I Q Q A K Y Q G R L H V S H K V P G

401 CATCTATCCC TCCAAATTGAG CACCCTGGAG ATGCAATACC GGAGCCACTA CACGTGTAA GTCACTGGC AGACTCCTGA TGGCNAACCA GTCTGTGACAG  
CTACATAGG AGCTTAACTC GTGGACCTC TACCTACTGG CCTCGGTGAT GTCCACACTT CAGTGGACCG TCTGAGGACT ACCGTTGGTT CAGCACTCTC  
95 D V S L Q L S T L E H D D R S H Y T C E V T W Q T P D G N Q V V R D

501 ATAAGATTAC TGAGTCTCCT GTCCAGAAAC TCTCTGTCTC CAAGCCACA GTGCAACTG GCAGCGTTA TGGCTTCAG GTGCCCCAGG GAATGAGGAT  
TATTCTAATG ACTCGAGCA CAGGTCTTTG AGAGACAGAG GTTCCGGTGT CACTGTTGAC CGTCCCCCAAT ACCGAAGTCC CACGGGTCC CTTACTCTTA  
129 K I T E L R V Q K L S V S K P T V T T G S G Y G F T V P Q G H R I

601 TAGCCTTCAA TGGCAGGCTC GGGGTTCTCC TCCCATCACT TATATTGGT ATAGCNACA GACTAATAC CAGGAACCA TCAAGTAGC AACCTAAGT  
ATCGGAAGTT ACGTCCGAG CCCCAAGAGG AGGATGCA ATATAACCA TATTCCTGT CTGATTATTG GTCTTGGGT AGTTTCATCG TTGGCATCA  
162 S L Q C Q A R G S P P I S Y I W Y K Q Q T N N Q E P I K V A T L S

**FIG.\_6A**

SEQ ID NO:7 701 ACCTTACTCT TCAAGCCTGC GGTGATAGCC GACTCAGGCT CCTATTCTCG CACTGCCAAG GGCAGGTTG GCTGTAGCA GCACAGGAC ATTGTGAAGT  
 TGGAAAGAGA AGTTCCGACG CCACTATCGG CTGACTCCGA GGTAAAGAC GTACCGTTTC CCGTCCAC CGAGACTCGT CGTGTCTGTG TAACACTTCA  
 SEQ ID NO:2 195 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  
 801 TTGTGGTCAA AGACTCCTCA AAGTACTCA AGACCAAGAC TGAGGCACCT ACAACATGA CATACCCCTT GAAAGCAACA TCTACACTGA AGCACTCTCTG  
 AACACCACTT TCTGAGGAGT TTGATGAGT TCTGGTTCTG ACTCGTGGT TCTTGTACT GTATGGGAA CTTCCTGTGT AGATGTCACT TCGTCAGGAC  
 229 V V K D 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  
 901 GGACTGGACC ACTGACATGG ATGGTACTCT TGGACAGACC AGTCTCTGGC CAGGAAAGAG CCGTCTGTCT TTTGCCATCA TCTCTATCAT CTCTTCTGTG  
 CCGTACCTGG TGACTGTACC TACCGATGGA ACCTCTCTGG TCACAGCCCG GTCTTTCTC GGACGACAG AAACGGTAGT AGGAGTAGTA GAGGAACACG  
 262 D W T T D M D G Y L G E T S A G P G K S L P V F A I I L I I S L C  
 1001 TGTATGCTGG TTTTACCAT GGCCTATATC ATGCTCTCTC GGAACACATC CCACAACAG CATGTCTAGC AAGCAGCCAG GTAAGAAGT CTCTCTCTCTT  
 ACATACCACC AAAAATGGTA CCGGATATAG TACGAGACAG CCTTCTGTAG GGTCTTCTC GTACAGATGC TTCTGCGTC CATCTTTCA GACAGGAGAA  
 295 C H V V F T M A Y I M L C R K T S Q Q E H V Y E A A R O  
 1101 CCAATTTTGA CCGCGTCCCT GCCTCAATT TTGATTACTG CCAGGAATG TGGAGGAAG GGGGTGTGGC ACAGACCCAA TCTTAAGGCC GAGGGCCTTC  
 GGTAAAACT GGGGCAGGA CGGAGTTAA AACTAATGAC CGTCTTTAC ACCTCTTCC CCCCACACG TGCTTGGGT AGGATTCGG CCTCCGGAAG  
 1201 AGGTCAGGA CATAGCTGC TTCCCTCTCT CAGGCACCTT CTGAGTTGT TTTGGCCCTC TGAACACAA GGATAATTTA CATCCATCTG CCTTCTCTCTT  
 TCCCAGTCT GTATCCACG AAGGACAGA GTCCGTGGA GACTCCACA AAACCGGAG ACTTGTGTTT CCTATTAAAT CTAGGTAGAC GGAAGACGAA  
 1301 CCAGAAATCC TGGGTGGTAG GATCCTGATA ATTAAATGCC AGAATTTAG GCAGAGGGT GGGAAACAG GACCACAGCC CCAACTCCCT TCTTATGGT  
 GGTCTTAGG ACCCACCATC CTAGGACTAT TAATTAACG TTCTTAATC CGTCTTCCA CCTTTTGGT CTGTGTCTG GGTTCAGGA AGAATACCCA  
 1401 GGTGGCTCT TGGGCCATAG GGCATATCC ACAGATCTG AGAACCATG AGGTGGCCA TCTTGGGAAG TGGTGTCTCC AGTGATGAGC  
 CCACCCGAGA ACCCGTATC CGGTGTACG TCTCTCGGT TCGTAGACC TCTTTGGTAC TCCCACCGT AGAAGCTTC ACCGACGAGG TCACACTCTG  
 1501 CAACTTCCA GAATCTGGC AACAACTACT CTGATGAGCC CTGATAGGA CAGGATPACC AGATCATCC CCAGATCAAT GGCACACTAG CCCGCCCTCT  
 GTTGAAGGT CTAGACCCG TTGTTGATGA CACTACTCG GACCTATCT GTCTCATGG TCTAGTAGG GGTCTAGTTA CCGTTGATGC GGGCGGACCA

**FIG. 6B**

SEQ ID NO:7

1601 GGACACAGTT CCTCTGGATT ATGAGTTTCT GGCACATCAG GGCAGAAAGTG TCTGTTAAAG ATGCCCCATT AGCCACAGAT CTGCTGACAT AATTGCCTAG  
CCTGTCTCAA GGAGACCTAA TACTCAAAGA CCGTGACTC CCGTTTTCAC AGACAATTTT TACGGGGTAA TCCGGTCTTA GACCACTGTA TTAACGGATC

1701 TCAGTCCCTG CCTTCTGCAT GGCCTTCTTC CCTGCTACCT CTCTTCTCTG ATAGCCCAAA GTGTCCGCTT ACCAACACTG GAGCCGCTGG GAGTCACTGG  
AGTCAGGAAC GGAACACGTA CCGGAAGAAG GGACGATGGA GAGAAGGACC TATCGGGTTT CACAGGGGA TGGTTGTGAC CTCGGCGACC CTCAGTGACC

1801 CTTTCCGCTG GAATTTGCCA GATGCATCTC AACTAAGCCA GCTGCTGGAAT TTGGCTCTGG GCCCTTCTAG TATCTCTGCC GGGGGCTTCT GGTACTCTCTC  
GAACGGGAC CTTAAACGCT CTACGTAGAG TTCATTCTGT CGACGACCTA AACCCAGACC CCGGAAGATC ATAGAGACGG CCCCCGAAGA CCATCAGGAG

1901 TCTAAATACC AGAGGGAGA TCCCCATAGC ACTAGGACTT GGTCACTATG CCTACAGACA CTATTCAACT TTGGCATCTT GCCACCAGAA GACCCGAGGG  
AGATTTATGG TCTCCCTTCT ACCGGTATCG TGATCTCTCA CCAGTAGTAC GGATCTCTGT GATAAGTTGA AACCGTAGAA CCGTGTCTTT CTGGCTCCC

2001 AGGCTCAGCT CTGCCAGCTC AGAGGACCAG CTATATCCAG GATCATTCTT CTTTCTTTCAG GGCACAGACAG CTTTAAATTG AATTGTTAT TTCACAGCCC  
TCCGAGTCCA GACGGTCCAG TCTCCTGGTC GATATAGTTC CTAGTAAGA GAAAGNAGTC CCGTCTCTC GAAATTAAC TTTAACAATA AAGTCTCCGG

2101 AGGTTTCAGT TCTGCTCTCT CACTATAAGT CTATATTTCT GACTCTCTCC TGGTCTCTCA TAAATATCTA ATCAATACAG C  
TCCCAAGTCA AGACGAGGAG GTGATATTCA GATTACAGA CTCAGAGAGG ACCAGAGTT ATTTATAGAT TAGTATTGTC G

**FIG. 6C**

SEQ ID NO:8

CCCAGAAGTTCAAGGGCCCCCGGCCTCCTGCGCTCCTGCCGCCGGGACCCTCGACCTCCT  
CAGAGCAGCCGGCTGCCGCCCGGGAAGATGGCGAGGAGGAGCCGCCACCGCCTCCTCCT  
GCTGCTGCTGCGCTACCTGGTGGTCGCCCCTGGGCTATCATAAGGCCTATGGGTTTTCTGC  
CCCAAAGACCAACAAGTAGTCACAGCAGTAGAGTACCAAGAGGCTATTTTAGCCTGCAA  
AACCCCAAAGAAGACTGTTTCTCCAGATTAGAGTGGAAGAACTGGGTCGGAGTGCTC  
CTTTGTCTACTATCAACAGACTCTTCAAGGTGATTTTAAAAATCGAGCTGAGATGATAGA  
TTTCAATATCCGGATCAAAAATGTGACAAGAAGTGATGCGGGGAAATATCGTTGTGAAGT  
TAGTGCCCCATCTGAGCAAGGCCAAAACCTGGAAGAGGATACAGTCACTCTGGAAGTATT  
AGTGGCTCCAGCAGTTCCATCATGTGAAGTACCCTCTTCTGCTCTGAGTGGAAGTGGT  
AGAGCTACGATGTCAAGACAAAGAAGGGAATCCAGCTCCTGAATACACATGGTTTAAGGA  
TGGCATCCGTTTGCTAGAAAATCCAGACTTGGCTCCCAAAGCACCAACAGCTCATAAC  
AATGAATACAAAACCTGGAAGTCTGCAATTTAATACTGTTTCCAAACTGGACACTGGAGA  
ATATTCCTGTGAAGCCCGCAATTCTGTTGGATATCGCAGGTGTCCTGGGAAACGAATGCA  
AGTAGATGATCTCAACATAAGTGGCATCATAGCAGCCGTAGTAGTTGTGGCCTTAGTGAT  
TTCCGTTTGTTGGCCTTGGTGTATGCTATGCTCAGAGGAAAGGCTACTTTTCAAAGAAAC  
CTCCTTCCAGAAGAGTAATTCTTCATCTAAAGCCACGACAATGAGTGAAAATGTGCAGTG  
GCTCACGCCTGTAATCCAGCACTTTGGAAGGCCGCGGCGGGCGGATCACGAGGTCAGGA  
GTTCTAGACCAGTCTGGCCAATATGGTGAAACCCCATCTCTACTAAAATACAAAATTAG  
CTGGGCATGGTGGCATGTGCCTGCAGTTCAGCTGCTTGGGAGACAGGAGAATCACTTGA  
ACCCGGGAGGCGGAGGTTGCAGTGAGCTGAGATCACGCCACTGCAGTCCAGCCTGGGTAA  
CAGAGCAAGATTCCATCTCAAAAAATAAAATAAATAAATAAATAAATACTGGTTTTTACC  
TGTAAGATTCTTACAATAAATATAGCTTGATATTC

**FIG.\_7**

SEQ ID NO:9

MARRSRHRLLLLLLRYLVVALGYHKAYGFSAPKDQQVVTAVEYQEAILACKTPKKTVSSR  
LEWKKLGRSVSFVYYQQTLOGDFKNRAEMIDFNIRIKNVTRSDAGKYRCEVSAPSEQGQN  
LEEDTVTLEVLVAPAVPSCEVPSSALSGTVVELRCQDKEGNPAPEYTWFKDGIRLLENPR  
LGSQSTNSSYTMNTKTGTLQFNTVSKLDTGEYSCEARNSVGYYRRCPGKRMQVDDLNI SGI  
IAAVVVVALVISVCGLGVCYAQRKGYFSKETSFQKSNSSSKATTMSENVQWLTPVIPALW  
KAAAGGSRGQEF

**FIG.\_11**

SEQ ID NO:5

1 GCAGGCAGAG TACCAGGGCC GCGTGCATCT GAGCCACAG GTTCCAGGAG ATGTATCCCT CCATTTGAGC AGCCTGGAGA TGCATCAGCC GAGCCACTAC  
 CGTCCGTTTC ATCGTCCCG CGGACGTACA CTCGGTGTTC CAGGTCTCT TACATAGGA GGTMACTCG TGGGACCTCT ^42257.p1 SEQ ID NO:22

101 ACGTGTGAAG TCACCTGGCA GACTCCTGAT GGCACCCAG TCCTCAGAGA TAAGATTACT GAGCTCCGTG TCCAGAACT CTCTGTCTCC AAGCCACAG  
 TGCACACTTC ACTGGACCGT CTGAGGACTA CCGTTGGTTC AGCACTCTCT ATTCTAATGA CTCGAGGCAC AGGTCTTTGA GAGACAGAGG TTCGGGTGTC

201 TGACAACTGG CAGCGTTAT GCGTTCACGG TGCCCCAGG AATGAGATT AGCCTTCAAT GCCAGGTTTC GGGTTCCTCC TCCATCAGT TATATTTGGT  
 ACTGTTGACC GTGCCCAATA CCGAAGTCCC ACGGGTCCC TTACTCTTAA TCGGAAGTTA CGGTCCCAAG CCCCAGAGG AGGTAGTCA ATATAAACCA

301 ATAAGCAACA GACTAATAAC CAGGGAACCC ATCAAGTAG CAACTTAATC TACCTTACTC TTCAAGCCTG CCGTGAATAC CGACTCAGGC TCCTATTCTT  
 TATTGCTTGT CTGATTATTG GTCCCTTGGG TAGTTTCATC GTTGGGATTC ATCGAATGAG AAGTTCCGAC GCCACTATCG GCTGACTCCG AGCATAAAGA

401 GCACTGCCAA GGGCCAGGTT GGTCTCTAGC AGCAGAGCGA CATTGTGAG TTGTGGTCA AAGACTCCTC AAGACTACTC AAGACCAGA CTGAGGCACC  
 CGTCAGGTT CCGGTCCTAA CCGAGACTCG TCGTGTCCGT GTACACTTC AATACCACTT TTCTCAGGAG TTTCGATGAG TTCTGCTTCT GACTCCCTGG  
 ^42257.r1 SEQ ID NO:20

501 TACAACCATG ACATACCCCT TGAAGGCAC ATCTACAGTG AAGCAGTCTT GGGACTGGAC CACTGACATG GATGGCTACC TTGGAGAGAC CAGTCTCTGG  
 ATGTTGGTAC TGTATGGGA ACTTTCGTTG TAGATGTGAC TTGCTCAGCA CCTGACCTG GTCACTGTAC CTACCCATGG AACCTCTCTG GTCACGACCC

601 CCAGGAAGA GCGTGCCTGT CTTTGGCATC ATCTCATCA TCTCCTTGTG CTGTATGGTG GTTTTACCA TGGCCTATAT CATGCTCTGT CGGAAGACAT  
 GGTCTCTTCT CGGAGGACA GAAACGGTAG TAGCAGTAGT ACAGGAACAC GACATACCAC CAAAATGGT ACCGATATA GTAGGAGACA GCTTCTCTGA  
 ^42257.f2 SEQ ID NO:19

701 CCCAACAGA GCATGTCTAC GAAGCAGCCA GGGACATGC CAGAGAGGC AAGCACTCTG GAGAAACCAT GAGGGTGGCC ATCTTCGCAA GTGGCTGCTC  
 GGGTCTTCT CGTACAGATG CTTCTCTGGT CCCGTCTAGG GTCTCTAGG TTGCTCAGAC CTCCTTTGGTA CTCGCCCGG TAGAAGCTT CACCGACGAG

**FIG.\_9A**

SEQ ID NO:5

801 CAGTGATGAG CCAACTTCCC AGAATCTGGG GCACAACTA CTCTGATGAG CCTGTCATAG GACAGAGTA CCAGATCATC GCCCAGATCA ATGGCACTA  
CTCACTACTC GGTGAAGGG TCTTAGACCC CGTTGTTGAT GAGACTACTC GGGAGGTATC CTGTCTCAT GTCTCTAGT CCGGTCTAGT TACCGTTGAT

901 CCCCCCCTG CTGCACACAG TTCTCTGGA TTATGAGTTT CTGGCCACTG AGGCCAAAG TGTCTGTTA AATGCCCA TTAGGCCAGG ATCTGCTGAC  
GGGGCCGAC GACCTGTGTC AAGGAGACCT AATACTCAA GACCGGTGAC TCCGTTTC ACAGACAAT TTACGGGT ATCCGGTCC TAGACGACTG

1001 ATAAATGCCCT AGTCAGTCCCT TGCCTTCTGC ATGGCCTTCT TCCTCTCTAC CTCTCTTCTT GGTATGCCA AAGTGTCCG CTACCAACAC TGGAGCCGCT  
TATTAAACGA TCAGTCAGGA ACGGAAGACG TACCCGAAGA AGGACCATG GAGAGAGGA CCTATCGGT TTCACAGCCG CATGCTTCTG ACCTCGGCCA

1101 GGCAGTCACT GCGTTTGCCC TGGAAATTTGC CAGATGCATC TCAAGTAGC CAGTCTCTGG ATTTGGCTCT GGGCCCTTCT AGTATCTCTG CCGGGGCTT  
CCCTCAGTGA CCGAAACGGG ACCTTAAAG GTCTACGTAG AGTTCATTCG GTCCAGACC TAAACCGA CCGGGGAAGA TCATAGAGAC GCGCCCCGAA  
^42257..r2 SEQ ID NO:21

1201 CTGGTACTCC TCCTAAATA CCAGAGGGA GATGCCATA GCACTAGGAC TTGTCATCA TGCCTACAGA CACTATTCAA CTTTGGCATC TTCCACACCAG  
GACCATGAGG AGAGATTTAT GCTCTCCCTT CTACCGGTAT CGTGATCTG AACCATCTG ACCGATCTCT GTGATAGTT GAAACCGTAG AACGTGGTC

1301 AAGACCCGAG GGGAGGCTCA GCTCTGCCAG CTCAGAGGAC CAGTATATC CAGGATCATT TCTCTTCTT CAGGGCCAGA CAGCTTTTAA TTGAAATTGT  
TTCTGGGCTC CCTTCCGAGT CGAGACGGTC GAGTCTCTG GTCGATATAG GTCCATAGTAA AGAGAAAGAA GTCCCCGTCT GTCGAAATTT AACTTTAACA

1401 TATTTACAG GCCAGGGTTC AGTTCTGCTC CTCCTATA AGTCTAATGT TCTCACTCTC TCCTGTCTCT CAATAATAT CTAAATCAT CAGCAAAAA  
ATAAGTGTG CGGTCCCAAG TCAAGACCGAG CAGGTGATAT TCAGATTACA AGACTGAGAG AGGACCACA GTTATTATTA GATTAGTATT GTCGTTTTTT

1501 AAA  
TTT

**FIG.-9B**



A33_HUMAN	PRECURSOR DE ANTIGÉNIO A33 - HOMOSAPIENS	QUADRO	PONT.	CORRESP.	PCT
		+1	246	81	30
	A33_HUMAN - PRECURSOR DE ANTIGÉNIO A33 - HOMOSAPIENS (319 aa)				
	PONTUAÇÃO = 246 (86.6 BITS), ESPERADA = 2.8e-19, P = 2.8e-19				
	IDENTIDADES = 81/268 (30%), POSITIVOS = 131/268 (48%), AT 121,17, QUADRO = +1				
DNA40628	121	LALGSLVTVHSSSEPEVRIPENNPVKLSAYSGFSSPR---	VEW-KFDQGDTRLVC---	YNN	
SEQ ID NO:23		. . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . * . . . . . *			
A33_human	17	VTVDALSVETPQDVLRASQGSVTLPCITYHTSTSSREGLIQWDKLLLTHTERVVWIPFSN			
SEQ ID NO:24					
DNA40628	283	K--ITAS-YEDRVTF-----PTGITFKSVTREDTGTTCMV-----EEGNSYGEVKVK			
A33_human	77	KNYIHGELYKNRVSISSNNAEQSDASITIDQLTMADNGTYECSVSLMSDLEGNT--KSRVR			
DNA40628	427	LIVLVPPSKPTVNIPSSATIGNRAVLTCSEQDGSPPSEYTWFKDGI VMPNPKSTRAFSN			
A33_human	135	LLVLVPPSKPEGIEGETIIGNNIQLTCQSKESGPTQYSWKRYNILNQEQ-----			
DNA40628	607	SSYVLNPTTGELV-FDPLSASDTGEYSCEARNGYGTPTMTSNAVRMEAVERNVGV---	IVA		
A33_human	187	---LAQPASGQPVSLKNISTDTSGTYICTSSNEEGTQFCNITVAVRSPSMVALYVGI			
DNA40628	775	AVLVTLILLGILVFGIWFAYSRGHEDRT--KKGTSKKVIYSQP			
A33_human	244	GVVAALIIIGIIY---CCCCRGKDDNTEDKEDARPNREAYEEP			

FIG. 10A

PONTUAÇÃO = 245 (86,2 BITS), ESPERADA = 3,6e-19, P=3,6e-19  
IDENTIDADES = 83/273 (30%), POSITIVOS = 131/273 (47%), AT 112,12, QUADRO = +1

DNA40628	112	LCSL--ALGSVTVHSSEPEVRIPENNPVKLSAYSGFSSPR---VFW-KFDQGDITRLVC
SEQ ID NO:25		*** . . . . . * . . . . . * * * * * . * * . . . * * * * *
A33 human	12	LCAVRVTVDATSVETPQDVLRSQQKSVTLPCITYHTSTSSREGLIQWDKLLLTHTERVVI
SEQ ID NO:26		
DNA40628	274	--YNNK--ITAS-YEDRVTF-----PTGITFKSVTRDTGTYTCMVSEEGNSYGEVK
A33_human	72	WPFSNKNYIHGELYKNRVVISNNAEQSDASITIDQLTMADNGTYECSVSLMS-DLEGNTK
DNA40628	421	--VKLIVLVPPSKPTVNIPSSATIGNRAVLTCSEQDGGPPSEYTWFKDGIWMPNPKSTR
A33_human	131	SRVRLLVLVPPSKPEGIEGETIIGNNIQLTCQSKGSPTPQYSWKRYNILNQEQP----
DNA40628	595	AFSNSSYVLNPTTGELV-FDPLASDTGEYSCEARNGYGTPMTSNAVMEAVERNVGV--
A33_human	187	-----LAQPASGQPVSLKNISTDTSGYICTSSNEEGTQFCNITVAVRSPSMVALYV
DNA40628	766	-IVAAVLVTLILLGILVFGIWFAYSRGHEDRT--KKGTSKKKVIYSQP
A33_human	240	GIAVGVAALIIIGIIY---CCCCRGKDDNTEDKEDARNREAYEEP

FIG. 10B

SEQ ID NO: 6	A33_hum 40628	1 . . . . . M Y 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
		1 M G T K A Q O V E R K L L C L F I L A I L L C S . . L A L G S V T V H S S E P E V R I P E N N P V K L
A33_hum 40628	A33_hum 40628	42 P C T Y H T S T S S R E G L I Q W O K L L L T H T E R V V I W P F S M K N Y I H G E L Y K M R V S I
		49 S C A Y S G F S S P R . . . V E W . K F D O G D T T R L V C . . Y N N K . . I T A S . Y E D R V T F
A33_hum 40628	A33_hum 40628	92 S N N A E Q S D A S I T I D Q L T M A D 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
		90 . . . . . L P T G I T F K S V T R E D T G T Y T C H V S E E G G . N S Y G E V K V K L I V L V P P
A33_hum 40628	A33_hum 40628	142 S K P E C G I E G E T I I G N M I Q L T C Q S K E G S P T P O Y S W K R Y N I L N O E Q P . . . . .
		133 S K P T V N I P S S A T I G N R A V L T C S E Q D G S P S E Y T W F K D G I I V M P T N P K S T R A
A33_hum 40628	A33_hum 40628	187 . . . . . L A Q P A S G Q 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 O F C N I T V A V R S
		183 F 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 R M E A
A33_hum 40628	A33_hum 40628	231 P S M N V A L Y V G I A V G V V A A L 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
		232 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 O R T K K G T S S K K V
A33_hum 40628	A33_hum 40628	280 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
		279 I Y S Q P S A R S E G E F K Q T S S F L V

FIG.\_12



SEQ ID NO: 6	A33_hum	1	..MVGKMWPVLTWTLCAVRVTVD...AISVETPIDVLRASQGKSVTLPLP
SEQ ID NO: 9	35638	1	MARRSRHRLLLLLRYLVVALGYHKAYGFSAPKDDQVVTAVEYQEAIIAC
	A33_hum	44	TYHTSTSSREGLIQWDKLLLTHTERVVIWPFSSKNXYIHGELYKNRVSI
	35638	51	..KTPKKTVSSRLEWKKL...GRSVSFVYQQT-LQGD-FKNR....
	A33_hum	94	NAEQSQASITTDQLTMA DNGTYECVSLSMSOLEGN-TKSRVRLVLVPPS
	35638	87	..AEMIQFNIRIKNVTRSDAGKYRCEVSAPESEQGGNLEEDTVTLEVLVAPA
	A33_hum	143	XPECGIEGETIIGHNIOQLTCQSKEGSPTPQYSWKRYNIIINOEQPLAQPAS
	35638	136	VPSCEVPSSALSGT VVELRCQDKEGNPAPEYTWFXDGIIRLLENPRLGQS
	A33_hum	193	GQPVSLKNIISTDTSGYYICTSSNEEGTQFCNITVAV...RSPSMNVALYV
	35638	186	THSSYTMNTKTTGTLQFNT.VSKLDTGEYSCEARNSVGYRRCPCGKRMQVDD
	A33_hum	240	GIAVGVVAAALIIIGIIICYCC...CGRGKDDNTEDKEDARP NREAYEEPP
	35638	235	LHISGIIIAAVVVVALVIVSVCGLGVCIYQKGYFSKETSFOKSNSSSKAT
	A33_hum	287	QLREL SR-EREEEDDYRQEEQRSTGRESPDHL DQ
	35638	285	MSENVQWLTPVIPALWXAAAGGSRGQEF

**FIG..14**

**FIG. 14**

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	O	V	P	E	N	E	S	I	K	L	T	C
SEQ ID NO: 1	40628	1	M	G	T	K	A	O	V	E	R	K	L	L	C	L	F	I	L	A	I	L	L	C	S	L	A	L	G	S	V	T	V	H	S	S	E	P	E	V	R	I	P	E	N	N	P	V	K	L	S	C
	jam	50	T	Y	S	G	F	S	S	P	R	V	E	W	K	F	V	Q	S	T	T	A	L	V	C	Y	N	S	Q	I	T	A	P	Y	A	D	R	V	T	F	S	S	G	I	T	F	S	S	V	T		
	40628	51	A	Y	S	G	F	S	S	P	R	V	E	W	K	F	D	Q	G	D	T	T	R	L	V	C	Y	N	K	I	T	A	S	Y	E	D	R	V	T	F	L	P	T	G	I	T	F	K	S	V	T	
	jam	100	R	K	O	N	G	E	Y	T	C	M	V	S	E	E	G	G	O	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	G	N	R	A	V
	40628	101	R	E	O	T	G	T	Y	T	C	M	V	S	E	E	G	G	N	S	Y	G	E	V	K	V	K	L	I	V	L	V	P	P	S	K	P	T	V	N	I	P	S	S	A	T	I	G	N	R	A	V
	jam	150	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	G	D	L	I	F
	40628	151	L	T	C	S	E	Q	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	S	N	S	S	Y	V	L	N	P	T	T	G	E	L	V	F
	jam	200	O	P	V	T	A	F	D	S	G	E	Y	C	Q	A	Q	N	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	V	T	L	I	L	
	40628	200	O	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	R	M	E	A	V	E	R	N	V	G	V	I	V	A	A	V	L	V	T	L	I	L
	jam	250	L	G	L	I	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	O	P	S	T	R	S	E	G	E	F	K	O	T	S	S	F	L
	40628	250	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	S	K	K	V	I	Y	S	O	P	S	A	R	S	E	G	E	F	K	O	T	S	S	F	L
	jam	300	V																																																	
	40628	299	V																																																	

FIG.\_15

FIG.-15

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 O S D V Q V P E N E S I X L T  
SEQ ID NO: 2 45416 1 . . . . . M G I L L G L L L G H L T V D T Y G R P I L E V P E S V T G P W K G D V N L P

jam 49 C T Y S . . . G F S S P R V E W K F V O G S T T A L V . . . C Y N S Q I T A P Y A O R V T F S .  
45416 41 C T Y D P L Q G Y T Q V L V K W L V Q R G S D P V T I F L R D S S G D H I Q Q A K Y Q G R L H V S H

jam 90 . . . . S 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 V L V P P .  
45416 91 K V P G D Y S L Q L S T L E M D D R S H Y T C E V T W O T P D G N Q V V R D K I T E L R V Q K L S V

jam 132 S K 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 O G I S M L T A D A  
45416 141 S K P T V T T G S G Y G F T V P Q G M R I S L Q C Q A R G S P P I S Y I W Y K Q Q T N . . N Q E P

jam 178 K K T R A F M N S S F T I O 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 M R S E A A  
45416 188 I X 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

jam 228 H . . . M D A V E L N V G G I V A A V L V T L I L G L L I F G . . . V W F A Y S R G Y F E T T K K  
45416 227 K F V V K D 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 O M D G Y L G E T S A

jam 272 G T A P G K K V I Y S O P S T R S E G E F K Q T S S F L V  
45416 277 G P G K S L P V F A I L I S L C C M V V F T M A Y I N L C R K T S Q Q E H V Y E A A R

FIG. 16

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: 9 35638 1 . . . M A R R S R H R L L L L R Y L V V A L L G Y H K A Y G F S A P K Q Q V V T A V E Y O E A I L

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

jam 97 S V T R K D N G E Y T C M V S . . E 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 D A G K Y R C E V S A P S E Q G Q N L E E D T Y T L E V L V A P A Y 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 K 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 T N S S Y T M N T K T

jam 195 G O L I F D P V T A F D S G E Y Y C Q A Q N 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 W 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 Q  
 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 Q E F

FIG. 17



SEQ ID NO: 6 A33\_hum 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 O G K S V T L P C T  
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 T C T

A33\_hum 45 Y H T S T S S R E G L I Q W D K 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  
jam 51 Y S G F S S P R . . . V E W - K F V O G S T A L V C . . Y N S Q . . I T A P . Y A D R V T F S S .

A33\_hum 95 A E Q S D A S I T I D O L T M A D 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  
jam 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 . Q N Y G E V S I H L T V L V P P S K P

A33\_hum 145 E C G I E G E T I I G N H I O L T C Q S K E G S P T P O Y S W K R Y M I L N Q E O P L A O P A S G Q  
jam 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 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

A33\_hum 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 O F C N . . . . I T V A V R S P S M N . . . V A L L  
jam 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 M R S E A A H M D A V E L

A33\_hum 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 O N T E D K E D A R P N R E A Y E E  
jam 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 . I T K K G T A P G K K V I Y S Q

A33\_hum 284 P P E O L R E L S R E R E E E D O Y R O E E Q R S T G R E S P D H L D Q  
jam 284 P S T R S E G E F K Q T S S F L V

**FIG.\_18**

<u>TECIDO</u>	<u>EXPRESSÃO</u>	<u>TECIDO</u>	<u>EXPRESSÃO</u>	<u>TECIDO</u>	<u>EXPRESSÃO</u>
CÉREBRO COMPLETO	+	CORAÇÃO	++	RIM	+++
AMÍGDALA	+	AORTA	+	FÍGADO	++
NÚCLEO CAUDADO	+	MÚSCULO ESQUELÉTICO	+	INTESTINO DELGADO	++
CEREBELO	-	CÓLON	+++	BAÇO	++
CÓRTEX CEREBRAL	+	BEXIGA	++	TIMO	++
LOBO FRONTAL	+	ÚTERO	+	LEUCÓCITO PERIFÉRICO	+
HIPOCAMPO	+	PRÓSTATA	+++	NÓDULO LINFÁTICO	+
BOLBO RAQUIDIANO	+	ESTÔMAGO	+++	MEDULA ÓSSEA	+
LOBO OCCIPITAL	+	TESTÍCULO	++		
PUTAMEN	+	OVÁRIO	+++	APÊNDICE	+
SUBSTÂNCIA NEGRA	+	PÂNCREAS	++	PULMÃO	++++
LOBO TEMPORAL	+	GLÂNDULA PITUITÁRIA	++	TRAQUEIA	++++
TÁLAMO	+	GLÂNDULA SUPRA-RENAL	++	PLACENTA	++++
NÚCLEO ACCUMBENS	+	GLÂNDULA TIRÓIDE	++		
MEDULA ESPINAL	-	GLÂNDULA SALIVAR	+++	CÉREBRO FETAL	+
		GLÂNDULA MAMÁRIA	++	CORAÇÃO FETAL	+
				RIM FETAL	++
				FÍGADO FETAL	+++
				BAÇO FETAL	+
				PULMÃO FETAL	++++

FIG..19

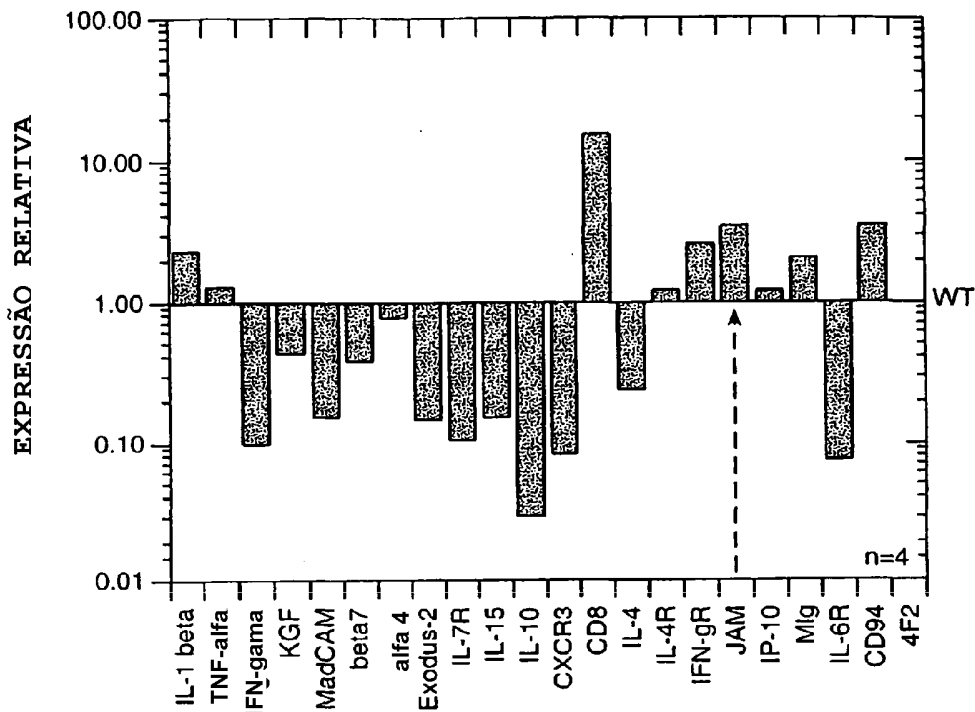


FIG.\_20

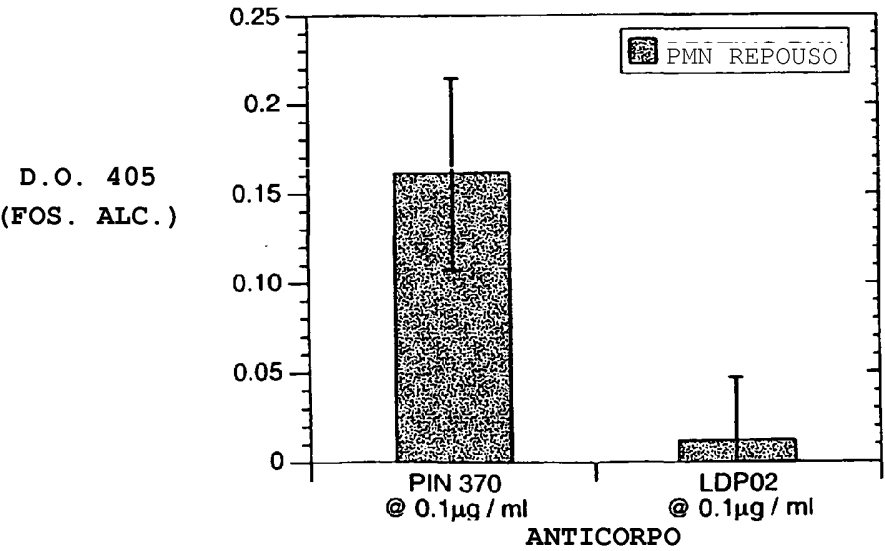


FIG.\_21