(11) Número de Publicação: **PT 964874 E**

(51) Classificação Internacional:
C07K 14/705 (2006.01) ***C07K 16/28*** (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01) ***C12N 15/11*** (2006.01)
C12N 5/12 (2006.01) ***C12N 5/10*** (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) ***C12N 1/19*** (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01) ***A01K 67/27*** (2006.01)

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

(22) Data de pedido: **1998.03.03**

(30) Prioridade(s): **1997.03.03 US 810572**

(43) Data de publicação do pedido: **1999.12.22**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.09.12**
148/2007

(73) Titular(es):
ST. JUDE CHILDREN`S RESEARCH HOSPITAL
332 N. LAUDERDALE AVENUE MEMPHIS, TN 38105 **US**

(72) Inventor(es):
RICHARD J. BRAM **US**
GOTZ VON BULOW **US**

(74) Mandatário:
LUÍSA MARIA FERREIRA GUERREIRO
PRACETA FERNANDO NAMORA, Nº 7, 3º ESQ. 2820-598
CHARNECA DA CAPARICA **PT**

(54) Epígrafe: **RECEPTOR DE SUPERFÍCIE DE LINFÓCITOS QUE LIGA UMA CICLOFILINA DE MODULAÇÃO DE SINAL DE CÁLCIO (CAML), ÁCIDOS NUCLEICOS QUE FAZEM A SUA CODIFICAÇÃO E OS PROCESSOS DE UTILIZAÇÃO DOS MESMOS**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

RECEPTOR DE SUPERFÍCIE DE LINFÓCITOS QUE LIGA UMA CICLOFILINA DE MODULAÇÃO DE SINAL DE CÁLCIO (CAML), ÁCIDOS NUCLEICOS QUE FAZEM A SUA CODIFICAÇÃO E OS PROCESSOS DE UTILIZAÇÃO DOS MESMOS

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se, de um modo geral, à regulação da transcrição em linfócitos, nas proteínas envolvidas nos mesmos, nos seus anticorpos, nos ácidos nucleicos que codificam as proteínas e os usos dos ácidos nucleicos, dos anticorpos e das proteínas.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Os investigadores encontram-se somente agora a começar a revelar os mecanismos que controlam a resposta celular a factores externos. Uma característica básica de muitos destes mecanismos reside na ligação inicial de um factor externo, por exemplo, um ligante, a uma proteína da membrana da superfície da célula, isto é, um receptor. A ligação de um ligante ao seu receptor efectua de um modo habitual uma mudança celular através de uma sequência de acontecimentos. Estes acontecimentos envolvem habitualmente outras proteínas, como sejam as quinases das proteínas, as fosfatases das proteínas, as proteínas JAK, as proteínas Stat e/ou as proteínas G. De um modo adicional existe habitualmente uma necessidade de um factor de transcrição destinado a ligar-se a uma sequência regulatória de DNA específica no núcleo da célula, e deste modo iniciam a transcrição de um ou mais genes particulares.

Encontram-se geralmente envolvidos outros factores. Por exemplo, na activação dos linfócitos estimulada pelos antigénios, a entrada de cálcio (Ca^{2+}) é também necessária para a transcrição final de DNA. A concentração acrescida de cálcio citoplásmico pode ter como origem um fluxo de entrada externo ou uma libertação de materiais internos armazenados. A concentração de cálcio acrescida que activa a calcineurina fosfatase da proteína dependente do cálcio actua em conjunto com outros agentes de modo a assinalar o inicio da transcrição. É notório que o trilho que envolve o fluxo de entrada do cálcio é essencial para uma série de processos envolvidos com a activação e com a proliferação de células.

Os níveis de cálcio intracelular desempenham uma função principal em vários tipos de células diferentes que envolvem muitas actividades diferentes. Para além da indução da transcrição dos genes por intermédio da entrada de cálcio, muitos outros acontecimentos dependentes do cálcio, como sejam os que se verificam durante a contracção dos músculos (tanto os cardíacos como os do esqueleto), a desgranulação da vesícula (como a que resulta da resposta dos neutrófilos e dos macrófagos às infecções, ou a resposta dos basófilos à estimulação feita pelos antigénios, ou a libertação de acetilcolina por parte dos neurões), e o fecho das uniões dos espaços intracelulares possibilitam um registo celular. O ciclo das células pode ainda envolver fluxos de cálcio. Os quelantes intracelulares que irão bloquear as mudanças na concentração de cálcio intracelular podem evitar que o ciclo de células progrida, parando deste modo a divisão celular. [Rabinovich e outros., J. of Immunol., 137:952 - 961 (1986)]. Deste modo, a regulação do cálcio pode ser eficaz para fazer a modulação da divisão celular em células normais e células doentes.

Os linfócitos são um componente primário do braço celular do sistema imunológico. A activação de um tipo de linfócitos em particular, uma célula T, pode resultar através da estimulação de um receptor de células T através de, por exemplo, a ligação de um receptor de células T (TCR) a um antigénio apresentando por uma célula que apresenta antigénio. Esta estimulação tem como resultado a activação do calcineurina, fosfatase dependente de Ca^{2+}. O calcineurina activado, por outro lado, activa NF-AT, um factor de transcrição específico dos linfócitos que em conjunto com um factor de transcrição companheiro, AP-1, e efectua a expressão do factor de crescimento de células T inductíveis, interleuquina-2 (IL-2). A activação do AP-1 é um processo independente do cálcio que envolve a quinase de prioteíona C, e pode ser conseguida de um modo experimental com a adição de um acetado de miristato de forbotol (PMA). O medicamento de ciclosporina A (CsA) liga-se a, e inibe a actividade de prolil-isomerase da ciclofilina e o complexo de medicamento-isomerase resultante inactiva a calcineurina através de uma interacção directa junto do local activo da enzima. [Liu e outros., Cell, 66:807 - 15 (1991)]; {Clipstone a Crabtree, Nature, 357:695 - 7 (1992)]. NF-KB é um terceiro factor de transcrição importante para a activação dos linfócitos e que é activado a seguir à estimulação do receptor de antigénios das células T ou das células B.

Uma outra proteína associada com o trilho de sinalização do cálcio em linfócitos é o recentemente identificado sinal de cálcio de ligante de modulação de ciclofilina (CAML) [Bram, R. J. e Crabtree, G. R., DNA Encoding Calcium-Signal Modulating Cyclophilin Ligand, Patente dos Estados Unidos nº 5 523 227, concedida em 4 de Junho de 1996, e WO95/35501. Ver ainda Von Bülow e Bram, Science 199, 278 (5335): 138 - 141; e Von Bülow e Bram, Blood 1997, 90(10): 246A - 247. CAML liga a ciclofilina A com uma especificidade razoável, isto é, a CAML

não se liga com a ciclofilina A ou C. Ao contrário do complexo ciclosporina A - ciclosporina, contudo, o complexo CAML - ciclofilina B não se liga de um modo directo a calcineurina. Deste modo, a CAML aparenta afectar a calcineurina através da sua regulação do fluxo de entrada de Ca^{2+}. Como se esperavam o CsA pode bloquear de um modo indirecto o efeito activante da CAML na transcrição ao inibir-se a calcineurina. De um modo adicional, CAML aparenta não ter qualquer efeito na activação de AP-1, e deste modo a activação de NF-AT dependente de CAML experimentalmente requer a adição de PMA.

CAML actua a jusante de um sinal externo mas a montante de calcineurina. A localização de CAML nas vesículas citoplásticas sugere que pode regular o fluxo de entrada de Ca^{2+} através da modulação da libertação de Ca^{2+} intracelular. No entanto, continua a haver a necessidade de determinar o factor natural (ou factores naturais) que comunicam o sinal externo ao CAML celular. De um modo adicional há a necessidade de compreender como é que o CAML interage com este factor de modo a aprender a melhor controlar os processos celulares importantes que a CAML ajuda a regular. Um diferente tipo de molécula de sinalização é a família TNFR de receptores de superfície das células [Smith e outros, cell 76:959 - 62 (1994)]. Estes receptores iniciam os sinais intracelulares conduzindo ao início do crescimento, da morte ou do ganho da função de trabalhador das células.

A presente invenção proporciona um ácido nucleico isolado que tem uma sequência de nucleótidos seleccionada de entre o grupo que é constituído por:

a) uma sequência de nucleótidos apresentando uma identidade de pelo menos 90% com os nucleótidos 14 - 895 da SEQ ID NO: 1 em que a referida sequência de nucleótidos codifica um

Activador de Transmembrana e uma proteína de interacção de CAML (TACI).

b) uma sequência de nucleótidos compreendendo pelo menos 18 nucleótidos de uma sequência de nucleótidos que codifica um Activador de Transmembranas e uma proteína de interacção de CAML (TACI) tendo uma sequência de aminoácidos seleccionada de entre o grupo que consiste pela SEQ ID NO: 2 e a SEQ ID NO: 2 compreende uma substituição conservativa da mesma, em que a referida sequência de nucleótidos codifica um fragmento terminal N da proteína TACI, que é o domínio regulatório extracelular; e

c) uma sequência de nucleótidos que codifica um fragmento terminal C da proteína TACI, em que o referido fragmento terminal C tem uma sequência de aminoácidos seleccionada de entre o grupo que consiste pela SEQ ID NO: 4, e a SEQ ID NO: 4 compreende uma sua substituição conservatória, e em que o referido fragmento terminal C é suficiente para fazer a ligação aos 146 aminoácidos de CAML do terminal N.

em que a referida proteína TACI funciona como uma proteína que assinala a superfície da célula através da interacção com a CAML.

Um novo receptor de linfócitos, a sua sequência de DNA, e o seu papel no trilho de activação do cálcio, encontram-se revelados. A proteína, ou estruturas elaboradas através de engenharia genética para a sua codificação, pode ser usada de modo a aumentar a resposta dos linfócitos, ou identificar ligantes do receptor de proteínas. O domínio solúvel extracelular pode ser usado para inibir a activação celular. Os anticorpos às proteínas podem ser gerados para uso de diagnóstico ou para uso terapêutico. A proteína e o DNA podem ser também usados para fins de diagnóstico e para identificar

os agentes para a modulação do trilho de activação do cálcio induzido. O conhecimento da sequência de codificação permite que a manipulação de células elucide o mecanismo do qual a CAML faz parte.

Uma vantagem particular da presente invenção reside no facto de a mesma proporcionar uma activação dos linfócitos de um receptor que se encontra em todas as células B, mas somente num subconjunto de células T. O receptor pode, deste modo, ser direccionado de modo a regular especificamente as respostas das células B sem afectar o tipo de actividade das células T. Uma tal especificidade da orientação é sempre vantajosa, em especial quando se verifica um aumento ou uma diminuição da produção de anticorpos independente das respostas de imunidade celular que são desejadas, por exemplo, durante uma infecção (aumento) ou de modo a evitar as complicações de deposição de complexo imune (artrite reumatóide, glomerulonephritis, e outras situações clínicas de auto-imunidade).

A reticulação do receptor de células de superfície novas de acordo com a presente invenção activa as células B e algumas populações de células T. A activação destas células aumenta a actividade do sistema imunológico. Por outro lado, o bloqueio ou a inibição do novo receptor das superfícies das células de acordo com a presente invenção pode resultar numa imunosupressão. Dependendo do nível endógeno de activação do receptor, o qual pode ser avaliado usando os anticorpos ou os ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção, a actividade do receptor pode ser aumentada ou suprimida de modo a que se consiga obter um resultado desejado. Quer activando ou inibindo a função do novo receptor das superfícies das células de acordo com a presente invenção pode ser usada de modo a tratar os cancros das células T e B.

A presente invenção inclui um Activador de Transmembrana e uma proteína de interacção de AXML (TACI) que funciona como uma proteína que assinala a superfície da célula e que compreende um domínio extracelular, um segmento que abrange a membrana, e um domínio citoplasmico. Numa forma de realização, a proteína TACI é um receptor de membrana de plasma no qual o domínio extracelular reside na porção terminal N da proteína e o domínio citoplásmico reside na porção de terminal C da proteína. A porção de terminal N da proteína TACI funciona como um local de ligação para um ligante que estimula a activação da célula através da introdução do ligante da porção terminal C da proteína TACI no domínio terminal N da CAML. Como a CAML é uma proteína de membrana integral que se encontra localizada nas vesículas citoplásmicas, a proteína TACO é um receptor de membrana de plasma que interage de um modo directo com um organelo intracelular nos linfócitos.

Numa forma de realização, a forma monomérica da proteína de TACI isolada consiste por cerca de 295 aminoácidos. Numa forma de realização preferencial a forma monomérica de um Activador de Transmembrana e da proteína de interacção de CAML (TACI) contém entre 280 e 310 aminoácidos. Numa forma de realização específica que se encontra indicada mais abaixo, a forma monomérica da proteína TACI contém 293 aminoácidos.

Uma forma de realização da proteína de TACI isolada contém duas repetições ricas em cisteina da super família TNFR [Bairoch, Nucl. Acids Res., 21: 3097 - 3103 (1993)]. Numa forma de realização preferencial, uma proteína TACI que é estimulada de um modo adequado no local, como seja através de um ligante ou de um anticorpo anti-TACI, inicia a activação de um factor de transcrição através da combinação de um trilho dependente de Ca^{2+} e de um trilho independente de Ca^{2+}.

A presente invenção inclui um ácido nucleico isolado que consiste por pelo menos 18 nucleótidos de uma sequência de nucleótidos que tem pelo menos 60% de identidade com a SEQ ID NO:1 ou, de um modo alternativo, uma identidade de pelo menos 60% com a sequência de codificação da SEQ ID NO:1. A sequência de nucleótidos codifica uma proteína de TACI que tem uma afinidade de ligação com a CAML. Numa tal forma de realização o ácido nucleico isolado codifica uma proteína TACI.

Numa forma de realização preferida da presente invenção a sequência de nucleótidos tem uma identidade de pelo menos 75% com a SEQ ID NO: 1, ou tem uma identidade de pelo menos 75% com a SEQ ID NO: 1. Numa forma de realização mais preferida da presente invenção a sequência de nucleótidos tem uma identidade de pelo menos 90% com a SEQ ID NO: 1, ou tem uma identidade de pelo menos 90% com a SEQ ID NO: 1. Numa forma de realização ainda mais preferida da presente invenção a sequência de nucleótidos tem uma identidade de entre 95 e 98% com a SEQ ID NO: 1, ou tem uma identidade de entre 95 e 98% com a SEQ ID NO: 1. Numa forma de realização em particular, a sequência de nucleótidos é a SEQ ID NO. 1. Numa forma de realização associada, a sequência de nucleótidos consiste pela sequência de SEQ ID NO: 1. Numa forma de realização específica que se encontra ilustrada de seguida, o ácido nucleico isolado tem a sequência de nucleótidos da SEQ ID NO: 1. Numa forma de realização associada, o ácido nucleico isolado consiste pela sequência de codificação da SEQ ID NO. 1.

Numa outra forma de realização associada da presente invenção encontra-se incluído um ácido núcleico isolado que contém pelo menos 18 nucleótidos de uma sequência de nucleótidos que codifica um Activador de Transmembrana e uma proteína de interacção de CAML (TACI) e torna híbrida a SEQ ID NO. 1, ou

de um modo mais concreto torna híbrida a sequência de codificação da SEQ ID NO: 1. Numa tal forma de realização, a hibridação é efectuada sob uma restrição moderada. Numa outra forma de realização, a hibridação é efectuada sob condições de hibridação padronizadas. Numa terceira forma de realização, a hibridação é efectuada sob condições de restrição de hibridação.

Numa outra forma de realização associada a presente invenção inclui um ácido nucleico isolado que contém pelo menos 16 nucleótidos da sequência de nucleótidos que codifica uma proteína TACI tendo uma sequência de aminoácidos quer da SEQ ID NO: 2 ou da SEQ ID NO: 2 com um ou mais substituições conservativas. Numa dessas formas de realização deste tipo, o ácido nucleico isolado codifica um fragmento terminal N da proteína TACI correspondente ao domínio extra celular. Numa outra forma de realização, o acido nucleico isolado codifica um fragmento terminal em C da proteína TACI que é suficiente para ligar os 146 aminoácidos terminais em N de CAML. Numa outra forma de realização, o ácido nucleico isolado codifica a porção de trans membrana da proteína TACI. Numa outra forma de realização o ácido nucleico isolado codifica uma proteína TACI completa.

Numa forma de realização preferencial da presente invenção o ácido nucleico isolado consiste por pelo menos 24 nucleótidos. Numa forma de realização mais preferencial da presente invenção o ácido nucleico isolado consiste por pelo menos 30 nucleótidos. Numa forma de realização ainda mais preferencial da presente invenção o ácido nucleico isolado consiste por pelo menos 36 nucleótidos. Os oligonucleótidos de acordo com a presente invenção podem ser usados como sondas de ácidos nucleicos, como primários de PCR, como ácidos nucleicos de sentido contrário e afins, para finalidades de diagnóstico e terapêuticas.

Numa forma de realização preferencial da presente invenção, um ácido nucleico isolado codifica um fragmento terminal C da proteína que é suficiente para ligar os 146 aminoácidos terminais em N de CAML. Numa forma de realização particular deste tipo, o fragmento terminal em C contém cerca de 126 aminoácidos. Numa outra forma de realização deste tipo o fragmento terminal em C tem uma sequência de aminoácido ou de SEQ ID NO: 4 ou SEQ ID NO: 4 com uma ou mais substituições conservadoras.

Numa outra forma de realização, o ácido nucleico isolado codifica um fragmento terminal em N da proteína de ligação de CAML correspondente ao domínio extracelular. Numa forma de realização particular deste tipo, o fragmento terminal em N tem uma sequência de aminoácidos que é ou SEQ ID NO: 6 ou SEQ ID NO: 6 com uma ou mais substituições conservadoras.

Numa forma de realização preferencial, o ácido nucleico isolado codifica uma proteína TACI que tem uma afinidade de ligação para CAML. Quando uma tal proteína TACI é adequadamente estimulada, no local dá início à activação de um factor de transcrição através da combinação de um trilho dependente de Ca^{2+} e de um trilho independente de Ca^{2+}. Numa forma de realização mais preferida, o ácido nucleico isolado codifica uma proteína TACI tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 2.

A presente invenção inclui também uma estrutura de DNA que compreende um ácido nucleico isolado da presente invenção que é um DNA recombinado que se encontra operacionalmente ligado a uma sequência de controlo de expressão. A sequência de controlo de expressão pode ser seleccionada de entre o grupo que consiste por promotores iniciais ou tardios de SV40 ou de adenovírus, o sistema lac, o sistema trp, o sistema TAC, o

sistema TRC, as regiões do operador ou do promotor principal do fago λ, as regiões de controlo da proteína de revestimento de fd, o promotor de quinase 3-fosfoglicerato, os promotores de ácido fosfatase e os promotores dos factores de correspondência α da levedura.

Numa forma de realização preferencial da presente invenção, a expressão da sequência de controlo é ou um promotor tet que pode ser induzido, um promotor de metalotioneína, ou um promotor de acidisone. Numa forma de realização mais preferida, a expressão da sequência de controlo é o promotor SR_{α}.

A presente invenção inclui ainda um hospedeiro unicelular transformado com uma estrutura de DNA recombinada de acordo com a presente invenção. Numa forma de realização, o hospedeiro unicelular é um procariota. Numa outra forma de realização o hospedeiro unicelular é um eucariota. De um modo preferencial, o hospedeiro eucariota é uma célula de mamífero, por exemplo uma célula CÓS, uma célula CHO ou uma célula T Jurkat, que pode ser útil para avaliar a actividade da proteína TACI ou para identificar os agentes modulatórios.

A presente invenção inclui os polipeptidos isolados codificados pelos ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção, pelos seus fragmentos, e pelas suas proteínas de fusão. Numa forma de realização, o fragmento de polipeptido consiste por um fragmento com terminal N da proteína TACI que corresponde ao domínio extracelular regulatório. Numa forma de realização particular o fragmento terminal em N tem uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:6 com uma ou mais das substituições conservatórias.

Numa outra forma de realização, o fragmento de polipeptido consiste por um fragmento de terminal C da proteína TACI que é suficiente para ligar os 146 aminoácidos de terminal N de CAML. Numa tal forma de realização, o fragmento com terminal em C contém entre 95 e 130 aminoácidos. Numa forma de realização específica, o fragmento em terminal C contém os 126 aminoácidos de terminal C da SEQ ID NO:2. Numa forma de realização alternativa o fragmento de terminal C da proteína TACI contém cerca de 110 aminoácidos. Numa forma de realização preferida deste tipo, o fragmento de terminal C contém 107 aminoácidos e tem uma sequência de aminoácidos SEQ ID NO:4.

A presente invenção inclui ainda a preparação de uma forma recombinante da porção extracelular de uma proteína TACI, criando deste modo um reagente de bloqueamento negativo dominante. Este componente intercepta os ligantes endógenos normais que servem para reticular e activar a proteína TACI. Quando é usado, um tal polipeptido actua de modo a suprimir o sistema imunitário. Um tal uso é útil no tratamento ou na prevenção de doenças auto-imunes ou da rejeição de enxertos ou da doença de enxerto versus hospedeiro que se segue ao transplante.

Uma proteína quimérica TACI da presente invenção pode ser uma proteína que é gerada pela união do domínio extra celular de uma outra molécula receptora com um domínio de trans membrana e com o domínio intracelular de uma proteína TACI. Numa outra forma de realização, o domínio extra celular de uma proteína TACI pode ser unido com o domínio de trans membrana e com um domínio intra celular de uma outra molécula de receptor. O domínio da trans membrana pode ser o domínio da trans membrana de uma proteína TACI, o domínio da trans membrana do outro receptor, ou um domínio de trans membrana diferente. De um modo preferencial, o domínio da trans membrana é do mesmo

componente da proteína da quimera como o domínio extra celular.

Numa forma de realização preferencial o polipeptido é uma proteína TACI codificada por um ácido nucleico de acordo com a presente invenção que tem uma afinidade de ligação para CAML e quando adequadamente estimulado, no local, inicia a activação de um factor de transcrição através da combinação de um trilho dependente de Ca^{2+} e de um trilho independente de Ca^{2+}.

A presente invenção inclui ainda ácidos nucleicos de sentido contrário que se hibridam sob condições fisiológicas para os mRNAs que codificam as proteínas TACI de acordo com a presente invenção. Tais ácidos nucleicos de sentido contrário podem ser o RNA transcrito a partir de um gene em sentido contrário, ou RNA ou DNA produzidos externamente (quer por expressão ou por síntese química). De um modo preferencial, um ácido nucleico sintético é preparado a partir de ligação que não existem na natureza de modo a evitar a sua rápida hidrólise e, deste modo, aumentar a sua meia vida eficaz.

Um rato de ensaio faz também parte da presente invenção. O rato de ensaio compreende um primeiro e um segundo alelos em que cada um deles codifica naturalmente e exprimem uma proteína TACI funcional mas em que pelo menos um dos dois alelos tem defeito e, deste modo, evita que o rato exprima uma quantidade adequada da proteína TACI. Numa forma de realização deste tipo o primeiro alelo contém um defeito que evita que o rato exprima qualquer proteína TACI funcional. Numa forma de realização preferencial, o rato de ensaio contém tanto um primeiro alelo defeituoso como um segundo alelo defeituoso. Estes alelos defeituosos evitam que o animal exprima a proteína TACI funcional.

A presente invenção inclui ainda anticorpos de todos os ácidos nucleicos e de todos os polipeptidos de acordo com a presente invenção. Numa forma de realização específica, o anticorpo é preparado de encontro à proteína TACI tendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2, ou um fragmento antigénico da mesma. OS anticorpos da presente invenção podem ser ou anticorpos monoclonais ou anticorpos policlonais. Numa forma de realização, o anticorpo é um anticorpo monoclonal que é um anticorpo quimérico.

Uma linha de células imortal que produz um anticorpo monoclonal de acordo com a presente invenção é também parte da presente invenção. Numa forma de realização específica desta linha de células imortal, o anticorpo monoclonal é preparado contra a proteína TACI que tem uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2 ou um seu segmento antigénico.

A presente invenção inclui ainda um fragmento terminal em N de CAML que é suficiente para se ligar ao fragmento de aminoácido 128 de terminal em C do TACI-1. Numa tal forma de realização o fragmento de terminal N de CAML contém 146 aminoácidos. Este fragmento com terminal em N de CAML pode servir como um inibidor para a ligação TACI - CAML.

A presente invenção inclui processos para fazer as proteínas TACI, os seus fragmentos e as duas proteínas de fusão. Numa forma de realização o processo compreende a introdução de um vector de expressão que compreende um ácido nucleico que codifica um polipeptido que é uma proteína TACI, ou um fragmento da mesma, ou uma sua proteína de fusão, numa célula hospedeira e expressando o polipeptido codificado. Numa forma de realização preferencial o polipeptido é uma proteína TACI codificada por um ácido nucleico de acordo com a presente invenção que tem uma afinidade de ligação para CAML e quando adequadamente estimulado, no local, inicia a activação de um

factor de transcrição através da combinação de um trilho dependente de Ca^{2+} e de um trilho independente de Ca^{2+}. Na forma de realização mais preferencial deste tipo o polipeptido expressado é uma proteína TACI que tem uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2.

Os processos para a purificação dos polipeptidos expressados que codificam as proteínas TACI, os seus fragmentos e as suas proteínas de fusão fazem também parte da presente invenção pois eles são os próprios polipeptidos expressados.

A presente invenção inclui ainda processos para identificar um ligante para uma proteína TACI. Uma forma de realização de um tal processo compreende a entrada em contacto do polipeptido extracelular com terminal em N de uma proteína TACI com uma molécula candidata. A ligação do polipeptido terminal extracelular terminal em N com a molécula candidata indica que a molécula candidata é um ligante.

Num processo alternativo para identificar um ligante de uma proteína TACI e usada uma proteína TACI funcional. Em formas de realização preferenciais deste tipo a proteína TACI funcional é TACI-1. A ligação da proteína funcional TACI com a molécula candidata indica que a molécula candidata é um ligante. Numa tal forma de realização, a ligação da molécula candidata à proteína TACI funcional é determinada através da detecção da activação celular como uma função do nível de activação do trilho AP-1. Em outra forma de realização, a ligação da molécula candidata à proteína TACI funcional é determinada através da detecção da activação celular como uma função do nível de activação do trilho CAML.

Numa outra forma de realização, a ligação da molécula candidata à proteína TACI funcional é determinada através da detecção da activação celular como uma função do nível de

concentração do factor de transcrição NF- AT. Numa outra forma de realização, a ligação da molécula candidata à proteína TACI convencional é determinada através da detecção da activação celular como uma função do nível de activação do trilho NF-KB. Numa outra forma de realização, a ligação da molécula candidata à proteína TACI funcional é determinada através da ligação entre a molécula convencional e a determinação da proteína de TACI funcional como uma função do nível de activação de NF-AT. Neste caso, o nível de activação do NF-AT pode ser determinado por processos que incluem o citoplasma de demonstração e a translocação nuclear de NF-AT, a desfosforização relativa de NF-AT; e/ou através de transcrição dependente de NF-AT.

Em formas de realização preferidas é feita mais de uma das determinações acima indicadas e a molécula candidata é identificada como sendo um ligante quando todas as determinações efectuadas indicam a ligação da molécula candidata à proteína TACI. Na forma de realização mais preferida, todas as determinações cima indicadas da activação celular são feitas e a molécula candidata é identificada como sendo um ligante quando todas estas determinações indicam que a molécula candidata se liga com a proteína TACI.

Processos para a identificação de um ligante para uma proteína TACI podem ser efectuados num grande número de sistemas de expressão na proteína TACI. Uma forma de realização emprega o uso de um sistema de expressão de dois híbridos de levedura usando a proteína de TACI como “isco”. Numa outra forma de realização, a interacção de clonagem das bibliotecas de expressões de E.coli podem ser empregues. Numa outra forma de realização, a expressão funcional que faz a clonagem das células de mamíferos da proteína TACI podem ser usadas. Numa outra forma de realização a expressão funcional da clonagem nas células dos mamíferos da proteína TACI pode

ser usada. Numa forma de realização preferencial, as células de mamífero são linhas derivadas de células B como sejam o Linfoma de Burkitt, as linhas de células imortalizadas por EBV, ou as linhas de células de mieloma múltiplos. Numa forma de realização mais preferido deste tipo a proteína TACI é expressa em células T Junkat contendo uma um gene de repórter sob o controlo de um promotor de NF-AT. Numa tal forma de realização, o gene relator codifica a fosfatase alcalina segregada (SEAP) como um marcador.

A presente invenção inclui ainda processos para a visualização de um medicamento imuno supressor que inibe a activação das células B num nível superior do que o que inibe a activação das células T maduras. Nas formas de realização preferidas deste tipo, o medicamento de imuno supressor inibe a activação das células B, mas não inibe as células T maduras. Tais processos podem ser efectuados em células T transformadas como sejam uma célula de Jurkat T, a qual pode ser geneticamente manipulada de modo a expressar a proteína TACI; ou em células B que as expressas naturalmente a proteína TACI.

A presente invenção inclui processos para a identificação de um medicamente de imuno supressor que bloqueia, de um modo selectivo, a acção dos linfócitos B sem afectar os linfócitos T. Uma tal forma de realização compreende o contacto de um primeiro linfócito com um medicamento potencial, em que o primeiro linfócito contém uma proteína TACI e uma primeira proteína de marcador. A primeira proteína de marcador é transcrita quando a proteína de TACI é estimulada na ausência de um medicamento candidato. A proteína TACI é estimulada e a primeira proteína de marcador é detectada sob condições nas quais se for transcrita é detectável. Um medicamento potencial é seleccionado como um medicamento candidato quando a primeira proteína de marcador não pode ser detectada. De

seguida, um segundo linfócito entra em contacto com o medicamento candidato, em que o segundo linfócito contém um receptor de células T, e uma segunda proteína de marcador que é transcrita quando o receptor de células T é estimulado quer na ausência quer na presença do medicamente imuno supressor. O receptor de células T é estimulado e a segunda proteína de marcador é detectada sob condições nas quais se for transcrita é detectada. Um medicamento candidato é identificado como um medicamento imuno supressor quando a segunda proteína de marcador é detectada pois o medicamento de imuno supressor interfere com o trilho (ou com o seu aspecto) que envolve a proteína TACI mas não o trilho (ou o seu aspecto) envolvendo o receptor de células T.

Numa forma de realização, os primeiro e segundo linfócitos são as células T Jurkat que foram modificadas para expressar uma proteína TACI. Numa tal forma de realização em particular, o processo compreende o contacto com uma primeira célula T Jurkat com um medicamento potencial, em que a primeira célula T Jurkat foi trabalhada geneticamente para expressar uma proteína TACI e um primeiro gene relator. O primeiro gene relator é controlado por um promotor NF-AT, e codifica uma primeira proteína de marcador. A proteína TACI é activada, e a quantidade de expressão da primeira proteína de marcador é quantificada. Um medicamento potencial é seleccionado enquanto medicamento candidato quando a quantidade da primeira proteína de marcador expressa na presença do medicamento candidato diminui em relação à quantidade expressa na ausência do medicamento candidato. O medicamento candidato é então posto em contacto com uma segunda célula T Jurkat que contém um receptor de células T e um segundo gene relator. O segundo gene relator é controlado por um promotor NF-AT, e codifica uma segunda proteína de marcador. O receptor de células T é activado e a quantidade de expressão da segunda proteína de marcador é quantificada e

é então comparada com a quantidade da segunda proteína de marcador expressa na ausência do segundo medicamento candidato. Um medicamento candidato é identificado como um medicamento de imuno supressor quer se não houver diminuição na quantidade de expressão da segunda proteína de marcador na presença do medicamento candidato, ou a diminuição na expressão da segunda proteína de marcador é, em termos de medida, inferior à correspondente diminuição na expressão da primeira proteína de marcador na presença do medicamento candidato.

Qualquer uma das proteínas de marcador descritas na presente pode ser usada para este aspecto da invenção, incluindo SEAP, LacZ ou luciferase. As primeiras e segundas proteínas de marcador podem ser a mesma proteína ou duas proteínas diferentes. A proteína TACO pode ser activada com um anticorpo comparado com uma proteína TACI, ou um seu fragmento activo, ou uma sua proteína de fusão. Numa forma de realização preferencial a proteína TACI é TACI-1. Vários promotores podem ser usados para controlar o gene relator incluindo o promotor NF-AT mencionado mais acima e o propmotor AP-1. Os medicamentos potenciais podem ser obtidos a partir de qualquer uma das bibliotecas de medicamentos actualmente disponíveis, e das bibliotecas químicas e fágicas aqui descritas.

Estes e outros aspectos da presente invenção serão melhor observados fazendo referência aos desenhos que se seguem e à Descrição Detalhada.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1. A distribuição do tecido, a sequência de proteínas e outras características que se destacam de TACI-1. A Figura 1 ilustra um grupo de tecidos Northern indicados e testados

com TACI-1 cDNA. Outros tecidos testados incluem tecidos do coração, do cérebro, da placenta, dos pulmões, do fígado, da estrutura muscular, dos rins e com o pâncreas, nenhum dos quais ilustra qualquer expressão de TACI-1 mRNA.

A Figura 2a ilustra a sequência de aminoácidos de TACI-1. O domínio da trans membrana proposta encontra-se no interior da quadrícula e os motivos Prosite TNFR_NGFR encontram-se sublinhados. A Figura 2b ilustra um traçado de hidrofobicidade Kyte-Doolittle e um diagrama de TACI-1 que ilustra as posições do domínio da trans membrana putativa (a preto forte) e os motivos TNFR_NGFR (a ponteado). A Figura 2c ilustra os resíduos de cisteina da proteína TACI e outros membros da família TNFR.

Figura 3. TACI-1 é uma proteína da superfície de célula. A Figura 3a ilustra a citometria de fluxo das células T TAg Jurkat que foram provisoriamente transfectados com o plasmida de expressão de TACI-1 e com o marcador de transfecção, pHook (Invitogen), ou o marcador de transfecção pHook isolado. A expressão da superfície da célula de TACI-1 e a proteína de marcador de transfecção, HA-Hook, foram detectadas através da imuno fluorescência indirecta usando o anticorpo policlonal anti-TACI-1 purificada por imunoafinidade e o anticorpo monoclonal 12CA5. Os dados ilustrados representam a marcação das células TACI-1 preparados para o marcador de transfecção. A Figura 3b ilustra uma superfície de apresentação de foto micrografia ilustrando a superfície das marcas das células Cós-7 expressando de um modo transitório as TACI-1 marcadas com FLAG de terminal N, marcados com anticorpos M2 (anti-FLAG) e com anticorpos de anti-rato fluorescente IgG (Bram & Crabtree, Nature, 371:355-358 (1994)). A marcação de superfície encontrava-se presente quer as células estivessem ou não permeabilizadas com detergente.

Figura 4. TACI-1 é uma proteína de sinalização que funciona na activação da transcrição específica de NF-AT. A Figura 4a ilustra a activação de um relator de fosfatase acticalina segregado impulsionado por NF-AT. As células T TAg Jurkat, co-transfectadas com o relator SXNFAT (Bram e outros Mol. Cell. Biol., 13:4760-4769 (1993)) e o plasmida de expressão pBJ5 (Takebe, Y., e outros, Mol. Cell. Biol., 8:466-472 (1988)) contendo ou cDNA que codifica TACI-1 (triângulos a cheio) ou nada (círculos), foram tratados com 50 ng/ml PMA e com as quantidades indicadas de inomicina na presença (símbolos fechados) e na ausência (símbolos abertos) de contas magnéticas revestidas com anticorpos policlonais anti-TACI-1 purificados com imunoafinidade. A Figura 4b apresenta a activação de NF-AT através TACI-1 de anticorpos reticulado que é bloqueado com Ciclosporina A (CsA) ou com FK506. A activação de NF-AT foi determinada em células T TAg Jurkar transfectadas em simultâneo com SXNFAT e com pBJ5 (-TACI-1, esquerda) ou pBJS-TACI-1 (+TACI-1, direita) e tratado com as combinações indicadas de PMA (50 ng/ml), ionomicina (2μM), CsA (100 ng/ml) e FK506 (500 pg/ml) na presença de contas revestidas com anticorpos anti TACI-1 ("NS", não estimuladas). A Figura 4c ilustra que a activação de NF-AT por TACI-1 reticulados com anticorpos requer cálcio extracelular. A activação AF-AT foi medida na presença de EGTA em células T Jurkat que exprimem TACI-1. Os tratamentos incluem os anti-TACI-1 reticulados (círculos), a transfecção com uma subunidade de claceneurina A independente de cálcio truncado com terminações em C (triângulos) ou activação com anticorpos de estimulação TCR OKT3 (quadrados). Todas as células eram estimuladas em simultâneo através da adição de PMA de 50 ng/ml. A Figura 4d ilustra a activação de um relator de fosfatase alcalina segregada impulsionada por AP-1. A activação AP-1 foi medida em células T TAg Jurkat, transfectada em conjunto com um relator de metalotieno de

rato AP-1-SEAP (Bram e outros, 1991, acima) e pBJ5 não contendo qualquer encaixe (-TACI-1, esquerda) ou TACI-1 cDNA (+TACI-1, direita). As células foram incubadas na ausência, e com quantidades continuamente crescentes, de anticorpos reticulados anti-TACI-1. De modo a controlar a eficácia da transfecção, um plasmida contendo um promotor constitutivo que impulsiona a expressão da luciferase (EF-Luc) estava incluído.

Figura 5. A interacção TACI-1 com CAML é de importância crítica para a sinalização Ca^{2+}. A Figura 5a ilustra a interacção de 2-hibrido da levedura. Os cDNAs de comprimento total e os mutantes de apagamento indicados de TACI-1 e de CAML foram clonados nos plasmidas de expressão da levedura pACT e/ou pAS1, e as combinações indicadas foram testadas para a interacção com o sistema de 2-hibrido da levedura ("+", interacção posiitva; "-" sem interacção; "ND" não efectuado). A Figura 5b ilustra a co-imuno precipitação do CAML com TACI-1. 293 células T foram transfectadas com as combinações indicadas do plasmida de expressão pBJ5 contendo cDNAs para as CAML, TACI-1 com um sinalizador FLAG terminal em N, com 146 aminoácidos de CAML com terminal em N (CLX91), ou sem encaixes. Após a incubação durante 48 horas, as células foram lisadas (1% docecilo maltosido, 20 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 2 mM MgSO4, 1 mM CaCl2, 1 mM PMSF) e o material lisado foi limpo por centrifugação. TACI-1 sinalizado por FLAG e as proteínas associadas foram imuno precipitadas com grãos de agarose de anti-FLAG monoclonais enrugados de anticorpos e submetidos a uma transferência Western usando os protocolos padrão. O conjunto Western foi testado com anticorpos policlonais anti CAML purificados por imuno afinidade seguidos de detecção químico luminescente (Amersham). Os conjuntos Western paralelos, efectuados para cada uma das amostras, confirmaram a expressão esperada de TACI-1, de CAML ou do mutante truncado CAML em todas as

transfecções. A Figura 5c ilustra que a expressão exagerada da metade de CAML com terminal em N tem um efeito negativo dominante na activação de NF-AT induzida por TACI. A activação de NF-AT foi determinada em células TAg Jurkat transfectadas somente com pBJ5, com pBHJ5-TACI-1 mais o plasmida de controlo, ou pBJS-TACI-1 com uma quantidade equivalente de CLX91, a seguir a um tratamento com anticorpos específicos de TACI-1 (topo). A expressão TACI-1 nestas transfecções foi determinada por agrupamentos western usando anticorpos policlonais anti-TACI-1 (fundo). A Figura 5d ilustra um diagrama esquemático que apresenta o modelo de transdução do sinal TACI-1 / CAML ("SOC", canal de cálcio operado por armazenamento).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção, no seu aspecto mais amplo, proporciona um novo receptor de superfície das células que se encontram normalmente presente nos linfócitos de tipo B e, numa quantidade muito inferior, nos linfócitos de tipo B imaturos. O papel do receptor de superfície das células, o Activador de Transmembrana e a proteína de interactor CAML (TACI), é participar em trilhos alternativos ou so-estimulatórios de modo a activar ou a controlar a função dos linfócitos. Estas funções podem incluir a resposta dos linfócitos aos antigénios estranhos numa infecção, ou no canto, na rejeição de membros transplantados, e na rejeição de membros versus hospedeiro. De um modo adicional, a activação da sinalização dos linfócitos desempenha um papel principal durante o desenvolvimento dos linfócitos, permitindo deste modo a escolha positiva dos linfócitos funcionais e a escolha negativa em relação aos clones auto-reactivos. Quando activada, a proteína TACI estimula a entrada de cálcio nos linfócitos. Uma tal entrada de cálcio pode, em certas circunstancias específicas, conduzir ao desencadeamento da morte programada das células (apoptose).

Os termos proteína de "Activador de Transmembrana e Interactor de CAML" ou "TACI" ou "proteína TACI" são usados na presente de um modo que permite a sua troca mútua com "proteína de ligação CAML de trans membrana" ou "TCB" ou "proteína TCB" e refere-se a um material proteinado que inclui proteínas simples ou múltiplas que actuam como um novo receptor de superfície das células que se encontra normalmente presente nos linfócitos de tipo B. Este receptor de superfícies das células tem o perfil das actividades aqui indicadas. Deste modo, as proteínas que apresentam uma actividade substancialmente equivalente ou alternada encontram-se, deste modo, contemplados. Estas modificações podem ser deliberadas, por exemplo, as actividades substancialmente equivalentes ou alteradas encontram-se, do mesmo modo, contempladas. Estas modificações podem ser deliberadas, por exemplo, como as modificações obtidas através das mutações direccionadas pelo site, ou podem ser acidentais, como as que são obtidas através das mutações em hospedeiros que são os produtores da proteína. Incluídos dentro do âmbito destes termos encontram-se as proteínas especialmente indicadas, assim como todos os análogos substancialmente homólogos e por variações alelicas.

Numa forma de realização numa forma de realização o Activador de Trans membrana e o Interactor CAML é TACI-1, o homólogo humano. De acordo com o que se encontra ilustrado no Exemplo que se segue, TACI-1 inicia um mecanismo de transducção do sinal não detectado que liga directamente os estímulos da superfície das células para a molécula de sinalização intracelular, CAML. A TACI-1 é, deste modo, um membro de um novo tipo de receptores da superfície das células específicos dos linfócitos que modulam a resposta imunológica e, deste modo, modem ser usados como uma ferramenta para regular o sistema imunológico quer numa direcção positiva quer numa

direcção negativa. Numa forma de realização específica, TACI-1 tem a sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID NO:2.

Da forma aqui usada quando um ácido nucleico em particular é referenciado como estando a codificar uma proteína ou um polipeptido de acordo com a presente invenção, significa que a porção do ácido nucleico em particular que consiste da sequencia de codificação para essa proteína ou polpeptido que se encontra a ser identificado. Por exemplo, a região de codificação da SEQ ID NO:1 é desde o nucleótido 14 até ao nucleótido 895, incluindo o codo de paragem de translação do nucleótido 3 no terminal 3/.

Para muitas finalidades existe um interesse substancial em ser capaz de evitar de um modo selectivo a activação dos linfócitos ou, na alternativa, em aumentar de um modo selectivo a sua activação. Por exemplo, para as doenças auto-imunes com interferência de linfócitos, o sindroma de rejeição do transplante, e a doença do transplante versus hospedeiro, que inibem a activação do linfócito envolvido que é um tratamento viável ou necessário para a doença. De um modo adicional, no caso dos mielomas, dos linfomas e das leucemias, em especial das células B ou das células T imaturas, existe o interesse em tornar mais lenta a proliferação das células de cancro, as quais podem permitir terapias que não são tão destrutivas para o hospedeiro como as terapias actuais. Por outro lado, para infecções ou para respostas imunes anti-tumores, seria interessante em ser capaz de activar os linfócitos de modo a que respondam de uma forma mais rápida aos agentes patogénicos. Deste modo, a presente invenção permite a escolha de agentes úteis, por exemplo, compostos orgânicos sintéticos que podem activar e/ou desactivar os linfócitos proporcionando um componente chave previamente desconhecido no trilho de activação do linfócito.

De um modo adicional, à medida que se compreende o trilho de activação de um modo mais completo, há a possibilidade de modular o trilho de um modo mais eficaz, por exemplo, proporcionando agentes que são selectivos para um conjunto ou para um subconjunto em particular de uma população celular. Como em muitos casos a activação requer a co-estimulação, a capacidade para manipular os agentes disponíveis para a célula pode permitir uma tal actividade celular. Neste contexto, a identificação de uma proteína alvo que pode ser usada para o desenvolvimento de medicamentos que modulam um determinado trilho, como seja o trilho de activação mediado por CAML, iriam permitir que os médicos tratassem de um modo concreto as diferentes situações de imunidade sem estimular em demasia ou sem suprimir em excesso outros aspectos delicados do sistema imunitário que, em caso contrário, se encontram a funcionar de modo correcto. Tal estimulação direccionada pode ser usada para amplificar especificamente os efeitos dos estimuladores imunes, como seja o IL-2, permitindo deste modo o uso de dosagens inferiores do estimulador imunológico e reduzindo os efeitos secundários.

De um modo adicional, a presente invenção representa um importante avanço na compreensão do trilho de activação mediada por CAML ao permitir a avaliação selectiva e o controlo relativamente à presença ou à ausência de um intermediário específico nesse trilho. Isto pode ser conseguido com um animal usando a recombinação homóloga, com a integração de genes proporcionando sequências de sentido contrário, a introdução de estruturas de expressão que envolvem promotores que podem ser induzidos e afins. Existe também um interesse em serem capazes de determinar quando um gene em particular se encontra a ser expresso ou se encontra em silêncio, o tipo das células em que a proteína se exprime e afins. Deste modo, existe um interesse substancial na

identificação de componentes específicos dos trilhos celulares de modo a permitir a compreensão de um trilho de activação, modulando de um modo selectivo esse trilho, e desenvolvendo medicamentos que podem ser activos na ligação à proteína alvo. Desta forma, os medicamentos podem ser estudados de modo a inibirem tais trilhos específicos.

Um aspecto em particular da presente invenção inclui uma vistoria de medicamentos que usa TACI como uma ferramenta para o desenvolvimento de medicamentos imuno supressores específicos dos linfócitos do tipo B. Tais medicamentos imuno supressores poderão bloquear de um modo selectivo a acção dos linfócitos de tipo B ao mesmo tempo que deixas intactas as células T de modo a que protejam os pacientes das patogenias virais. Estes medicamentos seriam úteis no tratamento de doenças como sejam o Lúpus Sistémico Eritematosico, uma doença que é devida a uma activação excessiva da resposta dos linfócitos do tipo B, ou do mieloma múltiplo (por exemplo, o Mieloma Bence-Jones).

A reticulação da proteína TACI activa a entrada de cálcio e potencialmente outros mensageiros secundários. O seu modo de acção pode ser mediado por CAML. Ao contrário das moléculas de sinalização da superfície das células conhecidas que são as células do tipo B ou as células do tipo T, como as CD4, CD8, TCR, e CD3, o novo receptor de superfície das células de acordo com a presente invenção interage fisicamente com o CAML. De um modo adicional não existe qualquer homologia de sequências entre o novo receptor de superfície das células de acordo com a presente invenção e qualquer uma destas moléculas de sinalização da superfície das células conhecidas, ou quaisquer outras moléculas de sinalização da superfície das células.

Proteínas TACI e Polipeptidos

Numa forma de realização genérica, a presente invenção proporciona proteínas TACI. Tais proteínas incluem um domínio extracelular, um domínio trans membrana, e um domínio citoplásmico. O domínio extra celular liga o ligante. Aquando da ligação do ligante, o domínio citoplasmico liga CAML, iniciando deste modo um trilho de activação dependente do Ca^{2+}. A oligomerização, por exemplo fazendo-se a ligação do ligante com um anticorpo anti receptor inicia também um trilho de activação dependente do Ca^{2+}.

A forma monométrica da proteína TACI contém cerca de 295 aminoácidos. Da forma aqui usada "cerca de 295 aminoácidos" significam entre 265 e 325 aminoácidos, isto é, de um modo aproximado, mais ou menos 10%.

A presente invenção refere-se ainda a componentes funcionalmente activos de polipeptido de TACI. De acordo com um aspecto, um componente activo de funcionalidade de TACI é um fragmento antigénico, por exemplo um péptido reactivo com anticorpos anti-TACI, ou que, quando conjugados com um veículo, podem ser usados para gerar anticorpos anti TACI, Um outro fragmento funcionalmente activo inclui o domínio extracelular que liga o ligante. O domínio extracelular corresponde ao fragmento de TACI com terminação em N correspondente ao domínio extracelular.

Um outro fragmento funcionalmente activo é o domínio citoplásmico, por exemplo desde a extremidade com o terminal em forma de C do domínio da trans membrana até ao terminal em forma de C do TACI. O domínio citoplásmico do TACI faz a mediação da transdução do sinal através dos mecanismos dependentes do Ca^{2+} ou dependentes do Ca^{2+}.

O domínio citoplasmico inclui a região de ligação do CAML do TACI. Em particular, este domínio faz a ligação de um polipeptido correspondente aos 146 resíduos de aminoácidos de CAML com os terminais em forma de N. Numa forma de realização específica o domínio citoplásmico corresponde a uma quantidade que cai desde cerca de 187 aminoácidos para cerca de 293 resíduos de aminoácido da SEQ ID NO:2.

Numa outra forma de realização, a presente invenção proporciona fragmentos proteotípicos de uma proteína TACI. Tais fragmentos podem ser preparados através de digestão enzimática, por exemplo com Polipeptidos Saureus V8 em tripsinba de papaina, em quimiotripsina, em catepsina, em colagenase, em enteropeptidase, em trombina ou em enzimas fibroliticos ou de revestimento; através da clivagem química, por exemplo com bromida cianogénica, ou com hidreto de boro e sódio; etc.

Numa forma de realização específica, a proteína de TACI é uma proteína de receptor que tem a sequência de aminoácidos de acordo com o ilustrado na SEQ ID NO:2 a partir do resíduo 1 até ao resíduo 293. A presente invenção contempla a variações alelicas de TACI, as proteínas homologas de TACI a partir de outras especiais, e TACI análogas, por exemplo preparadas fazendo substituições de aminoácidos conservatórias, quer através da engenharia genética quer através de síntese química. UM análogo da TACI na presente invenção inclui ainda fragmentos antigénicos de TACI que contêm, por exemplo, um resíduo de cistina terminal de modo a tornar mais fácil a reticulação a uma proteína de transportador.

Não há sequências de DNA relatadas que se encontrem relacionadas de perto com a do TACI-1. Uma pesquisa de motivos Prosite no TACI-1 revela um padrão TNFR_NGFR, o qual consiste por C-x(4,6)-[FYH]-x(5,10)-C-x(0,2)-C-x(2,3)-C-

x(7.11)-C-x(4,6)-[DNEQSKP]-x(2)-C na metade terminal em N da proteína (em que, por exemplo, C-x(4,6)-[FYH] é indicador de uma sequência de aminoácidos que começa com cistina e que é seguida por 4, 5 ou 6 aminoácidos não especificados, que são ainda seguidos ou por uma fenil alanina, por uma tirosina ou por uma histidina). Este motivo encontra-se em várias proteínas a maioria das quais são receptores para os factores de crescimento. Algumas destas proteínas apresentam uma cópia deste motivo. Uma comparação da sequência da proteína de TACI-1 consigo própria revela uma repetição significativa entre o motivo TNFR_NGFR nos resíduos 33-66 e nos resíduos 70-104. Esta análise chamou a atenção para a presença de dois domínios do tipo TNFR ricos em cistina que compreendem as regiões que indicam que TACI-1 é um membro da super família de receptores TNFR.

Polipeptidos TACI sintéticos. O termo "polipeptido" é usado no seu sentido mais amplo de modo a referir-se a um composto de entre dois ou mais subunidades de aminoácidos, de análogos de aminoácidos ou semelhantes a péptidos.

As subunidades podem ser ligadas através de ligações de péptidos. Em outra forma de realização, a subunidade pode estar ligada por outras ligações, por exemplo, por Ester, por éter, etc. De acordo com o aqui usado o termo aminoácido"refere-se a aminoácidos naturais e/ ou não naturais ou sintéticos, incluindo a glicina e os isómeros ópticos D ou L, e os análogos dos aminoácidos e as cópias dos péptidos. Um péptido de três ou mais aminoácidos é habitualmente designado como sendo um oligopeptido se a cadeia de péptido for curta. Se a cadeia de péptido for longa, o péptido é habitualmente designado como sendo um polipeptido ou uma proteína. De acordo com a presente invenção, os fragmentos TACI, como sejam os fragmentos

antigénicos, ou potencialmente ainda os TCI completos, podem ser preparados de um modo sintético.

Os polipeptidos sintéticos, preparados usando as técnicas bem conhecidas da fase sólida, da fase líquida, ou as técnicas de condensação de péptidos, ou qualquer combinação dos mesmos, podem incluir aminoácidos naturais ou não naturais. Os aminoácidos usados para a síntese de péptidos podem ser Boc padrão resina acida amino (N^{α} - com protecção de amino N^{α} - t - butiloxicarbonito) com uma protecção, neutralização, ligação e protocolos de limpeza do procedimento da fase sólida original de Merrifield (J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)), ou base labile N^{α} - com protecção de amino 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) aminoácidos descritos pela primeira vez por Carpino e Han (J. Org. Chem., 37:3403-3409 (1972)). Ambos os aminoácidos Fmoc e Boc N^{α} - com protecção de amino podem ser obtidos em Fluka, Bachem, Advanced Chemtech, Sigma, Cambridge Research Biochemical, Bachem ou Península Labs ou outras companhias de produtos químicos que se encontrem familiarizadas com os que praticam esta técnica. De um modo adicional, o processo de acordo com a presente invenção pode ser usado com outros grupos de protecção de N^{α} que são familiares aos peritos na presente técnica. A síntese dos péptidos da fase sólida pode ser efectuada por intermédio de técnicas que são conhecidas dos peritos na técnica e que se encontram indicadas em, por exemplo, Stuart and Young, 1984, Solid Phase Syntesis, Segunda Edição, Pierce Chemical Co., Rockford, IL; Field e Noble, 1990, Int. J. Pept. Protein Res. 35:161-214, ou usando sintetizadores automáticos como sejam os que são vendidos por ABS. Deste modo, os polipeptidos de acordo com a presente invenção podem compreender os aminoácidos D, uma combinação de aminoácidos D e L, e vários aminoácidos "especiais" (por exemplo, aminoácidos de β-metilo, aminoácidos de Cα-metilo, e

aminoácidos de Nα-metilo, etc.) de modo a transmitirem propriedades especiais. Os aminoácidos sintéticos incluem a ornitina para a lisina, a fluoro-fenilalanina para a fenil alanina, e a norleucina para a leucina ou para a isoleucina. De um modo adicional, ao serem designados aminoácidos específicos em etapas de ligação específicas podem ser geradas hélices α, voltas β, hélices β, curvas γ e péptidos cíclicos.

Numa outra forma de realização, as subunidades de péptidos podem conferir propriedades químicas e estruturais úteis. Por exemplo, os péptidos que compreendem aminoácidos D serão resistentes a proteases específicas de aminoácidos L in vivo. De um modo adicional, a presente invenção tem como objectivo preparar péptidos que apresentam propriedades estruturais melhor definidas, e o uso de semelhantes a péptidos, ou de ligações semelhantes a péptidos, como sejam ligações de Ester, de modo a preparar péptidos com novas propriedades. Numa outra forma de realização, pode ser gerado um péptido que incorpora uma ligação de péptido reduzida, isto é R_1-CH2-NH-R_2, em que R_1 e R_2 são resíduos ou sequências de aminoácidos. Uma ligação reduzida de péptido pode ser introduzida como sendo uma subunidade de dipeptido. Uma tal molécula será resistente à hidrólise da ligação de péptido, por exemplo, à actividade de protease. Tais péptidos iriam proporcionar ligantes com funções e actividades únicas, como sejam as meias-vidas alongadas in vivo como resultado da resistência à quebra metabólica da actividade da protease. De um modo adicional é bem sabido que em certos sistemas os péptidos limitados apresentam uma actividade funcional aumentada (Hruby, Life Sciences, 31:189-199 (1982)); (Hruby e outros, Biochem J., 168:249-262 (1990)); a presente invenção proporciona um processo destinado a produzir um péptido com

uma limitação que incorpora sequências aleatórias em todas as outras posições.

Aminoácidos não clássicos que induzem limitações de conformação

Os aminoácidos não clássicos que se seguem podem ser incorporados no péptido de modo a introduzirem outros motivos de conformação particulares: 1, 2, 3, 4 - tetrahidroisoquinolina - 3 - carboxilato (Kazmierski e outros, J. Am. Chem. Soc., 113:2275-2283 (1991)); (2S, 3S) - metil fenil alanina, (2S, 3R) - metil fenil alanina, (2R, 3S) - metil fenil alanina e (2R, 3R) - metil fenil alanina, (Kazmierski e Hruby, Tetrahedron Lett., (1991)); 2 - amino tetra hidronaftaleno - 2- ácido carboxílico (Landis, PhD. Thesis, University of Arizona (1989)): hidroxi 1, 2, 3, 4 - tetrahidroisoquinolina - 3 - carboxilato (Miyake e outos, J. Takeda Res. Labs, 43:53-76 (1989)); β - carbolina (D e L) (Kazmierski, PhD. Thesis, University of Arizona (1988)); HIC (ácido carboxílico de histidina isoquinolina) (Zechel e outros, Int. J. Pep. Protein Res., 43 (1991)); e HIC (ureia cíclica de histidina) (Dharanipragada).

Os seguintes análogos de aminoácidos e os semelhantes a peptidos podem ser incorporados num péptido para induzir ou favorecer estruturas secundárias específicas: LL-Acp (LL - 3 - amino - 2 - propenidona - 6 - ácido carboxílico), um dipeptido análogo que induz uma rotação β (Kemp e outros, J. Org. Chem., 50:5834-5838 (1985)); análogos que induzem uma rotação β (Kemp e outros, Tetrahedron Lett., 29:5081-5082 (1988)); análogos que induzem uma folha β (Kemp e outros, Tetrahedron Lett., 29:5057-5060 (1988)); análogos que induzem uma hélice α (Kemp e outros, Tetrahedron Lett., 29:4935-4938 (1988)); análogos que induzem uma rotação γ (Kemp e outros,

J. Org. Chem., 54:109-115 (1989)); e os análogos proporcionados pelas seguintes referências: Nagai e Sato, Tetrahedron Lett., 26:647-650 (1985); Di Maio e outros, J. Chem. Soc. Perkin Trans., p. 1687 (1989); ainda um análogo de uma rotação Gli-Ala (Kahn e outros, Tetrahedron Lett., 30:2317 (1989)): o isótopo da ligação de amido (Jones e outros, Tetrahedron Lett., 29:3853-3856 (1988)); tretrazol (Zabrocki e outros, J. Am. Chem. Soc., 110:5875-5880 (1988)); DTC (Samanen e outros, Int. J. Protein Pep. Res., 35:501:509 (1990)); e os análogos revelados em Olson e outos, J. Am. Chem. Sci., 112:323-333 (1990) e Garvey e outos, J. ORg. Chem., 56:436 (1990). Idênticos restringidos do mesmo modo das rotações beta e dos volumes betas, e os péptidos que os contêm encontram-se descritos na Patente dos Estados Unidos nº 5 440 013 concedida a Kahn em 8 de Agosto de 1995.

Derivados de proteínas. Há dois grupos principais de ligações péptido - hidrato de carbono às proteínas. Em primeiro lugar as ligações de éter unem a serina ou o hidroxilo de teonina a um hidroxilo do açúcar. Em segundo lugar, as ligações de amido unem os grupos carboxilo do glutamato ou do aspartato a um grupo amino do açúcar. As ligações acetal e quetal podem ainda ligar o hidrato de carbono a um péptido.

De um modo geral, a proteína TACI, ou um fragmento da mesma, como seja o fragmento de domínio extra celular de terminal em N ou o fragmento de domínio de ligação CAML citoplasmico terminal em C podem ser derivados através da ligação de uma ou mais das partes químicas à parte de proteínas. A modificação química do componente biologicamente activo, ou dos componentes biologicamente activos, pode proporcionar vantagens adicionais em certas condições, como seja um aumento na estabilidade e no tempo de circulação do componente ou dos componentes e a diminuição da sua capacidade de imunização. Veja-se a Patente dos Estados

Unidos nº 4 179 337, em nome de Davies e outros, concedida em 18 de Dezembro de 1979. Para leitura, veja-se Abuchowski e outros, em Enzymes as Drugs (J. S. Holcerberg e J. Roberts, eds, ppp 367-383 (1981)). Uma revisão de um artigo que descreve a modificação das proteínas e a fusão das proteínas encontra-se em Francis, Focus ou Growth Factors, 3:4-10 (1992), Mediscript: Mountview Court, Friern Barnet Lane, Londres N20, OLD, Reino Unido.

As porções químicas adequadas para a derivação podem ser escolhidas de entre os polímeros solúveis e insolúveis em água, sendo preferidos os polímeros solúveis em água. O polímero seleccionado pode, de preferência, ser solúvel em água de modo a que o componente ao qual se encontra ligado não precipite num meio aquoso, como seja um ambiente fisiológico. De um modo preferencial, para o uso terapêutico da preparação de produto final, o polímero será farmacologicamente aceitável. UM perito na técnica poderá seleccionar o polímero desejado com base em considerações como sejam o saber se o conjunto entre o polímero e o componente serão usados de um modo terapêutico e, em caso afirmativo, a dosagem desejada, o tempo de circulação, a resistência à proteólise e outras considerações.

Para os presentes componentes, estes podem ser avaliados usando os testes aqui fornecidos.

Proteínas TACI tituladas. A proteína TACI de acordo com a presente invenção Ap, e os seus fragmentos, podem ser titulados. Tias títulos podem ser incluir as enzimas os fluoroferos (por exemplo o isotiocionado de fluorescência (FITC), a ficoeritrina (PE), o vermelho do Texas (TR), a rodamina, séries de sais de lantanida livres ou quelados, em especial Eu^{3+} somente para nomear alguns fluoroferos), cromóferos, rádio isótopos, agentes quelantes, corantes, ouro

coloidal, partículas de látex, ligantes (por exemplo, biotina), e agentes quimioluminiscentes. Quando é empregue um marcador de controlo, os mesmos ou diferentes títulos podem ser usados para a amostra de teste e para o marcador de controlo.

Por exemplo quando é usado um marcador radioactivo como sejam os isótopos ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S, ^{36}Cl, ^{51}Cr, ^{58}Co, ^{59}Fe, ^{90}Y, ^{125}I, ^{131}I e ^{186}Re, os procedimentos de contagem actualmente usados podem ser usados. No caso de o marcador ser uma enzima, a detecção pode ser conseguida através de uma qualquer técnica de calorimetria, de espectrototometria, de fluoroespectrometria, de amperometria ou de gasometria presentemente conhecida na técnica.

Os marcadores directos constituem um exemplo de marcadores que podem ser usados de acordo com a presente invenção. Um marcador directo foi definido como sendo uma entidade que, no seu estado natural, é facilmente visível quer através do uso de um filtro óptico e/ou de estimulação aplicada, por exemplo de luz UV para promover a fluorescência. Entre os exemplos de marcadores coloridos que podem ser usados na presente invenção incluem-se as partículas metálicas, por exemplo as partículas de ouro como as que se encontram descritas por Leuvering (Patente dos Estados Unidos nº 4 313 734); as partículas de corante como sejam as que se encontram descritas por Gribnau e outros (Patente dos Estados Unidos nº 4 373 932) e May e outos (WO 88/08534); o látex colorido como o que se encontra descrita por May, acima, por Snyder (EP - A 0 280 559 e 0 281 327); ou os corantes encapsulados em liposomas de acordo com o descrito por Campbell e outros (Patente dos Estados Unidos nº 4 703 017). Outros marcadores directos incluem um nucleótido de rádio, uma parte fluorescente ou uma parte luminescente. Para além destes dispositivos de titulação directa, os tituladores indirectos

que incluem os enzimas podem ser também usados de acordo com a presente invenção. Vários tipos de testes de imunidade ligados com os enzimas são bem conhecidos na técnica, por exemplo, a fosfatase alcalina e a peroxaidade de rábano silvestre, a lisozima, a dehidrogenase de glucose-6-fosfase, a dehidrogenase lactase, a urease, estes e outros compostos foram discutidos ao pormenor por Eva Engvall em Enzyme Immunoassay ELISA e EMIT em Methods in Enzymology, 70:419-439 (1980) e na Patente dos Estados Unidos nº 4 857 453.

Enzimas adequados incluem, de um modo não limitativo, a fosfatase alcalina e a peroxaidade de rábano silvestre.

Outros marcadores destinados a serem usados na presente invenção incluem os grânulos magnéticos ou os marcadores de imagiologia de ressonância magnética.

Numa outra forma de realização pode ser criado um local de fosforilação num anticorpo da presente invenção de modo a fazer a titulação com ^{32}P, por exemplo, na Patente Europeia nº 0372707 (Pedido nº 89311108.8) em nome de Pestka ou a Patente dos Estados Unidos nº 5 459 240 concedida em 17 de Outubro de 1995 a Foxwell e outros.

Conforme se encontra aqui exemplificado, as proteínas, incluindo os anticorpos, são titulados através de titulação metabólica. A titulação metabólica tem lugar durante a incubação in vitro das células que exprimem a proteína na presença de um meio de cultura suplementado com um titulador metabólico, como seja a (^{35}S)-metionina ou a (^{32}P)-ortofosfase. Para alem da titulação metabólica (ou bio sintética) com (^{35}S)-metionina, a presente invenção contempla ainda a titulação com aminoácidos (^{14}C) e com aminoácidos (^{3}H) (com o tritio substituído em posições não labiais).

Proteínas TACI Quiméricas

Uma proteína TACI quimérica de acordo com a presente invenção pode ser uma proteína que é gerada através da união de um domínio funcional de uma proteína TACI, como seja o domínio ligante ou o domínio de ligação CAML, com o domínio complementar de uma outra proteína, por exemplo, um receptor alternativo. As estruturas quiméricas podem ser também preparadas por um fragmento funcionalmente activo de uma proteína TACI e de uma outra molécula funcionalmente activa. Por exemplo, o domínio extra celular de uma proteína TACI pode ser unido ao domínio Fc de uma imunoglobulina. De um modo alternativo, o domínio citoplásmico de uma proteína TACI pode ser unido a um receptor ligante, como seja um transferidor ou uma hormona, para o direccionamento intracelular. Numa outra forma de realização um domínio TACI pode ser unido a uma outra molécula de direccionamento, como seja uma molécula de cadeia pesada ou de cadeia leve de anti-imunoglobulina (por exemplo, uma porção Fv de um anticorpo) de modo a visar especificamente as células B. Numa outra forma de realização o fragmento funcionalmente activo de uma proteína TACI, de preferência o domínio extra celular com terminal em N, pode ser unido com um glicosil fosfolipido como seja o glicosil fosfoinositol, fixar uma sequência de sinal, de preferência localizada no terminal C do fragmento TACI de modo a que uma proteína fixada a um glico lípido seja gerada (Cross, Annu. Ver. Cell Biol., 6:1-39 (1990); Low, Biochem. J. 244:1-13 (1987)).

Um receptor quimérico TACI pode ser preparado unindo o domínio de outra molécula de receptor com um domínio de trans membrana e o domínio intra celular de uma proteína TACI. Numa outra forma de realização, o domínio extra celular do TACI pode ser unido com um domínio de trans membrana e um domínio intra celular de outra molécula de receptor. O domínio de

trans membrana pode ser o domínio de trans membrana de uma proteína TACI, o domínio de trans membrana do outro receptor ou um domínio de trans membrana diferente. De um modo preferencial, o domínio de trans membrana é do mesmo componente de proteína da chaminé como domínio extra celular. Os receptores quiméricos já foram descritos (Publicações de Patentes Internacionais WO 96/23814; WO 96/23881 e WO 96/24671). Os receptores quiméricos de antigénios foram descritos (Capon e outros, Patente dos Estados Unidos nº 5 359 046, concedida em 25 de Outubro de 1994), incluindo os receptores funcionais específicos dos antigénios gerados nas células do tipo B (Sanchez e outros, J. Exp. Med., 178:1049-1055 (1993)) e das células T (Burkhardt e outros, Mol. Cell. Biol., 14:1095-1103 (1994)) fazendo a fusão das cadeias de transdução de sinal lgα e lgβ em lgM. Os vários receptores de citoquina do tipo I e do tipo II, incluindo o interferão-α, o interferão-β, o interferão-γ, a interleuquina-1, a interleuquina-2, a interleuquina-3, a interleuquina-4, a interleuquina-6, a interleuquina-8, a interleuquina-10, a interleuquina-12, a eritropoietina, o factor de estimulação da colónia de granulócitos macrófagos (CSF), granulócito-CSF, macrófago-CSF, receptores de quemoquina-α e receptores de quemoquina-β, podem proporcionar componentes complementares num receptor quimérico compreendendo um fragmento funcionalmente activo de uma proteína TACI.

Como os que os detentores de conhecimentos médios na técnica podem apreciar, os domínios de trans membrana são de um modo geral equivalentes funcionais na fixação de uma proteína numa membrana. No entanto, a presença de resíduos específicos de aminoácidos num domínio de trans membrana podem afectar a interacção do receptor afectado com, por exemplo, dimerização, ou associação com outras proteínas de membranas integrais, como seja um completo de receptor de proteínas

múltiplas. Deste modo, a selecção do domínio de trans membrana depende de se as funções reguladoras efectuadas pelo domínio de trans membrana de acordo com o desejado ou com o necessário.

Proteínas TACI que Codifica Ácidos Nucleicos

A presente invenção contempla o isolamento de um gene que codifica uma proteína TACI que inclui um comprimento total, ou que naturalmente ocorre na natureza da proteína TACI e quaisquer fragmentos de antigénios da mesma a partir de qualquer animal, em especial de um mamífero e mais em concreto a partir de um ser humano. Da forma aqui usada, o termo "gene" refere-se a um conjunto de nucleótidos que codificam um polipeptido, e incluem cDNA e ácidos nucleicos de DNA.

De acordo com a presente invenção podem ser usadas técnicas convencionais de biologia molecular, de micro biologia e de DNA recombinante no interior da técnica. Tais técnicas são explicadas de um modo completo na literatura. Ver, por exemplo, Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edição (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque (de aqui em diante "Sambrook e outros, 1989"); DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I e II (D. N. Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed. 1984); Nucleic Acid Hibridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1985)); Transcription and Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1984)); Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed. (1986)); Immobilizes Cells And Enzymes (IRL Press, (1986)); B. Perbal, A Practival Guide To Molecular Cloning (1984); F. M. Ausubel e outros (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

Deste modo, se aparecerem na presente, os termos seguintes terão as definições que se encontram de seguida.

Um "vector" é uma réplica, como seja um plasmida, um fago ou um cosmido, ao qual o outro segmento de DNA pode ser preso de modo a provocar a réplica do segmento anexo. Uma "réplica" é qualquer elemento genérico (por exemplo, um plasmida, um cromossoma, um vírus) que funcionam como uma unidade autónoma da replica de DNA em vivo, isto é, capaz de fazer a réplica sob o seu próprio controlo.

Uma "cassete" refere-se a um segmento de DNA que pode ser inserido num vector em locais de restrição específicos. O segmento de DNA codifica um polipeptido que interessa, e a cassete e os locais de restrição se encontram concebidos de modo a assegurar a inserção da cassete no momento de leitura adequado para a transcrição e para a translação.

Uma célula foi "transfectada" por intermédio de DNA exógenos ou heterologos quando o referido DNA tiver sido introduzido no interior da célula. A célula foi "transformada" por intermédio de DNA exógeno ou heterologo quando a DNA transfectada fizer uma mudança fenotípica. De um modo preferencial, o DNA em transformação deve ser integrado (através de uma ligação covalente) num DNA cromossómico constituindo o genoma da célula.

DNA "heterologo" refere-se a DNA que não se encontra naturalmente localizado na célula, ou num local promossómico da célula. De um modo preferencial o DNA heterologo inclui um gene estranho à célula.

Uma "molécula de acido nucleico" refere-se à forma de fosfato de éster dos ribonucleosideos (adenosina, guanosina, uridina ou citidina; "moléculas de RNA") ou desoxirubonucleosideos

(deoxidenosina, deoxyguanosina, deoxitimidina ou deoxicitidina; "moléculas de DNA"), ou quaisquer análogos de fosfoester das mesmas, como sejam fosforotiatos e tioesteres, de uma forma de cadeia simples ou em hélice de cadeia dupla. As hélices de cadeias duplas DNA - DNA, DNA - RNA e RNA - RNA são possíveis. O termo molécula de ácido nucleico e em particular a molécula de DNA ou de RNA refere-se somente à estrutura primária e secundária da molécula, e não o limita a quaisquer formas terciárias particulares. Deste modo, este termo inclui a cadeia dupla de DNA, entre outras, em moléculas de DNA lineares ou circulares (por exemplo, fragmentos de restrição), plasmidas e cromossomas. Ao discutir-se a estrutura das moléculas de DNA de cadeias duplas em particular, as sequências podem ser descritas na presente de acordo com a convenção normal de atribuição somente na direcção 5' ou 3' ao longo da cadeia de DNA não transcrita (isto é, a cadeia que tem uma sequência homologa no mRNA). Uma "molécula de DNA recombinante" é uma molécula de DNA que foi submetida a uma manipulação molecular biológica.

Uma molécula de acido nucleico é "hibridizável" para outra molécula de ácido nucleico, como seja um cDNA, o DNA genómico, ou o RNA, quando uma cadeia simples da molécula de acido nucleico pode anelizar para a outra molécula de ácido nucleico sob as condições adequadas da temperatura e da resistência iónica da solução (ver Sambrook e outros, mais acima). As condições de temperatura e de resistência da solução iónica determinam a "estringencia" da hibridação. Para a pesquisa preliminar de ácidos nucleicos homólogos, de condições de hibridação de estringencia correspondentes a T_m de 55° podem ser usadas, por exemplo 5 x SSC, 0,1 % SDS, 0,25 % de leite, e nenhum formaldeido; ou 30 % de formaldeido, 5 x SSC, 0,5 % SCC. As condições de estringencia de hibridação moderada correspondem ao T_m mais elevado, por exemplo de 40 %

de formaldeido com 5 x ou 6 x SSC. As condições de estringencia de hibridação elevada correspondem ao T_m mais elevado, por exemplo de 50 % de formaldeido com 5 x ou 6 x SSC. A hibridação requer que os dois ácidos nucleicos contenham sequências complementares, muito embora dependentes da estrigencia da hibridação, as faltas de correspondência entre as bases são possíveis. A estrigencia adequada para a hibridação dos ácidos nucleicos depende da extensão dos ácidos nucleicos e do seu grau de complementaridade, variáveis que são bem conhecidas na técnica. Quanto maior for o grau de semelhança ou de homologia entre as duas sequências de ácidos nucleicos, maior será o valor de T_m para os híbridos dos ácidos nucleicos que apresentam essas sequências. A estabilidade relativa (correspondente a um T_m mais elevado) de ácido nucleico que diminui na seguinte ordem: RNA: RNA, DNA:RNA, DNA:DNA. Para híbridos que são maiores a 100 nucleótidos de extensão, as equações para calcular o T_m foram deduzidas (ver Sambrook e outros, acima, 9,50 - 0,51). Para a hibridação com ácidos nucleicos mais curtos, isto é, os oligonucleótidos, a posição das faltas de correspondência torna-se mais importante, e o comprimento do oligonucleótido determina a sua especificidade (ver Sambrook e outros, acima, 11,7 - 11,8). Um comprimento mínimo para um ácido nucleico hibridizavel é de pelo menos 10 nucleótidos; de preferência de pelo menos 18 nucleótidos; mais preferencialmente o comprimento é de pelo menos 24 nucleótidos, e mais preferencialmente ainda de pelo menos 30 nucleótidos de comprimento. Numa forma de realização específica, um ácido nucleico hibridizavel de acordo com a presente invenção tem uma sequência que corresponde a pelo menos 12 nucleótidos, de preferência de pelo menos 18 nucleótidos, de um modo mais preferencial de pelo menos 24 nucleótidos e mais preferencialmente ainda de pelo menos 30 nucleótidos de comprimento da SEQ ID NO:1, ou mais especificamente da sequência de codificação de SEQ ID NO:1.

Numa forma de realização específica, o termo “condições de hibridação padrão” refere-se a um T_m de 55° C, e usa as condições acima indicadas. Numa forma de realização preferida, o T_m e de 60° C, numa forma de realização mais preferida, o T_m e de 65° C.

Da forma aqui usada, o termo “oligonucleótido” refere-se a um ácido nucleico, de um modo geral com pelo menos 18 nucleótidos, que pode ser hibridizado numa molécula de DNA genomico, uma molécula de cDNA, ou uma molécula de mRNA que codifica uma proteína de TACI. Os oligonucleótidos podem ser titulados, por exemplo, com ^{32}P nucleótidos ou nucleótidos que apresentam um título, como seja a biotina, tendo sido conjugados de um modo covalente (ver a discussão acima relativamente à titulação dos polipeptidos TACI). Numa forma de realização, um nucleótido titulado pode ser usado como uma sonda de modo a detectar a presença de um ácido nucleico que codifica uma proteína de TACI. Numa outra forma de realização os oligonucleótidos (em que um ou ambos podem não se encontrar titulados) podem ser usados como primários PCR, quer clonando na sua extensão completa ou num fragmento de uma proteína TACI, ou detectar a presença de ácidos nucleicos que codificam uma proteína de TACI. Numa outra forma de realização, um oligonucleótido de acordo com a presente invenção pode formar uma hélice tripla com uma molécula de DNA TACI. De um modo geral, os oligonucleótidos são preparados de um modo sintético, de um modo preferencial num sintetizador de ácido nucleico. Deste modo, os oligonucleótidos podem ser preparados com ligações análogas de fosfoester que não se encontram presentes na natureza, como sejam as ligações de tioester, etc.

A “recombinação homologa” refere-se à inserção de uma sequência de DNA estranha de um vector num cromossoma. De um

modo preferencial, o vector tem como alvo um local de cromossomas alvo para uma recombinação homologa. Para a recombinação homologa específica, o vector irá conter regiões suficientemente longas de homologia em relação às sequências dos cromossomas de modo a permitir a ligação complementar e a incorporação do vector no cromossoma. As regiões mais longas de homologia, e os graus mais elevados de semelhança entre as sequências, pode aumentar a eficácia da recombinação homologa.

A "sequência de codificação" do DNA é uma sequência de DNA de cadeia dupla que é transcrita e alvo de uma translação para o interior de um polipeptido numa célula in vivo ou in vitro quando colocados sob o controlo de sequências regulatórias adequadas. Os limites da sequência de codificação são determinados por um codo de início no terminal (amino) 5' e um codo de paragem da translação, no terminal (carboxilo) 3'. Uma sequência de codificação pode incluir, mas não se encontra limitada, sequencias procarioticas, cDNA de mRNA eucariotico, sequências de DNA genómico de DNA eucariotico (por exemplo de mamíferos) e mesmo sequências de DNA sintético. Se a sequência de codificação se destinar a ser expressa numa célula eucariotica, um sinal de poliadenilação e uma sequência de terminação da transcrição será habitualmente localizado em 3' da sequência de codificação. Numa forma de realização específica, uma sequência de codificação TACI de acordo com a presente invenção tem a sequência de nucleótidos ilustrada na SEQ ID NO:1.

As sequências de controlo de transcrição e de translação são sequências reguladoras de DNA, como sejam os promotores, os incrementadores, os terminadores e afins, que proporcionam a expressão de uma sequência de codificação numa célula ospedeira. Em células eucarióticas, os sinais de poliadenilação são sequências de controlo.

Uma “sequência de promotor” é uma região regulatória de DNA capaz de fazer a ligação de polimerase RNA numa célula e de iniciar a transcrição de uma sequência de codificação descendente (direcção 3’). Com o objectivo de definir a presente invenção, a sequência de promotor é ligada no seu terminal 3’ pelo local de inicio da transcrição e prolonga-se para cima (direcção 5’) de modo a incluir um número mínimo de bases ou de elementos necessários para iniciar a transcrição em níveis que podem ser detectados acima do fundo. Dentro da sequência do promotor será encontrado um local de início da transcrição (definido de um modo conveniente, por exemplo, fazendo o mapeamento com nuclease S1), assim como domínios de ligação das proteínas (sequências de consensos) responsáveis pela ligação da polimerase de RNA.

Uma sequência de codificação encontra-se “sob o controlo” das sequências de transcrição e de translação no interior de uma célula quando a polimerase de RNA transcreve a sequencia de codificação para o interior de mRNA, o qual é então separado em trnas-RNA e descreve uma translação para o interior de uma proteína codificada pela sequência de codificação.
Uma “sequência de sinal” pode ser incluída no inicio da sequencia de codificação de uma proteína a ser expressa na superfície de uma célula. Esta sequência codifica um sinal de péptido, terminal em N em relação ao polipeptido maduro, que orienta a célula hospedeira para fazer a translocação do polipeptido. O termo “sequência de sinal de translocação” é usado na presente para se referir a este tipo de sequência de sinais.

As sequências de translocação de sinal podem ser encontradas associadas a uma pluralidade de proteínas nativas aos eucariotas e aos policariotas, e são muitas vezes funcionais em ambos os tipos de organismos. De um modo interessante, o

TACO de acordo com a presente invenção é transportado de modo a que o terminal em N é extra celular em relação à ausência de uma sequência de sinal separada. Deste modo, esta proteína de trans membrana é um timo de proteína de trans membrana do tipo III (incluindo uma estrutura quimérica de acordo com o acima indicado) se a porção terminal em forma de N da estrutura codifica o terminal em N de TACI, um sinal de péptido pode não ser necessário de modo a que se obtenha a expressão da proteína de trans membrana TACI.

Da forma aqui usada, o termo "homologia da sequência" em todas as suas formas gramaticais refere-se à relação entre as proteínas que possuem uma "origem evolutiva comum", incluindo as proteínas a partir de super famílias (por exemplo, a super família da imunoglobulina) e as proteínas homólogas provenientes de diferentes espécies (por exemplo miosina de cadeia leve, etc.) [Reeck e outros, Cell, 50:667 (1987)]. A presente invenção contempla naturalmente os homólogos da proteína TACI que se enquadram no âmbito da presente invenção.

Deste modo, o termo "semelhança da sequência", em todas as suas formas gramaticais refere-se ao grau de identidade ou uma correspondência entre as sequências de ácidos nucleicos ou de aminoácidos quer estas partilhem ou não uma origem evolutiva comum (ver Reeck e outros, acima). Em uso comum, o termo "homologo" quando modificado com um advérbio como seja o "muito" pode referir-se a uma semelhança de sequência semelhante e não a uma origem evolutiva comum.

Numa forma de realização específica, duas sequências de DNA são "substancialmente homólogas" ou "substancialmente similares" quando pelo menos cerca de 60 % (de preferência pelo menos cerca de 75% e de um modo mais preferencial pelo menos cerca de 90 ou 95%) dos nucleótidos se corresponderem

ao longo do comprimento definido de sequências de DNA. As sequencias que são substancialmente homologas podem ser identificadas através da comparação das sequencias usando programas informáticos convencionais que se encontram disponíveis em sequencias de bancos de dados, ou numa experiência de hibridação Southern sob, por exemplo, condições estringentes de acordo com o definido para esse sistema em particular. A definição de condições de hibridação adequadas encontra-se dentro do âmbito da técnica. Ver, por exemplo, Maniatis e outros, mais acima; DNA Cloning, Vols I(e II, acima; Nucleic Acid Hibridization, acima. A presente invenção contempla nucleótidos que são em 60% idênticos a SEQ ID NO: 1 (ou a sua sequência complementar), e de um modo mais preferencial idênticos em 75 %. De um modo preferencial tais ácidos nucleicos similares são homólogos.

Do mesmo modo, numa forma de realização em particular, duas sequências de aminoácidos são “substancialmente homologas” ou “substancialmente similares” quando mais de 30 % dos aminoácidos são idênticos, ou maiores do que 60 % são similares (funcionalmente idênticos). De um modo preferencial, as sequências similares ou homólogas são identificadas por alinhamento usando, por exemplo, o programa GCG (Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, Version 7, Madison, Wisconsin).

O termo “correspondente a” é aqui usado de modo a referir-se a sequências homólogas ou similares, quer a posição exacta seja igual ou diferente da molécula relativamente à qual a similaridade ou a homologia é medida. Deste modo, o termo “correspondente a” refere-se à semelhança da sequência e não à numeração dos resíduos de aminoácidos ou das bases de nucleótidos.

Um gene que codifique uma proteína TACI, quer seja DNA genómico ou cDNA, pode ser isolado a partir de qualquer origem, em especial a partir de uma biblioteca de cDNA humano ou de uma biblioteca genómica. Os processos para a obtenção do gene da proteína de TACI são bem conhecidos na técnica, de acordo com o acima descrito (ver, por exemplo, Sambrook e outros, 1989, acima).

Deste modo, qualquer célula de animal potencialmente pode servir como fonte de ácido nucleico para a clonagem molecular de um gene de proteína de TACI. O DNA pode ser obtido através dos processos convencionais conhecidos na técnica do DNA clonado (por exemplo, a "biblioteca" DNA) e de um modo preferencial é obtido a partir de uma biblioteca de cDNA preparada com tecidos de um elevado nível de expressão da proteína (por exemplo uma biblioteca de cDNA do timo pois os glóbulos sanguíneos periféricos e em particular as células de linfócitos aparentam ter os níveis mais elevados de expressão da proteína TACI), através de síntese química, através de clonagem cDNA, ou através da clonagem de DNA genómico, ou dos seus fragmentos purificados a partir da célula desejada (ver, por exemplo, Sambrook e outros, 1989, acima; Glover, D.M. (ed.), 1985, DNA Cloning: A Practical Approach, MRL Press, Ltd., Oxford, Reino Unido, Vol. I, II). Os clones derivados do DNA genómico podem conter regiões de regulação e de introdução de DNA para além das regiões d codificação; os clones derivados do cDNA não irão conter sequências de introdução. Qualquer que seja a origem, o gene deve ser molecularmente clonado num vector adequado para a propagação do gene.

Na clonagem molecular do gene a partir do DNA genomico, os fragmentos de DNA são gerados, em que alguns deles irão codificar o gene desejado. O DNA pode ser clivado em locais específicos usando vários enzimas de restrição. De um modo

alternativo pode usar-se DNAse na presença de manganésio de modo a fragmentar o DNA, ou o DNA pode ser fisicamente partido, por exemplo por intermédio de ultra sons. Os fragmentos de DNA linear pode ser então separados de acordo com o seu tamanho através de técnicas padrão, incluindo, de um modo não limitativo, a electroforese de gel de poliacrilamida de agarose e a cromatografia de coluna.

Quando os fragmentos de DNA são gerados, a identificação do fragmento de DNA específico contendo o gene de proteína TACI desejado pode ser conseguido de diversas formas. Por exemplo, uma porção de um gene de uma proteína TACI ou o seu RNA específico ou um fragmento do mesmo, pode ser purificado e titulado, e os fragmentos de DNA gerados podem ser então pesquisados através de hibridação de acido nucleico à sonda titulada [Benton and Davis, Science, 196:180 (1977)]; [Grunstein e Hogness, Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A., 72:3961 (1975). Por exemplo, um par de oligonucleótidos correspondentes às informações de sequência de aminoácidos obtidas através da proteína TACI pode ser preparado usando sondas para a codificação do DNA que codifica uma proteína, ou de TACI, ou primários para o cDNA ou para o MRNA (por exemplo, em combinação com um primário poli-T para o RT_PCR). De um modo preferencial é seleccionado um fragmento que é único relativamente à proteína TACI da presente invenção: OS fragmentos de DNA com uma homologia substancial relativamente à sonda vão hibridizar. Conforme se encontra acima indicado, quanto maior for o grau de homologia, mais rigorosas são as condições de hibridação que podem ser usadas. Numa forma de realização específica, as condições de hibridação rigorosas são usadas para identificar um gene de proteína TACI homologo.

Podem ser feitas escolhas adicionais com base nas propriedades do gene, por exemplo, se o gene codificar um

produto com proteínas tendo uma composição isoelectrica, electroforética ou de aminoácidos, ou uma sequência de aminoácidos parcial da proteína TACI de acordo com o aqui descrito. Deste modo, a presença do gene pode ser detectada por intermédio de testes baseados nas propriedades físicas, químicas ou imunológicas do seu produto expresso. Por exemplo, os clones cDNA, ou os clones DNA que seleccionam por intermédio de híbridos os mRNAs adequados, que podem ser seleccionados de modo a produzirem uma proteína que, por exemplo, tem uma migração electroforética similar ou idêntica, uma focagem isoelectica ou um comportamento de electroforese de gel de pH de não equilíbrio, ou propriedades antigénicas conhecidas relativamente à proteína TACI.

O gene da proteína TACI de acordo com a presente invenção pode ser também identificado através de selecção de mRNA, isto é, através de hibridação de ácido nucleico seguida por translação in vitro. Neste processo, os fragmentos de nucleótidos são usados de modo a isolarem os mRNAs complementares através de hibridação. Tais fragmentos de DNA podem representar DNA de proteína TACI purificado disponível ou podem ser oligonucleótidos sintéticos concebidos a partir de informações de aminoácidos se sequência parcial. A análise da precipitação imunulógica ou os testes funcionais (por exemplo a actividade de ligação CAML) dos produtos de translação in vitro dos produtos das mRNAs isoladas identifica o mRNA e, deste modo, os fragmentos de DNA complementares que contêm as sequências desejadas. De um modo adicional, os mRNAs específicos podem ser seleccionados através de adsorção dos polisomas isolados a partir das células para os anticorpos imobilizados especificamente destinados contra a proteína TACI, como seja o anticorpo da proteína TACI anti-humana de coelho policlonal aqui descrito.

Uma proteína TACI de DNA titulada por rádio pode ser sintetizada usando o mRNA seleccionado (dos polisomas adsorvidos) como um modelo. O mRNA titulado com rádio ou cDNA pode ser então usado como uma sonda de modo a identificar a proteína TACI homologa do DNA em fragmentos a partir de outros fragmentos de DNA genomico.

A presente invenção refere-se ainda a vectores de clonagem contendo genes que codificam análogos e derivados da proteína TACI de acordo com a presente invenção, que têm a mesma actividade funcional, ou uma funcionalidade homóloga, relativamente à proteína TACI, e seus homólogos de outras espécies. A produção e o uso de derivados e de análogos relacionados com a proteína TACI encontram-se dentro do âmbito da presente invenção. Numa forma de realização específica, o derivado ou análogo é funcionalmente activo, isto é, é capaz de apresentar uma ou mais actividades funcionais associadas com uma proteína TACI completa e de um tipo selvagem de acordo com a presente invenção. Numa outra forma de realização, a proteína TACI contendo um domínio citoplásmico diferente, por exemplo que não seja capaz de se ligar a CAML mas que seja, no entanto, capaz de modular a activação de AP-1. Num outro aspecto, uma proteína TACI de acordo com a presente invenção pode ser preparada com um domínio de lectina ou com domínios de uma outra proteína, como seja um receptor de manose de macrófagos ou o receptor de fosfolipase no músculo.

Os derivados de proteína TACI podem feitos alterando as sequências de ácidos nucleicos através de substituições, de adições ou de apagamentos que proporcionem moléculas funcionalmente equivalentes. De um modo preferencial são feitos derivados que apresentam uma actividade funcional aumentada ou acrescida relativamente à proteína TACI nativa. De um modo alternativo tais derivados podem codificar

fragmentos solúveis do domínio extra celular da proteína TACI que apresentam uma idêntica ou maior afinidade com o ligante natural da proteína TACI da presente invenção. Tais derivados solúveis podem ser inibidores potentes do ligante através da sua ligação à proteína TACI.

Devido à degeneração das sequências de codificação de nucleótidos, as outras sequências de DNA que codificam substancialmente a mesma sequência de aminoácidos como um gene de proteína TACI pode ser usado na prática da presente invenção. Estes incluem, de um modo não limitativo, os genes alelicos, os genes homólogos de outras espécies e as sequências de nucleótidos que compreendem todas ou parte dos genes das proteínas TACI que são alteradas pela substituição de certos codos que codificam o mesmo resíduo de aminoácido no interior da sequência, produzindo deste modo uma mudança silenciosa. Do mesmo modo, os derivados da proteína TACI de acordo com a presente invenção incluem, de um modo não limitativo, aqueles que contêm, como sequência de aminoácido primário, a totalidade ou uma parte da sequência de aminoácido de uma proteína TACI incluindo as sequências alteradas em que a funcionalidade equivalente dos resíduos de aminoácidos é substituída por resíduos no interior da sequência que resulta numa substituição de aminoácidos conservadora. Deste modo, uma tal substituição é definida como sendo uma substituição conservadora.

Por exemplo, um ou mais resíduos de aminoácidos no interior da sequência podem ser substituídos por um outro aminoácido com uma polaridade similar, que actua como um equivalente funcional, resultando numa alteração silenciosa. Os substitutos de um aminoácido no interior da sequência podem ser seleccionados a partir de outros membros da classe à qual o aminoácido pertence. Por exemplo, os aminoácidos não polares (hidrofóbicos) incluem a alanina, a leucina, a

isoleucina, a valina, a fenilalanina, o triptofan e a metionina. Os aminoácidos contendo estruturas anelares aromáticas são a fenilalanina, o triptofan e a tirosina. Os aminoácidos polares neutros incluem a glicina, a serina, a treonina, a cisteina, a tirosina, a aspargina e a glutamina. Os aminoácidos de carga positiva (básicos) incluem a arginia, a lisina e a histidina. Os aminoácidos (acídicos) de carga negativa incluem o ácido aspártico e o ácido glutamico. Tais alterações não são pensadas como podendo afectar o peso molecular aparente de acordo com o determinado pela electroforese de poliacrilamida ou por um ponto isoelectrico.

As substituições particularmente preferidas são:

- Lis por Arg e o contrário de modo a que possa ser mantida uma carga positiva;
- Glu por Asp e o contrário de modo a que possa ser mantida uma carga negativa;
- Ser por Thr de modo a que um -OH livre possa ser mantido; e
- Gin por Asn de modo a que um NH_2 livre possa ser mantido.

As substituições de aminoácidos podem ser também introduzidas de modo a substituir um aminoácido com uma propriedade particularmente preferível. Por exemplo, Cis pode ser introduzido como um local potencial para as pontes bissulfito com outro Cis. Um His pode ser introduzido como um local particularmente catalítico (isto é, pode agir como um ácido ou como uma base e é o aminoácido mais comum em catálise bioquímica). Pode introduzir-se Pro porque é uma estrutura é particularmente plana, a qual induz voltas β na estrutura da proteína.

Os genes que codificam os derivados da proteína TACI e os análogos da presente invenção podem ser produzidos através de

vários processos conhecidos na técnica. As manipulações que resultam na sua produção podem ter lugar ao nível do gene ou da proteína. Por exemplo, a sequência de genes de proteína TACI clonada podem ser modificados por qualquer uma de entre várias estratégias conhecidas na técnica (Sambrook e outros, 1989, acima). A sequência pode ser clivada nos locais adequados com a(s) endonuclease(s) de restrição, seguidos de uma modificação enzimática, caso se deseje, isolada e ligada in vitro. Na produção do gene que codifica um derivado ou um análogo da proteína TACI deve ter-se cuidado para assegurar que o gene modificado permanece no mesmo momento de leitura de translação do que o gene da proteína TACI, sem interrupção efectuada pelos sinais de paragem de translação, na região dos genes onde a actividade desejada é codificada.

De um modo adicional, a sequência de ácido nucleico que codifica a proteína TACI pode ser alvo de uma mutação efectuada in vitro ou in vivo, de modo a criar e/ ou a destruir a translação, a iniciação e/ ou as sequências de terminação, ou de modo a criar variações nas regiões de codificação e/ou formar novos locais de restrição da endonuclease ou a destruir os que já fossem existentes de modo a tornar mais fácil a modificação adicional in vitro. De um modo preferencial tais mutações aumentam a actividade funcional do produto de gene de proteína TACI alvo de mutação. Qualquer técnica para a mutação conhecida na técnica pode ser usada, incluindo de um modo não limitativo, a mutagénese orientada para o sítio efectuada in vitro [Hutchinson, C., e outros, J. Biol. Chem., 253:6551 (1978)]; [Zoller e Smith, DNA, 3:479-488 (1984)]; [Oliphant e outros, Gene, 44:177 [1986)]; [Hutchinson e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A., 83:710 (1986)], uso de ligadores TAB ® (Pharmacia), etc. As técnicas PCR são as preferidas para ver a mutagénese direccionada ao local (ver Higuchi, “Using PCR to Engineer DNA”, em PCR Technology Principles and

Applications for DNA Amplification, H. Erlich, ed. Stockton Press, Capítulo 6, pp.61-70 (1989)).

O gene identificado e isolado pode ser então inserido no interior de um vector de clonagem adequado. Um grande número de sistemas de vector hospedeiro conhecidos na técnica pode ser usado. Os vectores possíveis incluem, de um modo não limitativo, os plasmidas e os vírus modificados, mas o sistema de vectores tem de ficar compatível com a célula hospedeira usada. Exemplos de vectores incluem, de um modo não limitativo, o E. Coli, os bacteriófagos como sejam os derivados de lambda, ou os plasmidas como sejam os derivados de pBR322 ou os derivados de plasmida pUC, por exemplo, os vectores pGEX, o pmal-c, o pFLAG, etc. A inserção num vector de clonagem pode, por exemplo, ser conseguida através da ligação do fragmento de DNA no interior de um vector de clonagem que tem um terminal coesivo complementar. No entanto, se os locais complementares de restrição usados para fragmentar o DNA não se encontrarem presentes no vector de clonagem, as extremidades das moléculas de DNA podem ser enzimaticamente modificadas. De um modo alternativo qualquer local desejado pode ser produzido ligando sequências de nucleótidos (ligadores) nos terminais de DNA; estes ligadores ligados podem compreender oligonucleótidos sintetizados quimicamente que codificam sequências de reconhecimento da restrição da endonuclease. As moléculas recombinantes podem ser introduzidas nas células hospedeiras através de transformação, de transfecção, de infecção, de electroporação, etc., de modo a que são geradas muitas cópias da sequência de genes. De um modo preferencial o gene clonado é contido no interior de um vector plasmida de vaivém, que é um vector que pode replicar-se em mais de um tipo de organismos, que pode ser preparado para a replicação tanto na E. Coli como na Saccharomyces cerevisiae ligando sequências

de um plasmida de E. Coli com sequências de um plasmida 2μ da levedura.

Num processo alternativo o gene desejado pode ser identificado e isolado após a inserção no interior de um vector de clonagem adequado numa técnica designada como "metrelhadora". O enriquecimento do gene desejado, por exemplo através de fraccionamento, pode ser feito antes da inserção no interior do vector de clonagem.

Expressão do Activador de Transmembrana e dos Polipeptidos de Interactor CAML

A sequência de codificação de nucleótidos para a proteína TACI, ou fragmento antigénico, seu derivado ou análogo, o derivado funcionalmente activo, incluindo uma proteína quimérica do mesmo, podem ser inseridos no interior de um vector de expressão adequado, isto é, um vector que contém os elementos necessários para a transcrição e para a translação da sequência de codificação de proteínas inserida. Tais elementos são aqui indicados como sendo um "promotor". Deste modo, o ácido nucleico que codifica a proteína TACI de acordo com a presente invenção encontra-se associada sob o ponto de vista operacional a um promotor num vector de expressão de acordo com a presente invenção. Tanto o cDNA como as sequências genómicas podem ser clonados e expressados sob o controlo de tais sequências regulatórias. Um vector de expressão inclui, também preferencialmente, uma origem replicada.

Os sinais de transcrição e de translação podem ser proporcionados num vector de recombinação ou podem ser fornecidos pelo fornecidos pelo gene activo que codifica uma proteína TACI e/ ou as suas regiões laterais.

Conforme foi anteriormente indicado, os parceiros quiméricos potenciais para a proteína TACI incluem os que apresentam domínios de lectina, quer proveniente de receptores de lecitina e existente na natureza quer arranjando um novo penhor quer sendo um domínio citoplásmico substituto, capaz de mediar um sinal de transdução ou de modificar o processo endolíquido.

Os sistemas de vector hospedeiro potenciais incluem, de um modo não limitativo, os sistemas celulares dos mamíferos infectados com vírus (por exemplo os vírus da vaccínia, o adenovírus, etc.); os sistemas das células dos insectos infectados com vírus (por exemplo, o baculovírus); os micro organismos como sejam a levedura contendo vírus de levedura, ou bactérias transformadas com bacteriófago, com DNA, com DNA plasmida ou com DNA cosmida. Os elementos de expressão dos vectores variam com as suas resistências e com as suas especificidades. Dependendo do sistema de vector hospedeiro usado, pode ser usado qualquer um dos elementos de transcrição e de translação.

Uma proteína TACI recombinante de acordo com a presente invenção, ou um fragmento funcional, derivado, estrutura quimérica ou análogo do mesmo, podem ser expressos de um modo cromossómico após a integração da sequência de codificação através de recombinação. Relativamente a este ponto, qualquer um de entre uma pluralidade de sistemas de amplificação pode ser usado de modo a que se consigam alcançar níveis elevados de expressão estável dos genes (ver Sambrook e outros, 1989, acima).

A célula contendo o vector recombinante compreendendo o ácido nucleico que codifica uma proteína TACO é posto em cultura num meio de células de cultura adequado em condições que

proporcionam a expressão da proteína TACI por parte da célula.

Qualquer um dos processos acima descritos para a inserção de fragmentos de DNA no interior de um vector de clonagem podem ser usados de modo a construírem vectores de expressão contendo um gene que consiste por sinais de controlo de transcrição/ translação adequados e pelas sequências de codificação das proteínas. Estes processos podem incluir DNA recombinante in vitro e técnicas sintéticas e de recombinação in vivo (recombinação genética).

A expressão da proteína TACI pode ser controlada por qualquer elemento promotor/ aumentador conhecido na técnica, mas estes elementos regulatórios devem ser funcionais no hospedeiro seleccionado para expressão. Os promotores que podem ser usados para controlar o gene de expressão da proteína TACI incluem, de um modo não limitativo, o promotor da região precoce SV40 [Benoist e Chambon, Nature, 290:304-310 (1981)], o promotor condido no terminal 3' longo da repetição do vírus do sarcoma de Rous [Yamamoto, e outros, Cell, 22:787-797 (1980)],, o promotor da quinase da timidina do herpes [Wagner e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78:1441-1445 (1981)], as sequências regulatórias do gene de metaloteina [Brinster et al., Nature, 296:39-42 (1982)], os vectores de expressão procariótica como seja o promotor de β lactamase [Villa-Kamaroff, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,75:3727-3731(1978)], ou o promotor de tac [DeBoer, e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80:21-25 (1983)]; ver também "Useful proteins from recombinant bacteria" in Scientific American, 242:74-94 (1980); elementos promotores das leveduras ou de outros fungos como sejam o promotor Gal 4, o promotor de ADC (de-hidrogenase de álcool), o promotor de PGK

(quinase de fosfoglicol), o promotor de fosfatase alcalina; E as regiões de controlo da transcrição do controlo dos animais que apresentam especificidade dos tecidos e que têm sido usados em animais transgénicos: a região de controlo do gene da elastase I que se encontra activo nas células do pâncreas [Swift et al., Cell, 38:639-646 (1984)]; [Ornitz et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 50:399-409 (1986)]; [MacDonald, Hepatology, 7:425-515 (1987)]; a região de controlo do gene da insulina que se encontra activa nas células beta do baço [Hanahan, Nature, 315:115-122 (1985)], a região de controlo do gene da imunoglobulina que é activa nas células linfoides [Grosschedl et al., Cell, 38:647-658 (1984)]; [Adames et al., Nature, 318:533-538 (1985)]; [Alexander et al., Mol. Cell. Biol., 7:14361444 (1987)], a região de controlo do vírus do tumor mamário em ratos que se encontra activa nas células dos testículos, da mama e linfoides [Leder et al., Cell, 45:485-495 (1986)], a região de controlo do gene da alfa-fetoproteina que se encontra activa no fígado [Pinkert e outros, Genes and Devel., 1:268-276 (1987)], a região de controlo do gene da alfa-fetoproteina que se encontra activa no fígado [Krumlauf e outros, Mol. Cell. Biol., 5:1639-1648 (1985)]; [Hammer e outros, Science, 235:53-58 (1987)], a região de controlo do gene de alfa 1-antitripsina que se encontra activo no fígado [Kelsey e outros, Genes e Devel., 1:161-171 (1987)], a região de controlo do gene da beta globulina que se encontra activa nas células mieloides [Mogram e outros, Nature, 315:338-340 (1985)]; [Kollias e outros, Cell, 46:89-94 (1986)] a região de controlo do gene de proteína básica de mielina que se encontra activa em células oligodendrócitas no cérebro [Readhead e outros, Cell, 48:703-712 (1987)], a região de controlo da miosina de cadeia 2 leve que se encontra activa no músculo do esqueleto [Sani, Nature, 314:283-286 (1985)], e a região de controlo da libertação do

gene da hormona gonadotropica que se encontra activa no hipotálamo [Mason e outros, Science, 234:1372-1378 (1986)].

Os vectores de expressão contendo um ácido nucleico que codifica uma proteína TACI de acordo com a presente invenção podem ser identificados através de quatro técnicas gerais: (a) a amplificação de PCR do plasmida desejado ou de mRNA específico, (b) a hibridação do ácido nucleico, (c) a presença ou a ausência de funções de genes de marcador, e (d) a expressão das sequências inseridas. Na primeira técnica, os ácidos nucleicos podem ser amplificados por PCR de modo a proporcionarem a detecção do produto amplificado. Na segunda técnica, a presença d um gene estranho inserido num vector de expressão pode ser detectada pela hibridação do ácido nucleico usando sondas contendo sequências que são homologas a um gene de marcador inserido. Na terceira técnica, o vector recombinante/ sistema hospedeiro pode ser identificado e seleccionado com base na presença ou na ausência de certas funções de gene de "marcador de selecção" (por exemplo, a actividade de β-galactosidase, a actividade da quinase da timidina, a resistência aos antibióticos, o fenótipo de transformação, a formação do corpo de oclusão no baculovírus, etc.) provocadas pela inserção de genes estranhos no vector. Num outro exemplo, se o ácido nucleico que codifica uma proteína TACI for inserido no interior da sequência de gene de "marcador de selecção" do vector, os recombinantes que contêm o encaixe de proteína TACI podem ser identificados pela ausência da função do gene de proteína TACI. Na quarta técnica, os vectores de expressão recombinantes podem ser identificados fazendo os testes das características de actividade bioquímica ou imunológica do produto de gene expresso pelo recombinante, desde que a proteína expressa assuma uma forma funcionalmente activa.

Uma grande variedade de combinações de vectores hospedeiros/ de expressão podem ser empregues para expressar as sequências de DNA da presente invenção. Os vectores de expressão úteis podem, por exemplo, consistir por sequências de DNA de cromossomas, de não cromossomas e sintéticas. Os vectores adequados incluem os derivados de SV40 e os plasmidas bactericidas conhecidos, por exemplo, plasmidas bactericidas como o E. Coli col El, pCR1, pBR322, pMal-C2, pET, pGEX [Smith e outros, Gene, 67:31-40 (1988)], pMB9 e seus derivados plasmidas como sejam o RP4; o fage DNAS, por exemplo os numerosos derivados do fage λ, por exemplo NM989, e outro fage de DNA, por exemplo o M13 e o fage de cadeia simples filamentosa de DNA, os plasmidas de levedura como sejam o plasmida 2μ ou os seus derivados; os vectores úteis nas células eucarioticas, como sejam os vectores úteis nas celulas dos insectos ou dos mamíferos; os vectores derivados das combinações de plasmidas e de fage dos DNAs, como sejam os plasmidas que foram modificados para empregar o fage DNA ou outras sequências de expressões de controlo e afins.

Por exemplo, em sistemas de expressão de baculovirus, tanto os vectores de transferência de não fusão, como sejam, de um modo não limitativo os pVL941 (local de clonagem BamH1; Summers), pVL1393 (BamH1, SmaI, XbaI, EcoR1, NotI, XmaIII, BglII, e local de clonagem PstI; Invitrogen), pVL1392 (BglII, PstI, NotI, XmaIII, EcoRI, XbaI, SmaI, e local de clonagem BamH1; Summers e Invitrogen), e pBlueBac III (BamHI, BglII, PstI, NcoI, e local de clonagem Hind lII, sendo possível a triagem recombinante azul/ branca; Invitrogen), e vectores de transferência de fusão, como sejam, de um modo não limitativo, pAc700 (local de clonagem BamH1 e KpnI, em que o local de reconhecimento de BamH 1 tem início com o codo de início; Summers), pAc701 e pAc702 (o mesmo que o pAc700, com

diferentes momentos de leitura), pAc360 (local de clonagem de BamH1 36 pares de bases a jusante de um codo de início de polihedrina; Invitrogen(195)), e pBlueBacHisA, B, C (três momentos de leitura diferentes com BamH1, BglII, PstI, NcoI, e o local de clonagem Hind II, um péptido com terminação em N para a purificação ProBond, e a leitura recombinante de azul/ branco de placas; pode ser usada Invitrogen (220)) podem ser usados.

Os vectores de expressão dos mamíferos contemplados para serem usados na invenção incluem vectores com promotores que podem ser induzidos como seja o promotor de dihidrofolato de reductase (DHFR), por exemplo, qualquer vector de expressão com um vector de expressão de DHFR, ou um vector de co-amplificação de DHFR/metotrexato, como seja um pED (local de clonagem de PstI, SalI, SbaI, SmaI, e EcoRI, com o vector a expressar tanto o gene clonado como em DHFR; ver Kaufman, Current Protocols in Molecular Biology, 16.12 (1991). De um modo alternativo, um vector de co-amplificação de sulfomixina de sintetase/ metionina, como seja o pEE14 (local de clonagem de HindIII, XbaI,SmaI, SbaI, EcoRI, e BclI, em que o vector expressa a sintase de glutamine e o gene clonedo; Celltech). Numa outra forma de realização, um vector que dirige a expressão episomal sob o controlo do Vírus Epstein Barr (EBV) pode ser usado, como seja o pREP4 (local de clonagem de BamH1, SfiI, XhoI, NotI, NheI,Hindi, NheI, PvuII, e KpnI, promotor constitutivo de RSV-LTR, marcador seleccionavel de higromicina; Invitrogen), pCEP4 (BamH1, SfiI, XhoI, NotI, NheI,Hind1II, NheI, PvuII, e local de clonagem de KpnI, gene constitutivo de hCMV imediato e prematuro, marcador de

Seleccionável de higromicina; Invitrogen), pMEP4 (local de clonagem de KpnI, PvuI, NheI,HindII, NotI, XhoI, SfiI, BamH1, promotor de gene de metalotioneina IIa que pode ser induzido

metalotioneina IIa: Invitrogen), pREP8 (local de clonagem de BamH1, XhoI, NotI,Hind5II, NheI, e KpnI, promotor de RSV-LTR, marcador seleccionavel de histidinol; Invitrogen), pREP9 (local de clonagem de KpnI, NheI,Hind1II, NotI, XhoI, SfiI, and BamHI, promotor de RSV-LTR, marcador seleccionavel de G418; Invitrogen), e pEBVHis (promotor de RSV LTR, marcador seleccionável de higromicina, péptido com terminar em forma de N purificavel através de resina ProBond e clivada através de enteroquinase; Invitrogen). Os vectores de expressão de mamíferos seleccionáveis para o uso na presente invenção incluem pRc/CMV(HindWII, BstXI, NotI, SbaI, o local de clonagem ApaI, selecção G418; Invitrogen), pRc/RSV(local de clonagem de HindII, SpeI, BstXI, NotI, XbaI, selecção G418; Invitrogen), e outros. Os vectores de expressão do vírus de mamíferos da Vaccinia (ver, Kaufman, 1991, acima) para ser usado de acordo com a presente invenção inclui, de um modo não limitativo, pSC11(local de clonagem SmaI, TO- and selecção P-gal), pMJ601 (local de clonagem SalI, SmaI, AflI, NarI, BspMII, BamHI, ApaI, NheI, SacII, KpnI, andHindIII cloning site; TK- e P-gal), e pTKgptF1S (EcoRI, PstI, Salt, AccI, HindlI, SbaI, BamHI, e o local de clonagem Hpa, TK ou uma selecção XPRT).

Os sistemas de expressão da levedura podem ser também usados de acordo com a presente invenção de modo a expressar a proteína TACI. Por exemplo, o vector de não fusão pYES2 (local de clonagem de XbaI, SphI, ShoI, NotI, GstXI, EcoRI, BstXI, BamH1, SacI, Kpnl, e HindXII Invitrogen) ou a fusão pYESHisA, B, C (local de clonagem XbaI, SphI, ShoI, NotI, BstXI, EcoRI, BamH1, SacI, KpnI, e local de clonagem HindIII, péptido purificado em forma de N com resina ProBond e com enteroquinase; Invitrogen), para mencionar somente alguns, podem ser empregues de acordo com a presente invenção.

Uma vez que uma molécula de DNA recombinada se encontre identificada e isolada podem ser usados vários processos conhecidos na técnica para fazer a sua propagação. Quando um sistema hospedeiro adequado e as condições de crescimento estivessem estabelecidos, os vectores de expressão recombinantes podem ser propagados e preparados em quantidade. Conforme foi anteriormente explicado, os vectores de expressão que podem ser usados incluem, de um modo não limitativo, os seguintes vectores ou os seus derivados de vírus humanos ou animais como sejam o vírus da vaccinia ou o adenovirus; os vírus de insectos como sejam o baculovirus; os vectores da levedura, os vectores de bacteriófagos (por exemplo, lambda) e os vectores de plasmida e cosmida, para mencionar somente alguns.

De um modo adicional, uma estirpe de células hospedeiras pode ser escolhida, sendo que esta modula a expressão das sequências inseridas, ou modifica e processa o produto de gene na forma específica desejada. Distintas células hospedeiras apresentam características e mecanismos específicos para o processamento translacional e pós-translacional e a modificação (por exemplo, por exemplo, glicosilação, clivagem, por exemplo de uma sequência de sinal) das proteínas. As linhas de células adequadas ou os sistemas hospedeiros podem ser escolhidos de modo a assegurar a modificação e o processamento desejados da proteína estranha expressada. Por exemplo, a expressão num sistema bacteriano pode ser usada de modo a produzir um produto com um núcleo de proteínas não glicosionado.

Os vectores são introduzidos no interior das células hospedeiras desejadas através de processos conhecidos na técnica, por exemplo, transfecção, electroporação, micro injecção, transdução, fusão de células, dextran DEAN, precipitação de fosfato de cálcio, lipofecção (fusão de

lisossomas), o uso de uma arma de gene ou de um transportador de vector de DNA (ver, por exemplo, Wu e outros, J. Biol. Chem., 267:963-967 (1992); Wu e Wu, J. Biol. Chem., 263:14621-14624 (1988); Hartmut e outros, Pedido de Patente Canadiana No. 2 012 311, depositada em 15 de Março de 1990).

Direccionamento dos Genes

Da forma aqui usada, "direccionamento de genes" refere-se a um tipo de recombinação que tem lugar quando é introduzido um fragmento de DNA genómico no interior de uma célula de mamífero e o fragmento localiza-se e recombina-se com as sequências endógenas homólogas.

Da forma aqui usada um "rato de abate" é um rato que contém, no interior do seu genoma um gene específico que foi desactivado pelo processo de direccionamento dos genes. Um rato de abate inclui tanto o rato heterozigótico (isto é, um alelo defeituoso e um alelo de um tipo selvagem) e o mutante homozigótico (isto é, com dois alelos defeituosos).

Da forma aqui usada, um "gene marcador" é um marcador de selecção que torna mais fácil o isolamento das células transfectadas raras a partir da maioria das células tratadas na população. Uma lista não exaustiva de tais marcadores inclui a fosfotransferase de neomicina, a fosfotrnasferase B da higromicina. A transferase de fosforibosilo de xantina/ guanina, a quinase de timidina do herpes simplex e a toxina da difteria.

A actividade funcional do Activador de Transmembrana e da proteína de interacção de CAML pode ser avaliado de um modo transgénico. Relativamente a este ponto pode ser usado um modelo de rato transgénico. O Activador de Transmembrana e o

gene da proteína do interactor CAML podem ser usados em estudos de complementação que empregam um rato transgénico. Os vectores transgénicos, incluindo os vectores virais ou os clones cosmidas (ou clones fage) correspondentes ao locus de um tipo selvagem de um gene candidato, podem ser construídos usando o gene de proteína TACI isolado. Os cosmidas podem ser introduzidos nos ratos transgénicos usando procedimentos publicados [Jaenisch, Science, 240:1468-1474 (1988)]. Num sentido genético o transgene actua como um supressor da mutação.

De um modo alternativo, o modelo do rato transgénico pode ser preparado com a expressão do transgene pode ser preparado em que a expressão do gene da proteína TACI é destruída. A expressão do gene é destruída de acordo com a presente invenção quando não é expressa qualquer proteína funcional. Um processo padrão para avaliar o efeito fenotípico de um produto de um gene é empregar a tecnologia de abate para apagar o gene. De um modo alternativo, as técnicas recombinantes podem ser usadas para introduzir mutações como sejam as mutações sem sentido e as mutações âmbar ou as mutações que conduzem à expressão de uma proteína inactiva. Numa outra forma de realização, os genes das proteínas TACI podem ser testados através do exame dos seus efeitos fenotípicos quando expressos numa orientação em sentido contrário em ratos de um tipo selvagem. Nesta técnica, a expressão do alelo do tipo selvagem pode ser suprimida, o que conduz a um fenótipo mutante. A formação duplex RNA-RNA (anti-sentido, sentido) evita o tratamento normal do mRNA, o que resulta na eliminação parcial ou completa do efeito do gene do tipo selvagem. Esta técnica foi usada para inibir a síntese TK na cultura do tecido e para produzir fenótipos da mutação Kruppel em Drosophila, and the Shiverer mutation in mice [Izant e outros, Cell, 36:1007-1015 (1984); Green e outros, Annu. Rev. Biochem., 55:569-597 (1986); Katsuki e

outros, Science, 241:593-595 (1988)]. Uma vantagem importante desta técnica reside no facto de somente uma pequena porção do gene ter de ser expresso para a inibição efectiva da expressão da totalidade do mRNA. O transgene de sentido contrário será colocado sob o controlo do seu próprio promotor ou de outro promotor expresso no tipo de célula correcto e colocado a montante do local SV40 poliA. O transgene será usado para fazer ratos transgénicos ou usando tecnologia de abate de genes.

Deste modo, a presente invenção estende-se à preparação de nucleótidos de sentido contrário e de ribossomas que podem ser usados para interferir com a expressão da proteína TACI e com o nível de translação. Esta técnica usa o ácido nucleico de sentido contrário e os ribossomas destinados a bloquearem a translação de um mRNA específico, quer mascarando esse mRNA com um ácido nucleico de sentido contrário ou através da sua clivagem com um ribossoma. Os genes que codificam os ácidos nucleicos de ribossomas ou mRNA específicos de sentido contrário e podem ser introduzidas, por exemplo, usando as técnicas descritas mais acima relativamente a “Gene Therapy”. De um modo alternativo podem ser preparados oligonucleótidos de ribossomas ou de sentido contrário sintéticos.

Os ácidos nucleicos de sentido contrário são as moléculas de DNA e de RNA que são complementares em relação a pelo menos uma porção de uma molécula de mRNA específica [ver Marcus-Sekura, Anal. Biochem., 172:298 (1988)]. Na célula, eles hibridizam esse mRNA formando uma molécula de cadeia dupla. A célula não descreve uma translação em mRNA nesta forma de cadeia dupla. Deste modo, os ácidos nucleicos de sentido contrário interferem com a expressão do mRNA na proteína. Os oligomeros de cerca de quinze nucleótidos e de moléculas que hibridizam o codo de inicio de AUG que será particularmente eficaz pois são fáceis de sintetizar e podem colocar menos

problemas do que as moléculas maiores quando se faz a introdução das mesmas no interior do órgão das células. Os processos de sentido contrário têm vindo a ser usados para impedir a expressão de muitos genes in vitro [Marcus - Sekura, 1988, acima; Hambor e outros, J. Exp. Med., 168: 1237 (1988)]. De um modo preferencial, os nucleótidos sintéticos de sentido contrário contêm análogos de fosfoester, como sejam os fosforotiolatos ou os tioesteres, ao invés das ligações de fosfoester naturais. Tais análogos de ligações de fosfoéster são mais resistentes à degradação, aumentando a estabilidade e deste modo a eficiência dos ácidos nucleicos de sentido contrário.

Os ribossomas são moléculas de RNA que possuem a capacidade de clivar outras moléculas de RNA de cadeia simples de um modo algo análogo ao das endonucleases de restrição de DNA. Os investigadores identificaram dois tipos de ribossomas o tipo Tetrahymena e o tipo "hammerhead" os ribossomas do tipo hammerhead são preferíveis aos ribossomas do tipo Tetrahymena de modo a desactivarem as espécies do tipo mRNA específico, e dezoito sequências de reconhecimento de bases são preferidas às sequências de reconhecimento mais curtas.

As sequências de DNA que codificam a proteína TACI descrita e habilitada aqui podem, deste modo, ser usadas para preparar as moléculas de sentido contrário contra os ribossomas que clivam os mRNAs da proteína TACI, inibindo deste modo a expressão do gene que codifica a proteína TACI, o que pode reduzir o nível de estimulação imune através de células dendríticas, ou o nível de detecção clonal através da mediação das células epiteliais do timo.

A escolha de genes nas células estaminais embrionárias é uma técnica relativamente nova que permite que a manipulação precisa dos genes in vivo seja possível. Esta

técnica permite a criação de ratos com mutações definidas na estrutura de qualquer gene determinado. A capacidade para gerar mutações previamente determinadas dá aos investigadores a capacidade para aplicar o poder da genética ao sistema imunológico humano complexo, tal como foi aplicado com sucesso num sistema neural para tais organismos como Drosophila e elegans C.

Uma chave para encontrar tratamentos para muitas perturbações foi o desenvolvimento de modelos animais adequados. A presente invenção inclui um rato de abate contendo um alelo não funcional para o gene que codifica naturalmente e que expressa a proteína funcional TACI. Incluído neste aspecto da presente invenção está um rato de abate que contém dois alelos não funcionais para o gene que codifica naturalmente e que exprime a proteina TACI funcional, e deste modo é incapaz de expressar a proteína TACI funcional.

Os alelos não funcionais podem ser gerados por um qualquer número de formas que são bem conhecidas na técnica, em que todas elas podem ser usadas na presente invenção. Em algumas formas de realização um alelo funcional fica defeituoso através da uma inserção de DNA estranho no interior da região de codificação do alelo de proteína TACI. Numa forma de realização preferida, a inserção é colocada no primeiro exon da região de codificação do alelo de proteína TACI. Numa forma de realização preferencial, a inserção contém um sinal destinado a terminar a transcrição antes da transcrição de uma região do alelo que codifica a proteína TACI. Nestas formas de realização preferenciais é ainda mais preferido remover uma secção de DNA no início da região de codificação existente para a proteína TACI e fazendo a sua substituição com a inserção acima.

A presente invenção inclui ainda um processo para a produção do rato de abate da presente invenção que inclui a obtenção de DNA genómico que codifica uma proteína TACI, construindo um vector que contém o referido DNA genómico e um gene de marcador em que o referido gene de marcador é colocado no interior do exon do referido DNA genómico. O vector é então electroporado numa célula embriónica estaminal e uma célula embriónica estaminal é seleccionada de modo a que integrou o vector no genoma em que a célula seleccionada tem o gene de marcador integrado no interior do local endógeno do gene para a proteína TACI no genoma do rato. A célula é então injectada no interior de um blastócito do rato que é então implantado de novo no interior de um rato fêmea com uma pseudo-gravidez, que dá origem a um rato quimérico contendo um alelo defeituoso para a proteina TACI na sua linha de germe. O rato quimérico é então cruzado com um rato de reprodução normal de modo a gerar um rato de abate homozigótico. Dois ratos heterozigóticos são então criados gerando uma cria de rato de abate. Os protocolos detalhados para a determinação bem sucedida dos genes são bem conhecidos na técnica e, por exemplo, é descrita por Joyner, A. L. (1993) Gene Targeting: A Practical Approach. The Practical Approach Series (Rickwood, D. e Hames, B. D., Eds.), IRL Press, Oxford.

Um outro aspecto da presente invenção é um processo para seleccionar um agente terapêutico para o seu possível uso como um diminuidor de imunidade que compreende a administração de um agente terapêutico suspeito ao rato de abate da presente invenção e a medição e/ ou a determinação do efeito de um agente terapêutico putativo em qualquer uma das características fenotípicas que podem ser consideradas como estando relacionadas com a imunodeficiência.

Uma forma de realização preferida deste aspecto da invenção inclui a administração de um agente terapêutico suspeito ao rato de abate da invenção actual e a medição de uma resposta do teste no rato de abate, em que a resposta normal do rato de abate na ausência de um agente terapêutico é caracteristicamente diferente daquela dos ratos de tipo selvagem. Os agentes terapêuticos potenciais são seleccionados na base de se há um significado estatístico entre a resposta do teste e a resposta normal. Os agentes terapêuticos potenciais que são seleccionados mostram uma mudança estatística significativa nas características medidas/ determinadas.

Numa forma de realização preferida, a resposta normal do rato de abate na ausência de um agente terapêutico é caracteristicamente diferente sendo caracteristicamente mais baixa do que aquela dos ratos de tipo selvagem e os agentes terapêuticos seleccionados agem para aumentar a sensibilidade daquela característica.

Os agentes terapêuticos suspeitos podem ser obtidos a partir de qualquer número de bibliotecas de medicamentos ou de péptidos incluindo os que se encontram comercialmente disponíveis e companhias químicas de medicamentos.

Purificação das proteínas TACI e dos seus homólogos

A proteína de TACI da invenção actual e os seus homólogos podem ser purificados por todo o número dos procedimentos que abrangem uma larga variedade de etapas conhecidas de purificação. Aqueles com conhecimentos na técnica saberiam consultar às referências, tais como a série dos Methods of Enzymology, para detalhes e a amplitude maiores. As etapas iniciais para purificar as proteínas da invenção actual incluem a salga, como nos fraccionamentos do sulfato de

amónio; fraccionamentos solventes da exclusão, por exemplo, uma precipitação do etanol; extracções detergentes para libertar proteínas ligadas da membrana usando detergentes como sejam o Triton X-100, o Tween-20 etc.; ou extracções elevadas de sal. A solubilização das proteínas pode também ser conseguida usando solventes apróticos tais como o sulfoxido e o dimetilo hexametilfosforamida. De um modo adicional a ultra centrifugação de alta velocidade pode ser usada sozinha ou conjuntamente com outras técnicas de extracção.

De um modo geral, o isolamento ou as etapas secundárias boas da purificação incluem a absorção da fase contínua usando o gel ou o hidroxiapatite do fosfato de cálcio; ou a ligação da fase sólida. A ligação da fase sólida pode ser executada com a ligação iónica, com um transferidor de aniões, tal como o dietilaminoethil (DEAE), ou o [2-hidroxi propil] amino (QAE) Sephadex ou celulose de etilo dietil; ou com um transferidor de catiões tal como o carboximetilo (CM) ou o sulfo (SP) Sephadex propilo ou celulose. Os meios alternativos de ligação da fase contínua incluem a exploração de interacções hidrofóbicas por exemplo, usando-se de uma sustentação contínua tal como o fenil Sepharose e um elevado tampão de sal; ligação por afinidade, usando, por exemplo, CAML (ou um fragmento de TACI-ligante do mesmo) limite a uma sustentação activada; imuno-ligante, usando por exemplo, um anticorpo ao limite da proteína de TACI a uma sustentação activada; assim como outras sustentações da fase contínua incluindo aquelas que contêm os corantes ou as lectinas específicas etc.. Uma outra técnica adicional da sustentação da fase contínua que seja usada frequentemente no fim do procedimento da purificação confia na exclusão do tamanho, em tais como geles de Sephadex e de sefarose, ou em técnicas pressurizadas ou centrífugas da membrana, usando filtros da membrana da exclusão do tamanho.

As separações da sustentação da fase contínua são geralmente executadas por lotes com centrifugações a baixa velocidade ou por cromatografia de coluna. A cromatografia líquida de desempenho elevado (HPLC), incluindo as técnicas relacionadas com o FPLC, é presentemente um dos meios mais comuns de executar a cromatografia líquida. As técnicas da exclusão do tamanho podem também ser realizadas com a ajuda da centrifugação de baixa velocidade.

De um modo adicional, as técnicas de permeação como sejam as técnicas electroforeticas podem ser empregues. Estas técnicas são geralmente efectuadas em tubos, em lajes ou através de electroforese capilar.

Quase todas as etapas que envolvem a purificação de proteínas empregam um tampão biológico a um pH próximo do pKa desse tampão. Os tampões típicos podem ser comprados na maioria dos catálogos bioquímicos e incluem os tampões clássicos como sejam o Tris, pirofosfato, monofosfato e difosfato, ou os tampões Good [Good, N.E., e outros, Biochemistry, 5:467 (1966)]; [Good, N.E. e Izawa, S., Meth. Enzymol., 24, Part B, 53 (1972)]; e [Fergunson, W.J. e Good, N. E., Anal. Biochem., 104:300 (1980)] como sejam Mes, Hepes, Mops, tricina and Ches.

Os materiais para efectuarem todas estas técnicas encontram-se disponíveis a partir de uma pluralidade de fontes, como seja a Sigma Chemical Company, em St. Louis, Missouri.

Anticorpos à proteína TACI

A invenção actual divulga a sequência das proteínas e as propriedades de um activador específico da trans membrana e da proteína de CAML Interactor, TACI, permitindo desse modo o

desenvolvimento dos reagentes do anti corpo específicos para a porção extra celular do receptor. Os reagentes polivalentes do anti corpos podem agir ligando e para fazer a reticulação e activar a TACI que sinaliza nos linfocitos, um processo útil nas situações onde a capacidade de resposta realçada do linfocito é benéfica. Tais situações incluem por exemplo, no tratamento dos imuno deficiencies que são congénitos ou adquiridos por exemplo, SIDA. Além disto, estes reagentes do anti corpo podem ser usados como um tratamento adjuvante no cancro nos exemplos a que o sistema imune pode ajudar na erradicação de células neoplásicas. Os reagentes monovalentes do mesmo corpo do anti corpo podem agir para obstruir o acesso a TACI nos linfocitos, um processo que seja útil nas situações onde a capacidade de resposta comprimida do linfocito é benéfica como durante os transplantes dos órgãos.

De acordo com a presente invenção, a proteína de TACI produzida naturalmente, por recombinação ou pela síntese química, e os fragmentos ou os outros derivados ou análogos dos mesmos, incluindo proteínas da fusão, podem ser usadas como um imunogénio gerar os anticorpos que reconhecem a proteína de TACI. Tais anticorpos incluem mas não são limitados, ao policlonal, à corrente monoclonal, quiméricas, única, aos fragmentos de Fab, e a uma biblioteca da expressão de Fab. Os anticorpos da proteína de anti-TACI da invenção podem ser reactivos em reticulação, por exemplo, podem reconhecer a proteína de TACI de uma espécie diferente. Os anticorpos policlonais têm uma probabilidade maior de reactividade transversal. De um modo alternativo, um anticorpo de acordo com a presente invenção pode ser específica de uma forma simples da proteína TACI. De um modo preferencial, um tal anticorpo é específico da proteína TACI humana. Os anticorpos de acordo com a presente invenção podem ser titulados da forma acima descrita para as proteínas e para os polipepidos de TACI.

Vários procedimentos conhecidos na técnica podem ser usados para a produção de anticorpos do policlonais à proteína de TACI ou de um derivado ou análogo do mesmo. Para a produção do anticorpo, os vários animais do anfitrião podem ser imunizados pela injecção com a proteína de TACI, ou por um derivado (proteína por exemplo, do fragmento ou da fusão) do mesmo, incluindo, de um modo não limitativo, os coelhos, os ratos, as ratazanas, os carneiros, as cabras, etc.. Em uma forma de realização, a proteína de TACI ou fragmenta da mesma pode ser conjugada com um portador imunogenico, por exemplo, de bovinos do soro da albumina (BSA) ou de hemocianina de buraco da fechadura (KLH). Os vários adjutores não podem ser usados para aumentar a resposta imunológica, dependendo da espécie do anfitrião, incluindo mas de um modo não limitativo, os geles minerais de Freund (completo e incompleto) tais como o hidróxido de alumínio, as substâncias activas da superfície tais como a lisolecitina, os poliois pluronicos, os polianiões, os péptidos, as emulsões de óleo, as hemocianinas do buraco da fechadura, o dinitrofenol, e os adjutores humanos potencialmente úteis tais como o BCG (bacilo Calmette-Guerin) e Corynebacterium parvum.

Para a preparação dos anticorpos monoclonais dirigidos para a proteína de TACI, ou para o fragmento, o análogo, ou o seu derivado, toda a técnica que fornece para a produção de moléculas do anticorpo pela célula contínua alinhada na cultura que pode ser usada. Estes incluem mas não são limitados à técnica do hibridoma desenvolvida originalmente por Kohler e por Milstein [Nature, 256:495-497 (1975)], técnica do trioma, a técnica humana do hibridoma das células do tipo B [Kozbor e outros, Immunology Today, 4:72 (1983)]; [Cote e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80:20262030 (1983)], e a técnica de EBV-hibridoma para produzir anticorpos monoclonais humanos [Cole e outros, em Monoclonal

Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985)]. Em uma forma de realização adicional da invenção, os anticorpos monoclonais podem ser produzidos nos animais sem germes que utilizam a tecnologia recente [PCT/US90/02545]. De facto, de acordo com a invenção, as técnicas desenvolveram-se para a produção "de anticorpos quiméricos" [Morrison e outros, J. Bacteriol., 159:870 (1984); Neuberger e outros, Nature, 312:604-608 (1984); Takeda e outros, Nature, 314:452-454 (1985)] dividindo os genes de um específico da molécula do anticorpo do rato para uma proteína de TACI junto com genes de uma molécula humana do anticorpo da actividade biológica apropriada que pode ser usada; tais anticorpos estão dentro do espaço desta invenção. Tais seres humanos ou anticorpos quiméricos humanizados são preferidos para o uso na terapia das doenças ou das desordens humanas (descritas abaixo), desde que o ser humano ou os anticorpos humanizados sejam muito menos prováveis do que os anticorpos xenogeneicos para eles próprios induzirem uma resposta imune, em especial uma resposta alérgica.

De acordo com a invenção, técnicas descritas para a produção de únicos anticorpos de cadeia simples [Patentes US nos. 5 476 786 e 5 132 405 em nome de Huston; Patente US no. 4 946 778] podem ser adaptadas para produzir anticorpos de cadeia de proteínas específicos de TACI de cadeia simples. Uma forma de realização adicional da invenção utiliza as técnicas descritas para a construção de bibliotecas da expressão de Fab [Huse e outros, Science, 246:1275-1281(1989)] para permitir a identificação rápida e fácil de fragmentos monoclonais de Fab com a especificidade desejada para uma proteína de TACI, ou seus derivados, ou análogos.

Os fragmentos do anticorpo que contêm o idiotipo da molécula do anticorpo podem ser gerados por técnicas conhecidas. Por exemplo, tais fragmentos incluem mas não são limitados: o

fragmento $F(ab')_2$ que pode ser produzido pela digestão do pepsina da molécula do anticorpo; fragmentos do Fab' que podem ser gerados reduzindo as pontes do bissulfito do fragmento $F(ab')_2$, e os fragmentos de Fab que podem ser gerados tratando a molécula do anticorpo com papain e com um agente de redução.

Na produção dos anticorpos, a procura do anticorpo desejado pode ser realizada pelas técnicas conhecidas na técnica, por exemplo, rádio imuno testes, ELISA (teste do enzima ligado diimuno absorvente ligado diimuno absorvente), imuno testes de "sanduíche", testes imuno radiometricos, reacções da precipitina da difusão do gel, testes do imuno difusão, nos imuno testes in situ (que usam titulações coloidais do ouro, da enzima ou do rádio isótopo, por exemplo), borrões, reacções de precipitação, testes de aglutinação (por exemplo, testes de aglutinação do gel, testes do hemaglutinação), testes de fixação de complemento, testes de imuno fluorescência, testes da proteína A, e testes de imuno electroforese, etc.. Em uma forma de realização, a ligação do anticorpo é detectada através de uma titulação do anticorpo preliminar. Em uma outra forma de realização, o anticorpo preliminar é detectado através da ligação de um anticorpo ou de um reagente secundário ao anticorpo preliminar. Em mais uma forma de realização adicional, o anticorpo secundário é titulado. Muitos meios são conhecidos na técnica para detectar e ligar um teste imunológico e estão dentro do espaço da invenção actual. Por exemplo, seleccionar os anticorpos que reconhecem um epitope específico de uma proteína de TACI, um pode ser um teste dos hibridomas gerados para um produto que se ligue a um fragmento da proteína de TACI que contém tal epitope. Para a selecção de um anticorpo específico de uma proteína de TACI de uma espécie particular do animal, pode seleccionar-se com base na ligação positiva

com a proteína de TACI expressada perto ou isolada das células daquela espécie do animal.

Os anticorpos antecedentes podem ser usados nos métodos conhecidos na técnica que se relaciona com a localização e com a actividade da proteína de TACI, por exemplo, a imagem latente da proteína de TACI in situ, medindo os seus níveis em amostras fisiológicas apropriadas, etc. usando algumas das técnicas da detecção mencionadas acima ou conhecidas na técnica.

Em uma forma de realização específica, os anticorpos que são agonistas ou antagonistas da actividade da proteína de TACI podem ser gerados. Tais anticorpos podem ser testados usando os testes descritos abaixo para identificar ligantes.

Ligantes para a proteína TACI

A identidade do ligante endógeno da proteína de TACI é desconhecida. A proteína de TACI pode ser usada para seleccionar clones a fim de identificar os ligante(s) endógenos. Este ligante é provável que seja envolvido também no regulamento do sistema imunitário, e assim deve ter usos similares ou complementares àqueles descritos na presente. Os métodos para seleccionar os ligantes TACI-1 incluem: (i) o uso de um sistema de dois híbridos do fermento com TACI-1 como "isto", como descrito, por exemplo, em Chien e outros, Proc. Natl. Science, USA, 88:9578-9582 (1991) e Durfee e outros, Genes Dev., 7:555-69(1993); (ii) clonagem da interacção das expressões de biblioteca do E. coli como as descritas acima; e (iii) clonagem funcional da expressão em células de mamíferos como as descritas acima. A identificação e o isolamento de um gene que codifica uma proteína de TACI da invenção fornece para a expressão da proteína de TACI ou os fragmentos da mesma nas quantidades maiores do que pode

ser isolado nas fontes naturais, ou nas células que são projectadas especialmente para ser reguladas pela proteína de TACI expressa após a transfecção ou a transformação das células. Do mesmo modo, para além do projecto racional dos agonistas e dos antagonistas baseados na estrutura da proteína de TACI, a invenção actual contempla um método alternativo para identificar ligantes específicos da proteína de TACI usando os vários testes de selecção sabidos na arte.

Todas as técnicas de escolha conhecidas na técnica podem ser usadas para seleccionar os agonistas ou os antagonistas da proteína de TACI. A invenção actual contempla peneiras para os ligantes da molécula ou para os análogos e imitadores pequenos do ligante, assim como peneiras para os ligante(s) natural(is) que ligam a, e agonizam ou antagonizam a proteína de TACI in vivo. Por exemplo, as bibliotecas dos produtos naturais podem ser seleccionadas usando os testes da invenção para as moléculas que agonizam ou antagonizam a actividade da proteína de TACI, ou que se ligam ao domínio extra celular ou ao domínio citoplasmico de TACI.

O conhecimento da seqüência preliminar da proteína de TACI, e a similaridade dessa sequência com proteínas de função conhecida, podem fornecer um indício inicial de como os inibidores ou os antagonistas da proteína funcionam. A identificação e a selecção dos antagonistas são facilitadas mais determinando características estruturais da proteína, por exemplo, usando a cristalografia de raios X, a defracção dos neutrões, a espectrometria da ressonância magnética nuclear, e outras técnicas para a determinação da estrutura.

Estas técnicas fornecem a concepção ou a identificação racional dos agonistas e dos antagonistas. Uma outra técnica usa o bacteriófago recombinante para produzir bibliotecas grandes. Usando "o método fago" [Scott e Smith, Science,

249:386-390 (1990); Cwirla, e outros, Proc. Natl. Acad. Sci., 87:6378-6382 (1990); Devlin e outros, Science, 249:404-406 (1990)], podem ser construídas bibliotecas muito grandes (106-108 entidades químicas). Uma segunda técnica usa primeiramente os métodos químicos, em que o método de Geysen [Geysen e outros., Molecular Immunology, 23:709-715 (1986); Geysen e outros, J. Immunologic Method, 102:259-274 (1987)] e o método de Fodor e outros [Science, 251:767-773 (1991)] são exemplos. Furka e outros [14th International Congress of Biochemistry, Volume 5, Abstract FR:013 (1988); Furka, Int. J. Peptide Protein Res., 37:487-493 (1991)], Houghton [Patente US No. 4 631 211, concedida em Dezembro de 1986] e Rutter e outros [Patent US No. 5 010 175, concedida em 23 de Abril de 1991] descrevem métodos para produzir uma mistura dos péptidos que podem ser testados como os agonistas ou como antagonistas.

Em um outro aspecto, bibliotecas sintéticas [Needels e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:10700-4 (1993); Ohlmeyer e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:10922-10926 (1993); Lam e outros, International Patent Publication No. WO 92/00252; Kocis e outros, International Patent Publication No. WO 9428028, cada uma delas incorporada na presente a titulo de referência na sua totalidade], e afins podem ser usadas para seleccionar relativamente aos ligantes da proteína de TACI de acordo com a presente invenção

Alternativamente, os testes para a ligação do ligante solúvel às células que expressam formas recombinantes do domínio extra celular da extremidade em forma de N de TACI podem ser executados. Os ligantes solúveis podem ser fornecidos prontamente como polipeptidos recombinantes ou sintéticos.

A selecção pode ser executada com as células recombinantes que TACI expressa, ou com um fragmento das mesmas, ou

alternativamente, usando a proteína purificada, por exemplo, produzida de um modo recombinante, como descrita acima. Por exemplo, a capacidade do fragmento titulado, solúvel ou solubilizado de TACI para ligar o ligante pode ser usada para seleccionar bibliotecas, como as descritas nas referências antecedentes.

Pesquisa de Novos Medicamentos Imunosupressores

Determinadas doenças resultam da activação excedente da resposta do B-b-linfócito. Um exemplo é Lupus Erythematosus Sistémico (SLE), em que os anticorpos são criados e reagem com os antigenios (proteínas, DNA, etc..) naturalmente presentes no paciente. Os anticorpos dão forma a complexos com os antigenios, e circulam como aglomerados reactivos da proteína. O depósito destes complexos em órgãos diferentes conduz a muitos sintomas de SLE, incluindo a falência renal, os sintomas neurológicos, e à morte. Os tratamentos actuais incluem o uso dos imunossupressores relativamente não específicos tais como o ciclosporin A ou os esteroides que suprimem respostas em células de T e em células B. Embora possam frequentemente tratar eficazmente SLE e doenças similares, há um risco significativo de sobre-immunosupressão, em que o paciente desenvolve infecções sérias por causa da falta de células T em funcionamento. Um novo medicamento imunossupressor que obstruísse selectivamente a acção dos B-b-linfócitos, ao deixar as células T intactas para proteger os pacientes dos agentes patogénicos virais seria extremamente útil para tratar estas doenças. Consequentemente, TACI-1 pode ser usado como uma ferramenta nova para desenvolver os medicamentos de imunossupressor específicos para B-b-linfócitos.

A proteína de TACI não está naturalmente presente nos em T-t-linfócitos maduros ou em células T de Jurkat, uma linha de

células que tenha características fenotípicas de células T maduras. Certamente, o nível mais elevado da expressão da proteína de TACI está em linfócitos periféricos de B, visto que as células T periféricas não expressam a proteína de TACI. Entretanto, as células T de Jurkat podem ser transfectadas com um plasmida da expressão de TACI e o TACI expressado pode prontamente ser estimulado pela reticulação a um anticorpo específico de TACI. Esta estimulação conduz à activação de um par dos segundos trilhos do mensageiro que são necessários e suficientes para estimular o factor adiantado NF-AT da transcrição da célula T.

As células de Jurkat da forma de realização particular de células T estão transfectadas com o plasmida da expressão TACI-1 e com um plasmida do NF-AT-repórter. As células T de Jurkat expressam naturalmente o receptor da célula T (TCR). As células são estimuladas pela adição dos anticorpos do TACI- 1, dos anticorpos a TCR, ou dos anticorpos a ambos. As drogas do candidato são misturadas com as células T de Jurkat e o efeito destes medicamentos é determinado. As bibliotecas fage e químicas descritas acima podem ser usadas como fontes para candidatos a medicamento.

Estes candidatos a medicamentos são aplicados então numa experiência paralela em que os anticorposs a TCR são usados no lugar dos anticorpos a TACI-1. Se o medicamento do candidato não tiver nenhum efeito na estimulação do sinal de SEAP devido à activação depender dos anticorpos de TCR, o candidato a medicamento está identificado como tendo a inibição selectiva da resposta activada TACI-1. Tais medicamentos seleccionados incluem essa classe dos medicamentos que podem selectivamente inibir a resposta da célula B (produtor de anticorpos), ao permitir que prossiga a imunidade (celular) relativamente às células T. Tais medicamentos seleccionados podem ser usados para tratar as

doenças auto imunes descritas acima. Porque TACI-1 activa os linfócitos por um mecanismo novo (isto é, através do contacto directo com CAML) é provável que um número significativo dos medicamentos possa ser descoberto que possa interferir com o trilho dependente de CAML, contudo deixa intacto o sinalizador normal através do receptor das células T.

Em uma forma de realização preferida deste tipo, o plasmida do NF-AR repórter contém o repórter de SEAP. Este sinal é usado para medir o grau de inibição da activação. O teste do repórter de SEAP pode ser aumentado para ser executado por um instrumento da selecção do robô. As drogas que obstruem a activação de TACI-1 mas não de TCR, como medido pelo teste do repórter de SEAP são identificadas como tendo a inibição selectiva da resposta activada TACI-1.

Alternativamente, pode ser empregue uma biblioteca fage. As bibliotecas fage foram construídas de modo a que quando infectadas produzem em sequências aleatórias do péptido do produto do E. coli do anfitrião de aproximadamente 10 a 15 aminoácidos [Parmley e Smith, Gene, 73:305-318 (1988), Scott e Smith, Science, 249:386-249 (1990)]. Especificamente, a biblioteca fage pode ser misturada em diluições baixas com o E. coli no ágar baixo LB do ponto de derretimento que é derramado então no alto de placas de ágar de LB. Após a incubação das placas a 37° C por um período de tempo, as chapas desobstruídas pequenas numa colónia do E. coli são formadas o que representa a lisagem do fago activo do crescimento do E. coli. Um representante destes fagos pode ser absorvido aos filtros de nilon colocando filtros secos nas placas de ágar. Os filtros podem ser marcados para a orientação, ser removidos, e colocados em soluções de lavagem para obstruir todos os locais absorventes restantes. Os filtros podem então ser colocados em uma solução que contém, para o exemplo, um fragmento radioactivo de uma proteína de

TACI que contém o domínio extra celular do N terminal por exemplo, porque o TACI-1 humano é um péptido que tem a sequência do aminoácidos de ID SEQ NO:6. Após um período especificado do incubação, os filtros podem ser completamente lavados e revelados por auto radiografia. As chapas que contêm o fage que ligam ao domínio extra celular do N terminal radioactivo podem então ser identificadas. Estes fages podem mais clonados e então ser reexaminados para que sua capacidade iniba a estimulação de TACI por um anticorpo de anti-TACI ao não inibir a estimulação correspondente de TCR como descrito acima.

Uma vez que os fages estejam purificados, a sequência obrigatória contida dentro do fage pode ser determinada pelo DNA padrão que se dispõe em sequências técnicas. Uma vez que a sequência do DNA é sabida, os péptidos sintéticos que representam estas sequências podem ser gerados.

Os péptido(s) eficaz(es) pode(m) ser sintetizado(s) em quantidades grandes para o uso dentro em modelos in vivo e eventualmente nos seres humanos como drogas do imunossupressor, por exemplo. Deve-se enfatizar que a produção sintética do péptido não exige mão-de-obra, é manufacturada facilmente, com qualidade controlada e, assim, as quantidades grandes do produto desejado podem ser produzidas completamente de um modo barato.
As combinações similares de péptidos sintéticos produzidos maciços têm sido usadas recentemente com grande sucesso [Patarroyo, Vaccine, 10:175-178(1990)].

Métodos e Composições Terapêuticas

A proteína do activador CAML Interactor do trans membrana de acordo com a presente invenção pode activar dois sinais usados normalmente para iniciar o crescimento e a divisão da

célula. Este receptor é provável que seja envolvido na transformação neoplásica de linfócitos de células T ou de células B em linfoma ou em leucemia.

Conseqüentemente, as formas negativas dominantes de TACI-1 são úteis para suprimir o crescimento de tais células de cancro. Alternativamente, a sobre estimulação TACI-1 pode conduzir à morte programada da célula. Fazendo exame da vantagem desta propriedade, a leucemia ou os linfomas com expressão na superfície da pilha TACI-1 podem ser induzidos a morrer por causa de tal sobre estimulação. A activação da proteína de TACI com anticorpo ou com reticulação pode activar um trilho endógeno que conduz à apoptose. A ligação com um formulário monomerico de um anticorpo ou de um ligante análogo pode obstruir os trilhos endógenos de proteína associado de TACI e interferir com a simulação do crescimento.

A estimulação terapêutica da actividade de TACI. Como discutido acima, a invenção actual proporciona vantajosamente a estimulação selectiva do sistema imune agonizando a actividade de TACI. Os agonistas de TACI incluem o ligante ou os ligantes de TACI descobertos como acima descrito, e os anticorpos que se reticulam com o receptor. Os agonistas do ligante ou os agonistas do anticorpo podem ser administrados como abaixo descrito para o tratamento dos assuntos em quem a estimulação imune, particularmente de células B, é desejada.

As respostas das células B podem ser particularmente importantes para lutar contra as doenças infecciosas, incluindo, mas não limitado a, as bacterianas, as virais, as de protozoários, e as infecções parasíticas. Os anticorpos de encontro aos micro organismos infecciosos podem rapidamente imobilizar os organismos ligados ao antigenio, seguido pelo ataque complementar ou pelo ataque mediado da célula. Assim,

um agonista de TACI da invenção pode ser fornecido a um paciente que esteja sofrendo de uma infecção para impulsionar respostas imunes humorais. Os agonistas de TACI podem ser particularmente úteis para impulsionar respostas imunes após a vacinação, durante o desafio com o organismo infeccioso. Assim, os indivíduos particularmente em risco para doenças infecciosas, tais como a gripe, podem suplementar uma vacinação ou uma imunidade com memória com um agonista de TACI durante a estação da gripe. Um aumento de imunidade comparável poderia ser usado com assuntos que estão a entrar ou a reentrar em uma área com uma doença infecciosa endémica, como seja a malária.

De um modo adicional, as respostas da célula B podem ser importantes para amplificar respostas imunes aos tumores que expressam antigenios específicos dos tumores. Assim, um agonista de TACI pode ser fornecido onde os anticorpos anti tumor endógenos são detectados. De facto, as células B ou as células de plasma que expressam a imunoglobulina anti tumor da superfície da célula podem ser seleccionadas, através de varrimento, e ser transductadas com TACI para permitir um amplificação da sua produção de anticorpos.

Para além a amplificar respostas imunes benéficas, os agonistas actuais de TACI, por exemplo, ligantes e anticorpos, podem ser usados para sobre estimular as células, tais como os tumores das células B (mielomas múltiplos, linfomas, e leucemias), tumores imaturos das células T (leucemias e timomas), e células auto imunes ou inflamatórias e induzir a apoptose em tais células, desse modo reduzindo ou eliminando o cancro ou a condição de auto imunidade /inflamatória.

Terapias para impulsionar respostas imunes celulares.

Embora o TACI seja encontrado somente em um subconjunto de células T imaturas, as células T maduras podem ser transfectadas ou transduzidas in vivo ou em ex vivo para expressar um receptor funcional de TACI, para amplificar respostas imunes celulares. Preferivelmente, as células que se infiltram no tumor são seleccionadas para tal impulsionar, e são reintroduzidas no sujeito de um modo mais vigoroso para lutar contra o tumor.

Métodos terapêuticos que antagonizam a actividade de TACI. Como discutida acima, a invenção actual contempla a inibição da actividade de TACI pelos vários meios, incluindo mas não limitados ao uso do domínio extra celular do terminal livre em forma de N; a expressão de um domínio extra celular não funcional a que falta um domínio do transdução do sinal, por exemplo, ligada a GPI com o terminal TACI em forma de N; o uso de tecnologias de anti-tensões ou dos ribozomas para suprimir a expressão de TACI; e o uso de ligantes ou de anticorpos do antagonista de TACI.

A supressão da actividade de TACI é útil para tratar respostas imunes indesejáveis, incluindo as doenças auto imunes e inflamatórias e a rejeição do transplante (GVH). As doenças auto imunes e inflamatórias incluem o vasculite de complexo induzido imune [Cochrane, Springer Seminar Immunopathol., 7:263 (1984)], glomerulo nefrite [Couser e outros, Kidney Inst., 29:879 (1985)], anemia hemolítica [Schreiber e Frank, J. Clin. Invest., 51:575 (1972)], miastenia grave [Lennon, e outros, J. Exp. Med., 147:973 (1978); Biesecker e Gomez, J.Immunol., 142:2654 (1989)], artrite induzida por colagéneo do tipo II [Watson and Townes, J. Exp. Med., 162:1878 (1985)]; rejeição de implantes experimental alérgica e aguda [Knechtle, e outros, J. Heart Transplant, 4(5):541 (1985); Guttman, Transplantation, 17:383

(1974); Adachi, e outros, Trans. Proc., 19(1):1145 (1987)]; artrite reumatóide, and eritematose sistémica do lúpus (SLE).

Em uma outra forma de realização, em que um cancro do linfócito tais como o mieloma, o linfoma, ou a leucemia expressam TACI, e TACI contribui para o crescimento do cancro, o uso de um antagonista de TACI da invenção pode ser usado para suprimir o crescimento da célula de cancro.

Deste modo, um componente de uma composição terapêutica tal como um anticorpo polivalente ou monovalente de acordo com a presente invenção pode ser introduzido parentalmente, trans inucosalmente, por exemplo por via, oral, nasal, ou rectal ou transdermica. Preferivelmente, a administração é parenteral, a administração por exemplo, através da injecção intravenosa, e também incluindo, mas não de um modo limitado, intra-arterial, intramuscular, intradermica, subcutânea, a intra peronial, a intra ventricular, e a intracranial.

Em uma outra forma de realização, o composto terapêutico pode ser distribuído numa vesícula, em especial num liposoma [ver Langer, Science, 249:1527-1533 (1990); Treat et al., em Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss: New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, ibid., pp. 317-327]. Para reduzir os seus efeitos colaterais sistémicos, este pode ser um método preferido para introduzir TACI.

Em, contudo, uma outra forma de realização, o composto terapêutico pode ser entregue num sistema de libertação controlada. Para o exemplo, um agonista ou um antagonista à proteína obrigatória do trans membrana da invenção actual, tal como um anticorpo, podem ser administrados usando a intravenosa, uma bomba osmotica implantavel, um remendo transdermico, liposomas, ou outras modalidades da

administração. Numa forma de realização pode ser usada uma bomba [ver Langer, mais acima; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng., 14:201 (1987); Buchwald e outros, Surgery, 88:507 (1980); Saudek e outros, N. Engl. J. Med., 321:574 (1989)]. Em outra forma de realização, os materais polimericos podem ser usedos [ver Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Press: Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley: New York (1984); Ranger and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem., 23:61 (1983); ver também Levy e outros, Science, 228: 190 (1985); During e outros, Ann. Neurol., 25:351 (1989); Howard e outros, J. Neurosurg., 71:105 (1989)]. Numa outra forma de realização, um sistema de libertação controlada pode ser colocado na proximidade do alvo terapêutico, isto é, o cérebro, assim requerendo somente uma fracção da dose sistémica [ver, por exemplo, Goodson, em Medical Applications of Controlled Release, mais acima, vol. 2, pp. 115138 (1984)]. Preferivelmente, um dispositivo libertação controlada é introduzido num sujeito na proximidade do local da activação imune imprópria ou de um tumor.
Outros sistemas liberação de controlada são discutidos na revisão feita por Langer (Science, 249:15271533 (1990).

Em um aspecto mais adicional, as células recombinantes que foram transformadas com o gene da proteína TACI e que os níveis elevados expressos do polipeptido podem ser transplantados num sujeito a necessitar da proteína de TACI. As células preferivelmente autologas são transformadas com a proteína de TACI transplantada para evitar a rejeição.

Os compostos terapêuticos da presente invenção podem ser administrados por vias de administração intravenosa, intra-arterial, intraperitonial, intramuscular, ou subcutânea. Alternativamente, estes compostos, formulados correctamente,

podem ser administrados pela administração nasal ou oral. Uma fonte constante destes compostos terapêuticos pode ser assegurada fornecendo um dose terapeuticamente eficaz (isto é, uma dose eficaz para induzir mudanças metabólicas num sujeito) nos intervalos necessários, por exemplo, diário, cada 12 horas, etc.. Estes parâmetros dependerão da severidade da condição da doença que está a ser tratada, de outras acções, tais como a modificação da dieta, que são executadas, o peso, a idade, e o sexo do sujeito, e de outros critérios, que podem ser facilmente determinados relativamente à boa prática médica por aqueles que são peritos na técnica.

O uso destes agentes terapêuticos é um regime terapêutico eficaz para uma doença de deficiência imunitária, preferencialmente para um humano, mas pode ser um animal. Assim, como pode prontamente ser apreciado por quem tiver conhecimentos medianos na técnica, os métodos e as composições farmacêuticas da invenção actual são particularmente adequados à administração a todo e qualquer animal, em especial a um mamífero, e incluir, mas de modo algum limitados, animais domésticos, tais como os sujeitos felinos ou caninos, dos animais de quinta, como sejam, de um modo não limitado, os bovinos, os equinos, os caprinos, os ovinos, e os porcinos, animais selvagens (no seu ambiente selvagem ou num jardim zoológico), animais da pesquisa, tais como ratos, ratazanas, coelhos, cabras, carneiros, porcos, cães, gatos, etc., espécies aviário, tais como as galinhas, perus, pássaros, etc., isto é, para o uso médico veterinário.

Os seguintes exemplos são apresentados a fim ilustrar mais inteiramente as formas de realização preferidas da invenção. Devem de modo algum ser interpretados, entretanto, como limitando o largo espectro da invenção.

EXEMPLO

SINALIZAÇÃO DE CÁLCIO POR UMA SUPERFÍCIE DE LINFÓCITOS DE RECEPTOR MEDIADA ATRAVÉS DE CAML

Introdução

O influxo de Ca^{2+} é um regulador chave da activação estimulada por antigenio linfócito [Imboden e outros, Immunol., 134:663-665 (1985)]; [Crabtree & Clipstone, Annu. Rev. Biochem., 63: 1045 - 1083 (1994)]; [Weiss & Littman, Pilha, 76:263 - 274(1994)]. A proteína de CAML foi identificada como um regulador de Ca^{2+} que sinaliza que é necessário mas não suficiente para a activação do factor da transcrição do linfócito, NF-AT (Bram & Crabtree, 1994, acima). A posição de CAML nos vesículos citoplasmicos é consistente com o influxo regulador de Ca^{2+} modulando a liberação intracelular de Ca^{2+}. Aqui, um novo receptor humano que interage com CAML expresso por linfócitos de B que aja enquanto uma célula de superfície que sinaliza a molécula é divulgada. Este receptor, TACI (activador CAML Interactor) da trans membrana, activação dos novos Ca^{2+} dependente de NF-AT quando a reticulada com um anticorpo. O sinal pode ser obstruído por um mutante negativo dominante de CAML. Como mostrado na presente, a proteína de TACI também pode independentemente activar o factor da transcrição AP-1, fornecendo assim ambos os sinais requeridos para a activação do linfócito. A proteína de TACI inicia um mecanismo de transdução do sinal da novela que liga directamente os estímulos de superfície à molécula sinalizando intracelular, CAML da célula, e define desse modo uma classe nova dos receptores específicos dos linfócitos da superfície da célula que modulam a resposta imune. Além do exposto, a proteína de TACI é uma ferramenta inovadora que pode ser usada para regular o sistema imune num sentido

positivo ou num sentido negativo. TACI-1 é o homologue humano de TACI ilustrado no presente exemplo.

Materiais e Métodos

Clonagem e vigilância molecular. Uma biblioteca humana do DNA do B-b-lymphocyte é vigiada pelo sistema de dois-híbridos [Fields & Song, Nature, 340:245-246 (1989)]; [Durfee e outros, Genes Dev., 7:555-569 (1993)], com a totalidade da região de codificação de CAML usada como isco. O cDNA humano de CAML é introduzido no vector isco pAS1 dos dois híbridos de fermento. Esta construção dirige a expressão de um domínio obrigatório de GAL4-DNA fundido à sequência inteira da proteína de CAML. Uma biblioteca do B-b-lymphocyte no plasmida pACT é transformada no fermento Y153 e os plasmidas de interacção do potencial são identificados pelo crescimento das colónias nos meios que faltam à histidina e que contêm o triazole 3-amino.

Um clone (TACI-1), de entre oito positivos preliminares foi identificado. O DNA TACI-1 é subclonado em um plasmida mamífero da expressão que adiciona uma etiqueta ao epitope à extremidade do terminal amino da proteína expressada. Esta estrutura é transfectada então na linha da célula do T-lymphocyte de Jurkat, nas células de COS, ou nas células NIH3T3. Em cada caso, a expressão de superfície da célula da proteína de TACI é demonstrada. A orientação da proteína é com o terminal N fora da célula, porque o epitope está disponível para a reacção com um anticorpo específico uniforme sem permeabilizar a membrana da célula. Este resultado facilitou os estudos funcionais descritos na presente.

A selecção secundária confiou na expressão excedente dos clones positivos em células de T de Jurkat, e em testes para

a activação de NF-AT. (Bram e outros, 1993, acima) as células T de Jurkat transfectadas transientes com a construção marcada TACI-1 e um plasmida do NFAT repórter incubado no meio que contém o anticorpo de epitope específico monoclonal. Para maximizar a reticulação de TACI 1, os anticorpos são limitados aos grânulos antes da adição às suspensões da célula. Depois de um período de incubação de 24 horas, é determinada a actividade do NFAT repórter. Uma indução dramática da actividade do repórter de NFAT é encontrada quando as células são estimuladas desta maneira. As transfecções do controle sem a construção TACI-1 não mostram a activação que se segue a tal tratamento. Do mesmo modo, a transfecção de uma molécula não relacionada da superfície da célula (CD8) seguida pela estimulação anti-CD8 que não activou NFAT nestas células. O grau de activação era 70 - 80% da estimulação máximo que poderia ser conseguido nestas células T de Jurkat pela adição do éster do forbol mais o ionomicina.

Depois de estudado um pedaço do tecido Northern múltiplo (Clontech) com o DNA TACI-1 (retirado do vector dos dois híbridos do fermento), um clone TACI-1 independente é obtido a partir de uma biblioteca fetal humana do DNA do vesícula (Stratagene). A região de codificação de terminal 5' é confirmada pela amplificação rápida das extremidades do DNA (RACE) que usam uma biblioteca humana ' Marathon-ready ' do DNA da vesícula (Clontech), os primários aninhados específicos de TACI-1 (5 ' TCTGAATTGTTTTCAACTTCTC-3 ' e 5'-CAGCAGAGGATCCCAGTACTGCTC-3 '), e a polimerase de Pfu (Stratagene) de acordo com as recomendações dos fabricantes.

Os antisoros. Os cDNAs que codificam os resíduos dos 146 aminoácido do terminal N de CAML e dos 151 resíduos do terminal N de TACI-1 cada um deles clonado em um vector bacteriano da expressão da GST de fusão (Pharmacia). Os antisoros do policlonal do coelho são levantados de encontro

às proteínas purificadas da GST de fusão [Smith & Johnson, Gene, 67:31-40 (1988)], e os anticorpos específicos purificados pelo excesso do cromatografia do imunoafinidade, as proteínas purificadas acopladas ao agarose (Pierce), usando técnicas padrão. Anti-TACI-1 reticulado é preparado incubando os anticorpos anti-TACI-1 poligonais de imunoafinidade purificado com anticorpos anti-coelho de IgG de grânulos magnéticos (PerSeptive Diagnostics).

Peneira para identificar novas drogas de imunossupressor: as células T de Jurkat são transfectadas com o plasmida da expressão TACI-1 e com um plasmida do NF-AT repórter. As células T de Jurkat expressam naturalmente o receptor da célula T (TCR). As células são estimuladas pela adição dos anticorpos a TACI-1, dos anticorpos a TCR, ou dos anticorpos a ambos. As drogas candidatas são misturadas com as células T de Jurkat e o efeito destas drogas é determinado.
O plasmida do NF-AT repórter contém o repórter de SEAP. Este sinal é usado para medir o grau de inibição da activação. O teste do repórter de SEAP aumentado para ser executado por um instrumento da selecção do robot. As drogas que obstruem a activação de TACI-1 mas não de TCR, de acordo com o medido pelo teste de repórter de SEAP são identificadas como tendo a inibição selectiva da resposta activada TACI-1.

Resultados e discussão

As proteínas que podem interagir com o CAML são identificadas usando uma peneira dos dois híbridos (Fields & Song, 1989, acima); (Durfee e outros, 1993, acima) com o CAML como isco. Para determinar se uma destas proteínas identificadas de ligação de CAML que pode afectar Ca^{2+} que sinaliza em células T, sua capacidade de modular a actividade do factor NF AT de transcrição de Ca^{2+} dependente é examinada [Truneh e outros, Nature, 313:318-321(1985)]; [Verweij e outros, J. Biol.

Chem., 265:15788-15795 (1990)]; [Karttunen & Shastri, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:3972-3976 (1991)]; [Emmel e outros, Science, 246:1617-1620 (1989)].

A expressão excedente reforçada dos dois clones híbridos em células T de Jurkat revela que um clone (que codifica a proteína TACI-1), substituindo a exigência para o influxo de Ca^{2+}, implicando que TACI-1 se encontra no mesmo trilho do sinal que CAML. A análise da mancha Northern para o mRNA TACI-1 demonstra um mRNA de 1.4 kb expresso somente na vesícula, no intestino delgado, no timo e nos linfócitos periféricos do sangue sugerindo uma expressão limitada de TACI-1 (figura 1). O teste padrão observado é consistente com a expressão de TACI-1 que está predominantemente em células de sangue periféricas, desde que as células de sangue periféricas, e em linfócitos particulares, podem estar actuais em todos estes órgãos (incluindo os remendos de Peyer que alinham o intestino delgado). Além disso, não há nenhuma detecção da expressão no cólon, nos testículos, nos ovários, ou na prostata. De um modo adicional, a proteína TACI-1 é detectada em todos os linfócitos normais do periférico B usando as manchas do anticorpo específico. Não há nenhuma proteína detectável expressa em linfócitos T periféricos, em monocitos ou em neutrofilos.

A determinação da sequência do DNA de ambas as cadeias do DNA isolado revela uma estrutura aberta completa da leitura de 1325 pares baixos, que seja previsto para codificar uma proteína de 293 aminoácidos. A sequência deduzida do aminoácido de TACI-1 (figura 2a) inclui uma única região hidrofóbica (resíduos 167 a 186) que tenha as características de uma membrana que mede o segmento (figura 2b). Análise da sequência da proteína pelo método de Sipos [Sipos & von Heijne, Biochem. de Eur. J., 213:1333-1340 (1993)]; [Claros & von Heijne, Comput. Appl. Biosci., 10:685-686 (1994)],

prevê a exposição extra celular para o terminal em N e para a exposição citoplasmica para o terminal em C. Embora em TACI-1 falte uma sequência do sinal do terminal N, a presença de um codo a montante do batente indica que a estrutura aberta completa da leitura está contida dentro do clone. TACI-1 é relativamente rico em resíduos de cisteina, mas não há nenhuma semelhança ou homologia significativa da sequência a qualquer outra proteína divulgada. Uma busca para vestígios de Prosite em TACI-1 revela um vestígio de TNFR~NGFR [Nucleic Acids Res., 21:3097-3103 (1993)] (resíduos 33-71) de terminal N numa região putativa da trans membrana, que consiste por C-x(4,6)-[FYH]-x(5, 10)-C-x(0,2)-C-x(2,3)-C-x(7, 11)-C-x(4,6) - [DNEQSKP]-x(2)-C no terminal N central da proteína. Este motivo é encontrado em um número de proteínas, algumas que são receptoras para factores do crescimento. Algumas destas proteínas têm uma cópia deste motivo. Uma comparação da sequência da proteína TACI-1 com se revela uma repetição significativa entre o motivo de TNFR NGFR em resíduos 33-66 e em resíduos 70-104. Esta análise atraiu a atenção para a presença dois domínios do tipo TNFR ricos em cisteina que abrangem estas regiões e que indicam que TACI-1 é um membro da super família dos receptores de TNFR. (Figura 2c) para confirmar que TACI-1 é uma proteína da trans membrana, a sua expressão em células de T de Jurkat transfectadas com um plasmida de TACI-1 de codificação que usa o fluxo de citometria foi examinada. As células transfectadas com manchas de superfície da mostra TACI-1 com os anticorpos do policlonal do coelho criados frente a uma proteína da fusão que incluísse a parcela do kilodalton do terminal N 12 de TACI-1 (figura 3a). A evidência adicional de que TACI-1 está localizado na superfície da célula é derivada da microscopia de imuno fluorescência, onde manchas da superfície de células intactas transfectadas com um plasmida FLAG-epitope etiquetado do terminal em N da expressão TACI-1 são observadas (figura 3b). Dado que o terminal em N de TACI-

1 é extra celular na ausência de uma sequência clivada do sinal, é um tipo proteína da trans membrana de III [Wilson-Rawls-Rawls e outros, Virology, 201:66-76(1994)] para avaliar o efeito de TACI-1 na actividade de NF-AT nas células T, a proteína é expressada de um modo transiente em células de T de Jurkat do Tag com um repórter segregado da fosfatase alcalina dirigida pelas sequências NF-AT ligado do promotor IL-2 (Bram & Crabtree, 1994, supra); [Fiering e outros, Genes Dev., 4:1823-1834 (1990)]; (Bram e outros, 1993, acima). A expressão TACI-1 é excedente e pode parcialmente substituir a exigência para o ionomicina neste teste. A adição dos anticorpos anti TACI 1 às células promove a activação aumentada de NF-AT (mais do que o dobro, veja-se a figura 4a), demonstrando que TACI-1 responde à reticulação na superfície da célula. O grau de activação de NF-AT varia nas experiências diferentes devido à eficiência da transfecção mas é tipicamente de 40 - 50% da resposta máxima ao tratamento correspondente das células com o PMA mais a activação de ionomicina.TACI-1 iniciado NF-AT é dependente do cálcio, como são demonstradas pela perda da actividade de NF-AT na presença das drogas imuno supressivas, tais como Cyclosporin A ou FK506 [Friedman & Weissman, Cell, 66:799-806 (1991)]; (Lui e outros., 1991, acima) (figura 4b).

Para examinar a exigência para o influxo de Ca^{2+} na activação de TACI-1 mediado de NF-AT, o cálcio extra celular pode ser removido pela adição de concentrações crescentes de EGTA. Isto resulta na inibição da activação de TACI-1 mediado de NF-AT, como tem sido mostrado previamente para a activação mediada pelo receptor das células T (figura 4c). Como controlo, o efeito de expressão das células, um mutante constitutivamente activo, independente de cálcio do calcineurina A [Hubbard & Klee, Biochemistry, 28:1868-74 (1989)]; (O'Keefe e outros, 1992, acima); (Clipstone & Crabtree, 1993, acima) é examinado. Como esperado, nestas

células a activação NF-AT é vista mesmo na presença de EGTA (figura 4c). Assim, nas células T, TACI-1 faz a mediação do aspecto dependente do cálcio da activação de NF-AT iniciando o influxo de Ca^{2+} extra celular (muito provável com o trilho capacitativo do influxo de Ca^{2+} que se segue ao esgotamento dos locais de armazenamento intracelular [Putney & Bird, Cell, 75:1, 99-201(1993)]; Hoth & Prenner, Physiol., 465:359-386 (1993)]; [Zweifach & Lewis, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 90:6295-6299 (1993)]; [Premack e outros, J.Immunol., 152:5226-5240 (1994)]).

A activação de NF-AT por CAML requer a estimulação exógena da quinase da proteína C pela adição do éster do forbol (Bram & Crabtree, 1994, acima). TACI1 de Anticorpo reticulado, entretanto, pode activar NF-AT na ausência de PMA ou de ionomicina (figura 4b, barras contínuas). As experiências que examinam a activação de um repórter AP-1 pela expressão excedente de TACI-1 mostram que a activação de AP-1 é elevada (em mais de quatro vezes) em células F TACI-1 Jurkat elevadas transfectadas. Este efeito pode ser mais realçado com a adição dos anticorpos reticulados anti TACI 1 (figura 4d). Consequentemente, TACI-1 inicía o influxo de Ca^{2+}, que nas voltas activa o cálcio, assim como o trilho AP-1 depois da estimulação, mediando desse modo o preenchimento de ambas as exigências para a activação de NF-AT.

Uma confirmação adicional de que o TACI-1 interage com o CAML pode ser demonstrada pela sua interacção específica em uma experiência da troca do inverso de dois híbridos (Durfee e outros, 1993, acima) (figure 5a). Para definir os resíduos críticos do aminoácido envolvidos na interacção, os mutantes do apagamento tanto de TACI-1 como de CAML são testados para sua capacidade de se associarem fisicamente (Figure 5a). Os aminoácidos do terminal em forma de C 126 de TACI-1 são encontrados de modo a serem suficientes para ligar aos

aminoácidos do terminal em N 146 de CAML. A prova adicional para que, na associação in vivo de TACI-1 com CAML, seja fornecida pelas experiências em que o comprimento total CAML e um mutante que compreende os 146 resíduos do aminoácido do terminal em N de CAML que são precipitados ao mesmo tempo relativamente à imunidade com o TACI-1 dos lisatos da célula (Figure 5b). Consequentemente, pode concluir-se que a cauda citoplasmica do terminal em forma de C de TACI-1 pode fisicamente associar-se com a metade do terminal em N de CAML.

Para examinar se o facto de sinalizar TACI-1 depende da associação de TACI-1 com CAML, o domínio de interacção de CAML (resíduos 1-146) está testado para determinar se pode inibir a activação de TACI-1 induzido com NF-AT numa forma negativa dominante. A co-transfecção do plasmida da expressão do mutante CAML(1 - 146) elimina completamente a activação de TACI-1 induzida de NF-AT em células de T de Jurkat. Por outro lado, não há nenhum efeito inibitório em PMA mais a actividade de ionomicina induzida de NF-AT, assim eliminando as hipóteses de se descobrir um efeito tóxico não específico. A expressão em simultâneo de CAML(1 - 146) também não influencia a acumulação da proteína TACI-1 como detectada pela análise da mancha do Ocidental (Figure 5c). A CAML (1-146) falta o domínios hidrofóbico da trans membrana que são requeridos para a actividade do influxo de Ca^{2+} [Holloway & Bram, Biol. Chem., 271:8549-8552 (1996)]. Daqui, a eliminação da actividade de indução nestas pilhas pode ser atribuído ao bloqueio CAML(1-146) do fragmento à parcela intracelular com o terminal evitando a associação com as CAML endógenas externas.

CAML é uma proteína integral da membrana localizada aos vesiculos citoplasmáticos (Bram & Crabtree, 1994, acima). A análise de mutantes do apagamento mostrou que os domínios

hidrofóbicos ao meio do terminal em C da proteína que são essenciais para a actividade (Holloway & Bram, 1996, acima), e em que a metade hidrofílica do terminal em N da proteína pode ter um papel regulatório. A experiência de digestão da tripsina demonstrou mais uma vez que a metade do terminal em N da molécula é citoplasmica. Neste caso, é demonstrada a interacção entre TACI-1 e CAML são requeridos para a activação de TACI-1 mediado por NF-AT em células T de Jurkat. Examinados em conjunto, estes dados indicam que uma interacção física entre TACI-1 na membrana do plasma e as vesículas intracelulares de que contêm CAML pode iniciar um sinal do influxo do cálcio (Figura 5d). Estas descobertas fornecem a primeira evidência para uma comunicação directa entre os receptores da superfície da célula e os organelos intracelulares nos linfócitos. Este mecanismo pode ser um tanto análogo ao modelo do receptor do dihidropiridina-rianodina nas células do músculo, em que a estimulação de uma molécula pode directamente modular a actividade da outra [Marty e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 91:2270-2274 (1994)]; [Sham e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 92:121-125 (1995)]; [Nakai e outros, Nature, 380:72-75 (1996)].

Outras proteínas da superfície da célula demonstraram activar a função de linfócito, incluindo o receptor da célula T CD3, o CD2, o CD20, e o Thy-1. Estas proteínas não têm nenhum homologia da sequência com TACI-1, e é provável que desempenhem papéis diferentes uns dos outros ou nos termos da resposta aos sinais extra celulares diferentes, e/ou nos termos da etapa de desenvolvimento da expressão dos linfócitos. TACI-1 deve também desempenhar um papel na modulação da função dos linfócitos em trilhos alternos e/ou co-estimulatorios. Deste modo, para além de definirem um novo mecanismo de sinalização, TACI-1 é um novo receptor específico dos linfócitos capaz de activar as células T.

Segue-se uma lista dos documentos relacionados com a revelação acima e particularmente com os procedimentos e com as discussões experimentais.

1. Imboden, J.B., Weiss, A. & Stobo, J.D., J.Immunol., 134:663-5 (1985).

2. Crabtree, G.R. & Clipstone, N.A., Annu. Rev. Biochem., 63:1045-83 (1994).

3. Weiss, A. & Littman, D.R., Cell, 76:263-74 (1994).

4. Bram, R.J. & Crabtree, G.R., Nature, 371:355-8 (1994).

5. Fields, S. & Song, O., Nature, 340:245-6 (1989).

6. Durfee, T., e outros, Genes Dev., 7:555-69 (1993).

7. Truneh, A., Albert, F., Golstein, P. & Schmitt, V.A., Nature, 313:318-21 (1985).

8. Verweij, C.L., Guidos, C. & Crabtree, G.R., J. Biol. Chem., 265:15788-95 (1990).

9. Karttunen, J. & Shastri, N., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:3972-6 (1991).

10. Sipos, L. & von Heijne, G., Eur. J. Biochem., 213:1333-40 (1993).

11. Claros, M.G. & von Heijne, G. Comput. Appl. Biosci., 10:685-6 (1994).

12. Bairoch, A., Nucleic Acids Res., 21:3097-103 (1993).

13. Wilson-Rawls, J., Deutscher, S.L. & Wold, W.S., Virology, 201:66-76 (1994).

14. Fiering, S., e outros, Genes Dev., 4:1823-34 (1990).

15. Bram, R.J., Hung, D.T., Martin, P.K., Schreiber, S.L. & Crabtree, G.R., Mol. Cell. Biol., 13:4760-9 (1993).

16. Friedman, J. & Weissman, I., Cell, 66:799-806 (1991).

17. Liu, J., e outros, Cell, 66:807-15 (1991).

18. Hubbard, M.J. & Klee, C.B., Biochemistry, 28:1868-74 (1989).

19. O'Keefe, S.J., Tamura, J., Kincaid, R.L., Tocci, M.J. & O'Neill, E.A., Nature, 357:692-4 (1992).

20. Clipstone, N.A. & Crabtree, G.R., Ann. N.Y. Acad. Sci., 696:20-30 (1993).

21. Putney, J.W., Jr. & Bird, G.S., Cell, 75:199-201 (1993).

22. Hoth, M. & Prenner, R., J.Physio. (Lond.), 465:359-86 (1993).

23. Zweifach, A. & Lewis, R.S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6295-9 (1993).

24. Premack, B.A., McDonald, T.V. & Gardner, P., J. Immunol., 152:5226-40 (1994).

25. Holloway, M.P. & Bram, R.J., J. Biol. Chem., 271:8549-52 (1996).

26. Marty, I., e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:2270-4 (1994).

27. Sham, J.S., Cleemann, L. & Morad, M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,92:121-5 (1995).

28. Nakai, J., e outros, Nature,380:72-5 (1996).

29. Smith, D.B. & Johnson, K.S., Gene, 67:31-40 (1988).

30. Takebe, Y., e outros, Mol. Cell. Biol., 8:466-72 (1988).

31. Emmel e outros, Science, 246:1617-1620 (1989).

32. Mattila e outros, Emble J, 9:4425-33 (1990).

Há várias publicações, para além do antecedentemente citado na presente, as revelações que são incorporadas a título de referência na sua totalidade. A citação de qualquer uma das referências na presente não deve ser julgada como uma admissão que tal referência está disponível como técnica anterior da presente invenção.

Muito embora a invenção tenha sido descrita e ilustrada na presente com referência às formas de realização específicas, aos vários materiais específicos, aos procedimentos e aos exemplos, compreende-se que a invenção não está restringida às combinações materiais e procedimentos particulares do material, que está seleccionado para essa finalidade. Certamente, as várias modificações da invenção além àquelas descritas na presente irão tornar-se aparentes para os peritos na técnica a partir da leitura da descrição anterior e das figuras em anexo. Tais modificações são destinadas a cair dentro do âmbito das reivindicações anexadas.

Deve ainda ser compreendido que todos os tamanhos da base ou tamanhos do aminoácido, e todo o peso molecular ou valores de massa molecular, dados para os ácidos nucleicos ou para os polipeptidos são aproximados, e são fornecidos como descrição.

SEQUÊNCIA DE LISTAGEM

(1) INFORMAÇÕES GERAIS

(i) REQUERENTE: Bran, Richard J.

von Bulow, Gotz

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: A LYMPHOCYTE SURFACE RECEPTOR THAT BINDS CAML, NUCLEIC ACIDS ENCODING THE SAME AND METHODS OF USE THEREOF

(iii) NÚMERO OF SEQUÊNCIAS: 10

(iv) MORADA DE CORRESPONDENCIA:

(A) DESTINATÁRIO: David A. Jackson, Esq.

(B) RUA: 411 Hackensack Ave, Continental Plaza, 4th Floor

(C) CIDADE: Hackensack

(D) ESTADO: New Jersey

(E) PAÍS: USA

(F) CÓDIGO POSTAL: 07601

(v) FORMOLÁRIO LEGÍVEL POR COMPUTADOR:

(A) TIPO DE MEIO: Disquete

(B) COMPUTADOR: IBM PC compatível

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

(D) SOFTWARE: Patent In Release #1.0, Version #1.30

(vi) DADOS ACTUAIS DO PEDIDO:

(A) NÚMERO DE PEDIDO: US

(B) DATA DE DEPÓSITO: 28 - FEV - 1997

(C) CLASSIFICAÇÃO:

(viii) INFORMAÇÕES DO PROCURADOR/ AGENTE:

(A) NOME: Jackson Esq., David A.

(B) NÚMBER DE REGISTO: 26 742

(C) NÚMERO DE REFERÊNCIA/ ASSUNTO: 1340-1-007

(ix) INFORMAÇÕES DE TELECOMUNICAÇÕES:

(A) TELEFONE : 201 487 5800

(B) FAX: 201 343 1684

(2) INFORMAÇÕES PARA A SEQ ID NO 1

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

(A) COMPRIMENTO: 1 377 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADEIAS: duplas

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Cdna

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(vi) FONTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Homo sapiens

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

AGCATCCTGA GTAATGAGTG GCCTGGGCCG GAGCAGGCGA GGTGGCCGGA GCCGTGTGGA 60
CCAGGAGGAG CGCTTTCCAC AGGGCCTGTG GACGGGGGTG GCTATGAGAT CCTGCCCCGA 120
AGAGCAGTAC TGGGATCCTC TGCTGGGTAC CTGCATGTCC TGCAAAACCA TTTGCAACCA 180
TCAGAGCCAG CGCACCTGTG CAGCCTTCTG CAGGTCACTC AGCTGCCGCA AGGAGCAAGG 240
CAAGTTCTAT GACCATCTCC TGAGGGACTG CATCAGCTGT GCCTCCATCT GTGGACAGCA 300
CCCTAAGCAA TGTGCATACT TCTGTGAGAA CAAGCTCAGG AGCCCAGTGA ACCTTCCACC 360
AGAGCTCAGG AGACAGCGGA GTGGAGAAGT TGAAAACAAT TCAGACAACT CGGGAAGGTA 420
CCAAGGATTG GAGCACAGAG GCTCAGAAGC AAGTCCAGCT CTCCCGGGGC TGAAGCTGAG 480
TGCAGATCAG GTGGCCCTGG TCTACAGCAC GCTGGGGCTC TGCCTGTGTG CCGTCCTCTG 540
CTGCTTCCTG GTGGCGGTGG CCTGCTTCCT CAAGAAGAGG GGGGATCCCT GCTCCTGCCA 600
GCCCCGCTCA AGGCCCCGTC ARAGTCCGGC CAAGTCTTCC CAGGATCACG CGATGGAAGC 660
CGGCAGCCCT GTGAGCACAT CCCCCGAGCC AGTGGAGACC TGCAGCTTCT GCTTCCCTGA 720
GTGCAGGGCG CCCACGCAGG AGAGCGCAGT CACGCCTGGG ACCCCCGACC CCACTTGTGC 780
TGGAAGGTGG GGGTGCCACA CCAGGACCAC AGTCCTGCAG CCTTGCCCAC ACATCCCAGA 840
CAGTGGCCTT GGCATTGTGT GTGTGCCTGC CCAGGAGGGG GGCCCAGGTG CATAAATGGG 900
GGTCAGGGAG GGAAAGGAGG AGGGAGAGAG ATGGAGAGGA GGGGAGAGAG AAAGAGAGGT 960
GGGGAGAGGG GAGAGAGATA TGAGGAGAGA GAGACAGAGG AGGCAGAAAG GGAGAGAAAC 1020
AGAGGAGACA GAGAGGGAGA GAGAGACAGA GGGAGAGAGA GACAGAGGGG AAGAGAGGCA 1080
GAGAGGGAAA GAGGCAGAGA AGGAAAGAGA CAGGCAGAGA AGGAGAGAGG CAGAGAGGGA 1140
GAGAGGCAGA GAGGGAGAGA GGCAGAGAGA CAGAGAGGGA GAGAGGGACA GAGAGAGATA 1200
GAGCAGGAGG TCGGGGCACT CTGAGTCCCA GTTCCCAGTG CAGCTGTAGG TCGTCATCAC 1260
CTAACCACAC GTGCAATAAA GTCCTCGTGC CTGCTGCTCA CAGCCCCCGA GAGCCCCTCC 1320
TCCTGGAGAA TAAAACCTTT GGCAGCTGCC CTTCCTCAAA AAAAFIAAAA AAAAAAAA 1377

(2) INFORMAÇÕES PARA A SEQ ID NO:2:

(i) CARACTERISTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 293 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADEIAS: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: terminal em N

(vi) FONTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Homo sapiens

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

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

```
Thr Gln Glu Ser Ala Val Thr Pro Gly Thr Pro Asp Pro Thr Cys Ala
               245                 250           255
Gly Arg Trp Gly Cys His Thr Arg Thr Thr Val Leu Gln Pro Cys Pro
           260         265                         270
His Ile Pro Asp Ser Gly Leu Gly Ile Val Cys Val Pro Ala Gln Glu
        275         280                         285
Gly Gly Pro Gly Ala
    290
```

(2) INFORMAÇÕES PARA A SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERISTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 321 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADEIAS: duplas

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: terminal em N

(vi) FONTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Homo sapiens

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

```
AAGAAGAGGG GGGATCCCTG CTCCTGCCAG CCCCGCTCAA GGCCCCGTCA AAGTCCGGCC 60
AAGTCTTCCC AGGATCACGC GATGGAAGCC GGCAGCCCTG TGAGCACATC CCCCGAGCCA 120
GTGGAGACCT GCAGCTTCTG CTTCCCTGAG TGCAGGGCGC CCACGCAGGA GAGCGCAGTC 180
ACGCCTGGGA CCCCCGACCC CACTTGTGCT GGAAGGTGGG GGTGCCACAC CAGGACCACA 240
GTCCTGCAGC CTTGCCCACA CATCCCAGAC AGTGGCCTTG GCATTGTGTG TGTGCCTGCC 300
CAGGAGGGGG GCCCAGGTGC A                                          321
```

(2) INFORMAÇÕES PARA A SEQ ID NO:4:

(i) CARACTERISTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 107 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADEIAS: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: terminal em C

(vi) FONTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Homo sapiens

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

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

(2) INFORMAÇÕES PARA A SEQ ID NO:5:

(i) CARACTERISTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 498 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADEIAS: duplas

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(vi) FONTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Homo sapiens

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:5:

```
ATGAGTGGCC TGGGCCGGAG CAGGCGAGGT GGCCGGAGCC GTGTGGACCA GGAGGAGCGC 60
TTTCCACAGG GCCTGTGGAC GGGGGTGGCT ATGAGATCCT GCCCCGAAGA GCAGTACTGG 120
GATCCTCTGC TGGGTACCTG CATGTCCTGC AAAACCATTT GCAACCATCA GAGCCAGCGC 180
ACCTGTGCAG CCTTCTGCAG GTCACTCAGC TGCCGCAAGG AGCAAGGCAA GTTCTATGAC 240
CATCTCCTGA GGGACTGCAT CAGCTGTGCC TCCATCTGTG GACAGCACCC TAAGCAATGT 300
GCATACTTCT GTGAGAACAA GCTCAGGAGC CCAGTGAACC TTCCACCAGA GCTCAGGAGA 360
CAGCGGAGTG GAGAAGTTGA AAACAATTCA GACAACTCGG GAAGGTACCA AGGATTGGAG 420
CACAGAGGCT CAGAAGCAAG TCCAGCTCTC CCGGGGCTGA AGCTGAGTGC AGATCAGGTG 480
GCCCTGGTCT ACAGCACG                                              498
```

(2) INFORMAÇÕES PARA A SEQ ID NO:6:

(i) CARACTERISTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 166 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADEIAS: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: terminal em N

(A) ORGANISMO: Homo sapiens

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:6:

```
Met Ser Gly Leu Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg Ser Arg Val Asp
1               5                  10                  15
Gln Glu Glu Arg Phe Pro Gln Gly Leu Trp Thr Gly Val Ala Met Arg
            20                  25                  30
Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met
        35                  40                  45
Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala
    50                  55                  60
Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp
65                  70                  75                  80
His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His
                85                  90                  95
Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Pro Val
            100                 105                 110
Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Arg Gln Arg Ser Gly Glu Val Glu Asn
        115                 120         125
Asn Ser Asp Asn Ser Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Glu His Arg Gly Ser
    130                 135                 140
Glu Ala Ser Pro Ala Leu Pro Gly Leu Lys Leu Ser Ala Asp Gln Val
145                 150                 155                 160
Ala Leu Val Tyr Ser Thr
                165
```

(2) INFORMAÇÕES PARA A SEQ ID NO:7:

(i) CARACTERISTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 60 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADEIAS: duplas

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(vi) FONTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Homo sapiens

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:7:

CTGGGGCTCT GCCTGTGTGC CGTCCTCTGC TGCTTCCTGG TGGCGGTGGC CTGCTTCCTC 60

(2) INFORMAÇÕES PARA A SEQ ID NO:8:

(i) CARACTERISTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 20 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADEIAS: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(vi) FONTE ORIGINAL

(A) ORGANISMO: Homo sapiens

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:8:

Leu Gly Leu Cys Leu Cys Ala Val Leu Cys Cys Phe Leu Val Ala Val
1 5 10 15

Ala Cys Phe Leu
20

(2) INFORMAÇÕES PARA A SEQ ID NO:9:

(i) CARACTERISTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 22 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADEIAS: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: outro ácido nucleico

(A) DESCRIÇÃO: desc. = “Primário”

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:9:

TCTGAATTGT TTTCAACTTC TC 22

(2) INFORMAÇÕES PARA A SEQ ID NO:10:

(i) CARACTERISTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADEIAS: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: outro ácido nucleico

(A) DESCRIÇÃO: desc. = “Primário”

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:10:

CAGCAGAGGA TCCCAGTACT GCTC 24

REIVINDICAÇÕES

1. Um ácido nucleico tendo uma sequência de nucleótidos seleccionada de entre o grupo que consiste por:

a) uma sequência de nucleótidos tendo pelo menos uma identidade de 90% com os nucleótidos 14-895 da SEQ ID NO:1, em que a referida sequência de nucleótidos codifica um Activador de Transmembrana e uma proteína de Interacção CAML (TACI);
b) uma sequência de nucleótidos compreendendo pelo menos 18 nucleótidos de uma sequência de nucleótidos que codifica um Activador de Transmembrana e uma proteína de Interacção CAML (TACI) tendo uma sequência de aminoácidos seleccionada de entre o grupo que consiste por SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 2 compreendendo uma substituição conservadora do mesmo, em que a referida sequência de nucleótidos codifica um fragmento de terminal em N da proteína TACO, que é o domínio extra celular regulatório; e
c) uma sequência de nucleótidos que codifica um fragmento de terminal em C da proteína TACI em que o referido fragmento de terminal em C tem uma sequência de aminoácido seleccionada de entre o grupo que consiste por SEQ ID NO: 4 e por SEQ ID NO: 4, compreendendo uma sua substituição conservadora, e em que o referido fragmento de terminal em C é suficiente para ligar os terminais em N dos 146 aminoácidos de CAML;

em que a referida proteína TACI funciona como uma proteína de sinalização da superfície de uma célula e como sinais para interagirem com CAML.

2. Um ácido nucleico isolado de acordo com a Reivindicação 1, em que a sequência de nucleótidos compreende os nucleótidos 14-895 da SEQ ID NO: 1.

3. Um ácido nucleico isolado de acordo com a Reivindicação 1, em que a referida sequência de nucleótidos que codifica um Activador de Transmembrana e uma proteína de Interacção CAML (TACI) que compreende a SEQ ID NO: 1.

4. Um ácido nucleico isolado de acordo com a Reivindicação 1, em que o terminal em forma de N da proteína TACI tem uma sequência de aminoácidos seleccionada de entre o grupo que consiste pela SEQ ID NO: 6 e pela SEQ ID NO: 6 compreendendo um substituinte conservador do mesmo.

5. Um ácido nucleico isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o referido ácido nucleico codifica a referida proteína TACI.

6. Uma estrutura recombinante de DNA compreendendo um ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, em que o referido ácido nucleico se encontra ligado sob o ponto de vista operacional a uma sequência de controlo de expressão.

7. Uma estrutura recombinante de DNA de acordo com a Reivindicação 6, em que a referida sequência de controlo de expressão é o promotor SRα.

8. Um hospedeiro unicelular transformado numa estrutura de DNA recombinante de acordo com as Reivindicações 6 ou 7.

9. Um hospedeiro unicelular de acordo com a Reivindicação 8, em que o hospedeiro unicelular é um procariota.

10. Um hospedeiro unicelular de acordo com a Reivindicação 8, em que o hospedeiro unicelular é um eucariota.

11. Um Activador de Transmembrana e uma proteína de Interacção CAML (TACI) codificado por um ácido nucleico de acordo com a Reivindicação 1, em que a referida proteína TACI compreende um domínio extra celular, um domínio do alcance da membrana, e um domínio citoplásmico que tem uma afinidade de ligação com CAML, em que a referida proteína TACI é um receptor de membrana de plasma que interage de um modo directo com um organelo intracelular nos linfócitos.

12. Uma proteína TACI de acordo com a Reivindicação 11, em que a referida proteína TACI compreende um motivo TNFR_NGFR em que a referida TNFR_NGFR tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

13. Uma proteína TACI de acordo com a Reivindicação 11, em que a referida proteína TACI compreende um monómero que consiste por cerca de 295 aminoácidos.

14. Uma proteína TACI de acordo com a Reivindicação 12 ou com a Reivindicação 13, em que a referida proteína TACI compreende motivos TNFR_NGFR, em que cada TNFR_NGFR tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 11.

15. Uma proteína TACI de acordo com a Reivindicação 13, em que a referida proteína TACI compreende dois motivos de acordo com os representados pelos aminoácidos 33-66 e 70-104 da SEQ ID NO: 2, e em que, quando adequadamente estimulada in situ, a referida proteína TACI inicia a activação de um factor de transcrição através da combinação de um trilho Ca^{2+} dependente e de um trilho Ca^{2+} independente.

16. Uma proteína TACI de acordo com a Reivindicação 11, em que a referida proteína TACI tem uma sequência de aminoácidos compreendendo SEQ ID NO: 2, ou uma sequência de aminoácidos

compreendendo SEQ ID NO: 2 tendo pelo menos uma substituição de aminoácidos conservativa.

17. Um fragmento de uma proteína TACI codificada por um ácido nucleico de acordo com a Reivindicação 1, em que a referida proteína compreende um domínio extra celular, um segmento de dispersão da membrana, e um domínio citoplásmico que tem uma afinidade de ligação relativamente a CAML, e em que a referida proteína TACI é um receptor de membrana de plasma que interage directamente com um organelo intracelular nos linfócitos, em que o referido fragmento é seleccionado de entre o grupo que consiste por:

a) fragmento com o terminal em forma de C da proteína TACI em que o referido fragmento com o terminal em forma de C tem uma sequência de aminoácidos seleccionada de entre o grupo que consiste por SEQ ID NO: 4 e por SEQ ID NO: 4 compreender um aminoácido conservador em substituição do mesmo, e em que o referido fragmento de terminal em forma de C é suficiente para fazer a ligação dos aminoácidos 146 de terminal em forma de N de CAML; e
b) um fragmento em forma de N da proteína TACI, que é o domínio extra celular regulatório.

18. Um fragmento de acordo com a Reivindicação 17 em que a proteína TACI compreende:

(a) um monómero que consiste por cerca de 195 aminoácidos; e
(b) dois motivos TNFR_NGFR, em que cada motivo TNFR_NGFR tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 11.

19. Um fragmento de acordo com a Reivindicação 17 ou com a Reivindicação 18, em que a proteína TACI tem uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2, e a SEQ ID NO: 2 tem uma substituição conservadora da mesma.

20. Um fragmento de acordo com a Reivindicação 17 em que o referido fragmento em forma de N tem uma sequência de aminoácidos seleccionada de entre o grupo que consiste pela SEQ ID NO: 6, e a SEQ ID NO: 6 compreende uma substituição conservadora de aminoácidos da mesma.

21. Uma proteína quimérica que compreende um fragmento de acordo com qualquer uma das reivindicações de 17 a 20.

22. Uma proteína quimérica de acordo com a Reivindicação 21; em que o referido fragmento é um fragmento com o terminal em forma de N que tem uma sequência como a da SEQ ID NO: 6, ou a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 6 tem pelo menos um aminoácido conservador de substituição.

23. Uma proteína quimérica de acordo com a Reivindicação 21; em que o referido fragmento é um fragmento com o terminal em forma de C que tem uma sequência como a da SEQ ID NO: 4, ou a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 4 tem pelo menos um aminoácido conservador de substituição.

24. Uma proteína quimérica de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 21 a 23, compreendendo ainda o domínio FC de uma imuno globulina.

25. Um anticorpo que se liga especificamente a uma proteína TACI de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 11 a 16, ou a um fragmento de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 17 a 20.

26. Um anticorpo de acordo com a Reivindicação 25, em que o referido fragmento consiste por um fragmento com um terminal em forma de N da proteína TACI, que é o domínio regulador extra celular da proteína TACI.

27. Um anticorpo de acordo com a Reivindicação 26, em que o referido fragmento tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 6.

28. Um anticorpo de acordo com a Reivindicação 25, em que o referido fragmento é um fragmento terminal em forma de C da proteína TACI que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 4, e que é suficiente para fazer a ligação dos aminoácidos 146 de terminal em forma de N de CAML.

29. Um anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 25 a 28, em que o referido anticorpo é um anticorpo monoclonal.

30. Um anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 25 a 28, em que a referida proteína TACI tem uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

31. Um anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 25 a 28, em que o referido anticorpo é um anticorpo quimérico.

32. Uma linha de células imortal que produz um anticorpo monoclonal de acordo com a Reivindicação 29.

33. Um ácido nucleico em sentido contrário que se hibridiza sob condições fisiológicas para um mRNA que codifica uma proteína TACI que tem uma sequência de aminoácidos seleccionada de entre o grupo que consiste por SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 2 compreende uma substituição conservadora do mesmo e bloqueia a translação do mRNA.

34. Um rato de abate que compreende um primeiro e um segundo alelos, em que

(a) o referido primeiro alelo e o referido segundo alelo se codificam, naturalmente, cada um deles e exprimem uma proteína TACI funcional;
(b) o referido primeiro alelo contém um defeito; e
(c) o referido defeito evita que o primeiro alelo expresse a proteína TACI funcional.

35. Um rato de abate de acordo com a Reivindicação 24, em que

(a) o referido segundo alelo contém também o referido defeito; e
(b) o referido defeito evita que o referido segundo alelo expresse uma proteína funcional TACI em que o rato de abate não exprime uma proteína funcional TACI.

36. Um processo para fazer um polipeptido de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 11 a 20, compreendendo a introdução de um vector de expressão que compreende um ácido nucleico que codifica o polipeptido no interior de uma célula hospedeira, em que o polipeptido se exprime na referida célula hospedeira.

37. Um processo de acordo com a Reivindicação 36, compreendendo ainda a purificação do polipeptido.

38. Um processo de acordo com a Reivindicação 36 ou com a Reivindicação 37, em que o polipeptido é uma proteína TACI tem uma sequência de aminoácidos seleccionada de entre o grupo que consiste pela SEQ ID NO: 2 e a SEQ ID NO: 2 compreende uma substituição conservadora da mesma.

39. Um processo para identificar um ligante de um Activador de Transmembrana e uma proteína de Interacção CAML (TACI) que compreende:

(a) a colocação em contacto de um polipeptido extra celular com terminal em forma de N de uma proteína TACI codificada por um ácido nucleico de acordo com a Reivindicação 1 com uma molécula candidata; e
(b) a detecção da ligação do polipeptido extra celular com terminal em forma de N com a molécula candidata, em que a ligação do polipeptido extra celular com terminal em forma de N com a molécula candidata identifica a molécula candidata como um ligante.

40. Um processo de acordo com a Reivindicação 39, em que o fragmento com terminal em forma de N da proteína TACI tem uma sequência de aminoácidos seleccionada de entre o grupo que consiste pela SEQ ID NO: 6, e a SEQ ID NO: 6 compreende uma sua substituição conservadora.

41. Um processo de acordo com a Reivindicação 40, em que o polipeptido extra celular com terminal em forma de N se encontra presente numa proteína funcional TACI, e em que a ligação da molécula candidata é determinada através da detecção da activação celular de um processo seleccionado de entre o grupo que consiste pela:

(a) activação do trilho AP-1;
(b) activação do trilho CAML;
(c) activação do factor de transcrição NF-AT
(d) activação do trilho NF-KB; e
(e) activação da transcrição dependente NF-AT.

42. Um processo de acordo com a Reivindicação 41, em que a proteína TACI se exprime numa análise de dois híbridos em levedura.

43. Um processo de acordo com a Reivindicação 41 ou com a Reivindicação 42, em que a proteína TACI se exprime em células Junkat contendo um gene repórter sob o controlo de um promotor NF-AT.

44. Um processo de acordo com a Reivindicação 43, em que o gene repórter codifica um marcador que uma fosfatase alcalina segregada (SEAP)

45. Um processo para identificar uma droga imuno supressora, que bloqueia de um modo selectivo a acção dos linfócitos B sem afectar os linfócitos T maduros, que compreende:

(a) o contacto de um primeiro linfócito com uma droga potencial; em que o primeiro linfócito contém uma proteína TACI codificada por um ácido nucleico de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 5, e uma primeira proteína de marcador, e em que a referida primeira proteína de marcador é transcrita quando o TACI é estimulado na ausência de uma droga candidata.
(b) a estimulação TACI;
(c) a detecção da primeira proteína de marcador sob as condições em que a primeira proteína de marcador transcrita é detectável, em que uma droga potencial é seleccionada como sendo uma droga de candidato quando a primeira proteína de marcador não pode ser detectada;
(d) a colocação em contacto de um segundo linfócito com a droga candidata; em que o segundo linfócito contém um receptor de célula T e uma segunda proteína de marcador, e em que a referida segunda proteína de marcador é transcrita quando o receptor de célula T é estimulado ou na ausência ou na presença de uma droga imuno supressora;
(e) a estimulação do receptor de células T;
(f) a detecção da segunda proteína de marcador sob as condições nas quais a segunda proteína de marcador transcrita

é detectável; em que uma droga candidata é identificada como uma droga imuno supressora quando a proteína do segundo marcador é detectada.

46. Um processo de acordo com a Reivindicação 45, em que a estimulação TACI é efectuada com um anticorpo de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 25 a 31.

DISTRIBUIÇÃO DE TECIDOS DE TACI

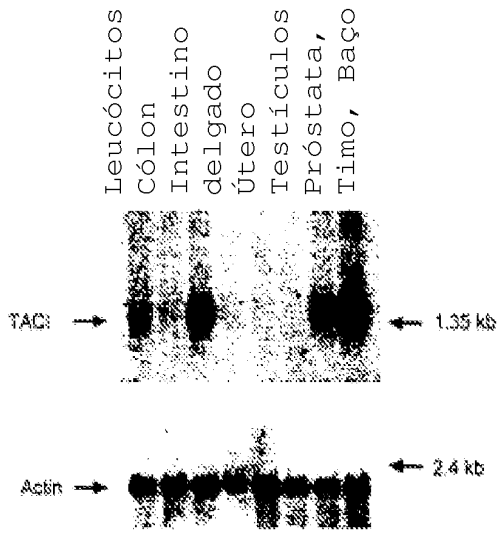


Figura 1

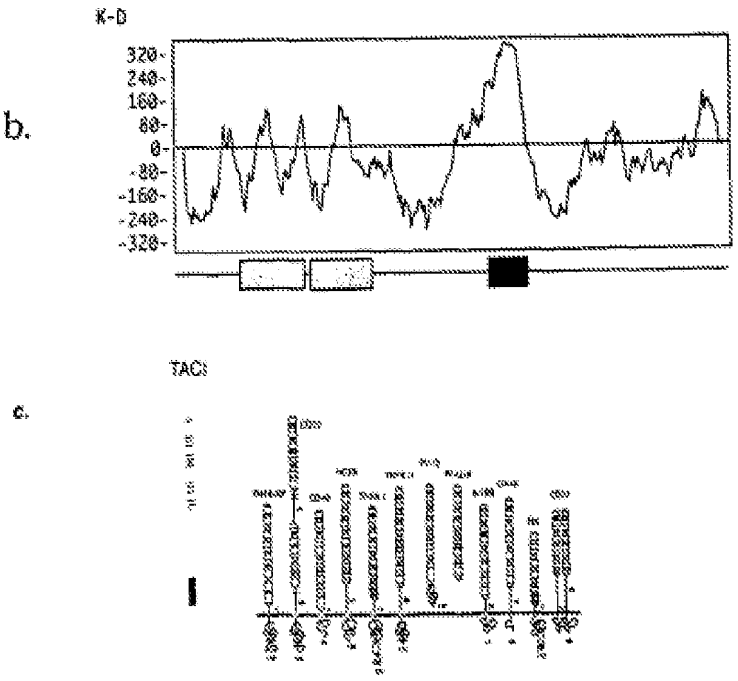
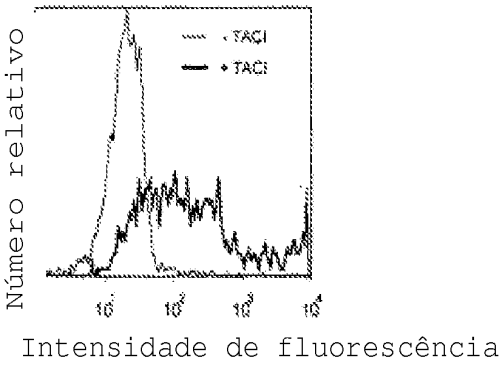


Figura 2

TACI é uma proteína da superfície da pelo

a.



b.

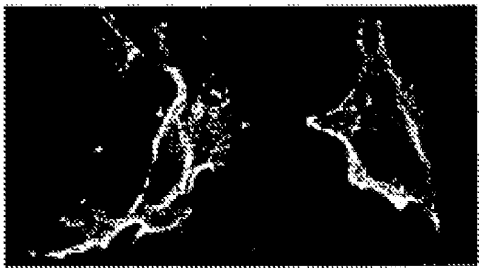


Figura 3

TACI é uma proteína de sinalização que resulta na activação da transcrição específica de NF-AT

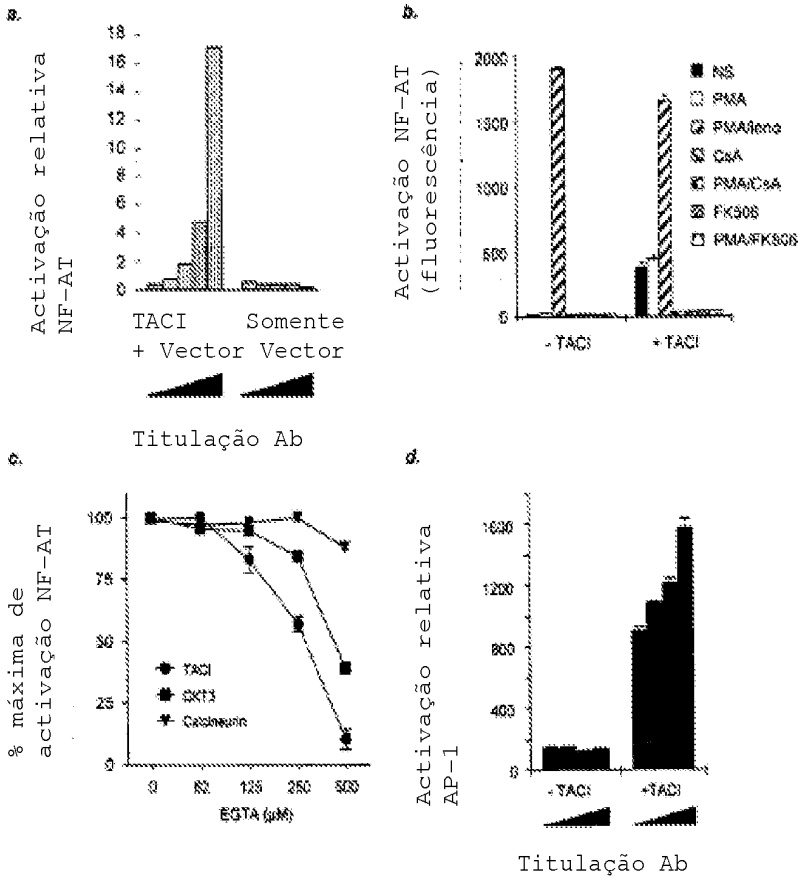


Figura 4

A interacção TACI com CAML é crítica para a sinalização Ca^{2+}

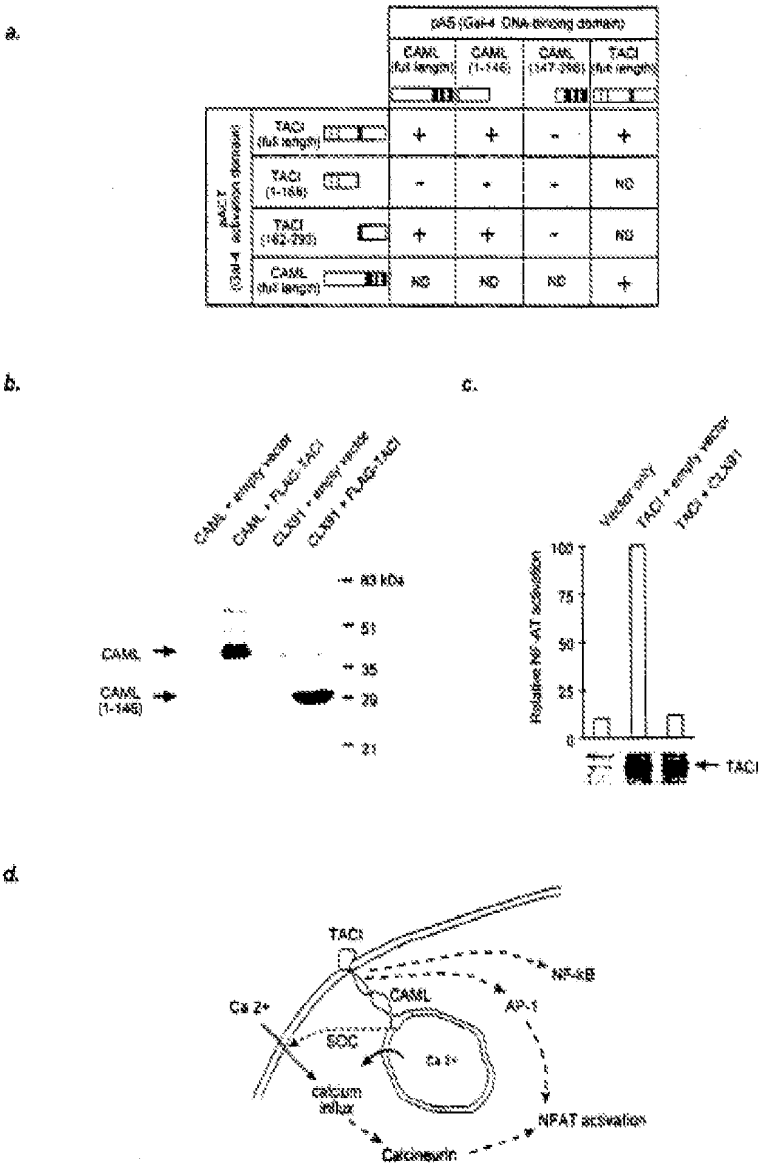


Figura 5