INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

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

(11) Número de Publicação: **PT 669929 E**

(51) Classificação Internacional:
C07H 21/04 (2006.01) ***C12N 15/12*** (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01) ***C07K 16/18*** (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01) ***C12N 15/19*** (2006.01)

(22) Data de pedido: **1993.11.15**

(30) Prioridade(s): **1992.11.13 US 0977693**

(43) Data de publicação do pedido: **1995.09.06**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.01.03**
004/2007

(73) Titular(es):
IMMUNEX CORPORATION
51 UNIVERSITY STREET SEATTLE,
WASHINGTON 98101 **US**

(72) Inventor(es):
M. PATRICIA BECKMANN **US**
STEWART LYMAN **US**
PETER R. BAUM **US**

(74) Mandatário:
ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **LIGANDO DE ELK, UMA CITOQUINA**

(57) Resumo:

RESUMO

"Ligando de ELK, uma citoquina"

Polipéptidos ligandos de elk (elk-L) bem como sequências de ADN, vectores e células hospedeiras transformadas, úteis para proporcionarem polipéptidos elk-L. O polipéptido elk-L liga-se a um receptor da superfície celular que é membro da família de receptores tirosina-quinase.

DESCRIÇÃO

"Ligando de ELK, uma citoquina"

ANTECEDENTES DO INVENTO

A proteína da superfície celular designada por elk é um membro de uma família de proteínas conhecidas como receptores tirosina-quinase. As proteínas desta família têm uma actividade intrínseca de quinase que é activada por ligação a um ligando (Ullrich *et al*, *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* 51:713, 1986). Um clone parcial de elk foi primeiro encontrado numa biblioteca de expressão de ADNc de cérebro de rato que foi pesquisada quanto a proteínas que expressavam actividade de tirosina-quinase (Letwin *et al.*, *Oncogene* 3:621, 1988). Posteriormente, foi derivada uma sequência compósita que abarca a totalidade da região de codificação de elk a partir de clones parciais isolados de uma biblioteca de ADNc de cérebro de rato e de uma biblioteca de cerebelo de rato usando o clone parcial como sonda (Lhotak *et al.*, *Mol Cell. Biol. 11*:2496, 1991). A proteína elk está muito relacionada com um certo número de outros receptores tirosina-quinases, incluindo hek (Boyd *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267:3262, 1992 e Wicks *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1611, 1992); os homólogos de hek, mek4 e cek4 (Sajjadi *et al.*, *New Biol* 3:769, 1991); eek (Chan *et al. Oncogene* 6:1057, 1991); erk (Chan *et al.*, *supra*), eck (Lindberg *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 10:6316, 1990); cek5 (Pasquale, E.B. *Cell Regulation* 2: 523, 1991) e eph (Hirai *et al.*, *Science* 238:1717, 1987). As proteínas desta subfamília estão relacionadas não apenas nos seus domínios citoplasmáticos, mas também nos seus domínios extracelulares, que são de 41% a 68% idênticos. Interessantemente, as distribuições tissulares destes vários receptores é distinta. Por exemplo, mostrou-se que a expressão de ARNm de elk está limitada aos testículos e ao cérebro (Lhotak *et al.*, *supra*), ao passo de eck não só é encontrado nesses mesmos dois tecidos, como também no pulmão, intestino, rim, baço, ovário e pele.

Os ligandos para as tirosina-quinases receptoras são um grupo distinto de proteínas que afectam o crescimento, a diferenciação e a sobrevivência das células que expressam os

receptores. Até à data, não foi identificado qualquer ligando para elk. A identificação de um ligando putativo seria útil na investigação da natureza de processos celulares que pudessem ser regulados pela proteína elk.

SUMÁRIO DO INVENTO

O presente invento proporciona novas citoquinas designadas por ligando de elk (elk-L) que se ligam ao receptor da superfície celular de rato conhecido como elk. O presente invento também proporciona ADN isolado que codifica a proteína elk-L, vectores de expressão compreendendo o ADN isolado e um método para a produção de elk-L por cultura de células hospedeiras contendo os vectores de expressão em condições adequadas para a expressão da proteína elk-L. Também são descritos anticorpos contra a proteína elk-L ou um seu fragmento imunogénico.

DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

No primeiro aspecto o presente invento proporciona um ADN isolado que codifica uma proteína elk-L capaz de se ligar a elk, em que o referido ADN compreende uma sequência nucleotídica, que é pelo menos, 80% idêntica a uma sequência seleccionada de entre o grupo consistindo nos nucleótidos 1-1041, 73-1041 1-711 e 73-711 de SEQ ID NO:1.

Noutro aspecto o presente invento proporciona um ADN isolado que codifica uma proteína elk-L capaz de se ligar a elk, em que a referida elk-L compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80% idêntica a uma sequência seleccionada de entre o grupo consistindo nos aminoácidos 1-322 e 1-213 de SEQ ID NO:2.

Noutro aspecto o presente invento proporciona proteína elk-L madura, purificada, biologicamente activa, caracterizada por a sequência de aminoácidos N-terminal ser Ala-Thr-Pro-Leu-Ala-Lys-Asn-Leu-Glu-Pro-Val-Ser.

Noutro aspecto, o presente invento proporciona uma proteína elk-L, purificada, compreendendo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80% idêntica a uma sequência

seleccionada de entre o grupo consistindo nos aminoácidos 1-322 e 1-2213 de SEQ ID NO:2.

De acordo com o presente invento foi isolado um ADNc que codifica um nova proteína ligando que se liga à proteína da superfície celular de rato conhecida como elk. Também são proporcionados vectores de expressão compreendendo o ADNc do ligando de elk (elk-L) e métodos para a produção de polipéptidos elk-L recombinantes por cultura de células hospedeiras contendo os vectores de expressão, em condições adequadas para a expressão de elk-L e recuperação da elk-L expressa. A proteína elk-L está, também, incluída no presente invento, incluindo formas solúveis da proteína compreendendo o domínio extracelular.

O presente invento também proporciona elk-L ou seus fragmentos antigénicos que podem actuar como imunogénios para a geração de anticorpos específicos para os imunogénios de elk-L. Podem, assim, ser preparados anticorpos monoclonais específicos para elk-L ou seus fragmentos antigénicos.

A nova citoquina aqui descrita é um ligando de elk, um receptor da superfície celular de rato que é um membro da família dos receptores tirosina-quinase. Os membros desta família de receptores têm uma actividade de quinase que é activada por ligação ao ligando. A ligação de elk-L a elk na superfície celular pode iniciar um sinal biológico mediado por elk. Uma utilização do ligando de elk do presente invento consiste numa ferramenta de investigação para o estudo da natureza deste sinal biológico e do papel que elk-L, em conjunto com elk, pode desempenhar no crescimento e diferenciação das células com o receptor de elk. A expressão de ARNm de elk foi detectada no cérebro e nos testículos de ratos (Lhotok *et al.*, *supra*) e foi sugerida a possibilidade de elk ser capaz de activação oncogénica (Letwin *et al.*, *supra*).

Os polipéptidos elk-L do presente invento têm utilidade como reagentes de purificação de proteínas e podem ser empregues em ensaios *in vivo* para a detecção de elk ou de elk-L ou das suas interacções. Estes e outros usos dos ligandos de elk são adicionalmente discutidos no que se segue.

Para a identificação de células adequadas para utilização como fontes de ácido nucleico na tentativa de clonagem, foram testados mais de 30 tipos diferentes de células humanas e murinas quanto à capacidade de se ligarem a elk (na forma de uma proteína de fusão compreendendo elk de rato e um polipéptido de anticorpo Fc.)

Como descrito no Exemplo 2, nenhum dos tipos celulares exibiu ligação a elk detectável. Uma vez que o tecido da placenta é rico em factores de crescimento e de diferenciação, uma biblioteca de ADNc de placenta humana foi pesquisada com elk/Fc de rato numa tentativa de isolamento de um clone de elk-L. Embora não se soubesse se a placenta expressava ou não elk-L e a capacidade de elk de rato se ligar a elk-L humana também ser desconhecida, o ADNc de elk-L humano foi isolado com sucesso tal como descrito no Exemplo 3. A sequência de ADN e a sequência de aminoácidos codificada da região de codificação de um clone de ADNc de elk-L humano são apresentadas em SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:2.

O ADNc de elk-L humano compreendendo a região de codificação foi isolado do clone positivo e inserido no local SmaI (na região de clonagem múltipla) do vector de clonagem pBLUESCRIPT® SK(-), disponível em Stratagene Cloning Systems, La Jolla. CA. O vector recombinante resultante, designado por tele 7 em pBLUESCRIPT® SK(-), em células *E. coli* DH5α, foi depositado em American Type Culture Collection em 9 de Outubro de 1992 e foi-lhe atribuído o n.º de acesso ATCC 69085. O depósito foi feito de acordo com os termos do Tratado de Budapeste.

A comparação quer da sequência de nucleótidos quer da sequência de aminoácidos codificada do clone de ADNc de elk-L humano com as bases de dados Genbank e Swisspro mostraram que a sequência do ligando de elk era única. Nesta pesquisa foi identificada uma sequência de aminoácidos que partilhava identidade de sequências limitada com o ligando de elk. Essa sequência era para a proteína B61, que tinha sido anteriormente identificada como o produto de um novo gene de resposta imediata precoce induzida por TNF em células endoteliais da veia umbilical humana (Holtzman *et al.*, *Mol. Cell. Biol. 19:*5830, 1990). Todos os quatro resíduos cisteína

no domínio extracelular das duas proteínas são conservados e a identidade global de aminoácidos entre a elk-L humana e B61 é de 33%. Em contraste com o ligando de elk, foi referido que a proteína B61 é segregada, mas termina com uma cauda hidrófoba e foi sugerido que esteja associada com a membranas através de uma ligação glicosilfosfatidilinositol (Holzman *et al.*, *supra*). A função da proteína B61 é desconhecida.

O termo "elk-L" tal como aqui usado refere-se a um género de polipéptido que é capaz de se ligar a elk e que exibe homologia com os polipéptidos elk-L nativos aqui descritos, compreendendo uma sequência de aminoácidos que é mais do que 80% idêntica à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2. Elk-L humana está no âmbito do presente invento, tal como estão as proteínas elk-L derivadas de outras espécies de mamíferos incluindo, mas não lhes estando limitadas, células murinas, de rato, bovinas, porcinas ou de vários primatas. Tal como aqui utilizado, o termo "elk-L" inclui proteínas ligadas a membrana (compreendendo um domínio citoplasmático, uma região transmembranar e um domínio extracelular) bem como proteínas truncadas que retêm a propriedade de ligação de elk. Estas proteínas truncadas incluem, por exemplo, elk-L solúvel compreendendo apenas o domínio extracelular (de ligação ao receptor).

O ADNc de elk-L humano pode ser radiomarcado e usado como sonda para o isolamento de outros ADNc de elk-L de mamífero por hibridação entre espécies. Por exemplo, uma biblioteca de ADNc preparada a partir de tecido de placenta de outra espécie de mamífero pode ser ensaiada com um ADNc de elk-L humano, radiomarcado, para o isolamento de um clone positivo. Alternativamente, os ARNm isolados de várias linhas celulares podem ser ensaiados por hibridação de *Northern* para a determinação de uma fonte adequada de ARNm de elk-L de mamífero para utilização na clonagem de um gene de elk-L.

Embora tenho sido empregue uma proteína de fusão elk/Fc no procedimento de ensaio descrito no Exemplo 3 que se segue, pode ser utilizado elk para o ensaio de clones e de linhas celulares candidatas para expressão de proteínas elk-L. A proteína de fusão elk/Fc, contudo, apresenta a vantagem de ser facilmente purificada. Adicionalmente, formam-se ligações

dissulfureto entre as regiões Fc de duas cadeias de proteínas de fusão separadas, criando dímeros. O receptor dimérico elk/Fc foi escolhido pela sua potencial vantagem de maior afinidade de ligação com o ligando de elk, tendo em vista a possibilidade do ligando procurado ser multimérico.

Outras regiões Fc de anticorpo podem substituir a região Fc de IgG1 descrita no Exemplo 1. Outras regiões Fc adequadas são aquelas que se podem ligar com afinidade elevada a proteína A ou proteína G e incluem a região Fc de IgG1 de murino ou fragmentos da região Fc de IgG1 humana, *e.g.*, fragmentos compreendendo pelo menos a região charneira de modo a que se formem ligações dissulfureto intercadeia.

Uma concretização do presente invento proporciona polipéptidos elk-L solúveis. Os polipéptidos elk-L solúveis compreendem todo ou parte do domínio extracelular de uma elk-L nativa, mas não têm a região transmembranar que provocaria a retenção do polipéptido numa membrana celular. Os polipéptidos elk-L solúveis compreendem vantajosamente o péptido de sinal nativo (ou um heterólogo) quando sintetizado inicialmente para a promoção da secreção, mas o péptido de sinal é clivado por secreção de elk-L pela célula. Os polipéptidos elk-L solúveis que podem ser empregues retêm a capacidade de se ligarem ao receptor de elk. A elk-L solúvel também pode incluir parte da região transmembranar ou parte do domínio citoplasmático ou outras sequências, desde que a proteína elk-L solúvel seja susceptível de ser segregada.

A elk-L solúvel pode ser identificada (e distinguida das suas parceiras não solúveis, ligadas a membranas) por separação de células intactas que expressam a proteína desejada a partir do meio de cultura, *e.g.*, por centrifugação e ensaio do meio (sobrenadante) quanto à presença da proteína desejada. A presença de elk-L no meio indica que a proteína foi segregada pelas células e, deste modo, é uma forma solúvel da proteína desejada. A elk-L solúvel pode ser uma forma de ocorrência natural desta proteína.

A utilização de formas solúveis de elk-L é vantajosa para certas aplicações. A purificação das proteínas a partir de células hospedeiras recombinantes é facilitada, uma vez que as

proteínas solúveis são segregadas pelas células. Para além disso, as proteínas solúveis são, geralmente mais adequadas para administração intravenosa.

Os exemplos de polipéptidos elk-L solúveis incluem os que compreendem a totalidade do domínio extracelular de uma proteína elk-L nativa. Uma dessas proteínas elk-L solúveis compreende os aminoácidos de 1 (Ala) até 213 (Lis) de SEQ ID NO: 2. Quando expressa inicialmente numa célula hospedeira, a proteína solúvel pode, adicionalmente, compreender um dos péptidos de sinal heterólogos, de modo que elk-L compreenda os aminoácidos -24 (Met) até 213 (Lis) de SEQ ID NO:2. Numa concretização do invento, a elk-L solúvel é, inicialmente expressa como uma proteína de fusão compreendendo (do terminal N para o C) o péptido de sinal do factor α de levedura, o péptido FLAG® descrito a seguir e na Patente US 5 011 912 e a elk-L solúvel compreendendo os aminoácidos 1-213 de SEQ ID NO:2. Esta proteína de fusão, recombinante, é expressa e segregada por células de levedura. O péptido FLAG® facilita a purificação da proteína e, subsequentemente, pode ser clivado de elk-L solúvel usando enteroquinase mucósica de bovino. As sequências de ADN que codificam as proteínas elk-L estão incluídas no presente invento.

A elk-L truncada, incluindo polipéptidos solúveis, podem ser preparados por qualquer uma de várias técnicas convencionais. Uma sequência de ADN desejada pode ser sintetizada quimicamente usando técnicas conhecidas. Também podem ser produzidos fragmentos de ADN por digestão com endonucleases de restrição de uma sequência clonada de ADN de tamanho total, e isolados por electroforese em géis de agarose. Podem ser empregues ligantes contendo local(ais) de clivagem para endonucleases de restrição, para inserção do fragmento de ADN desejado num vector de expressão, ou o fragmento pode ser digerido em locais de clivagem neles presentes naturalmente. O procedimento, bem conhecido, da reacção em cadeia com polimerase também pode ser empregue para o isolamento de uma sequência de ADN que codifica um fragmento de proteína desejado. Como uma alternativa adicional, podem ser empregues técnicas de mutagénese para a inserção de um codão de paragem num ponto desejado, *e.g.*, imediatamente a

jusante do codão para o último aminoácido do domínio extracelular.

Noutra abordagem, pode ser empregue tratamento enzimático (*e.g.*, usando a exonuclease Bal 31) para a eliminação de nucleótidos terminais de um fragmento de ADN para a obtenção de um fragmento como um terminal particular desejado. De entre os ligantes disponíveis comercialmente estão aqueles que podem ser ligados às extremidades lisas produzidas por digestão com Bal 31 e que contêm local(ais) de clivagem para endonucleases de restrição. Alternativamente, podem ser sintetizados oligonucleótidos que reconstruam até um certo ponto, o terminal N ou C de um fragmento de ADN. O oligonucleótido pode conter um local de clivagem para endonuclease de restrição a jusante da sequência de codificação desejada e posicionar um codão de iniciação (ATG) no terminal N da sequência de codificação.

O presente invento proporciona polipéptidos elk-L purificados, tanto recombinantes como não recombinantes. Também estão no âmbito do presente invento variantes e derivados de proteínas elk-L nativas que retêm a actividade biológica desejada (*e.g.*, a capacidade de ligarem elk). Podem ser obtidas variantes de elk por mutações de sequências nucleotídicas que codificam polipéptidos elk-L nativos. Uma variante de elk-L, tal como aqui referida, consiste num polipéptido substancialmente homólogo a uma elk-L nativa, mas que tem uma sequência de aminoácidos diferente daquela da elk-L nativa (humana, murina ou de outra espécie mamífera) devido a uma ou mais eliminações, inserções ou substituições.

A sequência de aminoácidos variante é pelo menos 80% idêntica à sequência de aminoácidos de elk-L nativa, muito preferivelmente, pelo menos 90% idêntica. A percentagem de identidade pode ser determinada, por exemplo, por comparação da informação de sequência usando o programa de computador GAP, versão 6.0, descrito por Devereux *et al.* (*Nucl. Acids Res.* 12:387, 1984) e disponível em University of Winsconsin Genetics Computer Group (UWGCG). O programa GAP utiliza o método de alinhamento de Needleman e Wunsch (*J. Mol Biol.* 48:443, 1970), tal como revisto por Smith e Waterman (*Adv. Appl. Math* 2:482, 1981). Os parâmetros predefinidos preferidos

para o programa GAP incluem: (1) uma matiz de comparação unária (contendo um valor de 1 para identidades e 0 para não identidades) para nucleótidos e a matriz de comparação ponderada de Gribskov e Burgess, *Nucl. Acids Res.* 14:6745, 1986, como descrito por Schwartz e Dayhoff, eds. *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, pag. 353-358, 1979; (2) uma penalização de 3,0 para cada hiato e uma penalização adicional de 0,10 para cada símbolo em cada hiato; e (3) nenhuma penalização para hiatos terminais. Para fragmentos de elk-L, a percentagem de identidade tem por base a porção de uma proteína elk-L nativa que está presente no fragmento.

Alterações na sequência de aminoácidos nativa podem ser conseguidas por qualquer uma de várias técnicas conhecidas. As mutações podem ser introduzidas em locais particulares por oligonucleótidos de síntese contendo uma sequência mutante, flanqueada por locais de restrição, permitindo a ligação de fragmentos da sequência nativa. A seguir à ligação, a sequência nativa resultante, reconstruída, codifica um análogo com a inserção, substituição ou eliminação de aminoácido desejada.

Alternativamente, podem ser empregues procedimentos de mutagénese específica de local dirigida por oligonucleótidos para proporcionar um gene alterado como codões particulares alterados de acordo com a substituição, eliminação ou inserção necessárias. Exemplos de métodos para a realização das alterações apresentadas acima são descritos por Walder *et al.* (*Gene* 42:133, 1986); Bauer *et al.* (*Gene*, 37:73, 1985); Crail (*BioTechniques*; Janeiro 1985, 12-19); Smith *et al.* (*Genetic Engineering: Principles and Methods*; Plenum Press, 1981); Kunkel (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488, 1985); Kunkel *et al.* (*Methods in Enzymol.* 154;367, 1987); e Patentes US N.º 4 518 584 e 4 737 462.

As variantes podem compreender sequências substituídas conservativamente, significando que um dado resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo com características físico-químicas semelhantes. Exemplos de substituições conservativas incluem a substituição de um resíduo alifático por outro, como Ile, Val, Leu ou Ala por outro ou

substituições de um resíduo polar por outro, como entre Lis e Arg; Glu e Asp; ou Gln e Asn. São bem conhecidas outras substituições conservativas, por exemplo, substituições de regiões inteiras com características de hidrofobicidade semelhantes.

A elk-L também pode ser modificada para criar derivados de elk-L por formação de conjugados covalentes ou de agregação com outras porções químicas como grupos glicosilo, lípidos, fosfato, grupos acetilo e semelhantes. Podem ser preparados derivados covalentes de elk-L por ligação das porções químicas a grupos funcionais como nas cadeias secundárias de aminoácidos de elk-L ou no terminal N ou terminal C de um polipéptido elk-L ou do seu domínio extracelular. Outros derivados de elk-L no âmbito deste invento incluem conjugados covalentes ou de agregação de elk-L, ou seus fragmentos, com outras proteínas ou polipéptidos, como por síntese em cultura recombinante de fusões do terminal N ou do terminal C. Por exemplo, o conjugado pode compreender um sequência polipeptídica de comando ou de sinal (*e.g.*, um comando do factor α de *Saccharomyces*) no terminal N de um polipéptido elk-L. O péptido de comando ou de sinal dirige em co-tradução ou pós-tradução, a transferência do conjugado do seu local de síntese para um local no interior ou no exterior da membrana celular ou da parede celular.

As fusões de polipéptidos elk-L podem compreender péptidos adicionados para facilitar a purificação e a identificação da elk-L. Estes péptidos incluem, por exemplo, poli-His ou péptidos de identificação antigénicos descritos na patente US N.º 5 011 912 e em Hopp *et al.*, *BiolTechnology* 6:1204, 1988. Um desse péptidos é o péptido FLAG®, Asp-Tir-Lis-Asp-Asp-Asp-Asp-Lis (DYKDDDDK), que é muito antigénico e proporciona um epítopo ligado reversivelmente por um anticorpo monoclonal específico que permite um ensaio rápido e a purificação fácil da proteína recombinante expressa. Esta sequência é, também, clivada especificamente por enteroquinase mucósica de bovino no resíduo imediatamente a seguir ao par Asp-Lis. As proteínas de fusão rematadas com este péptido também podem ser resistentes à degradação intracelular em *E. coli*. Um hibridoma de murino designado por 4E11 produz um anticorpo monoclonal que se liga ao péptido DYKDDDDK na

presença de certos catiões metálicos bivalentes (como descrito na Patente US 5 011 912, incorporada por referência) e que foi depositado junto de American Type Culture Collection, com o número de acesso HB 9259.

O presente invento também inclui polipéptidos elk-L com ou sem padrão de glicosilação nativo associado. O elk-L expresso em levedura ou em sistemas de expressão mamíferos (*e.g.* células COS-7) pode ser semelhante ou significativamente diferente de um polipéptido elk-L nativo em termos da massa molecular e do padrão de glicosilação, dependendo da escolha de sistema de expressão. A expressão de polipéptidos elk-L em sistemas de expressão bacterianos, como *E. coli.*, proporciona moléculas não glicosiladas.

Podem ser preparadas construções de ADN que codificam várias adições ou substituições de sequências ou resíduos de aminoácidos ou eliminações de resíduos ou sequências terminais ou internas não necessárias para actividade ou ligação biológica. Por exemplo, podem ser modificados locais de N-glicosilação no domínio extracelular de elk-L para impedir a glicosilação, permitindo a expressão de um análogo de hidrato de carbono reduzido mais homogéneo, em sistemas de expressão mamíferos e de leveduras. Locais de N-glicosilação em polipéptidos eucariotas são caracterizados pelo tripleto de aminoácidos Asn-X-Y, em que X é qualquer aminoácido com excepção de Pro e Y é Ser ou Thr. A proteína elk-L humana compreende um desses tripletos, nos aminoácidos 115-117 de SEQ ID NO:2. Modificações adequadas na sequência nucleotídica que codifica este tripleto resultarão em substituições, adições ou eliminações que impedem a ligação de resíduos hidrato de carbono à cadeia secundária de Asn. A alteração de um único nucleótido, escolhido de modo que Asn seja substituído por um aminoácido diferente, é, por exemplo, suficiente para inactivar um local de N-glicosilação. Procedimentos conhecidos para a inactivação de locais de N-glicosilação em proteínas incluem os descritos na Patente US 5 071 972 e em EP 276 846.

Noutro exemplo, sequências codificando resíduos Cis que não são essenciais para actividade biológica podem ser alteradas para provocar a eliminação ou substituição dos resíduos Cis por outros aminoácidos, impedindo a formação de

pontes de dissulfureto intramoleculares incorrectas por renaturação. Outras variantes são preparadas por modificação de resíduos de aminoácido dibásicos, adjacentes, para melhorar a expressão em sistemas de levedura nos quais está presente actividade de protease KEX2. Em EP 212 914 descreve-se o uso de mutagénese específica do local para a inactivação de locais de processamento de protease KEX2 numa proteína. Locais de processamento de protease KEX2 são inactivados por eliminação, adição ou substituição de resíduos para a alteração de pares Arg-Arg, Arg-Lis e Lis-Arg para a eliminação da ocorrência destes resíduos básicos adjacentes. Os emparelhamentos Lis-Lis são consideravelmente menos susceptíveis à clivagem por KEX2 e a conversão de Arg-Lis ou de Lis-Arg em Lis-Lis representa uma abordagem conservativa e preferida para a inactivação de locais KEX2. O elk-L humano contém três locais de processamento para protease KEX2 nos aminoácidos 242-243, 243-244 e 246-247 de SEQ ID NO:2.

Também estão incluídas no presente invento variantes de elk-L de ocorrência natural. Exemplos destas variantes são proteínas que resultam de eventos de "*splicing*" alternativo do ARNm ou de clivagem proteolítica da proteína elk-L, em que a propriedade de ligação da elk é retida. A emenda alternativa de ARNm pode originar uma proteína elk-L truncada, mas biologicamente activa, como, por exemplo, uma forma solúvel de ocorrência natural da proteína. As variações atribuíveis a proteólise incluem, por exemplo, diferenças nos terminais N ou C por expressão em diferentes tipos de células hospedeiras devido a remoção proteolítica de um ou mais aminoácidos terminais da proteína elk-L (geralmente 1-5 aminoácidos terminais).

As sequências de ácido nucleico no âmbito do presente invento incluem sequências de ADN e de ARN isoladas que hibridam com as sequências nucleotídicas de elk-L nativa aqui descritas, em condições de rigor moderado a elevado e que codificam elk-L biologicamente activa. Condições de hibridação de rigor moderado referem-se a condições descritas em, por exemplo Sambrook *et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual,* 2 ed. Vol. 1, pag 1.101-104, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989). Condições de rigor moderado, tal como definidas por Sambrook *et al.*, incluem a utilização de

uma solução de pré-lavagem de 5X SSC, SDS a 0,5%, EDTA 1,0 mM (pH 8,0) e condições de hibridação de cerca de 55°C, 5X SSC, durante a noite. Condições de rigor elevado incluem temperaturas mais elevadas de hibridação e lavagem. O perito na especialidade reconhecerá que a temperatura e a concentração salina da solução de lavagem podem ser ajustadas na medida do necessário de acordo com factores como o comprimento da sonda.

Devido à degeneração conhecida do código genético em que mais do que um codão podem codificar o mesmo aminoácido, uma sequência de ADN pode variar da apresentada na SEQ ID NO:1. Essas sequências de ADN variantes podem resultar em mutações silenciosas (*e.g.*, que ocorrem durante a amplificação por PCR) e podem ser o produto de mutagénese deliberada de uma sequência nativa.

O presente invento proporciona, deste modo, sequências de ADN isoladas codificando elk-L biologicamente activa, seleccionada de entre: (a) ADN derivado da região de codificação de um gene de elk-L nativo de mamífero (*e.g.*, ADNc compreendendo a sequência nucleotídica apresentada em SEQ ID NO:1; (b) ADN capaz de hibridação com um ADN de (a) em condições de rigor moderado e que codifica elk-L biologicamente activa; e (C) ADN que é degenerado como resultado do código genético de um ADN definido em (a) ou (b) e que codifica elk-L biologicamente activa. As proteínas elk-L codificadas por estas sequências de ADN estão incluídas no presente invento.

Os exemplos de proteínas elk-L codificadas por ADN que varia da sequência de ADN nativa de SEQ ID NO:1, em que o ADN variante hibridará com a sequência de ADN nativa em condições de rigor moderado, incluem, mas não lhes estão limitados, fragmentos de elk-L (solúveis ou ligados a membrana) e proteínas elk-L compreendendo local(ais) de N-glicosilação inactivados, local(ais) de processamento para protease KEX2 inactivados ou substituições conservativas de aminoácidos como descrito acima. Também estão incluídas proteínas elk-L codificadas por ADN derivado de outras espécies de mamíferos, em que o ADN hibridará com o ADN humano de SEQ ID NO:1.

Podem ser identificadas variantes possuindo a capacidade requerida para ligação de elk por qualquer ensaio adequado. A actividade biológica de elk-L pode ser determinada, por exemplo, por competição por ligação ao domínio de ligação de ligando de elk (*i.e.* ensaios de ligação competitiva).

Um tipo de um ensaio de ligação competitiva para polipéptidos elk-L usa uma elk-L humana, solúvel, radiomarcada e células intactas que expressam elk na superfície celular. Em vez de células intactas, poderia utilizar-se, em substituição, elk solúvel (como uma proteína de fusão elk/Fc) ligada a uma fase sólida através da interacção de uma Proteína A ou Proteína G com a região Fc da proteína de fusão. Outro tipo de ensaio de ligação competitiva utiliza elk solúvel, radiomarcada, como uma proteína de fusão elk/Fc e células intactas expressando elk-L. Alternativamente, a elk-L solúvel pode ser ligada a uma fase sólida.

Os ensaios de ligação competitiva podem ser realizados utilizando metodologia corrente. Por exemplo, pode ser utilizado elk-L radiomarcado para competir com um possível homólogo de elk-L para ensaio da actividade de ligação contra elk ligada à superfície. Podem ser obtidos resultados qualitativos por ensaios de ligação competitiva em placa autorradiográfica, ou podem ser utilizados gráficos de Scatchard para a geração de resultados quantitativos.

Alternativamente, a elk solúvel pode ser ligada a uma fase sólida como uma matriz de cromatografia em coluna ou a um substrato semelhante para análise da presença de um porção detectável como ^{125}I. A ligação a uma fase sólida pode ser conseguida, por exemplo, por ligação de uma proteína de fusão elk/Fc a uma matriz contendo proteína A ou proteína G.

As características de ligação de elk-L (incluindo variantes) também podem ser determinadas utilizando elk solúvel, conjugada (por exemplo, ^{125}I-elk/Fc) em ensaios de competição semelhantes aos descritos acima. Neste caso, contudo, são utilizadas células que expressam elk-L ou elk-L solúvel ligada a um substrato sólido, para a medição da extensão na qual a amostra contendo a possível variante de elk compete pela ligação a uma elk solúvel, conjugada a elk-L.

A elk-L do presente invento pode ser utilizada num ensaio de ligação para a detecção de células que expressam elk. Por exemplo, elk-L ou um seu domínio extracelular ou fragmento pode ser conjugado com uma porção detectável como ^{125}I. A radiomarcação com ^{125}I pode ser realizada por uma de várias metodologias correntes que originam uma molécula funcional ^{125}I-elk-L marcada para actividade específica elevada. Alternativamente, pode ser utilizada outra porção detectável como um enzima, biotina ou avidina, que pode catalisar uma reacção colorimétrica ou fluorimétrica. As células a testar quanto à expressão de elk podem ser colocadas em contacto com uma elk-L marcada. Após incubação, a elk-L marcada, não ligada, é removida e a ligação é medida usando a porção detectável.

As proteínas ligando de elk aqui descritas também podem ser empregues para a medição da actividade biológica da proteína elk em termos de afinidade de ligação a elk-L. Como ilustração, pode ser empregue elk-L num estudo de afinidade de ligação para a medição da actividade biológica de uma proteína elk que foi armazenada a temperaturas diferentes ou produzida por diferentes tipos celulares. A actividade biológica de uma proteína elk pode, deste modo, ser aferida antes de, por exemplo, ser usada num estudo de investigação.

As proteínas elk-L podem ser utilizadas como reagentes que podem ser empregues por aqueles que conduzem estudos de "garantia de qualidade", *e.g.*, para monitorizar a vida em prateleira e a estabilidade da proteína elk em diferentes condições. Podem ser utilizados ligandos de elk para determinar se a actividade biológica é ou não mantida após modificação de uma proteína elk (*e.g.* modificação química, truncagem, mutação, etc.). A afinidade de ligação de proteína elk modificada por uma elk-L é comparada com a de uma proteína elk não modificada para a detecção de qualquer impacto adverso das modificação sobre a actividade biológica de elk.

Uma utilização diferente de um ligando de elk é como reagente em procedimentos de purificação de proteínas. Elk-L ou proteínas de fusão elk-L/Fc podem ser ligadas a um material de suporte sólido, por técnicas convencionais e utilizadas para a purificação de elk por cromatografia de afinidade.

Os polipéptidos elk-L podem existir como oligómeros, como dímeros ou trímeros. Os oligómeros são ligados por ligações dissulfureto formadas entre resíduos cisteína em diferentes polipéptidos elk-L. Numa concretização do invento, é criado um dímero elk-L por fusão de elk-L com a região Fc de um anticorpo (IgG1) de um modo que não interfere com a ligação de elk-L ao domínio de ligação do ligando de elk. O polipéptido Fc é, preferivelmente, fundido com o terminal C de uma elk-L solúvel (compreendendo apenas o domínio extracelular). Foi descrita a preparação de proteínas de fusão compreendendo polipéptidos heterólogos fundidos com várias porções de polipéptidos derivados de anticorpo (incluindo o domínio Fc), *e.g.*, por Ashkenazi *et al.* (*PNAS USA* 88:10535, 1991) e Byrn *et al.* (*Nature* 344:677, 1990). Um gene de fusão codificando a proteína de fusão elk-L/Fc é inserido num vector de expressão adequado. Deixa-se que as proteínas de fusão se construam, muito à semelhança das moléculas de anticorpo, após o que se formam ligações de dissulfureto intercadeia entre polipéptidos Fc, originando elk-L bivalente. Se as proteínas de fusão forem feitas com ambas as cadeias pesada e leve de um anticorpo é possível formar um oligómero de elk-L com tantas quantas quatro regiões extracelulares de elk-L.

Alternativamente, dois domínios elk-L solúveis podem ser ligados com um péptido ligante como o ligante $Gli_4SerGli_5Ser$ descrito na Patente dos Estados Unidos 5 073 627.

O presente invento proporciona oligómeros de domínios extracelulares de elk-L ou seus fragmentos, ligados por interacções de dissulfureto ou expressos como polímeros de fusão, com ou sem grupos espaçadores de ligação, de aminoácidos. Por exemplo, um dímero do domínio extracelular de elk-L pode ser ligado por um grupo de ligação da região Fc de IgG.

O presente invento proporciona vectores de expressão recombinantes para a expressão de elk-L e as células hospedeiras transformadas com os vectores de expressão. Pode ser empregue qualquer sistema de expressão adequado. Os vectores incluem uma sequência de ADN de elk-L ligada operativamente a sequências nucleotídicas de regulação de transcrição ou de tradução, adequadas, como as que são

derivadas de um gene de mamífero, microbiano, viral ou de insecto. Exemplos de sequências de regulação incluem promotores, operadores ou intensificadores de transcrição, um local de ligação de ARNm ribossómico e sequências adequadas que controlam o início e o término da transcrição e da tradução. As sequências nucleotídicas são ligadas operativamente quando a sequências de regulação se relaciona funcionalmente com a sequência de ADN de elk-L. Deste modo uma sequência nucleotídica promotora é ligada operativamente a uma sequência de ADN de elk-L se a sequência nucleotídica promotora controlar a transcrição da sequências de ADN de elk-L. Podem ser, adicionalmente, incorporadas no vector de expressão, a capacidade de replicação em células hospedeiras desejadas, usualmente conferida por uma origem de replicação e um gene de selecção pelo qual os transformantes são identificados.

Adicionalmente, podem ser incorporadas em vectores de expressão, sequências que codificam péptidos de sinal adequados que não são nativos do gene de elk-L. Por exemplo, uma sequência de ADN de um péptido de sinal (comando de secreção) pode ser fundida em enquadramento com a sequência de elk-L, de modo que elk-L seja inicialmente traduzido como uma proteína de fusão compreendendo o péptido de sinal. Um péptido de sinal que é funcional nas células hospedeiras pretendidas intensifica a secreção extracelular do polipéptido elk-L por secreção de elk-L pela célula. O péptido de sinal é clivado do polipéptido elk-L por segregação de elk-L da célula.

As células hospedeiras adequadas para a expressão de polipéptidos elk-L incluem procariotas, leveduras ou células eucariotas superiores. Os vectores de clonagem e de expressão adequados à utilização com hospedeiros celulares bacterianos, fúngicos, de levedura e mamíferos são descritos, por exemplo, em Pouwels *et al. Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, New York, (1985). Também poderiam ser utilizados sistemas de tradução sem células para a produção de polipéptidos elk-L usando ARN derivados de construções de ADN aqui descritas.

Os procariotas incluem organismos Gram-negativos e Gram-positivos, por exemplo, *E. coli* ou *Bacilli*. Células

procariotas adequadas para transformação incluem, por exemplo, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, e várias outras espécies dos géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces* e *Staphylococcus*. Numa célula hospedeira procariota como *E. coli* um polipéptido elk-L pode incluir um resíduo metionina N-terminal para facilitar a expressão do polipéptido recombinante na célula hospedeira procariota. A Met N-terminal pode ser clivada do polipéptido elk-L recombinante, expresso.

Os vectores de expressão para utilização em células hospedeiras procariotas compreendem, geralmente, um ou mais genes marcadores, fenotípicos, seleccionáveis. Um gene marcador fenotípico, seleccionável, é, por exemplo, um gene que codifica uma proteína que confere resistência a antibióticos ou que proporciona uma necessidade autotrófica. Exemplos de vectores de expressão úteis para células hospedeiras procariotas incluem os derivados de plasmídeos disponíveis comercialmente como o vector de clonagem pBR322 (ATCC 37017). O pBR322 contém genes para resistências a ampicilina e tetraciclina e, deste modo, proporciona um meio simples para a identificação das células transformadas. Um promotor adequado e uma sequência de ADN de elk-L adequados são inseridos no vector pBR322. Outros vectores disponíveis comercialmente incluem, por exemplo, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia) e pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, EUA).

As sequências promotoras usadas comummente para vectores de expressão de células hospedeiras procariotas incluem sistema promotor da β-lactamase (penicilinase), da lactose (Chang *et al.*, *Nature* 275:615, 1978: e Goeddel *et al.*, *Nature* 281:544, 1979), o sistema promotor do triptofano (trp) Goeddel *et al.*, *Nucl. Acids. Res.* 8:4057, 1980; e EP-A-36776) e o promotor tac (Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory, pag 412, 1982). Um sistema de expressão de células hospedeiras procariotas, particularmente útil, emprega um promotor do fago λP_L e uma sequência repressora termolábil cI857ts. Os vectores plasmídicos disponíveis na American Type Culture Collection que incorporam derivados do promotor λP_L incluem o plasmídeo pHUB2 (residente em *E. coli* estirpe JMB9)(ATCC 37092)) e pPLc28 (residente em *E. coli* RRI (ATCC 53082)).

O elk-L pode, alternativamente, ser expresso em células hospedeiras de levedura, preferivelmente do género *Saccharomyces* (*e.g., S. cerevisiae*). Podem, também, ser empregues outros géneros de levedura como *Pichia* ou *Kluyveromyces*. Os vectores de leveduras conterão, frequentemente uma sequência de uma origem de replicação de um plasmídeo de levedura 2μ, uma sequência de replicação autónoma (ARS), uma região promotora, sequências de poliadenilação, sequências de terminação da transcrição e um gene marcador seleccionável. Sequências promotoras adequadas para vectores de levedura incluem, entre outras, promotores para metalotioneina, 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; e Holland *et al., Biochem*, 17:4900, 1978), como enolase, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, hexoquinase, piruvato-descarboxilase, fosfofruto-quinase, glucose-6-fosfato-isomerase, 3-fosfoglicerato-mutase, piruvato-quinase, triosefosfato-isomerase, fosfoglucose-isomerase e glucoquinase. Outros vectores e promotores adequados para utilização em expressão de leveduras são descritos adicionalmente em Hitzeman, EPA-73.657. Outra alternativa é o promotor ADH2 repressível por glucose descrito por Russel *et al.* (*J. Biol. Chem.* 258:2674, 1982) e Beier *et al.* (*Nature* 300:724, 1982). Podem ser construídos vectores vaivém replicáveis tanto em levedura como em *E. coli* por inserção de sequências de ADN de pBR322 para a selecção e replicação em *E. coli* (origem de replicação e gene Amp^r) nos vectores de levedura acima referidos.

A sequência de comando de factor α de levedura pode ser empregue para dirigir a secreção do polipéptido elk-L. A sequência de comando de factor α é, frequentemente, inserida entre a sequência promotora e a sequência estrutural do gene. Ver, *e.g.* Kurjan *et al., Cell* 30:933, 1982; Bitter *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81-5330, 1984; Patente US 4 546 082 e EP 324 274. Outras sequências de comando adequadas para facilitar a secreção de polipéptidos recombinantes de hospedeiros levedura são conhecidas dos peritos na especialidade. Uma sequência de comando pode ser modificada próximo da sua extremidade 3' para conter uma ou mais locais de restrição. Isto facilitará a fusão da sequências de comando com o gene estrutural.

Protocolos de transformação de levedura são conhecidos dos peritos na especialidade. Um desses protocolos é descrito por Hinnen *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929, 1978. O protocolo de Hinnen *et al.* selecciona transformantes Trp^+ num meio selectivo, em que o meio selectivo consiste de 0,67% de base azotada de levedura, 0,5% de casaminoácidos, 2% de glucose, adenina a 10 μg/ml e uracilo a 20 μg/ml.

As células hospedeiras de levedura transformadas por vectores contendo a sequência promotora ADH2 podem ser desenvolvidas para a indução de expressão num meio "rico". Um exemplo de um meio rico é um que consiste em 1% de extracto de levedura, 2% de peptona e 1% de glucose, suplementado com adenina a 80 μg/ml e uracilo a 80 μg/ml. A desrepressão do promotor ADH2 ocorre quando a glucose está exausta no meio.

Também poderiam ser empregues sistemas de cultura de células hospedeiras de mamífero ou de insecto para a expressão de polipéptidos elk-L recombinantes. Sistemas de baculovírus para a produção de proteínas heterólogas em células de insecto são revistos por Luckow e Summers *BiolTechnology* 6:47 (1988). Também podem ser empregues linhas celulares estabelecidas de origem mamífera. Exemplos de linhas celulares hospedeiras mamíferas, adequadas, incluem a linha de células de rim de macaco COS-7 (ATCC CRL 1651) (Gluzman *et al.*, *Cell* 23:175, 1981), células L, células C127, células 3T3 (ATCC CCL 163), células de ovário de criceto chinês (CHO), células HeLa e linhas celulares BHK (ATCC CRL 10) e linha celular CV-1/EBNA-1 derivada de linha celular de rim de macaco verde Africano CV1 (ATCC CCL 70) como descrito por McMahan *et al.* (*EMBO J.* 10:2821, 1991).

Sequências de controlo de transcrição e tradução para vectores de expressão para células hospedeiras mamíferas podem ser excisadas de genomas virais. Sequências promotoras e sequências intensificadoras usadas comummente são derivadas de Poliomavírus, Adenovírus 2, Vírus Símio 40 (SV40) e citomegalovírus humano. Sequências de ADN derivadas do genoma viral de SV40, por exemplo, origem de SV40, promotor precoce e tardio, locais de intensificação de *splicing* e de poliadenilação, podem ser usados para proporcionar outros elementos genéticos para a expressão de uma sequência de gene

estrutural numa célula hospedeira mamífera. Promotores virais precoces e tardios são particularmente úteis porque são, ambos, facilmente obtidos de um genoma viral como um fragmento que pode, também, conter uma origem viral de replicação (Fiers *et al.*, *Nature* 273:113, 1978). Também podem ser utilizados fragmentos maiores ou menores de SV40, desde que seja incluída a sequência de aproximadamente 250 pb que se prolonga do local *Hind* III na direcção do local *Bgl* I localizada na origem do local de replicação viral de SV40.

Os vectores de expressão exemplificativos para utilização em células hospedeiras mamíferas podem ser construídos como descrito por Okayama e Berg (*Mol. Cell. Biol.* 3:280, 1983). Um sistema útil para expressão estável, de nível elevado, de ADNc de mamífero em células epiteliais mamárias C 127 de murino podem ser construído substancialmente como descrito por Cosmam *et al.* (*Mol. Immunol.* 23:935, 1986). Um vector de expressão elevada, útil, PMLSV N1/N4, descrito por Cosman *et al.*, *Nature* 312:768, 1984 foi depositado como ATCC 39890. Vectores de expressão, mamíferos, úteis, adicionais, são descritos em EP-A-0367566 e na Publicação PCT WO91/18982. Os vectores podem ser derivados de retrovírus. Em vez da sequência de sinal nativa, pode ser adicionada uma sequência heteróloga de sinal, como a sequência de sinal da interleucina-7 (IL-7) descrita na Patente dos Estados Unidos 4 965 195; a sequência de sinal do receptor da interleucina-2 descrita por Cosman *et al.*, *Nature* 312:768 (1984); o péptido de sinal da interleucina-4 descrito em EP 367 566; o péptido sinal do receptor de interleucina-1 de tipo I descrito na Patente US 4 968 607; e o péptido sinal do receptor de interleucina-1 de tipo II descrito em EP 460 846.

O presente invento proporciona a proteína elk-L substancialmente homogénea, que pode ser produzida por sistemas de expressão recombinantes como descrito acima ou purificada a partir de células de ocorrência natural. A elk-L é purificada até à homogeneidade substancial, tal como indicado por uma banda única de proteína por análise em electroforese em SDS-gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Um processo para a produção da proteína elk-L compreende a cultura de uma célula hospedeira transformada com um vector

de expressão compreendendo uma sequência de ADN que codifica elk-L em condições tais que elk-L é expressa. A proteína elk-L é, então recuperada do meio de cultura dos extractos celulares, dependendo do sistema de expressão empregue. Como o perito na arte reconhecerá, os procedimentos para a purificação de elk-L recombinante variarão de acordo com factores tais como tipo de células hospedeiras empregues e se elk-L é ou não segregada para o meio de cultura.

Por exemplo, quando os sistemas de expressão que segregam a proteína recombinante são empregues, o meio de cultura pode, primeiro, ser concentrado usando um filtro de concentração de proteínas, disponível comercialmente, por exemplo, uma unidade de ultrafiltração Amicon ou Millipore Pellicon. A seguir ao passo de concentração, o concentrado pode ser aplicado a uma matriz de purificação como um meio de filtração em gel. Alternativamente, pode ser empregue uma resina de permuta aniónica, por exemplo, uma matriz ou substrato com grupos dietilaminoetilo (DEAE) pendentes. As matrizes podem se acrilamida, agarose, dextrano, celulose ou outros tipos comummente empregues em purificação de proteínas. Alternativamente, pode ser empregue um passo de permuta catiónica. Permutadores de catiões adequados incluem várias matrizes insolúveis compreendendo grupos sulfopropilo ou carboximetilo. São preferidos grupos sulfopropilo. Finalmente, podem ser empregues um ou mais passos de cromatografia líquida de alto desempenho, de fase inversa, (RP-HPLC) empregando meios de RP-HPLC hidrófobos (*e.g.*, sílica-gel com grupos metilo ou outros grupos alifáticos pendentes) para a purificação adicional de elk-L. Alguns ou todos os passos anteriores de purificação, em várias combinações podem ser empregues para proporcionar uma proteína recombinante substancialmente homogénea.

Também é possível utilizar uma coluna de afinidade compreendendo o domínio de ligação a ligante de elk para purificar por afinidade polipéptidos elk-L expressos. Os polipéptidos elk-L podem ser removidos de uma coluna de afinidade com um tampão de eluição de alto teor salino e, depois, dialisados para um tampão de baixo teor salino para utilização. Alternativamente, a coluna de afinidade pode compreender um anticorpo que se liga a elk-L. O Exemplo 4

descreve um procedimento para utilização da proteína elk-L do presente invento para a geração de anticorpos monoclonais dirigidos contra elk-L.

A proteína recombinante produzida em cultura bacteriana é usualmente isolada por rompimento inicial das células hospedeiras, centrifugação, extracção das peletes celulares se for um polipéptido insolúvel ou do fluido sobrenadante se for um polipéptido solúvel, seguindo-se um ou mais passos de concentração, *salting-out*, permuta iónica, purificação por passos de cromatografia de afinidade ou de exclusão por tamanhos. Finalmente pode ser empregue RP-HPLC para passos de purificação final. As células microbianas podem ser rompidas por qualquer método conveniente, incluindo ciclos de congelação-descongelação, ultra-sons, ruptura mecânica ou a utilização de agentes de lise celular.

As células hospedeiras de levedura transformadas são empregues, preferivelmente, para a expressão de elk-L como um polipéptido segregado. Isto simplifica a purificação. Polipéptido recombinante segregado de uma fermentação de célula hospedeira de levedura pode ser purificado por métodos análogos aos descritos por Urdal *et al.* (*J. Chromatog.* 296:171, 1984). Urdal *et al.* descrevem dois passos de purificação sequenciais de HPLC de fase inversa para a purificação de IL-2 humana, recombinante, numa coluna de HPLC preparativa.

Fragmentos de Ácido Nucleico

É descrita, adicionalmente, a utilização de uma molécula de ácido nucleico isolada compreendendo uma sequência de pelo menos 14 nucleótidos da sequências nucleotídica de SEQ ID NO:1 ou o seu ADN ou ARN complementar para o isolamento ou detecção de um ARN ou ADN de elk-L, ou para o bloqueio da expressão de proteínas elk-L. Esses fragmentos compreendem pelo menos cerca de 14 nucleótidos da sequência apresentada em SEQ ID NO:1. Os complementos de ADN e ARN dos referidos fragmentos são aqui descritos, em conjunto com as formas de cadeia simples e de cadeia dupla do ADN de elk-L.

De entre os usos desses fragmentos de ácido nucleico de elk-L está a utilização como sonda. Essas sondas podem ser empregues em procedimentos de hibridação cruzada entre espécies para o isolamento de ADN de elk-L de espécies mamíferas adicionais. Como exemplo, pode ser empregue uma sonda correspondente ao domínio extracelular de elk-L. As sondas também podem ser usadas na detecção da presença de ácidos nucleicos de elk-L em ensaios *in vitro* e em procedimentos como transferências de *Northern* e de *Southern*. Podem ser identificados tipos celulares que expressam elk-L. Estes procedimentos são bem conhecidos e o perito na arte pode escolher uma sonda de comprimento adequado, dependendo da aplicação particular pretendida.

Outros fragmentos úteis dos ácidos nucleicos de elk-L são oligonucleótidos de sentido directo e sem sentido compreendendo uma sequência de ácido nucleico de cadeia única (seja ARN ou ADN) capaz de se ligar a sequências alvo de ARNm de elk-L (de sentido directo) ou de ADN de elk-L (anti-sentido) alvo. Oligonucleótidos contra-sentido ou de sentido directo, de acordo com o presente invento, compreendem um fragmento da região de codificação de ADN de elk-L. Um destes fragmentos compreende pelo menos cerca de 14 nucleótidos, preferivelmente de cerca de 14 a cerca de 30 nucleótidos. A capacidade de criar um oligonucleótido anti-sentido ou de sentido directo, com base numa sequência de ADNc para uma dada proteína é descrito em, por exemplo, Stein e Cohen, *Cancer Res.* 48:2659, 1988 e van der Krol *et al.*, *BioTechniques* 6:958, 1988.

A ligação de oligonucleótidos anti-sentido ou de sentido directo a sequências de ácido nucleico alvo resulta na formação de dúplices que bloqueiam a tradução (ARN) ou tradução (ADN) por um de vários modos, incluindo degradação melhorada das dúplices, terminação prematura da transcrição ou tradução ou por outro modo. Os oligonucleótidos anti-sentido podem, deste modo, ser utilizados para o bloqueio da expressão de proteínas elk-L. Oligonucleótidos anti-sentido ou de sentido directo compreendem, adicionalmente, oligonucleótidos com estruturas açúcar-fosfodiéster modificadas (ou outras ligações açúcar, como as descritas em WO91/06629) e em que as ligações açúcar são resistentes a nucleases endógenas. Esses

oligonucleótidos com ligações açúcar resistentes são estáveis *in vivo* (i.e., capazes de resistir a degradação enzimática), mas mantêm a especificidade de sequência para serem capazes de se ligarem a sequências nucleotídicas alvo. Outros exemplos de oligonucleótidos de sentido directo ou anti-sentido incluem os nucleótidos que são ligados covalentemente a porções orgânicas como as descritas em WO90/10448 e outras porções que aumentam a afinidade do oligonucleótido por uma sequências alvo de ácidos nucleicos como poli-(L-lisina). Para além disso, podem ser ligados aos oligonucleótidos de sentido directo e anti-sentido agentes intercalares, como elipticina e agentes alquilantes ou complexos metálicos, para a modificação das especificidades de ligação do oligonucleótido anti-sentido ou de sentido directo para a sequência nucleotídica alvo.

Os oligonucleótidos anti-sentido e de sentido directo podem ser introduzidos numa célula contendo a sequência de ácido nucleico alvo por qualquer método de transferência de genes, incluindo, por exemplo, transfecção de ADN mediada por $CaPo_4$, electroporação ou por utilização de vectores de transferência de gene como vírus de Epstein-Barr. Os oligonucleótidos anti-sentido e de sentido directo são, preferivelmente, introduzidos numa célula contendo a sequência de ácido nucleico alvo por inserção do oligonucleótido anti-sentido ou de sentido directo num vector retroviral adequado, depois, fazer contactar a célula com o vector retrovírus contendo a sequência inserida, seja *in vivo* seja *ex vivo*. Vectores retrovirais adequados incluem, mas não lhes estão limitados, o retrovírus murino M-MuLV, N2 (um retrovírus derivado de M-MuLV) ou os vectores de cópia dupla designados por DCT5A, DCT5B e DCT5C (ver pedido PCT US90/02656 = WO90/13641).

Também podem ser introduzidos oligonucleótidos de sentido directo ou anti-sentido numa célula contendo a sequência nucleotídica alvo por formação de um conjugado com uma molécula de ligação a ligando, como descrito em WO91/04753. Moléculas de ligação a ligando, adequadas, incluem, mas sem lhes estarem limitadas, receptores da superfície celular, factores de crescimento, outras citoquinas ou outros ligandos que se ligam a receptores da superfície celular. Preferivelmente, a conjugação da molécula de ligação a ligando

não interfere substancialmente com a capacidade da molécula de ligação a ligando para ligar a sua molécula correspondente ou receptor ou bloquear a entrada do oligonucleótido anti-sentido ou de sentido directo ou a sua versão conjugada numa célula.

Alternativamente, pode ser introduzido um oligonucleótido de sentido directo ou anti-sentido numa célula contendo a sequência de ácido nucleico alvo por formação de um complexo oligonucleótido-lípido como descrito em WO90/10448. O complexo lípido/oligonucleótido de sentido directo ou anti-sentido é, preferivelmente dissociado na célula por uma lipase endógena.

Os exemplos seguintes são proporcionados para a ilustração de concretizações particulares e não para limitarem o âmbito do invento.

EXEMPLO 1
Preparação de Proteína de Fusão elk/Fc

Este exemplo descreve a construção de um vector de expressão codificando um proteína de fusão elk/Fc solúvel, para utilização na detecção de clones de ADNc que codificam um ligando de elk (elk-L). Um ADN e a sequência de aminoácidos codificada para ADNc de elk de rato é apresentada em Lhotak *et al.* (*Mol. Cell. Biol.* 11:2496, 1991), aqui incorporada por referência. A proteína elk de rato tem um domínio extracelular de 538 aminoácidos, um domínio transmembranar de 25 aminoácidos e um domínio citoplasmático de 419 aminoácidos.

Um fragmento de ADNc de elk de rato foi fundido com o terminal N do ADNc que codifica a porção Fc de um anticorpo IgG1 humano. O ADNc de elk de rato foi obtido junto de T. Pawson (Samuel Lunenfeld Research Institute, Mt. Sinai Hospital, Toronto). Foi introduzido um local de clivagem por endonuclease de restrição Asp718 a montante da região de codificação de elk. Foi isolado um fragmento Asp718-BglII de ADNc de elk de rato (compreendendo a totalidade do domínio extracelular, a região transmembranar e uma pequena porção do domínio citoplasmático).

Foi clonado ADN codificando um polipéptido de cadeia simples, compreendendo a região Fc de um anticorpo de IgG1

humano no local *Spe*I do vector pBLUESCRIPT SK®, que está disponível comercialmente em Stratagene Cloning Systems, La Jolla, California. Este vector plasmídeo é replicável em *E. coli* e contém um segmento poliligante que inclui 21 locais de restrição únicos. Foi introduzido próximo da extremidade 5' da sequência de codificação de Fc um local *Bgl*II único de modo o local BglII engloba os codões dos aminoácidos três e quatro do polipéptido Fc.

O polipéptido Fc codificado prolonga-se da região charneira do terminal N até ao terminal C nativo, *i.e.*, é uma região Fc de anticorpo essencialmente completa. Fragmentos de regiões Fc, *e.g.*, as que são truncadas na extremidade do terminal C, também podem ser empregues. Os fragmentos contêm, preferivelmente, múltiplos resíduos cisteína (pelo menos os resíduos cisteína na região charneira) para permitir a formação de ligações dissulfureto intercadeia entre as porções do polipéptido Fc de duas proteínas de fusão elk/Fc, formando dímeros como discutido acima.

O fragmento Asp718-BglII de ADNc de elk, descrito acima foi clonado no vector pBLUESCRIPT SK® contendo o ADNc de Fc, de modo que o ADNc de elk fique posicionado a montante do ADNc de Fc. ADNc de cadeia simples, derivado do gene de fusão resultante foi mutado pelo método descrito em Kunkel (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488, 1985) e Kunkel *et al.* (*Methods in Enzymol.* 154-367, 1987) de modo a fundir perfeitamente a totalidade do domínio extracelular de elk com a sequência Fc. O ADN mutado foi sequenciado para confirmação de que os nucleótidos adequados tinham sido removidos (i.e. o ADN da região transmembranar e do domínio citoplasmático parcial tinha sido eliminado) e que as sequências de elk e Fc estavam na mesma estrutura de leitura. O ADNc de fusão foi, então, excisado e inserido num vector de expressão de mamífero designado por pCAV/DHFR. O vector pCAV/DHFR é semelhante ao pCAV/NOT descrito no pedido PCT W090/05183, mas contém adicionalmente um gene de di-hidrofolato-reductase (DHFR) como um marcador seleccionável. O gene de DHFR confere uma vantagem selectiva a célula mamíferas que são $DHFR^-$ que incorporaram o vector, quando desenvolvidas na presença de metotrexato (MTX).

As proteínas de fusão elk/Fc são, preferivelmente, sintetizadas em cultura de células mamíferas recombinantes. O vector de expressão contendo a fusão elk/Fc foi transfectado em células CV-1 (ATCC CCL 70) e células COS-7 (ATCC CRL 1651), ambas derivadas de rim de macaco. O nível de expressão da proteína de fusão elk/Fc era relativamente baixo tanto nas células CV-1 como nas COS-7. Deste modo, foi tentada a expressão em células 293 (células primárias de rim embrionário humano, transformadas, ATCC CRL 1573).

A fusão de gene de elk-Fc foi inserida num vector de expressão mamífero designado por HAV-EO (Dower *et al.*, *J. Immunol.* 142:4314, 1989) As células 293 transfectadas com o vector HAV-EO/elk/Fc foram cultivadas em balões rotativos para permitir a expressão transiente da proteína de fusão, que é segregada para o meio de cultura *via* péptido de sinal de elk. A proteína de fusão foi purificada em colunas de proteína A-Sepharose, eluídas, e utilizadas para testar células quanto à capacidade de ligarem a proteína elk/Fc como descrito nos exemplos 2 e 3.

EXEMPLO 2
Pesquisa de células quanto a ligação a elk/Fc

Foram pesquisados vários tipos celulares quanto à capacidade de se ligarem a elk/Fc, para a identificação de tipos celulares candidatos úteis como fontes de ácido nucleico, numa tentativa de clonar um ligando de elk. A proteína elk/Fc, recombinante de rato produzida e purificada no Exemplo 1 foi radiomarcada utilizando um reagente de radio-iodação Enzymobead (BioRad) disponível comercialmente de acordo com as intrusões do fabricante. A proteína ^{125}I-elk/Fc não mostrou ligação específica a qualquer uma das várias linhas celulares testadas. Preocupação de que a marcação directa da proteína elk/Fc com Na^{125}I tivesse resultado numa perda de actividade biológica levou ao desenvolvimento de um ensaio de ligação em dois passos.

O ensaio de ligação em dois passos envolveu a incubação de células com elk/Fc não radiomarcado seguindo-se ^{125}I-anticorpo de ratinho anti-Fc humano. Este último anticorpo

ligar-se-á à porção Fc de qualquer proteína de fusão elk/Fc que se tinha ligado às células.

O anticorpo de ratinho anti-humano foi obtido em Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., West Grove, PA. Este anticorpo mostrou ligação mínima a proteínas Fc ligadas ao receptor FCγ. O anticorpo foi marcado usando o método da cloramina T. Resumidamente, foi preparada uma coluna P6 de acordo com as instruções do fabricante. Num tubo de microcentrífuga, foram dissolvidos 10 μg do anticorpo em 10μl de PBS. Foram adicionados 2000 μCi de $Na^{125}I$, isento de transportador, e a solução foi bem misturada. Foram, então adicionados 15 μl de uma solução recém-preparada de cloramina T (32 μg/ml em tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,2) e a mistura foi incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente. A mistura foi aplicada imediatamente à coluna P6. O anticorpo radiomarcado foi, então, eluído da coluna por recolha de fracções de 100-150 μl do eluído. Foram adicionados meios de ligação (RPMI 1640 contendo 25 mg/ml de albumina de soro bovino, 2mg/ml de azida de sódio, Hepes 20 mM, pH7,2) às fracções de pico para levar o volume total de cada fracção a 2 ml. A radio-iodação originou actividades específicas na gama de $5-10x10^{15}$ cpm/mmol de proteína.

O procedimento de pesquisa foi o seguinte. Foram cultivadas aproximadamente $2x10^{6}$ células em placas de 96 poços. Foram adicionados a cada poço 150 μl de meio de ligação e as células foram, então, incubadas na presença ou ausência de elk/Fc durante 1 hora a 37°C com agitação suave. As células foram sedimentadas da mistura por centrifugação das placas de 96 poços, lavadas com PBS, centrifugadas de novo e ressuspensas em meio de ligação. As células foram então incubadas com ^{125}I-anticorpo Fc de ratinho anti-humano, preparado como descrito acima, durante 1 hora a 37°C. As células foram, também incubadas com ^{125}I-anticorpo Fc de ratinho anti-humano na presença de excesso de anticorpo Fc anti-humano não marcado como um controlo negativo. Depois de uma incubação de uma hora com o ^{125}I-anticorpo, as células e o ^{125}I-anticorpo não ligado foram separados pelo método de separação de óleo do ftalato, essencialmente como descrito por Dower *et al.*, *J. Immunol.* 132:751, 1984. O ^{125}I-anticorpo

ligado às células e livre foi quantificado num contador Packard Autogamma. No se encontraram neste ensaio quaisquer tipos celulares que ligassem elk/Fc.

As células, incluindo os tipos celulares adicionais ainda não pesquisados, foram ensaiadas quanto a elk/Fc através de um terceiro procedimento. As células foram incubadas com elk/Fc seguindo-se um anticorpo Fc anti-humano biotinilado, seguindo-se estreptavidina-ficoeritrina (Becton Dickinson). O anticorpo biotinilado foi comprado em Jackson Immunoresearch Laboratories. A estreptavidina liga-se à molécula de biotina ligada ao anticorpo Fc anti-humano, que, por sua vez, se liga à porção Fc da proteína de fusão elk/Fc. A ficoeritrina é uma ficobiliproteína fluorescente que actua como uma etiqueta detectável. O nível de sinal de fluorescência foi medido para cada tipo celular usando um citómetro de fluxo FACScan® (Becton Dickinson).

As células pesquisadas quanto à capacidade de ligar elk/Fc por pelo menos um dos três procedimentos descritos acima, incluíram aproximadamente 30 tipos celulares diferentes classificados nas seguintes categorias gerais: células primárias de cérebro de murino fetal, linhas celulares de fígado de murino fetal, linhas celulares de cérebro de murino fetal e linhas celulares de carcinoma de pulmão humano (fibroblastóide). Não foram identificadas quaisquer linhas celulares consideradas positivas para ligação a elk/Fc.

EXEMPLO 3
Isolamento de ADNc de ligando de elk de uma biblioteca de ADNc de placenta humana

Nenhum dos tipos celulares ensaiados no Exemplo 2 exibia ligação detectável de elk/Fc. Foi escolhida um biblioteca de ADNc de placenta humana como uma fonte possível de ADNc de ligando de elk, uma vez que o tecido de placenta é rico em factores de crescimento e de diferenciação. Tal como discutido acima, é provável que o ligando de elk desempenhe um papel no crescimento, sobrevivência e diferenciação de células que exprimem elk (o receptor correspondente). Contudo, o facto de a placenta ser relativamente rica em receptores de Fc colocou

um problema potencial para a tentativa de clonagem, uma vez que foi usada uma fusão elk/Fc para testar os clones.

Foi preparada uma biblioteca de ADNc de placenta humana no plasmídeo pDC302 como descrito em Larsen *et al.* (*J. Exp. Med.*, 172:1559, 1990). pDC302 é um vector de expressão mamífero que também se replica em *E. coli* (Mosley *et al.*, *Cell* 59:335, 1989) Resumidamente o ADNc de placenta foi clonado no local *Bgl*II de pDC302 por um método de adaptador semelhante ao descrito por Haymerle *et al.* (*Nucl. Acids Res.* 14:8615, 1986).

Plaquearam-se células de *E. coli* estirpe DH5α, transfectadas com a biblioteca de ADNc de placenta em pDC302 para serem proporcionadas aproximadamente 500 colónias por placa. As colónias foram raspadas de cada placa, reunidas e foi preparado ADN de plasmídeo de cada conjunto. O ADN reunido representando cerca de 2000 colónias foi, então usado para transfectar uma camada subconfluente de células CV-1/EBNA-1 usando DEAE-dextrano seguindo-se por tratamento com cloroquina, semelhante ao descrito por Luthman *et al.*, *Nucl Acids Res.* 11:1295, 1983) e McCutchan *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.* 41:351, 1986). A linha celular CV-1/EBNA-1 (ATCC CRL 10478) exprime constitutivamente o antigénio nuclear-1 de EBV do intensificador precoce/promotor intermediário de CMV. O CV-1-EBNA-1 foi derivado da linha celular CV-1 de rim de Macaco Verde Africano (ATCC CCL70) como descrito por McMahan *et al.* (*EMBO J.* 10:2821, 1991).

De modo a transfectar as células CV-1/EBNA-1 com a biblioteca de ADNc, as células foram mantidas em meio completo (meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) contendo 10% (v/v) de soro de bovino fetal (FCS), 50 U/ml penicilina, 50 U/ml de estreptomicina, glutamina 2 mM) e foram plaqueadas a uma densidade de $2x10^5$ células/poço em lâminas com um poço (Lab-Tek). As lâminas foram pré-tratadas com 1 ml de fibronectina humana (10 µg/ml em PBS) durante 30 minutos, seguindo-se 1 lavagem com PBS. O meio foi removido da camada celular aderente e foi substituído por 1,5 ml de meio completo contendo sulfato de cloroquina 66,6 µM. Foram, então, adicionados 2 ml de solução de ADN (2 µg de ADN, DEAE-dextrano 0,5 mg/ml em meio completo contendo cloroquina) às células e foram incubadas durante 5 horas. A seguir à incubação, os

meios foram removidos e as células submetidas a choque por adição de meio completo contendo 10% de DMSO durante de 2,5 a 20 minutos, seguindo-se a substituição da solução com meio completo fresco. As células foram cultivadas durante 2 a 3 dias para permitir a expressão transiente das sequências inseridas.

As monocamadas de células CV-1/EBNA-1 transfectadas foram ensaiadas quanto à expressão de elk-L por autorradiografia em placa essencialmente como descrito por Gearing *et al.* (*EMBO J.* 8:3667, 1989). A células CV-1/EBNA-1 transfectadas (que tinham aderido às lâminas) foram lavadas uma vez com meio de ligação com leite em pó magro (BM-NFDM) (meio RPMI 1640 contendo 25 mg/ml de albumina de soro bovino (BSA), 2mg/ml de azida de sódio, HEPES 20 mM, pH7,2 e 50 mg/ml de leite em pó magro). As células foram incubadas com elk/Fc em BM-NFDM (1μg/ml) durante 1 hora à temperatura ambiente. Após a incubação, as monocamadas de células nas lâminas com câmaras foram lavadas três vezes com BM-NFDM para a remoção da proteína de fusão elk/Fc não ligada e, depois, foram incubadas com 40 ng/ml de ^{125}I-anticorpo Fc anti-humano preparado no Exemplo 2 (uma diluição de 1:50) durante 1 hora à temperatura ambiente. As células foram lavadas três vezes com BM-NFDM, seguindo-se duas lavagens com solução salina tamponada com fosfato (PBS) para a remoção do ^{125}I-anticorpo Fc de ratinho anti-humano. As células foram fixadas por incubação durante 30 minutos à temperatura ambiente com 2,5% de glutaraldeído em PBS, pH 7,3, lavadas duas vezes em PBS e secas ao ar. As lâminas com câmaras contendo as células foram expostas num Phophorimager (Molecular Dynamics) durante a noite e depois, mergulhadas em emulsão fotográfica Kodak GTNB-2 (diluição de 6 x em água) e foram expostas no escuro durante 3-5 dias a 4°C numa caixa a prova de luz. As lâminas foram, depois, reveladas durante aproximadamente 4 minutos em revelador Kodak D19 (40g/500 ml água), enxaguados em água e foram fixadas com fixador Agfa G433C. As lâminas foram examinadas individualmente com um microscópio a uma ampliação de 25-40x e as células positivas expressando elk-L foram identificadas pela presença de grãos de prata autorradiográficos sobre um fundo claro.

Utilizando a abordagem de autorradiografia em placa foram testados aproximadamente 300.000 ADNc em conjuntos de

aproximadamente 2000 ADNc até o ensaio de um conjunto transfectante mostrar células múltiplas claramente positivas quanto à ligação de elk/Fc. Este conjunto foi, então, subdividido em conjuntos de 500 e, de novo, testado por autorradiografia em lâmina, tendo sido identificado um conjunto positivo. Foram testadas colónias individuais deste conjunto de 500 até ter sido identificada uma única colónia (clone #E7) que dirigia a síntese de uma proteína de superfície com actividade detectável de ligação de elk/Fc. Este clone e a sua inserção de ADNc foi sequenciada.

As sequências nucleotídicas e de aminoácidos codificadas da região de codificação do ADNc do ligando de elk humano do clone E7 são apresentadas em SEQ ID NO:1 e 2. A inserção de ADNc tem comprimento de 2111 pb. Existem três estruturas de leitura de tamanho razoável nesta sequência que poderiam codificar proteínas com 82, 85 e 346 aminoácidos. Destas três, as duas estruturas de leitura abertas, mais pequenas, não possuíam bons codões de iniciação de tradução bem como uma sequência de sinal. Deste modo, são apresentadas as sequências de ADN e a de aminoácidos codificada para a estrutura de leitura, aberta, de 346 aminoácidos nas SEQ ID NO:1 e 2. A proteína da SEQ ID NO:2 é uma proteína transmembranar do tipo I, com um péptido de sinal N-terminal (aminoácidos -24 a -1), um domínio extracelular (aminoácidos 1-213), um domínio transmembranar (aminoácidos 214-241) e um domínio citoplasmático (aminoácidos 242-322). A massa molecular prevista para a proteína nativa após clivagem da sequência de sinal é de 35 180 daltons. A proteína madura tem um pI estimado de 9,006. Existem 307 pb de sequência não codificante a 5' e 763 pb de sequência não codificante a 3' flanqueando a região de codificação.

O ADNc de elk-L humano foi excisado do clone E7 por digestão com *Bsu*361 (que cliva a jusante do codão de paragem), seguindo-se o tratamento com fragmento de Klenow para tornar lisa a extremidade digerida com *Bsu*361, seguindo-se digestão com *Sma*I (que cliva a montante do codão de iniciação e gera extremidades lisas). O ADNc excisado, que inclui a totalidade da região de codificação, foi clonado no local *Sma*I(no local de clonagem múltiplo) de pBLUESCRIPT® SK(-) (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA). O vector resultante (designado

por tele7 em pBLUESCRIPT SK(-)) em células *E. coli* DH5α foi depositado junto de American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA (ATCC) em 9 de Outubro de 1992 e foi-lhe atribuído o número de acesso ATCC 69085. O depósito foi feito nos termos do Tratado de Budapeste.

EXEMPLO 4
Anticorpos Monoclonais para elk-L

Este exemplo ilustra a preparação de anticorpos monoclonais para elk-L. O elk-L é expresso em células hospedeiras mamíferas como células COS-7 ou CV-1/EBNA-1 e é purificado usando cromatografia de afinidade para elk/Fc. O elk-L purificado (ou um seu fragmento, como o domínio extracelular) pode ser usado para gerar anticorpos monoclonais contra elk-L usando técnicas convencionais, por exemplo, as técnicas descritas na Patente US 4 411 993. Resumidamente, são imunizados ratinhos com elk-L como imunogénio, emulsionado em adjuvante de Freund completo, e são injectadas subcutânea ou intraperitonealmente, quantidades que variam entre 10-100 μg. Dez a doze dias depois os animais imunizados são alvo de um reforço com elk-L adicional emulsionada em adjuvante de Freund incompleto. Os ratinhos são, posteriormente, alvo de reforço periódico de acordo com um protocolo semanal ou bissemanal. São colhidas, periodicamente, amostras de soro por sangramento retro-orbital ou excisão da extremidade da cauda para teste por ensaios de transferência pontual ("*dot blot*") ou ELISA (ensaio imunossorvente com enzima ligada), quanto a anticorpos elk-L.

Depois da detecção de um título de anticorpos adequado, aos animais positivos é proporcionada uma última injecção intravenosa de elk-L em solução salina. Três a quatro dias mais tarde, os animais são sacrificados, as células do baço são recolhidas e as células do baço são fundidas com um linha celular de mieloma, *e.g.* NS1 ou, preferivelmente P3x63Ag8.653 (ATCC CRL 1580). As fusões geram células de hibridoma, que são plaqueadas em placas de microtitulação múltiplas num meio HAT (hipoxantina, aminopterina e timidina) selectivo para a inibição da proliferação de células não fundidas, híbridos de mieloma e híbridos de células do baço.

As células de hibridoma são testadas por ELISA quanto a reactividade contra elk-L purificada por adaptações das técnicas descritas em Engvall *et al.*, *Immunochem* 8:871, 1971 e na Patente US 4 703 004. Uma técnica de teste preferida consiste na técnica de captura de anticorpo descrita por Beckmann *et al.*, (*J. Immunol.* 144:4212, 1990). As células de hibridoma positivas podem ser injectadas intraperitonealmente em ratinhos BALB/c singénicos para a produção de ascites contendo concentrações elevadas de anticorpos monoclonais anti-elk-L. Alternativamente, as células de hibridoma podem ser desenvolvidas *in vitro* em frascos ou garrafas rotativas por várias técnicas. Os anticorpos monoclonais produzidos em ascite de ratinho podem ser purificados por precipitação por sulfato de amónio, seguindo-se cromatografia de exclusão em gel. Alternativamente, a cromatografia de afinidade com base na ligação de anticorpo ou proteína A ou proteína G também pode ser utilizada, tal como pode ser a cromatografia de afinidade com base na ligação de elk-L.

EXEMPLO 5
Análises por transferência de *Northern*

Para investigação da expressão de elk-L em vários tecidos, uma transferência de *Northern* de tecido humano que continha 2 μg de poli A+ARNm de uma variedade de tecidos (disponível em Clonetech, Palo Alto, CA) foi sondada com uma ribo-sonda de elk-L. As sequências de não codificação 5' e 3' foram removidas do ADNc do ligando de elk por digestão com SmaI e BsuI e inserção da região de codificação no vector pBluescript SK(-) (Stratagene Cloning Systems, LaJolla, CA). Foi preparada uma ribo-sonda por corte do ADNc de elk-L com SfiI e usando o promotor de ARN-polimerase T3 para transcrever os 450 nucleótidos mais próximos de 3' da sequência de codificação de elk-L. A transferência foi hibridada com a ribo-sonda a 63°C, depois foi lavada, primeiro com 1X SSC/SDS a 0,1% durante 1 hora a 68°C, depois com 0,1X SSC/SDS a 0,1% durante 30 minutos a 68°C. A transferência foi exposta a película de raios X a -70° durante 11 dias, integrada em sanduíche entre dois ecrãs de intensificação. Foi observada uma mensagem principal de 3,5 kb no coração, placenta, pulmão, fígado, músculo esquelético, rim e pâncreas.

O ARNm de elk-L não estava presente em níveis detectáveis em cérebro total de adulto, mesmo tendo em conta que o cérebro e os testículos são os únicos tecidos referidos como expressando o receptor elk (Lhotak *et al.*, *supra*). É possível que a expressão no cérebro seja a níveis muito baixos ou seja limitada a região(regiões) distinta(s) e, consequentemente, não tenha sido detectada pela técnica anterior. Para investigação adicional sobre este tecido, foram sondados com ADN de elk-L cérebros dissecadas de ratos com 8 dias e de adultos. Parece que elk-L é expressa no cérebro em desenvolvimento da rato, sendo o nível de expressão mais elevado no bolbo olfactivo. A expressão de elk-L no bolbo olfactivo parece continuar na idade adulta. Curiosamente, o bolbo olfactivo regenera-se activamente durante toda a vida do animal, em contraste com o resto do cérebro.

Uma segunda transferência de *Northern* revelou que a expressão de ARNm de elk-L é supra-regulada por TNF em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC). Mostrou-se que o ARNm de B61 em HUVEC é indutível por tratamento das células com IL-1 ou TNF (Holtzman *et al.*, *supra*). Tendo em conta o grau de homologia entre elk-L e B61, uma transferência de *Northern* de ARNm de HUVEC (de células em repouso ou de células induzidas com TNF) foi sondada com a ribo-sonda de elk-L descrita acima. A espécie principal de 3,5 kb encontrada noutros tecidos foi induzida especificamente a seguir ao tratamento com TNF.

EXEMPLO 6
Análise por Transferência de *Southern*

A presença de ADN de elk-L em várias espécies foi investigada como se segue. Uma transferência consistindo em ADN digeridos com EcoRI de uma variedade de espécies (Clonetech, Palo Alto, CA.) foi pré-hibridada a 63°C em tampão de pré-hibridação. A transferência foi então sondada com uma sonda do clone E7 iniciada aleatoriamente (correspondente à totalidade da região de codificação de elk-L) e foi lavada até um rigor elevado. (1X SSC/SDS a 0,1% durante 60 minutos a 63°C), depois 0,1X SSC/SDS a 0,1% a 63°C durante 30 minutos). A imagem da transferência foi revelada num Phosphorimager (Molecular Dynamics). Verificou-se que o gene era muito

conservado numa grande variedade de espécies, incluindo macaco, rato, cão, vaca, coelho, galinha e mesmo levedura.

EXEMPLO 7:
Estudo de ligação

Para examinar a ligação de elk-L ao receptor elk, foi concebida uma análise de Scatchard indirecta, modificada. Este ensaio indirecto foi necessário porque a radiomarcação directa de elk/Fc inactivava a especificidade de ligação desta proteína. O procedimento de ensaio foi o seguinte.

Células CV1-EBNA-1 (descritas no Exemplo 3) em placas de 12 poços ($2,5x10^5$ células/poço) foram transfectadas com um vector de expressão contendo o clone E7 de ADNc de elk-L. As células transfectadas foram cultivadas durante dois dias para permitir a expressão da proteína elk-L, foi depois lavada com BM-NFDM (o meio de ligação descrito no Exemplo 2, contendo, também 50 mg/ml de leite magro em pó) e foram incubadas com várias concentrações de proteína de fusão elk/Fc preparada no Exemplo 1, durante 1 hora a 37°C. Subsequentemente, as células foram lavadas e incubadas com uma saturação constante do anticorpo IgG de ratinho anti-humano marcado com ^{125}I, preparado no Exemplo 2 (40 ng/ml) em meio de ligação, com agitação suave, durante 1 hora a 37°C. As células foram, então, colhidas por tripsinação. As células e o ^{125}I-anticorpo não ligado foram separados pelo método de separação óleo ftalato, essencialmente como descrito por Dower *et al.*, *J. Immunol*. 132:751, 1984.

O ^{125}I-anticorpo livre e ligado às células foram quantificados num Packard Autogamma Counter. A curva de ligação foi representada de novo no sistema coordenado de Scatchard (Scatchard, *Ann. N.Y. Acas. Sci.* 51:660, 1949). Os cálculos da afinidade foram gerados em RS/1 (BBN Software, Boston MA) executado num computador Microvax. Foi identificado um único componente de afinidade elevada. Os locais de ligação de elk-L expressos nos transfectantes CV-1 EBNA-1 tinham uma constante de afinidade (K_A) de $1,08x10^9$ M^{-1} para elk/Fc. Esta constante de afinidade aproxima-se bem das observadas para a ligação de elk/Fc ao ligando nativo expresso em várias linhas celulares neutras de rato.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

(l) INFORMAÇÃO GERAL:

(i) REQUERENTE: Stewart D. Lyman
M. Patricia Beckmann
Peter R Baum

(ii) TÍTULO DO INVENTO: Ligando de elk, uma citoquina

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 2

(iv) ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIAS«:
(A) DESTINATÁRIO: Immunex Corporation
(B) RUA: 51 University Street
(C) CIDADE: Seattle
(d) ESTADO: Washington
(E) PAÍS: USA
(F) CÓDIGO POSTAL: 98101

(v) FORMATO LEGÍVEL EM COMPUTADOS:
(A) TIPO DE MEIO: Disquete
(B) COMPUTADOS: Compatível com IBM PC
(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
(D) *SOFTWARE*: PatentIn Release #1.0, Versão #1.25

(vi) DADOS DO PRESENTE PEDIDO:
(A) NÚMERO DO PEDIDO:
(B) DATA DE APRESENTAÇÃO: 12-NOV-1993
(C) CLASSIFICAÇÃO:

(viii) INFORMAÇÃO SOBRE REPRESENTANTE/AGENTE:
(A) NOME: Kathryn A. Seese
(B) NÚMERO DE REGISTO: 32.172
(C) NÚMERO DE REFERÊNCIA/PROCESSO: 28O7-WO

(Ix) INFORMAÇÃO PARA TELECOMUNICAÇÕES:
(A) TELEFONE: (206) 587-0430
(B) TELEFAX: (206) 233-0644

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 1041 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc para ARNm

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(ix) CARACTERÍSTICA:
(A) NOME/CHAVE: CDS
(B) LOCALIZAÇÃO: 1..1041

(ix) CARACTERÍSTICA:
(A) NOME/CHAVE: mat_peptide
(B) LOCALIZAÇÃO: 73..1038

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

```
ATG GCT CGG CCT GGG CAG CGT TGG CTC GGC AAG TGG CTT GTG GCG ATG    48
Met Ala Arg Pro Gly Gln Arg Trp Leu Gly Lys Trp Leu Val Ala Met
-24             -20                 -15                 -10

GTC GTG TGG GCG CTG TGC CGG CTC GCC ACA CCG CTG GCC AAG AAC CTG    96
Val Val Trp Ala Leu Cys Arg Leu Ala Thr Pro Leu Ala Lys Asn Leu
            -5                  1                   5

GAG CCC GTA TCC TGG AGC TCC CTC AAC CCC AAG TTC CTG AGT GGG AAG   144
Glu Pro Val Ser Trp Ser Ser Leu Asn Pro Lys Phe Leu Ser Gly Lys
     10                  15                  20

GGC TTG GTG ATC TAT CCG AAA ATT GGA GAC AAG CTG GAC ATC ATC TGC   192
Gly Leu Val Ile Tyr Pro Lys Ile Gly Asp Lys Leu Asp Ile Ile Cys
 25                  30                  35                  40

CCC CGA GCA GAA GCA GGG CGG CCC TAT GAG TAC TAC AAG CTG TAC CTG   240
Pro Arg Ala Glu Ala Gly Arg Pro Tyr Glu Tyr Tyr Lys Leu Tyr Leu
                45                  50                  55

GTG CGG CCT GAG CAG GCA GCT GCC TGT AGC ACA GTT CTC GAC CCC AAC   288
Val Arg Pro Glu Gln Ala Ala Ala Cys Ser Thr Val Leu Asp Pro Asn
            60                  65                  70

GTG TTG GTC ACC TGC AAT AGG CCA GAG CAG GAA ATA CGC TTT ACC ATC   336
Val Leu Val Thr Cys Asn Arg Pro Glu Gln Glu Ile Arg Phe Thr Ile
        75                  80                  85

AAG TTC CAG GAG TTC AGC CCC AAC TAC ATG GGC CTG GAG TTC AAG AAG   384
Lys Phe Gln Glu Phe Ser Pro Asn Tyr Met Gly Leu Glu Phe Lys Lys
     90                  95                  100

CAC CAT GAT TAC TAC ATT ACC TCA ACA TCC AAT GGA AGC CTG GAG GGG   432
His His Asp Tyr Tyr Ile Thr Ser Thr Ser Asn Gly Ser Leu Glu Gly
105                 110                 115                 120

CTG GAA AAC CGG GAG GGC GGT GTG TGC CGC ACA CGC ACC ATG AAG ATC   480
Leu Glu Asn Arg Glu Gly Gly Val Cys Arg Thr Arg Thr Met Lys Ile
                125                 130                 135

ATC ATG AAG GTT GGG CAA GAT CCC AAT GCT GTG ACG CCT GAG CAG CTG   528
Ile Met Lys Val Gly Gln Asp Pro Asn Ala Val Thr Pro Glu Gln Leu
            140                 145                 150

ACT ACC AGC AGG CCC AGC AAG GAG GCA GAC AAC ACT GTC AAG ATG GCC   576
Thr Thr Ser Arg Pro Ser Lys Glu Ala Asp Asn Thr Val Lys Met Ala
        155                 160                 165

ACA CAG GCC CCT GGT AGT CGG GGC TCC CTG GGT GAC TCT GAT GGC AAG   624
Thr Gln Ala Pro Gly Ser Arg Gly Ser Leu Gly Asp Ser Asp Gly Lys
    170                 175                 180
```

```
CAT GAG ACT GTG AAC CAG GAA GAG AAG AGT GGC CCA GGT GCA AGT GGG   672
His Glu Thr Val Asn Gln Glu Glu Lys Ser Gly Pro Gly Ala Ser Gly
185                 190                 195                 200

GGC AGC AGC GGG GAC CCT GAT GGC TTC TTC AAC TCC AAG GTG GCA TTG   720
Gly Ser Ser Gly Asp Pro Asp Gly Phe Phe Asn Ser Lys Val Ala Leu
                205                 210                 215

TTC GCG GCT GTC GGT GCC GGT TGC GTC ATC TTC CTG CTC ATC ATC ATC   768
Phe Ala Ala Val Gly Ala Gly Cys Val Ile Phe Leu Leu Ile Ile Ile
            220                 225                 230

TTC CTG ACG GTC CTA CTA CTG AAG CTA CGC AAG CGG CAC CGC AAG CAC   816
Phe Leu Thr Val Leu Leu Leu Lys Leu Arg Lys Arg His Arg Lys His
        235                 240                 245

ACA CAG CAG CGG GCG GCT GCC CTC TCG CTC AGT ACC CTG GCC AGT CCC   864
Thr Gln Gln Arg Ala Ala Ala Leu Ser Leu Ser Thr Leu Ala Ser Pro
    250                 255                 260

AAG GGG GGC AGT GGC ACA GCG GGC ACC GAG CCC AGC GAC ATC ATC ATT   912
Lys Gly Gly Ser Gly Thr Ala Gly Thr Glu Pro Ser Asp Ile Ile Ile
265                 270                 275                 280

CCC TTA CGG ACT ACA GAG AAC AAC TAC TGC CCC CAC TAT GAG AAG GTG   960
Pro Leu Arg Thr Thr Glu Asn Asn Tyr Cys Pro His Tyr Glu Lys Val
                285                 290                 295

AGT GGG GAC TAC GGG CAC CCT GTC TAC ATC GTC CAA GAG ATG CCG CCC  1008
Ser Gly Asp Tyr Gly His Pro Val Tyr Ile Val Gln Glu Met Pro Pro
            300                 305                 310

CAG AGC CCG GCG AAC ATC TAC TAC AAG GTC TGA                      1041
Gln Ser Pro Ala Asn Ile Tyr Tyr Lys Val
        315                 320
```

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 346 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGIA: linear

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

```
Met Ala Arg Pro Gly Gln Arg Trp Leu Gly Lys Trp Leu Val Ala Met
-24             -20                 -15                 -10

Val Val Trp Ala Leu Cys Arg Leu Ala Thr Pro Leu Ala Lys Asn Leu
            -5                  1                   5

Glu Pro Val Ser Trp Ser Ser Leu Asn Pro Lys Phe Leu Ser Gly Lys
     10                  15                  20

Gly Leu Val Ile Tyr Pro Lys Ile Gly Asp Lys Leu Asp Ile Ile Cys
 25                  30                  35                  40
```

```
Pro Arg Ala Glu Ala Gly Arg Pro Tyr Glu Tyr Tyr Lys Leu Tyr Leu
                45                  50                  55

Val Arg Pro Glu Gln Ala Ala Ala Cys Ser Thr Val Leu Asp Pro Asn
            60                  65                  70

Val Leu Val Thr Cys Asn Arg Pro Glu Gln Glu Ile Arg Phe Thr Ile
        75                  80                  85

Lys Phe Gln Glu Phe Ser Pro Asn Tyr Met Gly Leu Glu Phe Lys Lys
    90                  95                  100

His His Asp Tyr Tyr Ile Thr Ser Thr Ser Asn Gly Ser Leu Glu Gly
105                 110                 115                 120

Leu Glu Asn Arg Glu Gly Gly Val Cys Arg Thr Arg Thr Met Lys Ile
                125                 130                 135

Ile Met Lys Val Gly Gln Asp Pro Asn Ala Val Thr Pro Glu Gln Leu
            140                 145                 150

Thr Thr Ser Arg Pro Ser Lys Glu Ala Asp Asn Thr Val Lys Met Ala
        155                 160                 165

Thr Gln Ala Pro Gly Ser Arg Gly Ser Leu Gly Asp Ser Asp Gly Lys
    170                 175                 180

His Glu Thr Val Asn Gln Glu Glu Lys Ser Gly Pro Gly Ala Ser Gly
185                 190                 195                 200

Gly Ser Ser Gly Asp Pro Asp Gly Phe Phe Asn Ser Lys Val Ala Leu
                205                 210                 215

Phe Ala Ala Val Gly Ala Gly Cys Val Ile Phe Leu Leu Ile Ile Ile
            220                 225                 230

Phe Leu Thr Val Leu Leu Leu Lys Leu Arg Lys Arg His Arg Lys His
        235                 240                 245

Thr Gln Gln Arg Ala Ala Ala Leu Ser Leu Ser Thr Leu Ala Ser Pro
    250                 255                 260

Lys Gly Gly Ser Gly Thr Ala Gly Thr Glu Pro Ser Asp Ile Ile Ile
265                 270                 275                 280

Pro Leu Arg Thr Thr Glu Asn Asn Tyr Cys Pro His Tyr Glu Lys Val
                285                 290                 295

Ser Gly Asp Tyr Gly His Pro Val Tyr Ile Val Gln Glu Met Pro Pro
            300                 305                 310

Gln Ser Pro Ala Asn Ile Tyr Tyr Lys Val
        315                 320
```

Lisboa,

REIVINDICAÇÕES

1. ADN isolado codificando uma proteína elk-L capaz de se ligar a elk, em que o referido ADN compreende uma sequência nucleotídica que é, pelo menos, 80% idêntica a uma sequência seleccionada de entre o grupo consistindo nos nucleótidos 1-1041, 73-1041, 1-711 e 73-711 de SEQ ID NO:1.

2. ADN isolado de acordo com a reivindicação 1, em que o referido ADN compreende uma sequência nucleotídica seleccionada de entre o grupo consistindo nos nucleótidos 1-1041, 73-1041, 1-711, 73-711 de SEQ ID NO:1.

3. ADN isolado codificando uma proteína elk-L capaz de se ligar a elk, em que a referida elk-L compreende uma sequência de aminoácidos que é, pelo menos, 80% idêntica a uma sequência seleccionada de entre o grupo consistindo nos aminoácidos 1-322 e 1-213 de SEQ ID NO:2.

4. ADN isolado de acordo com a reivindicação 3, em que a referida elk-L compreende uma sequência de aminoácidos seleccionada de entre o grupo consistindo nos aminoácidos 1-322 e 1-213 de SEQ ID NO:2.

5. Vector de expressão compreendendo uma sequência de ADN de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4.

6. Processo de preparação de uma proteína elk-L, compreendendo cultivar uma célula hospedeira transformada com um vector de acordo coma reivindicação 5 em condições promotoras da expressão de elk-L e recuperação do polipéptido elk-L da cultura.

7. Proteína elk-L madura biologicamente activa, purificada, caracterizada por a sequência de aminoácidos N-terminal ser Ala-Thr-Pro-Leu-Ala-Lys-Asn-Leu-Glu-Pro-Val-Ser.

8. Elk-L purificada de acordo com a reivindicação 7, em que a referida elk-L compreende uma sequência de aminoácidos seleccionada de entre o grupo consistindo nos aminoácidos 1-322 e 1-213 de SEQ ID NO:2.

9. Proteína elk-L purificada compreendendo uma sequência de aminoácidos que é, pelo menos, 80% idêntica a uma sequência seleccionada de entre o grupo consistindo nos aminoácidos 1-322 e 1-213 de SEQ ID NO:2.

10. Anticorpo que é especificamente imunorreactivo com uma proteína elk-L de acordo com a reivindicação 8.

11. Anticorpo de acordo com a reivindicação 10, em que o referido anticorpo é um anticorpo monoclonal.

12. Oligómero compreendendo proteínas elk-L solúveis, em que as referidas proteínas elk-L solúveis compreendem, cada uma, uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80% idêntica à sequência de resíduos 1-213 de SEQ ID NO:2, em que o referido oligómero é capaz de se ligar a elk.

13. Oligómero de acordo como a reivindicação 12, em que o referido oligómero compreende duas ou três proteínas elk-L solúveis.

14. Oligómero de acordo com as reivindicações 12 ou 13, em que a sequência de aminoácidos da referida proteína elk-L consiste nos aminoácidos 1-213 de SEQ ID NO:2.

15. Proteína de fusão compreendendo uma proteína elk-L solúvel e uma proteína Fc, em que a proteína elk-L solúvel compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80% idêntica à sequência de resíduos 1-213 de SEQ ID NO: 2.

16. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 15, em que a sequência de aminoácidos da referida proteína elk-L consiste nos aminoácidos 1-213 de SEQ ID NO:2.

17. Dímero compreendendo duas proteínas de fusão de acordo com a reivindicação 15 ou 16.

Lisboa,