

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0710407-3 A2**

(22) Data de Depósito: 03/05/2007
(43) Data da Publicação: 17/04/2012
(RPI 2154)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 14/46

(54) Título: POLIPTÍDEOS, PEIXES-ZEBRA TRANSGÊNICOS, MODELOS DE SISTEMAS, MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS, DE IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES, MÉTODOS DE TRATAMENTO DE DISFUNÇÕES RELATIVAS A APOPTOSE, MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES DE PREVENÇÃO OU REDUÇÃO DA APOPTOSE, COMPOSIÇÃO DE AUMENTO DA APOPTOSE, COMPOSIÇÕES DE REDUÇÃO OU PREVENÇÃO DE APOPTOSE, COMPOSIÇÃO DE APOPTOSE, MÉTODO DE DETECÇÃO, KITS E ARTIGO INDUSTRIALIZADO

(30) Prioridade Unionista: 04/05/2006 US 60/797,703

(73) Titular(es): GENENTECH, INC.

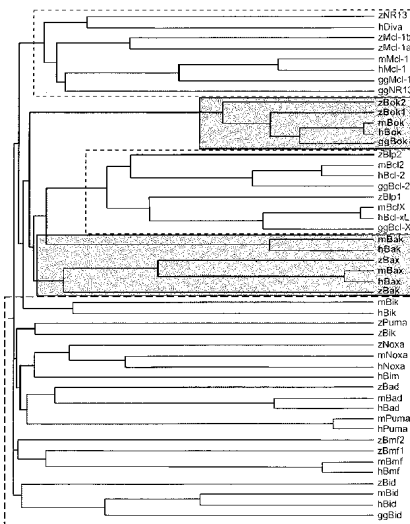
(72) Inventor(es): Avi J. Ashkenazi, ERICA KRATZ, KIRAN MUKHYALA, Reece Hart

(74) Procurador(es): KÁTIA JANE FERREIRA EVANGELISTA

(86) Pedido Internacional: PCT US2007068180 de 03/05/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/131133de 15/11/2007

(57) Resumo: POLIPEPTÍDEOS, PEIXES-ZEBRA TRANSGÊNICOS, MODELOS DE SISTEMAS, MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS, DE IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES, MÉTODOS DE TRATAMENTO DE DISFUNÇÕES RELATIVAS A APOPTOSE, MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES DE PREVENÇÃO OU REDUÇÃO DA APOPTOSE, COMPOSIÇÃO DE AUMENTO DA APOPTOSE, COMPOSIÇÕES DE REDUÇÃO OU PREVENÇÃO DE APOPTOSE, MÉTODO DE DETECÇÃO, KITS E ARTIGO INDUSTRIALIZADO. A presente invenção fornece polipeptídeos ZPA, anticorpos, iolécias de ácido nucleico, antagonistas, agonistas, potencializadores e composições relativas a polipeptídeos ZPA e métodos de sua identificação, laboração e utilização que são úteis para o tratamento e prevenção de doenças e para diagnóstico e pesquisa médica. A presente invenção também fornece modelos de sistemas para o processo apoptótico intrínseco.



**“POLIPEPTÍDEOS, PEIXES-ZEBRA TRANSGÊNICOS, MODELOS DE
SISTEMAS, MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS, DE
IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES, MÉTODOS DE TRATAMENTO DE
DISFUNÇÕES RELATIVAS A APOPTOSE, MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO
5 DE AGENTES DE PREVENÇÃO OU REDUÇÃO DA APOPTOSE,
COMPOSIÇÃO DE AUMENTO DA APOPTOSE, COMPOSIÇÕES DE
REDUÇÃO OU PREVENÇÃO DE APOPTOSE, MÉTODO DE DETECÇÃO,
KITS E ARTIGO INDUSTRIALIZADO”**

CAMPO DA INVENÇÃO

10 A presente invenção refere-se a polipeptídeos ZPA, anticorpos,
moléculas de ácido nucleico, antagonistas, agonistas e composições relativas a
polipeptídeos ZPA, bem como métodos de sua fabricação e utilização,
incluindo métodos de diagnóstico e tratamento de disfunções relativas a
apoptose em mamíferos. A presente invenção também se refere a modelos de
15 sistemas para o processo apoptótico intrínseco.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O crescimento celular descontrolado é a causa de muitas doenças
em uma série de tipos de células. Câncer ocorre, por exemplo, quando há um
aumento da quantidade de células anormais ou neoplásticas derivadas de um
20 tecido normal que se proliferam para formar uma massa de tumor. As células
de tumores freqüentemente invadem os tecidos adjacentes e podem difundir-se
por meio do sistema sangüíneo ou linfático para nódulos linfáticos regionais e
para locais distantes por meio de um processo denominado metástase. Em um
crescimento canceroso, uma célula prolifera-se sob condições em que as
25 células normais não cresceriam. O câncer manifesta-se em uma ampla
variedade de formas, caracterizadas por diferentes graus de invasividade e
agressividade. Tumores malignos (cânceres) são a segunda principal causa de
morte nos Estados Unidos, depois das doenças cardíacas (Boring et al, CA

Cancel J. Clin. 43: 7 (1993)).

Muitas pesquisas foram dedicadas à descoberta de novos tratamentos de disfunções proliferativas celulares, tais como câncer. Apesar dos avanços recentes, existe uma grande necessidade de identificar e compreender o papel de novos alvos celulares para a modulação da proliferação celular e desenvolver métodos alternativos ou mais eficazes de tratamento e agentes terapêuticos e de diagnóstico. Existe também a necessidade de desenvolver produtos e métodos terapêuticos alternativos de tratamento de tipos de células específicos e de tratamento de doenças causadas por proliferação celular anormal ou associada, tal como cânceres. Uma abordagem de desenvolvimento de produtos terapêuticos anticancerígenos é estudar os mecanismos de apoptose, também conhecidos como morte celular programada.

Forte controle dos mecanismos apoptóticos que determinam o destino da célula é necessário para o desenvolvimento do organismo, homeostase e reação a danos celulares. A desregulagem desses processos freqüentemente gera doenças sérias. Muitos cânceres inibem seletivamente, por exemplo, processos pró-apoptóticos e/ou aumentam processos pró-sobrevivência, a fim de evitar reações de hospedeiros destinadas a regular o crescimento (Kirkin et al, *Biochim. Biophys. Acta* 1644 (2-3): 229-249 (2004); LeBlanc et al, *Nature Med.* 8: 2 274-281 (2002); Cory e Adams, *Trends Biochem. Sci.* 26: 61-66 (2001)). A compreensão e o tratamento de uma série de doenças, incluindo câncer, doenças autoimunes e disfunções degenerativas, necessitam, portanto de uma compreensão da apoptose (Strasser, *Nat. Rev. Immunol.* 5: 189-200 (2005); Strasser et al, *Biochim. Biophys. Acta* 1333: F151-178 (1997)).

Dois processos de sinalização de apoptose foram descritos em mamíferos (Anderson et al, *Nat. Rev. Drug Discov.* 4 (5): 399-409 (2005)): o

processo extrínseco, tipicamente iniciado pelos ligantes que induzem a morte da família de TNF, e o processo intrínseco, que reage principalmente a estímulos intracelulares mediados pela família Bcl-2 (Strasser et al, *Nat. Rev. Imm.* 5: 189-200 (2005); Borner, *Mol. Immunol.* 39: 615-647 (2002)), mas
 5 também ativado por componentes do processo extrínseco.

As proteínas Bcl-2 são caracterizadas por quatro motivos de seqüências alfa-helicoidais distintos conhecidos como os domínios de homologia Bcl-2 (BH) BH1 a BH4. Em alguns casos, proteínas Bcl-2 também possuem uma região transmembrana C-terminal que as localiza para a face
 10 citoplasmática da membrana mitocondrial externa, envelope nuclear ou retículo endoplasmático (Borner, *Mol. Immunol.* 39: 615-647 (2003)). Os membros da família de proteína Bcl-2 podem ser divididos em três grupos: (i) proteínas similares a Bcl-2 pró-sobrevivência (tais como Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1, NR-13, BHRF1, LMW5-HL, ORF16, v-Bcl-2 (KSHV), E1B-19K, CED-9,
 15 Boo/DIVA/Bcl2-L-10 e Bcl-B); (ii) proteínas com múltiplos domínios pró-apoptóticas (tais como Bax, Bak, Bok/Mtd e Bcl-x_S); e (iii) proteínas pró-apoptóticas somente BH3 (tais como Bik/Nbk, Blk, Hrk/DP5, BNip3, BimL/Bod, Bad, Bid, EGL-1, Noxa, Puma/Bbc3 e Bmf) (*id.*). A maior parte dos membros pró-sobrevivência contém todos os quatro domínios BH enquanto a maior parte das
 20 proteínas pró-apoptóticas com múltiplos domínios não contém um domínio BH4.

Em células não estimuladas, interações entre membros da família de múltiplos domínios pró-sobrevivência e pró-apoptóticas evitam a oligomerização de proteínas similares a Bax na membrana mitocondrial e iniciam o programa apoptótico. Me diante estímulo, proteínas somente BH3
 25 liberam a inibição de proteínas similares a Bax por meio de dimerização com as proteínas pró-sobrevivência, liberando as proteínas com múltiplos domínios pró-apoptóticas para comprometer o potencial de membrana mitocondrial e iniciar a apoptose. Experimentos anteriores demonstraram que diversos

membros da família de Bcl-2 são críticos para o desenvolvimento normal (Lindsten et al, *Mol. Cell.* 6: 1389-1399 (2000); Motoyama et al, *Science*, 267: 1506-1510 (1995); Veis et al, *Cell* 75: 229-240 (1993); Rinkenberger et al, *Genes Dev.* 14: 23-27 (2000)). A função desta família de proteínas durante o desenvolvimento, entretanto, é em grande parte desconhecida: mesmo em knockouts genéticos relativos a Bcl-2 com efeitos de desenvolvimento significativos, nem o sinal apoptótico inicial, nem as proteínas somente BH3 ativadas em resposta ao sinal são conhecidos.

Uma série de membros da família Bcl-2 inovadores foi identificada em vertebrados por meio de similaridade de seqüências a Bcl-2, o membro epônimo da família denominado pelo seu papel em linfoma de células B (Tsujimoto et al, *Science* 228: 1440-1443 (1985)). Como os membros da família Bcl-2 são fundamentais para o desenvolvimento e regulação, entretanto, aberrações ou exclusões de um ou mais membros desta família de proteínas freqüentemente causam patologias que evitam uma caracterização da sua importância funcional ou resultam em animais inviáveis no primeiro caso. Um modelo de sistema no qual alterações reguladoras e de desenvolvimento poderão ser monitoradas a partir dos estágios iniciais de crescimento forneceria uma ferramenta fundamental para abordar questões relativas aos papéis da família Bcl-2 de genes em apoptose.

Peixe-zebra (*Danio rerio*) serviu de modelo de sistema útil para uma série de processos biológicos. Peixe-zebra pode servir de modelo excepcional para o estudo da apoptose, não apenas porque o desenvolvimento no peixe é rápido e os embriões de peixe-zebra permanecem transparentes ao longo da maior parte da embriogênese, mas também devido à disponibilidade de linhagens de peixe-zebra mutantes que exibem apoptose anormal (vide, por exemplo, Cole e Ross, *Devel. Biol.* 240: 123-142 (2001)). Foram examinados os padrões de apoptose em peixe-zebra, de forma que a detecção de células

apoptóticas e a dinâmica geral de apoptose naquele organismo são conhecidas (*id.*). Os processos bioquímicos responsáveis por esses padrões apoptóticos em peixe-zebra, entretanto, não foram caracterizados. Permanece uma questão em aberto se o processo apoptótico intrínseco funciona no peixe-zebra.

5 Um requisito prévio de estabelecimento de peixe-zebra como modelo de sinalização apoptótica ao longo do processo intrínseco é uma demonstração de que os principais membros da família Bcl-2 estão presentes no peixe-zebra. Vários estudos foram tentados para identificar membros da família Bcl-2 em peixe-zebra. Inohara e Nunez descobriram muitos genes de
10 peixe-zebra homólogos para membros de processo extrínseco de aves e mamíferos tais como as caspases, mas identificaram apenas oito genes de peixe-zebra supostamente relacionados com apenas seis membros da família Bcl-2 de processo intrínseco (Bcl-x_L, Mcl-1, NR-13, Bax, BNIP3 e Bad) (Inohara e Nunez, *Cell Death Diff.* 7: 509-510 (2000)). Coultas et al pesquisaram
15 exaustivamente os bancos de dados Genbank EST e não redundantes de peixe-zebra por meio de TBLASTN e identificaram apenas três membros da família Bcl-2 somente BH3 adicionais: Bid, Noxa e Bmf (*Cell Death Differ.* 9: 1163-1166 (2002)). De fato, aquele grupo comentou particularmente a falha de identificação de Bik, Bim e Puma em peixe-zebra utilizando busca BLAST
20 traduzida (*id.*). Esta observação foi recentemente confirmada por Aouacheria et al após pesquisa exaustiva de seqüências de proteínas e nucleotídeos Ensembl e GenBank utilizando PSI-BLAST e TBLASTN (*Mol. Biol. Evol.* 22 (12): 2395-416 (2005)).

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

25 A presente invenção fornece novos modelos de sistemas de investigação da apoptose *in vivo* e *in vitro* e fornece métodos de identificação de agentes que modulam a apoptose. A presente invenção também fornece novos agentes terapêuticos, agentes de diagnóstico e métodos de tratamento

ou prevenção de doenças relativas a apoptose, que incluem câncer, por meio de direcionamento de apoptose, particularmente o processo apoptótico intrínseco.

Em certas realizações, a presente invenção fornece polipeptídeos e polinucleotídeos pró-apoptose de peixe-zebra ("ZPA"). Em uma realização, é

5 fornecido um polipeptídeo que contém uma seqüência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID N° 1, 5, 7 e 9, em que o polipeptídeo é um polipeptídeo pró-apoptótico relativo a Bcl-2 ("B2R") de peixe-zebra. Em uma outra realização, é fornecido um polipeptídeo que contém uma seqüência de aminoácidos de SEQ ID N° 1, em que o polipeptídeo é um polipeptídeo pró-

10 apoptótico com múltiplos domínios B2R de peixe-zebra. Em uma outra realização, um polipeptídeo que contém uma seqüência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID N° 5, 7 e 9, em que o polipeptídeo é um polipeptídeo pró-apoptótico somente BH3 BR2 de peixe-zebra. Em uma outra realização, é fornecido um polinucleotídeo que contém uma seqüência de nucleotídeos selecionada a partir de SEQ ID N° 2, 6, 8 e 10, em que o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo pró-apoptótico B2R de peixe-zebra.

15 Em uma outra realização, é fornecido um polinucleotídeo que contém uma seqüência de nucleotídeos de SEQ ID N° 1, em que o polinucleotídeo é um polipeptídeo pró-apoptótico com múltiplos domínios B2R de peixe-zebra. Em uma outra realização, é fornecido um polinucleotídeo que contém uma seqüência de nucleotídeos selecionada a partir de SEQ ID N° 6, 8 e 10, em que o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo pró-apoptótico somente BH3 BR2 de peixe-zebra.

20 Em outras realizações, a presente invenção fornece peixe-zebra transgênico para uma ou mais proteínas relativas a apoptose. Em uma realização, é fornecido um peixe-zebra transgênico, em que um ou mais polinucleotídeos selecionados a partir de SEQ ID N° 2, 6, 8 e 10 é excluído. Em uma outra realização, é fornecido um peixe-zebra transgênico, em que a expressão de um ou mais polinucleotídeos selecionados a partir de SEQ ID N°

2, 6, 8 e 10 é modulada com relação à expressão do um ou mais polinucleotídeos em um peixe-zebra do tipo selvagem. Em um aspecto, a expressão aumenta. Em um outro aspecto, a expressão é reduzida. Em uma outra realização, é fornecido um peixe-zebra transgênico, em que um ou mais polipeptídeos selecionados a partir de SEQ ID Nº 1, 5, 7 e 9 não são expressos. Em uma outra realização, é fornecido um peixe-zebra transgênico, em que a expressão de um ou mais polipeptídeos selecionados a partir de SEQ ID Nº 1, 5, 7 e 9 é modulada com relação à expressão do um ou mais polipeptídeos em um peixe-zebra do tipo selvagem. Em um aspecto, a expressão aumenta. Em um outro aspecto, a expressão é reduzida.

Em uma outra realização, é fornecido um peixe-zebra transgênico, em que um ou mais genes B2R endógenos são substituídos com um parceiro de gene B2R de um outro organismo. Em um aspecto, o parceiro é mamífero. Em um outro aspecto, o parceiro é humano. Em um outro aspecto, todos os genes B2R endógenos são substituídos com parceiros genéticos BR2 de um outro organismo. Em um aspecto, o parceiro é mamífero. Em um outro aspecto, o parceiro é humano. Em uma outra realização, é fornecido um peixe-zebra transgênico, em que um ou mais genes do processo apoptótico intrínseco endógeno são substituídos com um parceiro genético de processo apoptótico intrínseco de um outro organismo. Em um aspecto, o parceiro é mamífero. Em um outro aspecto, o parceiro é humano. Em um outro aspecto, o um ou mais genes do processo apoptótico intrínseco endógeno são selecionados a partir de SEQ ID Nº 2, 6, 8 e 10. Em uma outra realização, é fornecido um peixe-zebra transgênico, em que todos os genes do processo apoptótico intrínseco endógeno são substituídos com parceiros de gene de processo apoptótico intrínseco de um outro organismo. Em um aspecto, o parceiro é mamífero. Em um outro aspecto, o parceiro é humano. Em um outro aspecto, os genes do processo apoptótico intrínseco endógeno incluem SEQ ID Nº 2, 6, 8 e 10.

Em certas realizações, a presente invenção fornece modelos de sistemas de apoptose. Em uma realização, é fornecido um modelo de sistema de apoptose que compreende um peixe-zebra conforme descrito em qualquer das realizações anteriores. Em um aspecto, o modelo de sistema é um modelo de sistema para o processo apoptótico intrínseco. Em uma outra realização, é fornecido um modelo de sistema *in vitro* para apoptose que compreende pelo menos um polipeptídeo codificado por uma seqüência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID Nº 1, 5, 7 e 9. Em um aspecto, o modelo de sistema é um modelo de sistema para o processo apoptótico intrínseco. Em um outro aspecto, o modelo de sistema é um modelo de sistema para o processo apoptótico extrínseco. Em uma outra realização, é fornecido um modelo de sistema *in vitro* para apoptose que compreende pelo menos um polinucleotídeo codificado por uma seqüência de nucleotídeos selecionada a partir de SEQ ID Nº 2, 6, 8 e 10. Em um aspecto, o modelo de sistema é um modelo de sistema para o processo apoptótico intrínseco. Em um outro aspecto, o modelo de sistema é um modelo de sistema para o processo apoptótico extrínseco.

Em certas realizações, a presente invenção fornece métodos de identificação de compostos que se unem a um polipeptídeo ZPA, que compreendem o contato de um polipeptídeo ZPA com um composto e determinação se o composto se une ao polipeptídeo ZPA. Em certas realizações, a presente invenção fornece métodos de identificação de compostos que modulam a atividade de um polipeptídeo ZPA, que compreendem o contato de um polipeptídeo ZPA com um composto e determinação se o composto modula a atividade do polipeptídeo ZPA.

Em certas realizações, a presente invenção fornece métodos de identificação de agentes que modulam a apoptose. Em uma realização, é fornecido um método de identificação de agentes de redução ou prevenção da apoptose, que compreende a administração de pelo menos um agente a um

peixe-zebra e determinação se a apoptose é reduzida ou evitada. Em um aspecto, o método compreende adicionalmente a determinação da presença ou da quantidade de apoptose no peixe-zebra antes da administração do pelo menos um agente. Em um outro aspecto, o método compreende
5 adicionalmente o estímulo da apoptose no peixe-zebra antes da administração do pelo menos um agente. Em um outro aspecto, o agente reduz ou evita a apoptose por meio do processo apoptótico intrínseco. Em um outro aspecto, o agente reduz ou evita a apoptose por meio do processo apoptótico extrínseco. Em um outro aspecto, a expressão e/ou atividade de uma ou mais proteínas
10 BR2 no peixe-zebra é aumentada com relação à expressão ou atividade de uma ou mais proteínas BR2 em um peixe-zebra do tipo selvagem. Em um outro aspecto, uma ou mais proteínas B2R não são expressas no peixe-zebra. Em um outro aspecto, a expressão e/ou atividade de uma ou mais proteínas BR2 no peixe-zebra é reduzida com relação à expressão e/ou atividade de uma ou
15 mais proteínas BR2 em um peixe-zebra do tipo selvagem. Em um outro aspecto, o agente é selecionado a partir de um anticorpo, um fragmento de anticorpo de união de antígeno, aptâmero e uma molécula pequena. Em um outro aspecto, o peixe-zebra é uma larva de peixe-zebra. Em um outro aspecto, a etapa de determinação compreende o exame microscópico da viabilidade
20 celular. Em um outro aspecto, a etapa de determinação compreende a determinação da ativação de caspase.

Em uma outra realização, é fornecido um método de identificação de agentes de início e/ou estímulo da apoptose, que compreende a administração de pelo menos um agente a um peixe-zebra e determinação se a
25 apoptose é iniciada ou aumentada. Em um aspecto, o método compreende adicionalmente a determinação da presença ou da quantidade de apoptose no peixe-zebra antes da administração do pelo menos um agente. Em um outro aspecto, o método compreende adicionalmente a prevenção e/ou redução da

apoptose no peixe-zebra antes da administração do pelo menos um agente. Em um outro aspecto, o agente inicia e/ou estimula a apoptose por meio do processo apoptótico intrínseco. Em um outro aspecto, o agente inicia e/ou estimula a apoptose por meio do processo apoptótico extrínseco. Em um outro
5 aspecto, a expressão e/ou atividade de uma ou mais proteínas BR2 no peixe-zebra é aumentada com relação à expressão ou atividade da uma ou mais proteínas BR2 em um peixe-zebra do tipo selvagem. Em um outro aspecto, uma ou mais proteínas B2R não são expressas no peixe-zebra. Em um outro aspecto, a expressão e/ou atividade de uma ou mais proteínas BR2 no peixe-
10 zebra é reduzida com relação à expressão e/ou atividade da uma ou mais proteínas BR2 em um peixe-zebra do tipo selvagem. Em um outro aspecto, o agente é selecionado a partir de um anticorpo, um fragmento de anticorpo de união de antígeno, aptâmero e uma molécula pequena. Em um outro aspecto, o peixe-zebra é uma larva de peixe-zebra. Em um outro aspecto, a etapa de
15 determinação compreende o exame microscópico da viabilidade celular. Em um outro aspecto, a etapa de determinação compreende a determinação da ativação de caspase.

Em certas realizações, a presente invenção fornece ainda métodos de identificação de agentes que modulam a apoptose. Em uma
20 realização, é fornecido um método de identificação de agentes de prevenção ou redução da apoptose, que compreende o contato de pelo menos um polipeptídeo codificado por uma seqüência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID N° 1, 5, 7 e 9 com o agente e determinação da capacidade do agente de bloquear ou reduzir a atividade do pelo menos um polipeptídeo. Em
25 uma outra realização, é fornecido um método de identificação de agentes de prevenção ou redução da apoptose, que compreende o contato de uma célula que compreende pelo menos um polinucleotídeo codificado por uma seqüência de nucleotídeos selecionada a partir de SEQ ID N° 2, 6, 8 e 10 com o agente e

determinação da capacidade do agente de evitar ou reduzir a expressão do pelo menos um polinucleotídeo.

Em uma outra realização, é fornecido um método de identificação de agentes de início ou estímulo da apoptose, que compreende o contato de
5 pelo menos um polipeptídeo codificado por uma seqüência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID Nº 1, 5, 7 e 9 com o agente e determinação da capacidade do agente de estimular ou aumentar a atividade do pelo menos um polipeptídeo. Em uma realização, é fornecido um método de identificação de
10 agentes de início ou estímulo da apoptose, que compreende o contato de uma célula que compreende pelo menos um polinucleotídeo codificado por uma seqüência de nucleotídeos selecionada a partir de SEQ ID Nº 2, 6, 8 e 10 com o agente e determinação da capacidade do agente de estimular ou aumentar a expressão do pelo menos um polinucleotídeo.

Em certas realizações, a presente invenção fornece métodos de
15 tratamento. Em uma realização, é fornecido um método de tratamento de disfunções relativas a apoptose, que compreende a administração a um paciente de pelo menos um polipeptídeo codificado por uma seqüência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID Nº 1, 5, 7 e 9. Em uma outra realização, é fornecido um método de tratamento de disfunções relativas a
20 apoptose, que compreende a administração a um paciente necessitado desse tratamento de uma quantidade eficaz de pelo menos um polipeptídeo codificado por uma seqüência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID Nº 1, 5, 7 e 9, por meio do quê a disfunção relativa a apoptose é tratada no paciente. Em uma outra realização, é fornecido um método de tratamento de
25 disfunções relativas a apoptose, que compreende a administração a um paciente de um agonista de pelo menos um polipeptídeo codificado por uma seqüência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID Nº 1, 5, 7 e 9. Em uma outra realização, é fornecido um método de tratamento de disfunções

relativas a apoptose, que compreende a administração a um paciente necessitado desse tratamento de uma quantidade eficaz de um agonista de pelo menos um polipeptídeo codificado por uma seqüência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID Nº 1, 5, 7 e 9, por meio do quê a disfunção

5 relativa a apoptose é tratada no paciente. Em uma outra realização, é fornecido um método de tratamento de disfunções relativas a apoptose, que compreende a administração a um paciente de um agonista de pelo menos um polipeptídeo codificado por uma seqüência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID Nº 1, 5, 7 e 9. Em uma outra realização, é fornecido um método de tratamento

10 de disfunções relativas a apoptose, que compreende a administração a um paciente necessitado desse tratamento de uma quantidade eficaz de um antagonista de pelo menos um polipeptídeo codificado por uma seqüência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID Nº 1, 5, 7 e 9, por meio do quê a disfunção relativa a apoptose é tratada no paciente. Em um outro aspecto, o

15 antagonista é selecionado a partir de um aptâmero, um anticorpo, um fragmento de anticorpo de união de antígeno e uma molécula pequena. Em um outro aspecto, a disfunção relativa a apoptose é selecionada a partir de uma disfunção proliferativa celular, uma disfunção de apoptose viral, uma disfunção autoimune, uma disfunção hematológica e uma disfunção neurológica. Em um

20 aspecto, a disfunção relativa a apoptose é câncer. Em uma outra realização, é fornecido um método de tratamento de disfunções relativas a apoptose, que compreende a administração a um paciente de pelo menos um polipeptídeo selecionado a partir do grupo de polipeptídeos codificados pelas seqüências de polinucleotídeos de SEQ ID Nº 2, 6, 8 e 10. Em um aspecto, a disfunção

25 relativa a apoptose é selecionada a partir de uma disfunção proliferativa celular, uma disfunção de apoptose viral, uma disfunção autoimune, uma disfunção hematológica e uma disfunção neurológica. Em um aspecto, a disfunção relativa a apoptose é câncer.

Em certas realizações, a presente invenção fornece composições de modulação de apoptose. Em uma realização, é fornecida uma composição de aumento da apoptose, que compreende um polipeptídeo codificado por uma seqüência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID Nº 1, 5, 7 e 9. Em 5 um aspecto, a composição compreende ainda um veículo farmacologicamente aceitável. Em uma outra realização, é fornecida uma composição de aumento da apoptose, que compreende um agonista de um polipeptídeo codificado por uma seqüência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID Nº 1, 5, 7 e 9. Em uma outra realização, é fornecida uma composição de redução ou 10 prevenção de apoptose, que compreende um antagonista de um ou mais dentre SEQ ID Nº 1, 5, 7 e 9. Em um aspecto, o antagonista é selecionado a partir de um anticorpo, um fragmento de anticorpo de união de antígeno, um aptâmero e uma molécula pequena. Em um outro aspecto, a composição compreende ainda um veículo farmacologicamente aceitável. Em uma outra 15 realização, é fornecida uma composição de redução ou prevenção de apoptose, que compreende um agente que reduz ou inibe a expressão de um ou mais dentre SEQ ID Nº 2, 6, 8 e 10. Em um aspecto, a composição compreende ainda um veículo farmacologicamente aceitável.

Em certas realizações, a presente invenção fornece métodos de 20 tratamento de uma disfunção relativa à apoptose em pacientes necessitados de tratamento, que compreende a administração de pelo menos uma das composições de acordo com a presente invenção. Em certas realizações, a presente invenção fornece métodos de tratamento de uma disfunção relativa à apoptose em pacientes necessitados de tratamento, que compreende a 25 administração de uma quantidade eficaz de pelo menos uma das composições de acordo com a presente invenção, por meio do quê a disfunção relativa à apoptose é tratada no paciente. Em certos aspectos, a disfunção relativa à apoptose é selecionada a partir de uma disfunção proliferativa celular, uma

disfunção de apoptose viral, uma disfunção autoimune, uma disfunção hematológica e uma disfunção neurológica.

Em certas realizações, a presente invenção fornece métodos de detecção da presença, severidade e/ou disposição prévia a uma disfunção relativa a apoptose em pacientes. Em uma realização, a presença de uma disfunção relativa a apoptose é detectada por meio da detecção da presença ou quantidade de um polipeptídeo ZPA em células do paciente. Em uma outra realização, a predisposição a uma disfunção relativa a apoptose é detectada por meio da detecção da presença ou quantidade de um polipeptídeo ZPA em células do paciente. Em uma outra realização, a severidade de uma disfunção relativa a apoptose é detectada por meio da detecção da presença ou quantidade de um polipeptídeo ZPA em células do paciente. Em uma outra realização, a presença de uma disfunção relativa a apoptose é detectada por meio da detecção da presença ou quantidade de um homólogo de polipeptídeo ZPA em células do paciente. Em uma outra realização, a predisposição a uma disfunção relativa a apoptose é detectada por meio de detecção da presença ou quantidade de um homólogo de polipeptídeo ZPA em células do paciente. Em uma outra realização, a severidade de uma disfunção relativa a apoptose é detectada por meio da detecção da presença ou quantidade de um homólogo de polipeptídeo ZPA em células do paciente. Em certos aspectos, a disfunção relativa a apoptose é selecionada a partir de uma disfunção proliferativa celular, uma disfunção de apoptose viral, uma disfunção autoimune, uma disfunção hematológica e uma disfunção neurológica.

Em uma outra realização, a presença de uma disfunção relativa a apoptose é detectada por meio da detecção da presença ou quantidade de expressão de um polinucleotídeo ZPA em células do paciente. Em uma outra realização, a predisposição a uma disfunção relativa a apoptose é detectada por meio da detecção da presença ou quantidade de expressão de um

polipeptídeo ZPA em células do paciente. Em uma outra realização, a severidade de uma disfunção relativa a apoptose é detectada por meio da detecção da presença ou quantidade de expressão de um polinucleotídeo ZPA em células do paciente. Em uma outra realização, a presença de uma

5 disfunção relativa a apoptose é detectada por meio da detecção da presença ou quantidade de expressão de um homólogo de polinucleotídeo ZPA em células do paciente. Em uma outra realização, a predisposição a uma disfunção relativa a apoptose é detectada por meio da detecção da presença ou quantidade de expressão de um homólogo de polinucleotídeo ZPA em células

10 do paciente. Em uma outra realização, a severidade de uma disfunção relativa a apoptose é detectada por meio da detecção da presença ou quantidade de expressão de um homólogo de polinucleotídeo ZPA em células do paciente. Em certos aspectos, a disfunção relativa a apoptose é selecionada a partir de uma disfunção proliferativa celular, uma disfunção de apoptose viral, uma disfunção

15 autoimune, uma disfunção hematológica e uma disfunção neurológica.

Em certas realizações, a presente invenção também fornece kits e artigos industrializados para os compostos e composições descritos no presente, em qualquer combinação útil. Em uma realização, é fornecido um kit que compreende uma ou mais das composições de acordo com a presente

20 invenção e instruções de uso. Em um aspecto, o uso é um uso terapêutico. Em um outro aspecto, o uso é um uso em diagnóstico. Em um outro aspecto, o uso é um uso em pesquisa. Em uma outra realização, é fornecido um kit que compreende um modelo de sistema de processo apoptótico intrínseco *in vitro* e suas instruções de uso. Em um aspecto, o uso é um uso em diagnóstico. Em

25 um outro aspecto, o uso é um uso em pesquisa. Em uma outra realização, é fornecido um kit que compreende um modelo de sistema de processo apoptótico intrínseco de peixe-zebra e suas instruções de uso. Em um aspecto, o uso é um uso em diagnóstico. Em um outro aspecto, o uso é um uso em

pesquisa. Em uma outra realização, a presente invenção fornece um artigo industrializado que compreende: (a) uma composição que compreende um ou mais polipeptídeos ZPA, agonistas e antagonistas; (b) um recipiente que contém a mencionada composição; e (c) um rótulo afixado ao recipiente ou
 5 uma bula incluída no recipiente que se refere ao uso da composição no tratamento de uma disfunção relativa à apoptose.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 exibe plotagens de reconvação de precisão para Modelos Markov Ocultos (HMM) construídas a partir de matrizes e padrões PROSITE, conforme descrito no Exemplo 1 (b). A precisão e a reconvação
 10 de padrões PROSITE são indicadas por losangos; as para HMMs derivados de padrões em várias avaliações são plotadas como linhas; e ampulhetas indicam a precisão e a reconvação dos limites de avaliações HMM utilizados no presente. A Figura 2 exibe um alinhamento dos domínios BH3 de proteínas
 15 relativas a Bcl-2 ("B2R") possíveis e conhecidas, conforme descrito no Exemplo 2. Aminoácidos com propriedades físico-químicas similares recebem sombras similares, de acordo com os padrões de coloração ClustalX comuns.

A Figura 3A ilustra um alinhamento de proteínas B2R de peixe-zebra possíveis e conhecidas com parceiros humanos (h), camundongos (m) e
 20 galinhas (gg), conforme descrito no Exemplo 2 (g). Proteínas pró-sobrevivência aparecem como as seções não sombreadas superior e intermediária; proteínas somente BH3 aparecem como a seção não sombreada mais ao fundo; e as seções sombreadas restantes são proteínas pró-apoptóticas com múltiplos domínios. A Figura 3B exibe um alinhamento dos domínios BH3 de proteínas
 25 somente BH3 de seres humanos, camundongos e peixe-zebra agrupados de acordo com o gene, conforme discutido no Exemplo 2. Aminoácidos com propriedades físico-químicas similares são sombreados de forma similar. As Figuras 3C e 3D ilustram os resultados de experimentos descritos no Exemplo

3 (a). A Figura 3C ilustra os resultados eletroforéticos de RT PCR específico de estágios, o que demonstra que a maior parte dos membros da família Bcl-2 de peixe-zebra foi expressa em níveis consistentes a partir da contribuição materna até 72 horas após a fertilização (hpf). A Figura 3D ilustra os resultados eletroforéticos de RT PCR específico de tecidos, demonstrando a expressão de muitos membros da família Bcl-2 de peixe-zebra em uma série de tecidos de peixe-zebra adulto.

As Figuras 4A e 4B ilustram gráficos que exibem os resultados da expressão de proteína B2R de peixe-zebra ectópico *in vivo*, conforme descrito no Exemplo 3 (b). Com a exceção de zBad, zBok1 e zBok2, a expressão ectópica de cada membro de família zBcl-2 pró-apoptótico induziu a morte de forma dependente da dosagem. A Figura 4C exibe imagens microscópicas em campo brilhante (painéis esquerdos) e mancha imunofluorescente para caspase-3 ativada (painéis direitos) em embriões de peixe-zebra que receberam injeção de proteínas B2R de peixe-zebra sintéticas ou um controle de proteína fluorescente verde (GFP), conforme descrito no Exemplo 3 (b). A Figura 4D exibe uma ilustração gráfica dos dados obtidos a partir de experimentos descritos no Exemplo 3 (c). O percentual de embriões sobreviventes é plotado para as combinações indicadas de proteínas B2R de peixe-zebra expressas de forma ectópica. O topo do gráfico exibe a quantidade total de embriões examinados para cada combinação.

As Figuras 5A a 5F ilustram os resultados de experimentos descritos no Exemplo 3 (d). A Figura 5A exibe imunomanchas para a atividade de caspase-3 em embriões de peixe-zebra não tratados (painéis esquerdos) ou que receberam irradiação gama (painéis direitos) que expressam ectopicamente uma das proteínas B2R pró-sobrevivência de peixe-zebra (zB1p1, zMcl-1a, zMcl-1b ou zB1p2) ou um controle (WT (sem injeção) ou GFP). A Figura 5B exibe imunomanchas para determinar a atividade de caspase 3 em

peixe-zebra não tratado (painéis esquerdos) ou que recebeu irradiação gama (painéis direitos) que recebeu injeção de morfolino até p53 ou um morfolino controle isoladamente ou em combinação com morfolinos até zBax ou zBak. A Figura 5C exibe um gráfico que quantifica a fluorescência de knockdowns simples e duplos de zBax e zBak. A Figura 5D exibe imunomanchas para determinar a atividade de caspase 3 em embriões de peixe-zebra não tratados (painéis esquerdos) ou que receberam irradiação gama (painéis direitos) que receberam injeção de morfolino controle ou de morfolino para uma proteína B2R somente BH3 de peixe-zebra (zBid, zBad1, zBmf1, zNoxa, zPuma ou zBik). A Figura 5E exibe imunomanchas para determinar a atividade de caspase 3 em peixe-zebra não tratado (painéis esquerdos) ou que recebeu irradiação gama (painéis direitos) que não recebeu injeção ou que recebeu injeção de morfolino controle ou morfolino contra p53. A Figura 5F ilustra graficamente os resultados de análise de PCR quantitativa do aumento na transcrição de zPuma ou zNoxa em embriões de peixe-zebra que receberam irradiação gama não tratados ou tratados com um morfolino controle ou p53.

A Figura 6A ilustra os resultados de experimentos descritos no Exemplo 3 (e). A Figura exibe um gráfico que ilustra o percentual de sobrevivência de embriões de peixe-zebra submetidos a knockdown de morfolino de zMcl-1a, zMcl-1b e/ou Blp2. As Figuras 6B e 6C ilustram os resultados de experimentos descritos no Exemplo 3 (f). As figuras exibem gráficos que ilustram o percentual de sobrevivência de embriões de peixe-zebra submetidos a knockdown morfolino de zMcl-1a e/ou zMcl-1b e apoptose induzida por Apo2L (seja com ortólogo DL1b de Apo2L de peixe-zebra ou com uma outra molécula relativa ao processo de Apo2L, tal como zDL1a, zDL2, zDL3, zTNF1, zTNF2 ou zFasL).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Os depositantes, utilizando métodos de pesquisa customizados,

identificaram cinco genes de peixe-zebra cuja relação com a família Bcl-2 de proteínas era anteriormente desconhecida, quatro dos quais representam membros da família Bcl-2 anteriormente não identificados no peixe-zebra: Bak, Bik, Puma e Bim. Os depositantes do presente também caracterizam pela primeira vez as atividades funcionais de certas proteínas relativas a Bcl-2 ("B2R") de peixe-zebra e demonstram a existência e o funcionamento do processo apoptótico intrínseco em peixe-zebra e a utilidade do peixe-zebra como modelo de sistema para o processo apoptótico intrínseco. A invenção dos depositantes permite a identificação de novos agentes e produtos terapêuticos para evitar, reduzir, iniciar e/ou estimular a apoptose e novos métodos de estudo do papel dos genes Bcl-2 e/ou o processo apoptótico intrínseco em disfunções relativas à apoptose. A invenção dos depositantes também fornece novos produtos terapêuticos e métodos de tratamento de doenças ou disfunções associadas a apoptose aberrante ou por ela causadas.

Conforme descrito no presente, SEQ ID N° 1, 3, 5, 7 e 9 (codificadas, respectivamente por SEQ ID N° 2, 4, 6, 8 e 10) são homólogas a certos membros humanos da família Bcl-2 de proteínas envolvidas no processo apoptótico intrínseco. SEQ ID N° 1 é uma proteína de peixe-zebra com identidade de sequência para Bak humano, uma proteína pró-apoptótica com múltiplos domínios. SEQ ID N° 3 é uma proteína de peixe-zebra com identidade de sequência para Bad humano, uma proteína pró-apoptótica somente BH3. SEQ ID N° 5 é uma proteína de peixe-zebra com identidade de sequência para Bik humano, uma proteína pró-apoptótica somente BH3. SEQ ID N° 7 é uma proteína de peixe-zebra com identidade de sequência para Puma humano, uma proteína pró-apoptótica somente BH3. SEQ ID N° 9 é uma proteína de peixe-zebra com identidade de sequência para Bmf, uma proteína pró-apoptótica somente BH3. Os depositantes também identificaram um homólogo de peixe-zebra de Bim humano, uma proteína pró-apoptótica somente BH3, mas,

conforme descrito no Exemplo 2 (d), o gene não poderá ser clonado devido a um erro aparente na construção atual do genoma de peixe-zebra.

SEQ ID N° 2, 6, 8 e 10 (que codificam as proteínas de SEQ ID N° 1, 5, 7 e 9) foram anteriormente identificadas como parte do projeto genoma de peixe-zebra mas, até o trabalho dos Depositantes, não haviam sido (1) identificadas como homólogos de codificação de membros da família Bcl-2 humana; ou (2) implicadas como membros de codificação de um ou mais processos de apoptose. Os depositantes identificaram SEQ ID N° 1, 5, 7 e 9 como homólogos de peixe-zebra de Bak, Bik, Puma e Bmf humano, respectivamente, conforme descrito no presente, por meio de identidade/similaridade de seqüências e por análise funcional.

A presente invenção fornece, portanto, em uma realização, proteínas selecionadas a partir de SEQ ID N° 1, 3, 5, 7 e 9, que são proteínas pró-apoptóticas somente BH3 ou com múltiplos domínios B2R de peixe-zebra, composições que as contêm e métodos de uso das proteínas e composições. A presente invenção também fornece, em uma outra realização, polinucleotídeos selecionados a partir de SEQ ID N° 2, 4, 6, 8 e 10, que codificam proteínas pró-apoptóticas somente BH3 ou com múltiplos domínios B2R de peixe-zebra, composições que as contêm e métodos de uso dos polinucleotídeos e composições. Em uma outra realização, são fornecidas variantes de proteínas que compreendem uma ou mais adições, exclusões ou mutações de aminoácidos de uma seqüência selecionada a partir de SEQ ID N° 1, 3, 5, 7 e 9. Em uma outra realização, são fornecidas variantes de polinucleotídeos que compreendem uma ou mais adições, exclusões ou mutações de nucleotídeos de uma seqüência selecionada a partir de SEQ ID N° 2, 4, 6, 8 e 10.

As proteínas, variantes de proteínas, ácidos nucleicos e variantes de ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção podem ser utilizadas para fins terapêuticos. Uma ou mais das proteínas ZPA ("pró-apoptose de

peixe-zebra”) de acordo com a presente invenção ou suas variantes podem ser utilizadas, por exemplo, como produto terapêutico para o tratamento de uma disfunção relativa a apoptose em que é desejável aumento da apoptose (tal como uma disfunção de proliferação celular). A presente invenção também fornece composições que compreendem uma ou mais proteínas ZPA de acordo com a presente invenção e um veículo farmaceuticamente aceitável, que inclui opcionalmente um ou mais agentes terapêuticos adicionais. Em uma outra realização, um ou mais dos ácidos nucleicos ZPA de acordo com a presente invenção ou suas variantes podem ser utilizados como um produto terapêutico para o tratamento de uma disfunção relativa a apoptose, no qual é desejável um aumento da apoptose, tal como por meio da expressão do ácido nucleico em pacientes necessitados desse tratamento, de tal forma que uma ou mais proteínas ZPA sejam expressas nas células dos pacientes. Ácidos nucleicos e proteínas de peixe-zebra podem ser preferidos para uso como produto terapêutico sobre quaisquer homólogos de mamíferos, por exemplo, devido ao menor risco de ativação de reações contrárias.

As proteínas ZPA de acordo com a presente invenção também encontram utilidade em métodos de identificação de agentes para iniciar, estimular, inibir ou bloquear a apoptose. Agonistas para uma ou mais proteínas ZPA podem ser identificados pela sua capacidade de iniciar ou estimular a atividade da uma ou mais proteínas ZPA no processo apoptótico intrínseco. Esse estímulo pode ser, por exemplo, por meio de ativação da proteína ZPA ou de interferência com uma ou mais moléculas que normalmente inibem a atividade de proteína ZPA e agonistas apropriados incluem, mas sem limitar-se a anticorpos e moléculas pequenas. Por outro lado, antagonistas para uma ou mais proteínas ZPA podem ser identificados pela sua capacidade de bloquear ou inibir a atividade da uma ou mais proteínas ZPA no processo apoptótico intrínseco. Esta inibição pode dar-se, por exemplo, pela prevenção da união de

proteínas ZPA a um ou mais ligantes ou alvos ou da prevenção da atividade da própria proteína ZPA e antagonistas apropriados incluem anticorpos e seus fragmentos de união de antígeno, aptâmeros e moléculas pequenas. Certos testes apropriados para medir a atividade de proteína ZPA no processo de apoptose intrínseca são descritos no presente. Os agonistas de proteína ZPA podem ser utilizados como produtos terapêuticos para o tratamento de uma disfunção relativa à apoptose em que é desejável maior apoptose e os antagonistas de proteína ZPA podem ser utilizados como produtos terapêuticos para o tratamento de uma disfunção relativa a apoptose em que é desejável redução da apoptose.

O processo apoptótico intrínseco reage a sinais intracelulares que dirigem a morte celular programada. A desregulação deste processo pode gerar apoptose inadequada ou falta inadequada de apoptose, qualquer dos quais pode resultar em disfunções tais como câncer. Desta forma, é necessário maior compreensão do processo apoptótico e modelos de sistemas em que a expressão e/ou atividade de um ou mais componentes de processos pode ser perturbada e as repercussões facilmente examinadas. Além da identificação e análise das proteínas ZPA descritas no presente, os Depositantes também demonstraram que existe um processo apoptótico intrínseco em peixe-zebra similar ao processo apoptótico intrínseco anteriormente caracterizado em mamíferos.

Desta forma, a presente invenção também fornece métodos de utilização do peixe-zebra como um modelo de sistema para o estudo de apoptose. Em algumas realizações, são fornecidos peixes-zebra transgênicos, em que a expressão e/ou atividade de uma ou mais proteínas ZPA é modulada com relação a um peixe-zebra do tipo selvagem. Esse peixe-zebra transgênico pode servir para elucidar a operação normal de processos de apoptose de peixe-zebra e também fornece uma ferramenta para uso na seleção de agentes que possuem atividade apoptótica agonista ou antagonista. Em outras

realizações, a presente invenção fornece peixe-zebra transgênico em que uma ou mais proteínas ZPA são substituídas com seus parceiros de outros organismos, de forma a criar um modelo de sistema para determinar se e até que grau cofatores, fatores ambientais ou modificações de seqüência e estrutura apresentam impacto sobre o funcionamento de um componente de processo apoptótico específico. Em algumas realizações, todas as proteínas de processos apoptóticos intrínsecos de peixe-zebra (ou seja, todas as proteínas B2R) são substituídas geneticamente por componentes de processos apoptóticos intrínsecos de um outro organismo (ou seja, mamíferos ou seres humanos). Esse peixe-zebra transgênico fornece uma ferramenta de estudo do processo apoptótico intrínseco que pode ser examinado e manipulado muito mais facilmente que poderia ser no outro organismo.

Em algumas realizações, pode ser útil examinar as interações bioquímicas entre membros de processo apoptótico intrínseco na ausência de outros processos de estímulos que poderão interferir com a análise. Desta forma, a presente invenção também fornece modelos de sistemas *in vitro*, por meio do quê o processo apoptótico intrínseco de peixe-zebra é reconstituído *in vitro*, opcionalmente com um ou mais cofatores, reagentes, inibidores e/ou estimulantes. Em um aspecto, o modelo de sistema *in vitro* compreende uma ou mais proteínas ZPA com atividade ou quantidade modificada. Em um outro aspecto, o modelo de sistema *in vitro* compreende uma ou mais proteínas B2R com atividade ou quantidade modificada. Em um outro aspecto, o modelo de sistema *in vitro* compreende uma ou mais variantes de proteína ZPA. Em um outro aspecto, o modelo de sistema *in vitro* compreende uma ou mais variantes de proteína B2R. Em um outro aspecto, o modelo de sistema *in vitro* não contém pelo menos uma proteína ZPA. Em um outro aspecto, o modelo de sistema *in vitro* não contém pelo menos uma proteína B2R. Em um outro aspecto, pelo menos uma proteína ZPA é substituída com uma proteína

correspondente de um outro organismo. Em um outro aspecto, pelo menos uma proteína B2R é substituída com uma proteína correspondente de um outro organismo.

As proteínas ZPA e ácidos nucleicos descritos no presente também encontram uso na detecção de uma disfunção relativa a apoptose em pacientes. Em uma realização, a presença de uma disfunção relativa a apoptose é detectada por meio da detecção da presença ou quantidade de um polipeptídeo ZPA ou homólogo de polipeptídeo ZPA em células do paciente. Em uma outra realização, a predisposição a uma disfunção relativa a apoptose é detectada por meio de detecção da presença ou quantidade de um polipeptídeo ZPA ou homólogo de polipeptídeo ZPA em células do paciente. Em uma outra realização, a severidade de uma disfunção relativa a apoptose é detectada por meio da detecção da presença ou quantidade de um polipeptídeo ZPA ou homólogo de polipeptídeo ZPA em células do paciente.

Em uma outra realização, a presença de uma disfunção relativa a apoptose é detectada por meio da detecção da presença ou quantidade de expressão de um polinucleotídeo ZPA ou um homólogo de polinucleotídeo ZPA em células do paciente. Em uma outra realização, a predisposição a uma disfunção relativa a apoptose é detectada por meio da detecção da presença ou quantidade de expressão de um polipeptídeo ZPA ou homólogo de polipeptídeo ZPA em células do paciente. Em uma outra realização, a severidade de uma disfunção relativa a apoptose é detectada por meio da detecção da presença ou quantidade de expressão de um polinucleotídeo ZPA ou um homólogo de polinucleotídeo ZPA em células do paciente.

A presente invenção também fornece kits e artigos industrializados para os compostos e composições descritos no presente, em qualquer combinação útil. É fornecido, por exemplo, um kit que compreende uma ou mais das composições de acordo com a presente invenção e

instruções de uso, tais como uso terapêutico, em diagnóstico e/ou pesquisa. Em um outro exemplo, é fornecido um kit que compreende um modelo de sistema de processo apoptótico intrínseco de peixe-zebra ou *in vitro* e instruções de uso em pesquisa ou seleção de agentes para modular a apoptose.

- 5 Detalhes destes métodos, composições, modelos de sistemas, kits e artigos industrializados são fornecidos no presente.

DEFINIÇÕES

As expressões “proteína relativa a Bcl-2”, “polipeptídeo relativo a Bcl-2” e “proteína B2R”, da forma utilizada no presente, incluem polipeptídeos de seqüência nativa, variantes de polipeptídeos e fragmentos de polipeptídeos de seqüência nativa e variantes de polipeptídeos (que são adicionalmente definidos no presente), a menos que especificado em contrário. Proteínas B2R podem ser obtidas de várias espécies, tais como seres humanos, utilizando anticorpos de acordo com a presente invenção ou por meio de métodos sintéticos ou recombinantes, que incluem o uso de moléculas de ácidos nucleicos depositadas. Em certas realizações, proteínas B2R são obtidas de peixe-zebra. Quando obtidas de peixe-zebra, proteínas B2R são denominadas “proteínas zB2R”. Proteínas B2R incluem, mas sem limitar-se a fatores de sobrevivência similares a Bcl-2 (que incluem, mas sem limitar-se a Bcl2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1, NR-13, BHRF1, LMW5-HL, ORF16, v-Bcl-2 (KSHV), E1B-19K, CED-9, Boo/DIVA/Bcl2-L-10, Bcl-B); fatores com múltiplos domínios pró-apoptóticos (que incluem, mas sem limitar-se a Bax, BpR, Bak, Bok/Mtd, Bcl-Rambo, Bcl-x_S e Bcl-G); e fatores somente BH3 pró-apoptóticos (que incluem, mas sem limitar-se a Bik/Nbk, Blk, Hrk/DP5, BNIP3, BimL/Bod, Bad, Bid, EGL-1, Noxa, PUMA/Bbc3, Bmf, Bnip1, Bnip2 e Bnip3). Proteínas zB2R incluem, mas sem limitar-se a fatores pró-sobrevivência (que incluem, mas sem limitar-se a zBip1, zBip2, zMcl-1a, zMcl-1b e zNR13); fatores com múltiplos domínios pró-apoptóticos (que incluem, mas sem limitar-se a zBak, zBax,

zBok1 e zBok2); e fatores somente BH3 pró-apoptóticos (que incluem, mas sem limitar-se a zBad1, zBad2, zBid, zBik, zBmf1, aBmf2, zNoxa, zPuma e zBim).

As expressões “proteína pró-apoptose de peixe-zebra”, “polipeptídeo pró-apoptose de peixe-zebra”, “proteína pró-apoptótica de peixe-zebra”, “polipeptídeo pró-apoptótico de peixe-zebra”, “polipeptídeo ZPA” e “proteína ZPA” são utilizadas de forma intercambiável no presente e incluem peptídeos de seqüências nativas, variantes de polipeptídeos e fragmentos de polipeptídeos de seqüência nativa e variantes de polipeptídeos (que são adicionalmente definidos no presente), a menos que especificado em contrário.

Proteínas ZPA podem ser obtidas de peixe-zebra, utilizando anticorpos de acordo com a presente invenção ou por meio de métodos sintéticos ou recombinantes, que incluem o uso de moléculas de ácidos nucleicos depositadas. Proteínas ZPA incluem as proteínas de peixe-zebra identificadas no presente, tal como zBak (SEQ ID N° 1), zBik (SEQ ID N° 5), zBim, zPuma (SEQ ID N° 7) e zBmf2 (SEQ ID N° 9).

As expressões “processo apoptótico intrínseco”, “processo de apoptose intrínseca” ou “processo intrínseco” são utilizadas de forma intercambiável no presente e designam um processo bioquímico celular que resulta na apoptose da célula que é iniciada de forma intracelular.

As expressões “processo apoptótico extrínseco”, “processo de apoptose extrínseca” ou “processo extrínseco” são utilizadas de forma intercambiável no presente e designam um processo bioquímico celular que resulta na apoptose da célula que é iniciada de forma extracelular.

Da forma utilizada no presente, a expressão “peixe-zebra” indica qualquer peixe ou linhagem de peixe que é considerada do gênero e espécie *Danio rerio*.

Um polipeptídeo de “seqüência nativa” ou “nativo” é aquele que contém a mesma seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo (por exemplo,

um anticorpo) derivado da natureza. Um polipeptídeo de “seqüência nativa” é aquele que contém a mesma seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo (por exemplo, um anticorpo) derivado da natureza. Esses polipeptídeos de seqüência nativa podem ser isolados da natureza ou podem ser produzidos por meios sintéticos ou recombinantes. Desta forma, um polipeptídeo de seqüência nativa pode conter a seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo humano de ocorrência natural, polipeptídeo de peixe-zebra ou polipeptídeo de qualquer outra espécie. Um polipeptídeo ZPA “de seqüência nativa” ou polipeptídeo ZPA “nativo” compreende um polipeptídeo que contém a mesma seqüência de aminoácidos do polipeptídeo ZPA correspondente derivado da natureza. Em uma realização, por exemplo, a seqüência de ácido nucleico que codifica uma seqüência nativa da proteína ZPA de peixe-zebra zPuma pode ser encontrada em SEQ ID Nº 8 e Exemplo 2 (e).

Esses polipeptídeos ZPA podem ser isolados da natureza ou podem ser produzidos por meios sintéticos ou recombinantes. A expressão proteína ou polipeptídeo ZPA “de seqüência nativa” ou “nativo” engloba especificamente formas secretadas ou truncadas de ocorrência natural da proteína ZPA, formas variantes de ocorrência natural (tais como formas alternativamente divididas) e variantes alélicas de ocorrência natural do polipeptídeo. Em certas realizações da presente invenção, os polipeptídeos ZPA de seqüência nativa descritos no presente são polipeptídeos de seqüência nativa maduros ou de comprimento total que compreendem as seqüências de aminoácidos de comprimento total exibidas no presente.

A localização aproximada dos “peptídeos de sinal” dos diversos polipeptídeos ZPA descritos no presente pode ser exibida no presente relatório descritivo e/ou nas figuras anexas. Também se reconhece que, em alguns casos, a divisão de uma seqüência de sinal de um polipeptídeo secretado não é totalmente uniforme, o que resulta em mais de uma substância secretada.

Estes polipeptídeos maduros, em que o peptídeo de sinal é dividido em não mais de cerca de cinco aminoácidos sobre cada lado da fronteira C-terminal do peptídeo de sinal conforme identificado no presente, e os polinucleotídeos que os codificam são contemplados pela presente invenção.

5 Uma “variante de polipeptídeo ZPA” ou “variante de proteína ZPA” indica polipeptídeo ZPA que possui pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência de aminoácidos com uma sequência de polipeptídeos ZPA de sequência nativa de comprimento total conforme descrito no presente ou qualquer fragmento de uma sequência de polipeptídeos ZPA de comprimento
10 total conforme descrito no presente (tal como os codificados por um ácido nucleico que representa apenas uma parte da sequência de codificação completa para um polipeptídeo ZPA de comprimento total). Essas variantes de polipeptídeos ZPA incluem, por exemplo, polipeptídeos ZPA em que são adicionados ou excluídos um ou mais resíduos de aminoácidos no terminal N
15 ou C da sequência de aminoácidos nativa de comprimento total. Normalmente, uma variante de polipeptídeo ZPA possuirá pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência de
20 aminoácidos para uma sequência de polipeptídeos ZPA de sequência nativa de comprimento total conforme descrito no presente ou qualquer outro fragmento especificamente definido de uma sequência de polipeptídeos ZPA de comprimento total conforme descrito no presente. Normalmente, polipeptídeos variantes ZPA possuem pelo menos cerca de dez aminoácidos de
25 comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 ou 210 aminoácidos de comprimento ou mais. Opcionalmente, os polipeptídeos variantes ZPA possuirão não mais de uma substituição de aminoácido conservadora em

comparação com a seqüência de polipeptídeos ZPA nativa, alternativamente não mais de duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove ou dez substituições de aminoácidos conservadoras em comparação com a seqüência de polipeptídeos ZPA nativa.

5 “Percentual (%) de identidade de seqüência de aminoácidos”, com relação às seqüências de polipeptídeos ZPA identificadas no presente, é definido como o percentual de resíduos de aminoácidos em uma possível seqüência que são idênticos aos resíduos de aminoácidos no polipeptídeo ZPA específico, após o alinhamento das seqüências e introdução de intervalos, se
10 necessário, para atingir o percentual máximo de identidade de seqüências, sem considerar nenhuma substituição conservadora como parte da identidade de seqüências. O alinhamento para propósitos de determinação do percentual de identidade de seqüências de aminoácidos pode ser atingido de várias formas que se encontram dentro do conhecimento da técnica, utilizando, por exemplo,
15 software de computador disponível ao público, tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN ou Megalign (DNASTAR). Os técnicos no assunto podem determinar parâmetros apropriados para medir o alinhamento, incluindo quaisquer algoritmos necessários para atingir o alinhamento máximo ao longo do comprimento total das seqüências sendo comparadas. Para os propósitos
20 do presente, entretanto, valores percentuais de identidade de seqüência de aminoácidos são gerados utilizando o programa de computador de comparação de seqüências ALIGN-2. O programa de computador de comparação de seqüências ALIGN-2 foi elaborado pela Genentech, Inc. e o código fonte foi depositado com documentação de usuário no Escritório Norte-Americano de
25 Direitos Autorais, Washington DC 20559, onde foi registrado com o nº de Registro de Direitos Autorais Norte-Americano TXU510087. O programa ALIGN-2 é disponível ao público por meio da Genentech, Inc., South San Francisco, Califórnia, ou pode ser compilado a partir do código fonte disponível

ao público. O programa ALIGN-2 deverá ser compilado para uso em um sistema operativo UNIX, preferencialmente UNIX digital V4.0D. Todos os parâmetros de comparação de seqüências são estabelecidos pelo programa ALIGN-2 e não variam.

- 5 Em situações em que ALIGN-2 é empregado para comparações de seqüências de aminoácidos, o percentual de identidade de seqüências de aminoácidos de uma dada seqüência de aminoácidos A para, com ou contra uma dada seqüência de aminoácidos B (que pode ser alternativamente expressa como uma dada seqüência de aminoácidos A que possui ou
- 10 compreende um certo percentual de identidade de seqüências de aminoácidos para, com ou contra uma dada seqüência de aminoácidos B) é calculado conforme segue:

100 vezes a fração X/Y

- em que X é a quantidade de resíduos de aminoácidos avaliados
- 15 como coincidências idênticas pelo programa de alinhamento de seqüências ALIGN-2 no alinhamento de A e B naquele programa e em que Y é a quantidade total de resíduos de aminoácidos em B. Apreciar-se-á que, quando o comprimento da seqüência de aminoácidos A não for igual ao comprimento da seqüência de aminoácidos B, o percentual de identidade de seqüências de
- 20 aminoácidos entre A e B não será igual ao percentual de identidade de seqüências de aminoácidos entre B e A. A menos que indicado especificamente em contrário, todos os valores percentuais de identidade de seqüências de aminoácidos utilizados no presente são obtidos conforme descrito no parágrafo imediatamente anterior, utilizando o programa de
- 25 computador ALIGN-2.

Da forma utilizada no presente, "sintenia conservada" designa evidência que o local humano evoluído a partir do local de peixe-zebra, tal como genes vizinhos similares sobre um ou os dois lados de um gene ZPA e

um gene humano ao qual se acredita que o gene ZPA seja homólogo.

“Polinucleotídeo variante ZPA” ou “seqüência de ácido nucleico variante ZPA” indica uma molécula de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo ZPA, preferencialmente um polipeptídeo ZPA ativo, conforme
5 definido no presente, que possui pelo menos cerca de 80% de identidade de seqüência de ácido nucleico com uma seqüência de ácido nucleico que codifica uma seqüência de polipeptídeos ZPA de seqüência nativa e comprimento total conforme descrito no presente ou qualquer fragmento de seqüência de polipeptídeos ZPA de comprimento total conforme descrito no presente.

10 Normalmente, um polinucleotídeo variante ZPA possuirá pelo menos cerca de 80% de identidade de seqüência de ácidos nucleicos, alternativamente pelo menos cerca de 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de seqüência de ácidos nucleicos para uma seqüência de ácidos nucleicos que codifica uma
15 seqüência de polipeptídeos ZPA de seqüência nativa e comprimento total conforme descrito no presente ou qualquer fragmento de uma seqüência de polipeptídeos ZPA de comprimento total conforme descrito no presente. As variantes não englobam a seqüência de nucleotídeos nativa.

Normalmente, polinucleotídeos variantes possuem pelo menos de
20 cerca de cinco nucleotídeos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15; 16, 17, 18, 19, 20; 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40; 45, 50, 55, 60; 65, 70, 75, 80; 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120; 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160; 165, 170, 175, 180; 185, 190, 195, 200; 210, 220, 230, 240, 250; 260, 270, 280, 290, 300; 310, 320, 330,
25 340, 350; 360, 370, 380, 390, 400; 410, 420, 430, 440, 450; 460, 470, 480, 490, 500; 510, 520, 530, 540, 550; 560, 570, 580, 590, 600; 610, 620 ou 625 nucleotídeos de comprimento, em que, neste contexto, a expressão “cerca de” indica o comprimento de seqüência de nucleotídeos de referência mais ou

menos 10% daquele comprimento indicado.

“Percentual (%) de identidade de seqüência de ácidos nucleicos”, com relação às seqüências de ácidos nucleicos codificadoras de ZPA identificadas no presente, é definido como o percentual de nucleotídeos em uma possível seqüência que são idênticos aos nucleotídeos na seqüência de ácidos nucleicos de ZPA de interesse, após o alinhamento das seqüências e introdução de intervalos, se necessário, para atingir o percentual máximo de identidade de seqüências. O alinhamento para propósitos de determinação do percentual de identidade de seqüências de ácido nucleico pode ser atingido de várias formas que se encontram dentro do conhecimento da técnica, utilizando, por exemplo, software de computador disponível ao público, tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN ou Megalign (DNASTAR). Para os propósitos do presente, entretanto, valores de identidade de seqüência de ácidos nucleicos são gerados utilizando o programa de computador de comparação de seqüências ALIGN-2. O programa de computador de comparação de seqüências ALIGN-2 foi elaborado pela Genentech, Inc. e o código fonte foi depositado com documentação de usuário no Escritório Norte-Americano de Direitos Autorais, Washington DC 20559, onde foi registrado com o nº de Registro de Direitos Autorais Norte-Americano TXU510087. O programa ALIGN-2 é disponível ao público por meio da Genentech, Inc., South San Francisco, Califórnia, ou pode ser compilado a partir do código fonte disponível ao público. O programa ALIGN-2 deverá ser compilado para uso em um sistema operativo UNIX, preferencialmente UNIX digital V4.0D. Todos os parâmetros de comparação de seqüências são estabelecidos pelo programa ALIGN-2 e não variam.

Em situações em que ALIGN-2 é empregado para comparações de seqüências de ácidos nucleicos, o percentual de identidade de seqüências de ácidos nucleicos de uma dada seqüência de ácidos nucleicos C para, com

ou contra uma dada seqüência de ácidos nucleicos D (que pode ser
alternativamente expressa como uma dada seqüência de ácidos nucleicos C
que possui ou compreende um certo percentual de identidade de seqüências
de ácidos nucleicos para, com ou contra uma dada seqüência de ácidos
5 nucleicos D) é calculado conforme segue:

100 vezes a fração W/Z

em que W é a quantidade de nucleotídeos avaliados como
coincidências idênticas pelo programa de alinhamento de seqüências ALIGN-2
no alinhamento de C e D naquele programa e em que Z é a quantidade total de
10 nucleotídeos em D. Apreciar-se-á que, quando o comprimento da seqüência de
ácidos nucleicos C não for igual ao comprimento da seqüência de ácidos
nucleicos D, o percentual de identidade de seqüências de ácidos nucleicos de
C para D não será igual ao percentual de identidade de seqüências de ácidos
nucleicos de D para C. A menos que indicado especificamente em contrário,
15 todos os valores percentuais de identidade de seqüências de ácidos nucleicos
utilizados no presente são obtidos conforme descrito no parágrafo
imediatamente anterior, utilizando o programa de computador ALIGN-2.

Em outras realizações, polinucleotídeos variantes de ZPA são
moléculas de ácido nucleico que codificam um polipeptídeo ZPA e que são
20 capazes de hibridização, tal como sob condições de lavagem e hibridização
estringentes, em seqüências de nucleotídeos que codificam um polipeptídeo
ZPA de comprimento total conforme descrito no presente. Polipeptídeos
variantes de ZPA podem ser aqueles que são codificados por um
polinucleotídeo variante de ZPA.

25 A expressão “região de codificação de comprimento total”, da
forma utilizada com referência a um ácido nucleico que codifica um
polipeptídeo ZPA, designa a seqüência de nucleotídeos que codificam o
polipeptídeo ZPA de comprimento total de acordo com a presente invenção

(que freqüentemente é exibida entre códons de início e de parada, inclusive, no presente).

“Isolado”, quando utilizado para descrever os vários polipeptídeos ZPA descritos no presente, indica um polipeptídeo que foi identificado e separado e/ou recuperado a partir de um componente do seu ambiente natural. Os componentes contaminantes do seu ambiente natural são materiais que tipicamente interfeririam com utilizações diagnósticas ou terapêuticas para o polipeptídeo e podem incluir enzimas, hormônios e outros solutos proteínicos ou não proteínicos. Em certas realizações, o polipeptídeo será purificado (1) até um grau suficiente para a obtenção de pelo menos quinze resíduos de seqüência de aminoácidos interna ou N-terminal, utilizando um seqüenciador de xícaras de centrifugação; ou (2) até a homogeneidade, por meio de SDS-PAGE, sob condições redutoras ou não redutoras, utilizando azul de Coomassie e/ou manchas de prata. Um polipeptídeo isolado inclui polipeptídeo *in situ* em células recombinantes, já que pelo menos um componente do ambiente natural do polipeptídeo ZPA não estará presente. Normalmente, entretanto, o polipeptídeo isolado será preparado por meio de pelo menos uma etapa de purificação.

Um ácido nucleico codificador de polipeptídeo ZPA “isolado” ou outro ácido nucleico codificador de polipeptídeo é uma molécula de ácido nucleico que é identificada e separada de pelo menos uma molécula de ácido nucleico contaminante com a qual normalmente é associada na fonte natural do ácido nucleico codificador de polipeptídeo. Uma molécula de ácido nucleico codificadora de polipeptídeo isolada é diferente na forma ou ambiente em que é encontrada na natureza. As moléculas de ácido nucleico codificadoras de polipeptídeos isoladas são diferenciadas, portanto, da molécula de ácido nucleico codificadora de polipeptídeo específica que existe em células naturais. Uma molécula de ácido nucleico codificadora de polipeptídeo isolada inclui,

entretanto, moléculas de ácido nucleico codificadoras de polipeptídeo contidas em células que normalmente expressam o polipeptídeo no qual, por exemplo, a molécula de ácido nucleico encontra-se em um local cromossômico diferente de células naturais.

5 A expressão “seqüências de controle” designa seqüências de DNA necessárias para a expressão de uma seqüência de codificação ligada operativamente em um organismo hospedeiro específico. As seqüências de controle que são apropriadas para procariotes, por exemplo, incluem uma seqüência promotora, opcionalmente uma seqüência operadora, e um local de
10 união de ribossomos. As células eucarióticas são conhecidas por utilizarem promotores, sinais de poliadenilação e amplificadores.

 Ácido nucleico é “ligado operativamente” quando é colocado em relação funcional com uma outra seqüência de ácido nucleico. DNA para uma seqüência prévia ou líder de secreção, por exemplo, é ligado operativamente a
15 DNA para um polipeptídeo caso seja expresso na forma de proteína prévia que participa da secreção do polipeptídeo; um promotor ou amplificador é ligado operativamente a uma seqüência de codificação caso afete a transcrição da seqüência; ou um local de união de ribossomos é ligado operativamente a uma seqüência de codificação caso seja posicionado de forma a possibilitar a
20 tradução. Geralmente, “ligado operativamente” indica que as seqüências de DNA que são ligadas são contíguas e, no caso de líder de secreção, contíguas e em fase de leitura. Os aprimoradores, entretanto, não necessitam ser contíguos. A ligação é obtida por meio de ligação em locais de restrição convenientes. Caso estes locais não existam, os adaptadores de
25 oligonucleotídeos sintéticos ou ligantes são utilizados de acordo com a prática convencional.

 A “estringência” das reações de hibridização pode ser facilmente determinada pelos técnicos comuns no assunto e geralmente é um cálculo

empírico dependente do comprimento da sonda, temperatura de lavagem e concentração de sal. De forma geral, sondas mais compridas necessitam de temperaturas mais altas para combinação apropriada, enquanto sondas mais curtas necessitam de temperaturas mais baixas. A hibridização geralmente depende da capacidade de recombinação de DNA desnaturado quando linhagens complementares estiverem presentes em um ambiente abaixo da sua temperatura de fusão. Quanto mais alto o grau de homologia desejado entre a sonda e a seqüência hibridizável, mais alta a temperatura correspondente que pode ser utilizada. Como resultado, segue-se que temperaturas correspondentes mais altas tenderiam a tornar as condições de reação mais estridentes, enquanto temperaturas mais baixas o fazem em menor proporção. Para detalhes adicionais e explicações sobre a estridência das reações de hibridização, vide Ausubel et al, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers (1995).

“Condições estridentes” ou “condições de alta estridência”, da forma definida no presente, podem ser identificadas por aquelas que: (1) empregam baixa resistência iônica e alta temperatura para lavagem, tal como 0,015 M de cloreto de sódio/0,0015 M de citrato de sódio/0,1% de dodecil sulfato de sódio a 50 °C; (2) empregam durante a hibridização um agente desnaturante, tal como formamida, por exemplo 50% (v/v) formamida com albumina de soro bovino a 0,1%/0,1% Ficoll/0,1% polivinilpirrolidona/50 mM de tampão fosfato de sódio sob pH 6,5 com 750 mM de cloreto de sódio, 75 mM de citrato de sódio a 42 °C; ou (3) hibridização por uma noite em uma solução que emprega 50% formamida, 5 x SSC (0,75 M de NaCl, 0,075 M de citrato de sódio), 50 mM de fosfato de sódio (pH 6,8), 0,1% pirofosfato de sódio, 5 x solução de Denhardt, DNA de esperma de salmão sonificado (50 µg/ml), 0,1% SDS e 10% sulfato de dextran a 42 °C, com lavagem por dez minutos a 42 °C em 0,2 x SSC (cloreto de sódio/citrato de sódio), seguidos por lavagem em alta

estringência por dez minutos que consiste de 0,1 x SSC contendo EDTA a 55 °C.

“Condições moderadamente estringentes” podem ser identificadas conforme descrito por Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Nova Iorque: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluem o uso de solução de lavagem e condições de hibridização (tais como temperatura, resistência iônica e % SDS) menos estringentes que as descritas acima. Um exemplo de condições moderadamente estringentes é a incubação por uma noite a 37 °C em uma solução que compreende: 20% formamida, 5 x SSC (150 mM de NaCl, 15 mM de citrato trissódico), 50 mM de fosfato de sódio (pH 7,6), 5 x solução de Denhardt, 10% sulfato de dextran e 20 mg/ml de DNA de espermatozóide de salmão dividido desnaturado, seguido por lavagem dos filtros em 1 x SSC a cerca de 37-50 °C. Os técnicos no assunto reconhecerão como ajustar a temperatura, resistência iônica etc. conforme o necessário para acomodar fatores tais como comprimento de sonda e similares.

A expressão “marcado por epítipo” utilizada no presente designa um polipeptídeo quimérico que compreende um polipeptídeo ZPA ou anticorpo anti-ZPA fundido a um “polipeptídeo de marca”. O polipeptídeo de marca contém resíduos suficientes para fornecer um epítipo contra o qual pode ser fabricado um anticorpo, mas ainda é suficientemente curto para não interferir com a atividade do polipeptídeo ao qual é fundido. Em certas realizações, o polipeptídeo de marca também é razoavelmente exclusivo, de forma que o anticorpo não apresente reação cruzada substancial com outros epítipos. Os polipeptídeos de marca apropriados contêm pelo menos seis resíduos de aminoácidos e, normalmente, cerca de oito a cinquenta resíduos de aminoácidos (em certas realizações, cerca de dez a vinte resíduos de aminoácidos). São contemplados polipeptídeos e anticorpos de acordo com a presente invenção que são marcados por epítipos.

“Biologicamente ativo”, “atividade biológica” e “características biológicas” com relação a um polipeptídeo ZPA indica (1) que possui a capacidade de iniciar ou estimular a apoptose *in vivo* ou *ex vivo*; (2) que possui a capacidade de unir-se especificamente a um membro acima e/ou abaixo no
5 fluxo do processo apoptótico intrínseco; e/ou (3) que possui a capacidade de modular de outra forma a sinalização de ZPA ou atividade de ZPA, exceto quando especificado em contrário.

“Biologicamente ativo”, “atividade biológica” e “características biológicas” com relação a um polipeptídeo ZPA indica (1) que possui a
10 capacidade de iniciar ou estimular a apoptose *in vivo* ou *ex vivo*; (2) que possui a capacidade de unir-se especificamente a um membro acima e/ou abaixo no fluxo do processo apoptótico intrínseco; e/ou (3) que possui a capacidade de modular de outra forma a sinalização de ZPA ou atividade de ZPA, exceto quando especificado em contrário.

15 “Biologicamente ativo”, “atividade biológica” e “características biológicas” com relação a um anticorpo anti-ZPA de acordo com a presente invenção indica (1) possuir a capacidade de bloquear, inibir ou neutralizar parcial ou totalmente uma atividade biológica de um polipeptídeo ZPA nativo (seja de forma antagonista ou bloqueadora); (2) possuir a capacidade de unir
20 especificamente um polipeptídeo ZPA; e/ou (3) possuir a capacidade de modular a sinalização de ZPA ou atividade de ZPA, exceto quando especificado em contrário. Em uma realização, um anticorpo de acordo com a presente invenção une-se a uma proteína ZPA com uma afinidade de pelo menos 1 μ M ou menos, 100 nm ou menos, 50 nm ou menos, 10 nm ou menos,
25 5 nM ou menos, 1 nm ou menos. Da forma utilizada no presente, “domínio variável de anticorpos” designa as partes das cadeias leve e pesada de moléculas de anticorpos que incluem seqüências de aminoácidos de Regiões Determinantes de Complementaridade (CDRs; ou seja, CDR1, CDR2 e CDR3)

e Regiões de Estrutura (FRs). V_H designa o domínio variável da cadeia pesada. V_L designa o domínio variável da cadeia leve. Segundo os métodos utilizados na presente invenção, as posições de aminoácidos atribuídas a CDRs e FRs são definidas conforme Kabat (*Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda MD, 1987 e 1991)). A numeração de aminoácidos de anticorpos ou fragmentos de união de antígenos também é de acordo com a de Kabat.

Da forma utilizada no presente, “conjunto de códons” indica um conjunto de diferentes seqüências de trios de nucleotídeos utilizadas para codificar aminoácidos variantes desejados. Um conjunto de oligonucleotídeos pode ser sintetizado, por exemplo, por meio de síntese de fase sólida, que contém seqüências que representam todas as combinações possíveis de trios de nucleotídeos fornecidos pelo conjunto de códons e que codificarão o grupo desejado de aminoácidos. Uma forma padrão de designação de códons é a do código IUB, que é conhecido na técnica e descrito no presente.

“DNA heterólogo” é qualquer DNA que é introduzido em uma célula hospedeira. O DNA pode ser derivado de uma série de fontes, que incluem DNA genômico, cDNA, DNA sintético e suas fusões ou combinações. O DNA pode incluir DNA da mesma célula ou tipo de célula como a célula hospedeira ou receptora ou DNA de um tipo diferente de célula, tal como de um mamífero ou planta. O DNA pode incluir opcionalmente genes marcadores ou de seleção, tais como genes de resistência a antibióticos, genes de resistência à temperatura etc. Células hospedeiras que codificam DNAs heterólogos que compreendem os polipeptídeos e anticorpos de acordo com a presente invenção são contempladas, bem como o seu uso.

Da forma utilizada no presente, “biblioteca” designa uma série de polipeptídeos (tais como seqüências de anticorpos ou fragmentos de anticorpos) ou os ácidos nucleicos que codificam essas seqüências, em que as

seqüências são diferentes na combinação de aminoácidos variantes que são introduzidos nessas seqüências segundo os métodos de acordo com a presente invenção.

“Exibição de fagos” é um método por meio do qual polipeptídeos variantes são exibidos na forma de proteínas de fusão para uma proteína de revestimento sobre a superfície de partículas de fago, tais como partículas de fago filamentosos. Uma utilidade de exibição de fagos reside no fato de que grandes bibliotecas de variantes de proteínas aleatorizadas podem ser ordenadas rápida e eficientemente para as seqüências que se unem a uma molécula alvo com alta afinidade. A exibição de bibliotecas de proteínas e peptídeos sobre fago vem sendo utilizada para selecionar milhões de polipeptídeos em busca dos que possuem propriedades de união específicas. Métodos de exibição de fagos polivalentes vêm sendo utilizados para exibir pequenos peptídeos aleatórios e proteínas pequenas por meio de fusões ao gene III ou gene VII de fago filamentosos. Wells e Lowman, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 3: 355-362 (1992) e referências ali mencionadas. Em uma exibição de fagos monovalentes, uma biblioteca de peptídeos ou proteínas é fundida a um gene III ou uma de suas partes e expressa em baixos níveis na presença de proteína de gene III do tipo selvagem, de forma que as partículas de fagos exibam uma ou nenhuma cópia das proteínas de fusão. Os efeitos da avidéz são reduzidos com relação a fago polivalente, de tal forma que a seleção seja realizada com base na afinidade de ligantes intrínsecos e são utilizados vetores de fagomídeos, que simplificam manipulações de DNA. Lowman e Wells, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 3: 205-0216 (1991).

Um “fagomídeo” é um vetor de plasmídeo que possui uma origem de reprodução bacteriana, tal como Co1E1, e uma cópia de uma região intergênica de um bacteriófago. O fagomídeo pode ser utilizado sobre qualquer bacteriófago conhecido, incluindo bacteriófago filamentosos e bacteriófago

lambdóide. O plasmídeo também conterá geralmente um marcador selecionável para resistência a antibióticos. Segmentos de DNA clonados nesses vetores podem ser propagados na forma de plasmídeos. Quando células que abrigam estes vetores possuírem todos os genes necessários para a produção de partículas de fagos, o modo de reprodução do plasmídeo altera-se para reprodução de círculo rolante para gerar cópias de uma fita do DNA de plastídeo e partículas de fagos de pacotes. O fagomídeo pode formar partículas de fagos infecciosas ou não infecciosas. Este termo inclui fagomídeos que contêm um gene de proteína de revestimento de fago ou seu fragmento ligado a um gene de polipeptídeo heterólogo como uma fusão de gene, de tal forma que o polipeptídeo heterólogo seja exibido sobre a superfície da partícula de fago.

A expressão “vetor de fago” indica uma forma reprodutiva de fita dupla de um bacteriófago que contém um gene heterólogo e capaz de reprodução. O vetor de fago possui uma origem de reprodução de fago que permite a reprodução de fagos e a formação de partículas de fago. O fago pode ser um bacteriófago filamentosos, tal como um fago M13, f1, fd, Pf3 ou um de seus derivados, ou um fago lambdóide, tal como lambda, 21, phi80, phi81, 82, 424, 434 etc. ou um de seus derivados.

O termo “proteoglicano” designa uma molécula em que pelo menos uma cadeia lateral de glicosaminoglicano é ligada covalentemente ao núcleo de proteína da molécula. Uma linhagem celular com deficiência na síntese de proteoglicano de acordo com a presente invenção inclui uma linhagem celular que possui deficiência em galactosiltransferase I. Segundo uma realização, a linhagem celular é uma linhagem celular de CHO-psbg.

O termo “antagonista” é qualquer molécula que bloqueia, inibe ou neutraliza parcial ou completamente a atividade biológica de um polipeptídeo ZPA nativo e que se une especificamente a um polipeptídeo ZPA nativo. Segundo uma realização, o antagonista é um polipeptídeo. Segundo uma outra

realização, um anticorpo de acordo com a presente invenção pode inibir a união do antagonista ao polipeptídeo ZPA nativo.

A expressão “antagonista de moléculas pequenas” designa qualquer molécula em que o peso molecular é de 1500 daltons ou menos e é um antagonista de acordo com a presente invenção. Segundo uma realização, o antagonista de moléculas pequenas está abaixo de cerca de 500 Daltons.

Segundo uma realização, o antagonista bloqueia, inibe, reduz ou neutraliza a apoptose em células que expressam pelo menos um polipeptídeo ZPA nativo. Antagonistas apropriados incluem anticorpos, fragmentos de anticorpos de união de antígenos, variantes de seqüências de aminoácidos de polipeptídeos ZPA, peptídeos de acordo com a presente invenção, aptâmeros etc. Métodos de identificação de antagonistas de um polipeptídeo ZPA podem compreender o contato de um polipeptídeo ZPA com uma possível molécula antagonista e a medição de uma alteração detectável em uma ou mais atividades biológicas associadas ao polipeptídeo ZPA.

O termo “aptâmero” designa uma molécula de ácido nucleico que é capaz de unir-se a uma molécula alvo, tal como um polipeptídeo ZPA. A geração e o uso terapêutico de aptâmeros são bem estabelecidos na técnica. Vide, por exemplo, a Patente Norte-Americana nº 5.475.096 e a eficácia terapêutica de Macugen® (Eyetechnology, Nova Iorque) para o tratamento de degeneração macular relativa à idade.

Os termos “potencializador” e “agonista” designam qualquer molécula que aumente a atividade biológica de um polipeptídeo ZPA nativo, em que o potencializador inicia e/ou estimula a apoptose. Em uma realização, um agonista une-se especificamente a um polipeptídeo ZPA nativo e aumenta a atividade biológica daquele polipeptídeo ZPA nativo. Em uma outra realização, um agonista estimula a transcrição e/ou a tradução de um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo ZPA nativo de forma a aumentar a expressão do

polipeptídeo ZPA nativo. Em uma outra realização, um agonista inibe o funcionamento normal de um inibidor de um polipeptídeo ZAP nativo. Compreende-se que as realizações acima não são mutuamente exclusivas, de tal forma que um agonista pode, por exemplo, unir-se especificamente a um polipeptídeo ZPA nativo e aumentar uma atividade biológica daquele polipeptídeo ZPA nativo ao mesmo tempo em que também inibe o funcionamento normal de um inibidor de um polipeptídeo ZPA nativo. Métodos de identificação de agonistas de um polipeptídeo ZPA podem compreender o contato de uma molécula que une ZPA com um polipeptídeo ZPA e o possível agonista e medir uma alteração detectável em uma ou mais atividades biológicas associadas ao polipeptídeo ZPA (tais como aumento da ativação de caspase ou aumento da taxa ou quantidade de apoptose).

“Tratar, “tratamento” ou “melhoria” designa o tratamento terapêutico e medidas profiláticas ou preventivas, em que o objeto é o de evitar ou reduzir a velocidade da condição ou disfunção patológica desejada (diminuir). Os necessitados de tratamento incluem os que já possuem a disfunção, bem como os propensos a ter a disfunção ou aqueles em que a disfunção deva ser evitada. Estas expressões indicam que os usos terapêuticos e profiláticos do presente são bem sucedidos caso melhorem, diminuam ou reduzam os sintomas, complicações ou outros problemas associados a uma doença ou melhorem, diminuam ou reduzam a possibilidade de início ou freqüência dos sintomas, complicações ou outros problemas associados a uma doença.

Um paciente ou mamífero é “tratado” com sucesso de um câncer se, após receber uma quantidade terapêutica de um antagonista segundo os métodos de acordo com a presente invenção, o paciente exibir redução notável e/ou mensurável em um ou mais dos seguintes, ou na sua ausência: redução da quantidade de células cancerosas ou ausência das células cancerosas,

redução do tamanho do tumor, inibição (ou seja, redução da velocidade até certo ponto e, preferencialmente, suspensão) da infiltração de células cancerosas em órgãos periféricos, incluindo a difusão de câncer em tecido mole e ossos; inibição (ou seja, redução até certo ponto e, preferencialmente, suspensão) da metástase tumoral; inibição, até certo ponto, do crescimento de tumores; e/ou melhoria, até certo ponto, de um ou mais dos sintomas associados ao câncer específico, redução da morbidez e mortalidade e melhoria de questões de qualidade de vida. Desde que possa evitar o crescimento de células cancerosas existentes e/ou matá-las, um anticorpo anti-ZPA ou oligopeptídeo de união de ZPA pode ser citostático e/ou citotóxico. A redução desses sinais ou sintomas pode também ser sentida pelo paciente.

Um paciente ou mamífero é “tratado” com sucesso para uma disfunção relativa à apoptose se, após receber uma quantidade terapêutica de um antagonista ou agonista segundo os métodos de acordo com a presente invenção, o paciente exibir modulação observável e/ou mensurável de apoptose e/ou alívio até certo ponto de um ou mais dos sintomas associados à apoptose aberrante; e melhoria em questões de qualidade de vida.

Os parâmetros acima para a determinação do tratamento bem sucedido e melhoria da doença são facilmente mensuráveis por meio de procedimentos familiares dos médicos. Para a terapia de câncer, pode-se medir a eficácia determinando-se, por exemplo, o tempo para o progresso da doença (TTP) e/ou determinando-se a velocidade de reação (RR). Pode-se determinar a metástase por meio de testes de estágio, varrimento de ossos e testes para a determinação do nível de cálcio e outras enzimas para determinar a difusão para os ossos. Podem também ser realizados varrimentos de CT para verificar a difusão para a pélvis e nódulos linfáticos na área. Raios X do tórax e medição dos níveis de enzimas no fígado por meio de métodos conhecidos são utilizados para determinar metástase para os pulmões e

fígado, respectivamente. Outros métodos conhecidos de monitoramento da doença incluem ultrassonografia transretal (TRUS) e biópsia de agulhas transretais (TRNB), entre outros métodos bem conhecidos na técnica.

Administração “crônica” indica a administração do(s) agente(s) em um modo contínuo, ao contrário de modo agudo, de forma a manter o efeito terapêutico inicial (atividade) por maior período de tempo. Administração “intermitente” é o tratamento que não é efetuado consecutivamente sem interrupção, mas sim de natureza cíclica.

“Mamífero”, para os propósitos de tratamento, redução dos sintomas ou de diagnóstico de câncer, designa qualquer animal classificado como mamífero (também denominado “paciente”), incluindo seres humanos, animais domésticos e de fazenda, bem como animais domésticos, de esportes ou zoológico, tais como cães, gatos, bois, cavalos, carneiros, porcos, cabras, coelhos etc. Em certas realizações, o mamífero é um ser humano.

A administração “em combinação com” um ou mais agentes terapêuticos adicionais inclui administração simultânea (concorrente) e consecutiva em qualquer ordem.

“Veículos”, da forma utilizada no presente, incluem veículos, excipientes ou estabilizantes farmacêuticamente aceitáveis que são atóxicos para a célula ou mamífero a eles sendo expostos nas dosagens e concentrações empregadas. Frequentemente, o veículo fisiologicamente aceitável é uma solução tamponada com pH aquoso. Exemplos de veículos fisiologicamente aceitáveis incluem tampões tais como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes, incluindo ácido ascórbico; polipeptídeo de baixo peso molecular (menos de cerca de dez resíduos); proteínas, tais como albumina de soro, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tais como glicina, glutamina, asparagina, arginina ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros

carboidratos, incluindo glicose, manose ou dextrinas; agentes quelantes, tais como EDTA; álcoois de açúcar, tais como manitol ou sorbitol; contraíons formadores de sais, tais como sódio; e/ou tensoativos não iônicos, tais como TWEEN®, polietileno glicol (PEG) e PLURONICS®.

5 Por “fase sólida” ou “suporte sólido”, indica-se uma matriz não aquosa à qual um anticorpo, antagonista ou polipeptídeo de acordo com a presente invenção pode aderir-se ou fixar-se. Exemplos de fases sólidas englobadas no presente incluem as formadas total ou parcialmente de vidro (tal como vidro de poros controlados), polissacarídeos (tais como agarose),
10 poliacrilamidas, poliestireno, álcool polivinílico e silicones. Em certas realizações, dependendo do contexto, a fase sólida pode compreender a cavidade de um placa de teste; em outras, é uma coluna de purificação (tal como uma coluna de cromatografia de afinidade). Esta expressão também inclui uma fase sólida descontínua de partículas discretas, tais como as
15 descritas na Patente Norte-Americana nº 4.275.149.

Da forma utilizada no presente, o termo “imunoadesina” designa moléculas similares a anticorpos que combinam a especificidade de união de uma proteína heteróloga (“uma adesina”) com as funções efetoras de domínios constantes de imunoglobulina. Estruturalmente, as imunoadesinas
20 compreendem uma fusão de uma seqüência de aminoácidos com a especificidade de união desejada, que é diferente do local de união e reconhecimento de antígenos de um anticorpo (ou seja, é “heteróloga”) e uma seqüência de domínio constante de imunoglobulina. A parte de adesina de uma molécula de imunoadesina é tipicamente uma seqüência de aminoácidos
25 contígua que compreende pelo menos o local de união de um receptor ou ligante, tal como uma parte de uma proteína ZPA nativa. A seqüência de domínio constante de imunoglobulina na imunoadesina pode ser obtida a partir de qualquer imunoglobulina, tal como os subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 ou IgG-4,

IgA (incluindo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD ou IgM.

Um “lipossomo” é uma pequena bolha composta de diversos tipos de lipídios, fosfolipídios e/ou tensoativo que é útil para o fornecimento de drogas (tais como um polipeptídeo ZPA, seu anticorpo ou oligopeptídeo de união de ZPA) a mamíferos. Os componentes do lipossomo são normalmente dispostos em uma formação bicamadas, similar à disposição de lipídios de membranas biológicas.

Uma “quantidade eficaz” de um polipeptídeo, anticorpo, antagonista ou composição, da forma descrita no presente, é uma quantidade suficiente para conduzir um propósito especificamente indicado. Uma “quantidade eficaz” pode ser determinada empiricamente e por meio de métodos conhecidos com relação ao propósito indicado.

A expressão “quantidade terapeuticamente eficaz” designa a quantidade de um anticorpo, polipeptídeo ou antagonista de acordo com a presente invenção eficaz para “tratar” uma doença ou disfunção em um mamífero (também denominado paciente). No caso de câncer, a quantidade terapeuticamente eficaz da droga pode reduzir o número de células cancerosas, reduzir o tamanho do tumor, inibir (ou seja, reduzir a velocidade até certo ponto e, preferencialmente, suspender) a infiltração de células cancerosas em órgãos periféricos; inibir (ou seja, reduzir até certo ponto e, preferencialmente, suspender) a metástase tumoral; inibir, até certo ponto, o crescimento de tumores; e/ou melhorar, até certo ponto, um ou mais dos sintomas associados ao câncer. Vide a definição de “tratamento” no presente. Desde que possa evitar o crescimento de células cancerosas existentes e/ou matá-las, a droga pode ser citostática e/ou citotóxica.

“Quantidade citotóxica” de um polipeptídeo, anticorpo, antagonista ou composição de acordo com a presente invenção é uma quantidade capaz de causar a destruição de células, especialmente tumorosas, tais como células

de câncer, *in vitro* ou *in vivo*. Uma “quantidade citotóxica” de um polipeptídeo, anticorpo, antagonista ou composição de acordo com a presente invenção para fins de inibição, por exemplo, do crescimento de células neoplásticas pode ser determinada empiricamente e por meio de métodos conhecidos na técnica.

5 O termo “anticorpo” é utilizado no sentido mais amplo e cobre especificamente, por exemplo, anticorpos monoclonais anti-polipeptídeos ZPA isolados (incluindo anticorpos agonistas, antagonistas e neutralizantes), composições de anticorpos anti-polipeptídeo ZPA com especificidade poliepitópica, anticorpos policlonais, anticorpos anti-polipeptídeo ZPA de fita
10 única e fragmentos de anticorpos anti-polipeptídeo ZPA (vide abaixo), desde que unam especificamente um polipeptídeo ZPA nativo e/ou exibam uma atividade biológica ou atividade imunológica de acordo com a presente invenção. A expressão “fragmento funcional ou análogo” de um anticorpo é um composto que possui uma atividade biológica qualitativa em comum com um
15 anticorpo ao qual se está referindo. Um fragmento funcional ou análogo de um anticorpo anti-polipeptídeo ZPA pode ser, por exemplo, aquele que pode unir-se especificamente a uma molécula ZPA. Em uma realização, o anticorpo pode evitar ou reduzir substancialmente a capacidade de indução da apoptose de uma molécula ZPA. O termo “imunoglobulina” (Ig) é utilizado no presente de
20 forma intercambiável com “anticorpo”.

“Anticorpo isolado” é aquele que tenha sido identificado, separado e/ou recuperado a partir de um componente do seu ambiente natural. Os componentes contaminantes do seu ambiente natural são materiais que interfeririam com utilizações em diagnóstico ou terapêuticas para o anticorpo e
25 podem incluir enzimas, hormônios e outros solutos proteínáceos ou não proteínáceos. Em certas realizações, o anticorpo será purificado (1) até mais de 95% em peso de anticorpo, conforme determinado por meio do método de Lowry, e, de maior preferência, mais de 99% em peso; (2) até grau suficiente

para a obtenção de pelo menos quinze resíduos de seqüência de aminoácidos interna ou N-terminal, utilizando um seqüenciador de xícara de centrifugação; ou (3) até a homogeneidade, por meio de SDS-PAGE, sob condições redutoras ou não redutoras, utilizando azul de Coomassie ou, preferencialmente, manchas de prata. Anticorpo isolado inclui o anticorpo *in situ* em células recombinantes, desde que pelo menos um componente do ambiente natural do anticorpo não esteja presente. Normalmente, entretanto, o anticorpo isolado será preparado por meio de pelo menos uma etapa de purificação.

A unidade básica de anticorpo de quatro cadeias é uma glicoproteína heterotetramérica composta de duas cadeias leves (L) idênticas e duas cadeias pesadas (H) idênticas (um anticorpo IgM consiste de cinco das unidades heterotetraméricas básicas, juntamente com um polipeptídeo adicional denominado cadeia J, contendo, portanto, dez locais de união de antígenos, enquanto os anticorpos IgA secretados podem polimerizar-se para formar conjuntos polivalentes que compreendem de duas a cinco das unidades básicas de quatro cadeias juntamente com a cadeia J). No caso de IgGs, a unidade de quatro cadeias é geralmente de cerca de 150.000 daltons. Cada cadeia L é ligada a uma cadeia H por uma união de dissulfeto covalente, enquanto as duas cadeias H são ligadas entre si por uma ou mais uniões de dissulfeto, dependendo do isotipo de cadeia H. Cada cadeia H e L também contém pontes de dissulfeto intracadeias em espaços regulares. Cada cadeia H contém, no terminal N, um domínio variável (V_H) seguido por três domínios constantes (C_H) para cada uma das cadeias α e γ e quatro domínios C_H para os isotipos μ e ϵ . Cada cadeia L contém, no terminal N, um domínio variável (V_L) seguido por um domínio constante (C_L) na sua outra extremidade. O V_L é alinhado ao V_H e o C_L é alinhado ao primeiro domínio constante da cadeia pesada (C_{H1}). Acredita-se que resíduos de aminoácidos específicos formem uma superfície intermediária entre os domínios variáveis de cadeia leve e de

cadeia pesada. O emparelhamento de V_H e V_L entre si forma um local de união de antígenos isolado. Para a estrutura e propriedades das diferentes classes de anticorpos, vide, por exemplo, *Basic and Clinical Immunology*, oitava edição, Daniel P. Stites, Abba I. Terr e Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk CT, 1994, pág. 71 e Capítulo 6.

A cadeia L de qualquer espécie de vertebrado pode ser classificada em um dentre dois tipos claramente distintos, denominados kappa e lambda, com base nas seqüências de aminoácidos dos seus domínios constantes. Dependendo da seqüência de aminoácidos do domínio constante das suas cadeias pesadas (C_H), as imunoglobulinas podem ser atribuídas a diferentes classes ou isotipos. Existem cinco classes de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que contêm cadeias pesadas denominadas α , δ , ϵ , γ e μ , respectivamente. As classes γ and α são adicionalmente divididas em subclasses com base em diferenças relativamente menores de função e seqüência C_H ; seres humanos, por exemplo, expressam as subclasses a seguir: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

O termo “variável” designa o fato de que certos segmentos dos domínios variáveis diferem extensamente de seqüência entre os anticorpos. O domínio V media a união de antígenos e define a especificidade de um anticorpo específico para o seu antígeno específico. Entretanto, a variabilidade não é distribuída regularmente ao longo da série de 110 aminoácidos dos domínios variáveis. Ao contrário, as regiões V consistem de estiramentos relativamente invariáveis denominados regiões de estrutura (FRs) de quinze a trinta aminoácidos separados por regiões mais curtas de extrema variabilidade, denominadas “regiões hipervariáveis” que contêm de nove a doze aminoácidos de comprimento cada uma. Os domínios variáveis de cadeias leve e pesada nativas compreendem quatro FRs cada um, adotando em grande parte uma configuração de folha β , conectadas por três regiões hipervariáveis, que

formam laços que conectam e, em alguns casos, fazem parte da estrutura de folha β . As regiões hipervariáveis de cada cadeia são mantidas juntas em boa proximidade pelas FRs e, com as regiões hipervariáveis da outra cadeia, contribuem para a formação do local de união de antígenos de anticorpos (vide Kabat et al, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edição, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda MD (1991)). Os domínios constantes não estão diretamente envolvidos na união de um anticorpo a um antígeno, mas exibem diversas funções efetoras, tais como a participação do anticorpo em citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC).

A expressão “região hipervariável”, quando utilizada no presente, designa os resíduos de aminoácidos de um anticorpo que são responsáveis pela união de antígenos. A região hipervariável compreende geralmente resíduos de aminoácidos de uma “região determinante de complementaridade” ou “CDR” (por exemplo, por volta dos resíduos cerca de 24 a 34 (L1), 50 a 56 (L2) e 89 a 97 (L3) no V_L e por volta de cerca de 1 a 35 (H1), 50 a 65 (H2) e 95 a 102 (H3) no V_H (em uma realização, H1 é de cerca de 31 a 35); Kabat et al, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edição, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda MD (1991)) e/ou os resíduos de um “laço hipervariável” (por exemplo, resíduos 26 a 32 (L1), 50 a 52 (L2) e 91 a 96 (L3) no V_L e 26 a 32 (H1), 53 a 55 (H2) e 96 a 101 (H3) no V_H (Chothia e Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987))).

A expressão “anticorpo monoclonal”, da forma utilizada no presente, designa um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, ou seja, os anticorpos individuais que compreendem a população são idênticos, exceto por possíveis mutações de ocorrência natural que podem estar presentes em quantidades menores. Os anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo dirigidos a um único

local antigênico. Além disso, ao contrário das preparações de anticorpos policlonais que incluem diferentes anticorpos dirigidos a diferentes determinantes (epítomos), cada anticorpo monoclonal é direcionado a um único determinante sobre o antígeno. Além da sua especificidade, os anticorpos monoclonais são vantajosos por poderem ser sintetizados de forma não contaminada por outros anticorpos. O adjetivo "monoclonal" não deve ser considerado exigindo a produção do anticorpo por meio de nenhum método específico. Os anticorpos monoclonais úteis na presente invenção podem ser preparados, por exemplo, por meio da metodologia de hibridoma descrita em primeiro lugar por Kohler et al, *Nature*, 256: 495 (1975), ou pode ser fabricada utilizando métodos de DNA recombinante em células vegetais, animais, eucarióticas ou bacterianas (vide, por exemplo, a Patente Norte-Americana nº 4.816.567). Os "anticorpos monoclonais" podem também ser isolados a partir de bibliotecas de anticorpos de fagos, utilizando as técnicas descritas, por exemplo, em Clackson et al, *Nature*, 352: 624-628 (1991) e Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), por exemplo, e nos Exemplos abaixo.

Os anticorpos monoclonais do presente incluem anticorpos "quiméricos", em que uma parte da cadeia leve e/ou pesada é idêntica ou homóloga a seqüências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie específica ou pertencentes a uma classe ou subclasse específica de anticorpos, enquanto o restante da(s) cadeia(s) é idêntico ou homólogo a seqüências correspondentes de anticorpos derivados de outras espécies ou pertencentes a outra classe ou subclasse de anticorpos, bem como fragmentos desses anticorpos, desde que exibam a atividade biológica de acordo com a presente invenção (vide a Patente Norte-Americana nº 4.816.567; e Morrison et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81: 6851-6855 (1984)). Os anticorpos quiméricos de interesse no presente incluem anticorpos "primatizados", que compreendem seqüências de união de antígenos de domínio variável

derivadas de primatas não humanos (por exemplo, Macaco do Velho Mundo, Chimpanzé etc.) e seqüências de regiões constantes humanas.

Um anticorpo “intacto” é aquele que compreende um local de união de antígenos, bem como um C_L e pelo menos domínios contantes de cadeia pesada, C_{H1} , C_{H2} e C_{H3} . Os domínios constantes podem ser domínios constantes de seqüência nativa (por exemplo, domínios constantes de seqüências nativas humanas) ou suas variantes de seqüências de aminoácidos. Em certas realizações, o anticorpo intacto possui uma ou mais funções efetoras.

“Fragmentos de anticorpos” compreendem uma parte de um anticorpo intacto, preferencialmente a região variável ou de união de antígenos do anticorpo intacto. Exemplos de fragmentos de anticorpos incluem fragmentos de Fab, Fab', $F(ab')_2$ e Fv; diacorpos, anticorpos lineares (vide a Patente Norte-Americana nº 5.641.870, Exemplo 2; Zapata et al, *Protein Eng.* 8 (10): 1057-1062 (1995)); moléculas de anticorpos de fita única; e anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpos. A expressão “anticorpos lineares” geralmente designa os anticorpos descritos em Zapata et al, *Protein Eng.*, 8 (10): 1057-1062 (1995). Resumidamente, estes anticorpos compreendem um par de segmentos Fd em conjunto ($VH-CH1-VH-CH1$) que, junto com os polipeptídeos de cadeia leve complementares, formam um par de regiões de união de antígenos. Os anticorpos lineares podem ser biespecíficos ou monoespecíficos.

A digestão de papaína de anticorpos produz dois fragmentos idênticos de união de antígenos, denominados fragmentos “Fab”, e um fragmento “Fc” residual, cuja designação reflete a capacidade de cristalização rápida. O fragmento de Fab consiste de uma cadeia L inteira, juntamente com o domínio de região variável da cadeia H (V_H), e o primeiro domínio constante de uma cadeia pesada (C_{H1}). Cada fragmento de Fab é monovalente com relação

à união de antígenos, ou seja, contém um único local de união de antígenos. O tratamento com pepsina de um anticorpo gera um único fragmento $F(ab')_2$ grande, que corresponde aproximadamente a dois fragmentos de Fab ligados por dissulfeto que possuem atividade de união de antígenos divalentes e ainda
5 são capazes de reticular antígenos. Os fragmentos de Fab' diferem dos fragmentos de Fab por conterem alguns resíduos adicionais no terminal carboxi do domínio C_H1 , incluindo uma ou mais cisteínas da região de articulação do anticorpo. Fab'-SH é a designação do presente para Fab' em que o(s) resíduo(s) de cisteína dos domínios constantes apresenta(m) um grupo tiol
10 livre. Os fragmentos de anticorpos $F(ab')_2$ foram originalmente produzidos na forma de pares de fragmentos de Fab' que contêm cisteínas de articulação entre eles. Outros acoplamentos químicos de fragmentos de anticorpos também são conhecidos.

O fragmento de Fc compreende as partes carboxi-terminais das
15 duas cadeias H mantidas juntas por dissulfetos. As funções efetoras de anticorpos são determinadas por seqüências na região Fc, que também é a parte reconhecida por receptores de Fc (FcR) encontrados em certos tipos de células.

"Fv" é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um local de
20 reconhecimento e de união de antígenos completo. Este fragmento consiste de um dímero de um domínio de região variável de cadeia leve e de cadeia pesada em associação firme e não covalente. Da dobra desses dois domínios, emanam seis laços hipervariáveis (três laços da cadeia H e L cada) que contribuem com os resíduos de aminoácidos para união de antígenos e
25 conferem especificidade de união de antígenos ao anticorpo. Entretanto, mesmo um domínio variável isolado (ou metade de um Fv que compreende apenas três CDRs específicas para um antígeno) possui a capacidade de reconhecer e unir antígeno, embora em afinidade menor que todo o local de

união.

“Fv de cadeia isolada”, também abreviado como “sFv” ou “scFv”, são fragmentos de anticorpos que compreendem os domínios de anticorpos V_H e V_L conectados a uma única cadeia de polipeptídeo. Preferencialmente, o polipeptídeo de sFv compreende adicionalmente um ligante de polipeptídeo entre os domínios V_H e V_L , o que permite que o sFv forme a estrutura desejada para união de antígenos. Para uma análise de sFv, vide Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg e Moore eds., Springer-Verlag, Nova Iorque, págs. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, abaixo.

O termo “diacorpos” designa fragmentos de anticorpos pequenos preparados por meio da construção de fragmentos de sFv (vide parágrafo anterior) com ligantes curtos (cerca de cinco a dez resíduos) entre os domínios V_H e V_L , de forma a atingir-se o emparelhamento intercadeias mas não intracadeias dos domínios V, resultando em um fragmento bivalente, ou seja, um fragmento que contém dois locais de união de antígenos. Os diacorpos biespecíficos são heterodímeros de dois fragmentos de sFv “cruzados”, em que os domínios V_H e V_L dos dois anticorpos estão presentes sobre diferentes cadeias de polipeptídeos. Os diacorpos são descritos mais completamente, por exemplo, em EP 404.097, WO 93/11161 e Hollinger et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90: 6444-6448 (1993).

As formas “humanizadas” de anticorpos não humanos (por exemplo, de roedores) são anticorpos quiméricos que contêm sequência mínima derivada do anticorpo não humano. Em sua maioria, os anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor), em que resíduos de uma região hipervariável do receptor são substituídos por resíduos de uma região hipervariável de uma espécie não humana (anticorpo doador), tal como camundongo, rato, coelho ou primata não humano que apresente a capacidade, afinidade e especificidade de anticorpo desejada. Em alguns

casos, os resíduos de região de estrutura (FR) da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não humanos correspondentes. Além disso, os anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo receptor nem no anticorpo doador. Essas modificações são feitas para refinar ainda mais o desempenho do anticorpo. Geralmente, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todos dentre pelo menos um, tipicamente dois domínios variáveis, em que todos ou substancialmente todos os laços hipervariáveis correspondem aos de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as FRs são as de uma seqüência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado também compreenderá opcionalmente pelo menos uma parte de região constante de imunoglobulina (F_c), tipicamente a de uma imunoglobulina humana. Para detalhes adicionais, vide Jones et al, *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann et al, *Nature* 332: 323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992).

Um "anticorpo dependente de espécie", tal como um anticorpo anti-IgE humano de mamífero, é um anticorpo que possui afinidade de união mais forte para um antígeno de uma primeira espécie de mamífero que para um homólogo daquele antígeno de uma segunda espécie de mamífero. Normalmente, o anticorpo dependente de espécie "une-se especificamente" a um antígeno humano (ou seja, possui um valor de afinidade de união (K_d) de não mais de cerca de 1×10^{-7} M, preferencialmente não mais de cerca de 1×10^{-8} e, de maior preferência, não mais de cerca de 1×10^{-9} M), mas possui afinidade de união para um homólogo do antígeno de uma segunda espécie de mamífero não humano que é pelo menos cerca de cinquenta vezes, pelo menos cerca de quinhentas vezes ou pelo menos cerca de mil vezes mais fraca que a sua afinidade de união para o antígeno humano. O anticorpo dependente de espécie pode ser de qualquer dos diversos tipos de anticorpos

definidos acima e, em certas realizações, é um anticorpo humano ou humanizado.

“Oligopeptídeo de união de ZPA” é um oligopeptídeo que se une, preferencialmente de forma específica, a um polipeptídeo ZPA conforme descrito no presente. Oligopeptídeos de união de ZPA podem ser sintetizados quimicamente utilizando metodologia de síntese de oligopeptídeos conhecida ou podem ser preparados e purificados utilizando tecnologia recombinante. Os oligopeptídeos de união de ZPA normalmente possuem pelo menos cerca de cinco aminoácidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20; 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 38, 40; 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60; 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80; 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ou 100 aminoácidos de comprimento ou mais, em que esses oligopeptídeos são capazes de unir-se, preferencialmente de forma específica, a um polipeptídeo ZPA conforme descrito no presente. Os oligopeptídeos de união de ZPA podem ser identificados sem experimentação indevida, utilizando métodos conhecidos. Neste particular, observa-se que os métodos de seleção de bibliotecas de oligopeptídeos em busca de oligopeptídeos que sejam capazes de unir-se especificamente a um polipeptídeo alvo são bem conhecidos na técnica (vide, por exemplo, Patentes Norte-Americanas nº 5.556.762, 5.750.373, 4.708.871, 4.833.092, 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689 e 5.663.173; Patentes PCT nº WO 84/03506 e WO 84/03564; Geysen et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 81: 3998-4002 (1984); Geysen et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 82: 178 (1985); Geysen et al, *Synthetic Peptides as Antigens*, 1985 (130); Geysen et al, *J. Immunol. Meth.*, 102: 259-274 (1987); Schoofs et al, *J. Immunol.*, 140: 611-616 (1988), Cwirla, S. E. et al (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 87: 6378; Lowman, H. B. et al

(1991), *Biochemistry*, 30: 10832; Clackson, T. et al (1991) *Nature*, 352: 624; Marks, J. D. et al (1991), *J. Mol. Biol.*, 222: 581; Kang, A. S. et al (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 88: 8363 e Smith, G. P. (1991), *Current Opin. Biotechnol.*, 2: 668).

5 Um polipeptídeo, anticorpo, antagonista ou composição de acordo com a presente invenção, "que une" um antígeno de interesse, tal como um polipeptídeo ZPA, é aquele que une o antígeno com afinidade suficiente, de tal forma que um polipeptídeo, anticorpo, antagonista ou composição seja útil como agente terapêutico e/ou de diagnóstico para dirigir-se a uma célula ou
10 tecido que expressa o antígeno e não apresenta reação cruzada significativa com outras proteínas. Nessas realizações, a extensão da união do polipeptídeo, anticorpo, antagonista ou composição a uma proteína "não alvo" será de menos de cerca de 10% da união do polipeptídeo, anticorpo, antagonista ou composição à sua proteína alvo específica, conforme
15 determinado por meio de análise de ordenamento de células ativadas por fluorescência (FACS) ou radioimunoprecipitação (RIA). Com relação à união de um polipeptídeo, anticorpo, antagonista ou composição a uma molécula alvo, a expressão "união específica", "une-se especificamente a" ou "é específica para" um polipeptídeo específico ou um epítipo sobre um polipeptídeo alvo
20 específico indica união que é mensuravelmente diferente de uma interação não específica. A união específica pode ser medida, por exemplo, por meio da determinação da união de uma molécula em comparação com a união de uma molécula controle, que geralmente é uma molécula com estrutura similar que não possui atividade de união. A união específica pode ser determinada, por
25 exemplo, por meio de competição com uma molécula controle que é similar ao alvo, tal como excesso de alvo não marcado. Neste caso, indica-se união específica caso a união do alvo marcado a uma sonda seja competitivamente inibida por alvo não marcado em excesso. A expressão "união específica",

“une-se especificamente a” ou “é específico para” um polipeptídeo específico ou um epítipo sobre um polipeptídeo alvo específico, da forma utilizada no presente, pode ser exibida, por exemplo, por uma molécula que possui K_d para o alvo de pelo menos cerca de 10^{-4} M, alternativamente pelo menos cerca de 10^{-5} M, alternativamente pelo menos cerca de 10^{-6} M, alternativamente pelo menos cerca de 10^{-7} M, alternativamente pelo menos cerca de 10^{-8} M, alternativamente pelo menos cerca de 10^{-9} M, alternativamente pelo menos cerca de 10^{-10} M, alternativamente pelo menos cerca de 10^{-11} M, alternativamente pelo menos cerca de 10^{-12} M ou mais. Em uma realização, a expressão “união específica” indica união em que uma molécula une-se a um polipeptídeo específico ou epítipo sobre um polipeptídeo específico sem união substancial a nenhum outro polipeptídeo ou epítipo de polipeptídeo (tal como uma proteína não ZPA). Compreende-se que um anticorpo que se une especificamente a um polipeptídeo ZPA nativo de peixe-zebra pode também unir um polipeptídeo não de peixe-zebra homólogo ao polipeptídeo ZPA.

Um polipeptídeo, anticorpo, antagonista ou composição que “inibe o crescimento” de células de tumores ou um polipeptídeo, anticorpo, antagonista ou composição “inibidora do crescimento” é aquele que resulta na inibição do crescimento mensurável de células de câncer. Em certas realizações, polipeptídeos, anticorpos, antagonistas ou composições inibidoras do crescimento inibem o crescimento de células de tumores em mais de 20%, cerca de 20% a cerca de 50% e em mais de 50% (tal como cerca de 50% a cerca de 100%) em comparação com o controle apropriado, em que o controle são tipicamente células de tumores não tratadas com o polipeptídeo, anticorpo, antagonista ou composição sendo testada. Em uma realização, a inibição do crescimento pode ser medida em uma concentração de anticorpos de cerca de 0,1 a 30 $\mu\text{g/ml}$ ou cerca de 0,5 nM a 200 nM em cultivo celular, em que a inibição do crescimento é determinada em um a dez dias após a exposição das

células tumorosas ao anticorpo. A inibição do crescimento de células tumorosas *in vivo* pode ser determinada de diversas formas, conforme descrito no capítulo de Exemplos Experimentais abaixo. O anticorpo é inibidor do crescimento *in vivo* caso a administração do anticorpo anti-ZPA a cerca de 1 $\mu\text{g/kg}$ até cerca de 100 mg/kg de peso do corpo resulte na redução do tamanho do tumor ou da proliferação de células tumorosas em até cerca de cinco dias a três meses a partir da primeira administração do anticorpo, preferencialmente em até cerca de cinco a trinta dias.

As “funções efetoras” de anticorpos designam as atividades biológicas atribuíveis à região Fc (uma região Fc de seqüência nativa ou região Fc com variação de seqüência de aminoácidos) de um anticorpo e variam de acordo com o isotipo do anticorpo. Exemplos de funções efetoras de anticorpos incluem: citotoxicidade dependente de complemento e união de C1q; união de receptor Fc; citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC); fagocitose; regulação para baixo de receptores da superfície celular (tais como receptores de células B); e ativação de células B.

“Citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos” ou “ADCC” indica uma forma de citotoxicidade na qual Ig secretado unido a receptores Fc (FcRs) presentes sobre certas células citotóxicas (tais como células Matadoras Naturais (NK), neutrófilos e macrófagos) permitem que essas células efetoras citotóxicas unam-se especificamente a uma célula alvo que contenha antígenos e subseqüentemente matem a célula desejada com citotoxinas. Os anticorpos “armam” as células citotóxicas e são absolutamente necessários para essa matança. As células primárias para a mediação de ADCC, células NK, expressam unicamente Fc γ RIII, enquanto monócitos expressam Fc γ RI, Fc γ RII e Fc γ RIII. A expressão de FcR sobre células hematopoiéticas é resumida na Tabela 3 da página 464 de Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991). Para determinar a atividade de ADCC

de uma molécula de interesse, pode ser realizado um teste de ADCC *in vitro*, tal como o descrito na Patente Norte-Americana nº 5.500.362 ou 5.821.337. Células efetoras úteis para esses testes incluem células mononucleares sangüíneas periféricas (PBMC) e células Matadoras Naturais (NK). Alternativa
 5 ou adicionalmente, a atividade de ADCC da molécula de interesse pode ser determinada *in vivo*, tal como em um modelo animal como o descrito em Clynes et al, (U. S. A.) 95: 652-656 (1998).

“Receptor de Fc” ou “FcR” descreve um receptor que se une à região Fc de um anticorpo. Em certas realizações, o FcR é um FcR humano de
 10 seqüência nativa. Além disso, o FcR pode ser um FcR que une um anticorpo IgG (receptor gama) e inclui receptores das subclasses FcγRI, FcγRII e FcγRIII, incluindo variantes alélicas e, alternativamente, formas divididas desses receptores. Os receptores FcγRII incluem FcγRIIA (um “receptor de ativação”) e FcγRIIB (um “receptor de inibição”), que possuem seqüências de aminoácidos
 15 similares que diferem principalmente nos seus domínios citoplasmáticos. O receptor de ativação FcγRIIA contém um motivo de ativação com base em tirosina imunorreceptora (ITAM) no seu domínio citoplasmático. O receptor de inibição FcγRIIB contém um motivo de inibição com base em tirosina imunorreceptora (ITIM) no seu domínio citoplasmático. (vide análise M. em
 20 Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234 (1997)). FcRs são analisados em Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991); Capel et al, *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); e de Haas et al, *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). Outros FcRs, incluindo aqueles a serem identificados no futuro, são englobados pelo termo “FcR” no presente. O termo também inclui o receptor
 25 neonatal, FcRn, que é responsável pela transferência de IgGs maternos para o feto (Guyer et al, *J. Immunol.* 117: 587 (1976) e Kim et al, *J. Immunol.* 24: 249 (1994)).

“Células efetoras humanas” são leucócitos que expressam um ou

mais FcRs e realizam funções efetoras. Em certas realizações, as células expressam pelo menos FcγRIII e realizam função efetora de ADCC. Exemplos de leucócitos humanos que mediam ADCC incluem células mononucleares sangüíneas periféricas (PBMC), células matadoras naturais (NK), monócitos, células T citotóxicas e neutrófilos; em que PBMCs e células NK são preferidas. As células efetoras podem ser isoladas a partir de uma fonte nativa, tal como sangue.

“Citotoxicidade dependente de complemento” ou “CDC” designa a lise de uma célula alvo na presença de complemento. A ativação do processo clássico de complemento é iniciada pela união do primeiro componente do sistema de complemento (C1q) a anticorpos (da subclasse apropriada) que são unidos ao seu antígeno cognato. Para determinar a ativação do complemento, pode ser realizado teste de CDC (conforme descrito, por exemplo, em Gazzano-Santoro et al, *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996)).

“Disfunção relativa a apoptose” designa um estado de doença ou condição fisiológica causado, prolongado ou caracterizado por apoptose aberrante ou mal regulada. Disfunções relativas a apoptose incluem, mas sem limitar-se a disfunções proliferativas celulares, disfunções de apoptose viral, disfunções autoimunes, disfunções hematológicas, disfunções neurológicas e outras disfunções caracterizadas por uma taxa de apoptose indesejavelmente alta.

As expressões “disfunção proliferativa celular” e “disfunção proliferativa” designam disfunções que são associadas a algum grau de proliferação celular anormal. Em uma realização, a disfunção proliferativa celular é câncer. Apoptose aberrante é uma causa de proliferação celular anormal. Uma série de cânceres foi relacionada à desativação de uma ou mais proteínas pró-apoptóticas (tais como p53 e fas) ou produção excessiva ou desregulagem de proteínas pró-sobrevivência (tais como Bcl-2).

Os termos “câncer” e “canceroso” designam ou descrevem a condição fisiológica que é tipicamente caracterizada pelo crescimento celular desregulado. Exemplos de câncer incluem, mas sem limitar-se a carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma e leucemia ou malignidades linfóides. Exemplos mais específicos desses cânceres incluem câncer de células escamosas (por exemplo, câncer de células escamosas epiteliais), câncer do pulmão, incluindo câncer do pulmão de células pequenas, câncer do pulmão não de células pequenas, adenocarcinoma do pulmão e carcinoma escamoso do pulmão, câncer do peritônio, câncer hepatocelular, câncer gástrico ou estomacal, incluindo câncer gastrointestinal, câncer pancreático, glioblastoma, câncer da cervical, câncer do ovário, câncer do fígado, câncer da bexiga, câncer do trato urinário, hepatoma, câncer de mama, câncer do cólon, câncer retal, câncer colo-retal, carcinoma uterino ou endométrico, carcinoma das glândulas salivares, câncer renal ou dos rins, câncer da próstata, câncer da vulva, câncer da tireóide, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma peniano, melanoma, mieloma múltiplo e linfoma de células B, câncer do cérebro, bem como da cabeça e do pescoço, e metástases associadas.

“Tumor”, da forma utilizada no presente, indica toda proliferação e crescimento de células neoplásticas, sejam malignas ou benignas, e todas as células e tecidos pré-cancerosos e cancerosos.

A expressão “disfunção de apoptose viral” indica ou descreve apoptose aberrante em um paciente, causada por infecção viral ou como resultado dela. A expressão inclui apoptose aberrante (tal como apoptose reduzida ou bloqueada) causada diretamente por um vírus infeccioso, bem como apoptose aberrante (tal como morte celular aumentada) causada por funcionamento excessivo, descontrolado ou desorientado do sistema imunológico em resposta a uma infecção viral ou pelo próprio vírus. Exemplos de apoptose aberrante (reduzida) causada diretamente por um vírus infeccioso

incluem, mas sem limitar-se à produção de proteínas similares a Bcl-2 (polipeptídeos B2R pró-sobrevivência) e estimulantes da produção de Bcl-2 pelo vírus Epstein-Barr, de forma que as células infectadas não sofram apoptose; desativação ou degradação de p53 (um polipeptídeo não apoptótico) por meio de papiloma vírus, de tal forma que células infectadas não sofram apoptose; e produção de um inibidor das proteases similares a ICE pró-apoptóticas por vírus de varíola bovina, de tal forma que as células infectadas não sofram apoptose. Um exemplo de apoptose aberrante (aumentada) causada por infecções virais é a expressão inadequada de fas na superfície de células T auxiliares infectadas, o que faz com que essas células sofram apoptose prematura, de forma a eliminar um componente importante do sistema imunológico. Exemplos de apoptose aberrante causada por funcionamento excessivo, descontrolado ou mal direcionado do sistema imunológico em resposta a uma infecção viral incluem a morte inadvertida de células não infectadas vizinhas a células infectadas, pois as células vizinhas podem também haver sido induzidas à expressão de fas na superfície celular e, desta forma, são dirigidas à destruição por meio de ativação do processo de apoptose por linfócitos T citotóxicos em circulação.

A expressão “disfunção autoimune” designa uma doença ou disfunção não maligna que surge dos próprios tecidos do indivíduo e é dirigida contra eles. Disfunções autoimunes são tipicamente caracterizadas pela falha na destruição de células imunes auto-reativas pelo sistema imunológico; foram identificados linfócitos auto-reativos que sobreexpressam ou possuem de outra forma maior atividade de fatores apoptóticos pró-sobrevivência ou reduziram a expressão ou atividade de fatores pró-apoptóticos. As doenças autoimunes do presente excluem especificamente doenças ou condições malignas ou cancerosas, especialmente excluindo linfoma de células B, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia de

células Hairy e leucemia mieloblástica crônica. Exemplos de doenças ou disfunções autoimunes incluem, mas sem limitar-se a reações inflamatórias, tais como doenças inflamatórias da pele, incluindo psoríase e dermatite (tal como dermatite atópica); escleroderma sistêmico e esclerose; reações associadas a doença inflamatória do intestino (tal como mal de Crohn e colite ulcerativa); síndrome de tensão respiratória (incluindo síndrome de tensão respiratória em adultos; ARDS); dermatite; meningite; encefalite; uveíte; colite; glomerulonefrite; condições alérgicas, tais como eczema e asma e outras condições que envolvam a infiltração de células T e reações inflamatórias crônicas; arteriosclerose; deficiência na adesão de leucócitos; artrite reumatóide; eritematose do lúpus sistêmico (SLE) (incluindo, mas sem limitar-se a nefrite do lúpus, lúpus cutâneo); diabetes mellitus (tal como diabetes mellitus do tipo I ou diabetes mellitus dependente de insulina); esclerose múltipla; síndrome de Reynaud; tireoidite autoimune; tireoidite de Hashimoto; encefalomielite alérgica; síndrome de Sjorgen; diabetes precoce juvenil; e reações imunológicas associadas à hipersensibilidade aguda e atrasada mediada por citocinas e linfócitos T tipicamente encontradas em tuberculose, sarcoidose, polimiosite, granulomatose e vasculite; anemia perniciosa (mal de Addison); doenças que envolvem diapedese de leucócitos; disfunções inflamatórias do sistema nervoso central (SNC); síndrome de lesões de múltiplos órgãos; anemia hemolítica (incluindo, mas sem limitar-se a crioglobulinemia ou anemia positiva de Coombs); miastenia grave; doenças mediadas por complexo de anticorpos e antígenos; doença da membrana base anti-glomerular; síndrome antifosfolípidios; neurite alérgica; mal de Graves; síndrome miastênica de Lambert-Eaton; penfigóide bolhosa; pênfigo; poliendocrinopatias autoimunes; mal de Reiter; síndrome de homem rígido; mal de Behcet; artrite de células gigantes; nefrite complexa imune; nefropatia de IgA; polineuropatias de IgM; púrpura trombocitopênica imune (ITP) ou

trombocitopenia autoimune etc.

A expressão “disfunção hematológica” designa ou descreve uma doença ou disfunção caracterizada pela produção aberrante de glóbulos sangüíneos ou por fluxo sangüíneo inadequado. As disfunções hematológicas incluem, mas sem limitar-se a anemia associada a doenças crônicas, anemia aplástica, neutropenia crônica e as síndromes mielodisplásticas, enfarte do miocárdio e apoplexia.

As expressões “disfunção neurológica” ou “doença neurológica” designam ou descrevem uma doença ou disfunção do sistema nervoso central e/ou periférico e/ou neurônios específicos que é tipicamente caracterizada pela deterioração de tecido nervoso ou deterioração da comunicação entre células nervosas em tecido nervoso. Exemplos de disfunções neurológicas incluem, mas sem limitar-se a doenças neurodegenerativas (que incluem, mas sem limitar-se a doenças de corpos Lewy, síndrome pós-poliomielite, síndrome de Shy-Draeger, retinite pigmentosa, atrofia olivopontocerebelar, mal de Parkinson, atrofia muscular espinhal, atrofia de sistemas múltiplos, esclerose lateral amiotrófica, degeneração estriatonigral, tauopatias (que incluem, mas sem limitar-se a mal de Alzheimer e paralisia supranuclear), doenças de príon (que incluem, mas sem limitar-se a encefalopatia espongiforme bovina, tremor epizootico, síndrome de Creutzfeldt-Jakob, kuru, doença de Gerstmann-Straussler-Scheinker, doença de perda crônica e insônia familiar fatal) paralisia dos bulbos, doenças neuronais motoras e disfunções heterodegenerativas do sistema nervoso (que incluem, mas sem limitar-se a mal de Canavan, mal de Huntington, ceróide-lipofuscinose neuronal, mal de Alexander, síndrome de Tourette, síndrome de pêlos encaracolados de Menkes, síndrome de Cockayne, síndrome de Halervorden-Spatz, mal de lafora, síndrome de Rett, degeneração hepatolenticular, síndrome de Lesch-Nyhan e síndrome de Unverricht-Lundborg), demência (incluindo, mas sem limitar-se a mal de Pick,

ataxia espinhocerebelar, lesões cerebrais hipóxicas e isquêmicas e lesões cerebrais excitotóxicas e traumáticas.

Um polipeptídeo, anticorpo, antagonista ou composição de acordo com a presente invenção que “induz a morte celular” ou “induz a apoptose” é aquele que faz com que uma célula viável torne-se inviável. Em certas realizações, a célula é uma célula cancerosa, tal como célula da mama, ovário, estômago, endométrio, glândula salivar, pulmão, rim, cólon, tireóide, pancreática ou da bexiga. A morte celular *in vitro* pode ser determinada na ausência de células efetoras imunes e complementares para distinguir a morte celular induzida por citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC) ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC). Desta forma, o teste de morte celular pode ser realizado utilizando soro desativado por calor (ou seja, na ausência de complemento) e na ausência de células efetoras imunes. Para determinar se um polipeptídeo, anticorpo, antagonista ou composição de acordo com a presente invenção é capaz de induzir a morte celular, a perda da integridade da membrana conforme avaliado por meio da absorção de iodeto de propídio (PI), azul de tripano (vide Moore et al, *Cytotechnology* 17: 1-11 (1995)) ou 7AAD pode ser avaliada com relação a células não tratadas.

“Célula que expressa ZPA” é uma célula que expressa um polipeptídeo ZPA transfectado ou endógeno. “Câncer que expressa ZPA” é um câncer que compreende células que produzem um polipeptídeo ZPA. Um câncer que “sobreexpressa” polipeptídeo ZPA ou um de seus homólogos é aquele que apresenta níveis significativamente mais altos de polipeptídeo ZPA ou um de seus homólogos, em comparação com uma célula não cancerosa do mesmo tipo de tecido. Essa sobreexpressão pode ser causada por amplificação genética ou por maior transcrição ou tradução. A sobreexpressão de polipeptídeo ZPA ou homólogo de polipeptídeo ZPA pode ser determinada

em um teste de diagnóstico ou prognóstico por meio da avaliação de níveis mais altos da proteína ZPA ou homólogo de proteína ZPA presente na célula (tal como por meio de um teste de imunohistoquímica etc.). Alternativa, ou adicionalmente, pode-se medir os níveis de ácido nucleico codificador de polipeptídeo ZPA, ácido nucléico codificador de polipeptídeo ZPA ou mRNA na célula, por meio, por exemplo, de hibridização *in situ* fluorescente utilizando uma sonda com base em ácido nucleico correspondente a um ácido nucleico que codifica ZPA ou seu complemento (FISH; vide WO 98/45479 publicada em outubro de 1988), Southern Blot, Northern Blot ou técnicas de reação em cadeia de polimerase (PCR), tais como PCR quantitativa em tempo real (RT-PCR). Além dos testes acima, diversos testes *in vivo* são disponíveis para os técnicos no assunto. Pode-se, por exemplo, expor as células no corpo do mamífero a um anticorpo internalizante que seja opcionalmente marcado com uma marca detectável, tal como um isótopo radioativo, e pode-se avaliar a união do anticorpo a um polipeptídeo ZPA ou homólogo de polipeptídeo ZPA no mamífero, por exemplo, por meio de varrimento externo para avaliação da radioatividade ou de análise de uma biópsia retirada de um mamífero exposto anteriormente ao anticorpo.

A palavra “marca”, da forma utilizada no presente, designa um composto ou composição detectável que é conjugado direta ou indiretamente ao polipeptídeo, anticorpo, antagonista ou composição, de forma a gerar um polipeptídeo, anticorpo, antagonista ou composição “marcada”. A marca pode ser detectável por si própria (como marcas de radioisótopos ou marcas fluorescentes) ou, no caso de uma marca enzimática, pode catalisar a alteração química de um composto ou composição de substrato que seja detectável.

A expressão “agente citotóxico”, da forma utilizada no presente, indica uma substância que inibe ou evita o funcionamento das células e/ou

causa destruição das células. A expressão destina-se a incluir isótopos radioativos (tais como At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} e isótopos radioativos de Lu), agentes quimioterapêuticos, tais como metotrexato, adriamicina, vinca alcalóides (vincristina, vinblastina, etoposida), doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucil, daunorubicina ou outros agentes intercalantes, enzimas e seus fragmentos, tais como enzimas nucleolíticas, antibióticos e toxinas, tais como toxinas de moléculas pequenas ou toxinas enzimaticamente ativas de origem animal, vegetal, fúngica ou bacteriana, incluindo seus fragmentos e/ou variantes, e os diversos agentes antitumores ou anticancerígenos descritos abaixo. Outros agentes citotóxicos são descritos abaixo. Um agente tumoricida causa a destruição de células tumorosas.

“Agente quimioterapêutico” é um composto químico útil no tratamento de câncer. Exemplos de agentes quimioterapêuticos incluem agentes alquilantes, tais como tiotepa e ciclofosfamida CYTOXAN®; sulfonatos de alquila, tais como busulfan, improsulfan e piposulfan; aziridinas, tais como benzodopa, carboquona, meturedopa e uredopa; etilenoiminas e metilamelaminas, incluindo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida e trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina e bulatacinona); camptotecina (incluindo o análogo sintético topotecan); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluindo seus análogos sintéticos de adozelesina, carzelesina e bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 e criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluindo os análogos sintéticos, KW-2189 e CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; sarcodictina; espongistatina; mostardas de nitrogênio, tais como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, cloridrato óxido de mecloretamina, melfalan, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostarda de uracil; nitrosuréias, tais como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina,

nimustina e ranimustina; antibióticos, tais como os antibióticos de enediina (por exemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gama 1I e caliqueamicina ômega 1I (vide, por exemplo, *Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); dinemicin, incluindo dinemicin A; bifosfonatos, tais como clodronato; esperamicin; bem como neocarzinostatin cromóforo e cromóforos antibióticos de enediina cromoproteína relacionados), aclacinomisinas, actinomicin, autramicin, azaserina, bleomicinas, cactinomicin, carabycin, carminomicin, carzinofilin, cromomicinas, dactinomicin, daunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicin ADRIAMYCIN® (incluindo morfolino-doxorubicin, cianomorfolino-doxorubicin, 2-pirrolino-doxorubicin e desoxidoxorubicin), epirubicin, esorubicin, idarubicin, marcelomicin, mitomicinas tais como mitomicin C, ácido micofenólico, nogaiamicin, olivomicinas, peplomicin, potfiromicin, puromicin, quelamicin, rodorubicin, estreptonigrin, estreptozocin, tubercidin, ubenimex, zinostatin, zorubicin; antimetabólitos, tais como metotrexato e 5-fluorouracil (5-FU); análogos de ácido fólico, tais como denopterín, metotrexato, pteropterín, trimetrexato; análogos de purina, tais como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, tais como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, tais como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; anti-adrenais, tais como aminoglutetímida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico, tal como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamido glicosídeo; ácido aminolevulínico; eniluracil; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptínio; epotilona; etoglucídeo; nitrato de gálio; hidroxiuréia; lentinan; lonidainina; maitansinóides, tais como maitansina e ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitraerina; pentostatin; fenamet; pirarubicin; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etil hidrazida;

procarbazina; complexo de polissacarídeos PSK® (JHS Natural Products, Eugene OR, Estados Unidos); razoxano; rizoxin; sizofiran; espirogermânio; ácido tenuazônico; triaziquona; 2,2',2"-triclortrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurin A, roridin A e anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxóides, tais como paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton NJ), ABRAXANE® livre de Cremophor, formulação de nanopartículas de paclitaxel elaborada com albumina (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) e doxetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, França); clorambucil; gemcitabina GEMZAR®; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platina tais como cisplatina e carboplatina; vinblastina; platina; etoposida (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina NAVELBINE®; novantrona; teniposida; edatrexato; daunomicin; aminopterín; xeloda; ibandronato; CPT-11; inibidor de topoisomerase RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinóides, tais como ácido retinóico; capecitabina; e sais, ácidos ou derivados farmacêuticamente aceitáveis de quaisquer dos acima.

Também são incluídos nesta definição agentes anti-hormonais que agem para regular ou inibir a ação hormonal sobre tumores tais como antiestrógenos e moduladores receptores de estrógenos seletivos (SERMs), que incluem, por exemplo, tamoxifen (incluindo tamoxifen NOVALDEX®), raloxifeno, droloxifeno, 4-hydroxytamoxifen, trioxifeno, queoxifeno, LY117018, onapristona e toremifeno FARESTON; inibidores da aromatase que inibem a enzima aromatase, que regula a produção de estrógenos nas glândulas adrenais, tais como 4 (5)-imidazóis, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestanie, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA® e anastrozol ARIMIDEX®; e anti-andrógenos,

tais como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida e goserelin; bem como troxacitabina (análogo de citosina nucleosídeo de 1,3-dioxolano); oligonucleotídeos sem sentido, particularmente os que inibem a expressão de genes em processos de sinalização relacionados à proliferação celular aberrante, tais como PKC-alfa, Ralf e H-Ras; ribozimas, tais como inibidor da expressão de VEGF (por exemplo, ribozima ANGIOZYME®) e inibidor da expressão de HER2; vacinas, tais como vacinas de terapia genética, por exemplo vacina ALLOVECTIN®, vacina LEUVECTIN® e vacina VAXID®; rIL-2 PROLEUKIN®; inibidor da topoisomerase 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; e os sais, ácidos ou derivados farmacologicamente aceitáveis de quaisquer dos acima.

Um “agente inibidor do crescimento”, da forma utilizada no presente, designa um composto ou composição que inibe o crescimento de uma célula, especialmente célula cancerosa, seja *in vitro* ou *in vivo*. Desta forma, o agente inibidor do crescimento pode ser aquele que reduz significativamente o percentual de células em fase S. Exemplos de agentes inibidores do crescimento incluem agentes que bloqueiam o progresso do ciclo celular (em local diferente da fase S), tais como agentes que induzem a suspensão de G1 e a suspensão da fase M. Bloqueadores clássicos de fase M incluem as vincas (vincristina e vinblastina), taxanos e inibidores da topoisomerase II, tais como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etoposida e bleomicina. Os agentes que prendem G1 também invadem a prisão da fase S, por exemplo, agentes alquilantes de DNA, tais como tamoxifen, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatina, metotrexato, 5-fluorouracil e ara-C. Informações adicionais podem ser encontradas em *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, intitulado *Cell Cycle Regulation, Oncogenes and Antineoplastic Drugs* de Murakami et al (WB Saunders: Filadélfia, 1995), especialmente pág. 13. Os taxanos (paclitaxel e docetaxel)

são drogas anticancerígenas, ambas derivadas da árvore de teixo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhône-Poulenc Rorer), derivado do teixo europeu, é análogo semi-sintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel e docetaxel promovem a reunião de microtubos a partir de dímeros de tubulina e estabilizam microtubos ao evitarem a despolimerização, o que resulta na inibição de mitose em células.

“Doxorubicina” é um antibiótico de antraciclina. O nome químico completo de doxorubicina é (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-trideóxi- α -L-lixo-hexapiranosil)óxi]-7,8,9,10-tetraidro-6,8,11-tri-hidróxi-8-(hidroxiacetil)-1-metóxi-5,12-naftacenodiona.

O termo “bula” é utilizado para indicar instruções costumeiramente incluídas em embalagens comerciais de produtos terapêuticos que contêm informações sobre as indicações, uso, dosagem, administração, contra-indicações e/ou avisos com referência ao uso desses produtos terapêuticos.

COMPOSIÇÕES E MÉTODOS DE ACORDO COM A PRESENTE INVENÇÃO

VARIANTES DE POLIPEPTÍDEOS ZPA

Além dos polipeptídeos ZAP de sequência nativa e comprimento total descritos no presente, contempla-se a preparação de variantes de polipeptídeos ZPA. Variantes de polipeptídeos ZPA podem ser preparadas por meio da introdução de mudanças de nucleotídeos apropriadas no ácido nucleico ZPA e/ou por meio de síntese do polipeptídeo ZPA desejado. Os técnicos no assunto apreciarão que as mudanças de aminoácidos podem alterar processos pós-tradução do polipeptídeo ZPA, tais como a mudança do número ou posição de locais de glicosilação ou alteração das características de ancoramento de membranas.

Variações em um polipeptídeo ZAP de sequência de comprimento total nativo ou em vários domínios de um polipeptídeo ZPA descrito no presente podem ser elaboradas, por exemplo, utilizando quaisquer dos

métodos e orientações para mutações conservadoras e não conservadoras descritas, por exemplo, na Patente Norte-Americana nº 5.364.934. Variações podem ser uma substituição, exclusão ou inserção de um ou mais códons que codificam um polipeptídeo ZPA que resulta em uma alteração da seqüência de aminoácidos do polipeptídeo ZPA em comparação com o polipeptídeo ZPA de seqüência nativa. Opcionalmente, a variação é realizada por meio da substituição de pelo menos um aminoácido com qualquer outro aminoácido em um ou mais dos domínios do polipeptídeo ZPA. Orientação na determinação de qual resíduo de aminoácido pode ser inserido, substituído ou excluído sem prejudicar a atividade desejada pode ser encontrada por meio de comparação da seqüência de um polipeptídeo ZPA com a de moléculas de proteína conhecidas homólogas e minimização da quantidade de alterações de seqüências de aminoácidos realizadas em regiões de alta homologia. Substituições de aminoácidos podem ser o resultado da substituição de um aminoácido com outro aminoácido que possui propriedades químicas e/ou estruturais similares, tais como a substituição de uma leucina com uma serina, ou seja, substituições de aminoácidos conservadores. Inserções ou exclusões podem estar opcionalmente na faixa de cerca de um a cinco aminoácidos. A variação permitida pode ser determinada realizando-se sistematicamente inserções, exclusões ou substituições de aminoácidos na seqüência e testando-se as variantes resultantes para determinar a atividade exibida pela seqüência nativa madura ou de comprimento total.

Em realizações específicas, substituições conservadoras de interesse são exibidas na Tabela 1 sob o título substituições preferidas. Caso essas substituições resultem em mudança da atividade biológica, mudanças mais substanciais, denominadas “exemplos de substituições” na Tabela 1 ou conforme descrito adicionalmente abaixo com referência a classes de aminoácidos, são introduzidas e os produtos, selecionados.

TABELA 1

	<u>Resíduo Original</u>	<u>Exemplos de Substituições</u>	<u>Substituições Preferidas</u>
	Ala (A)	val; leu; ile	Val
	Arg (R)	lys; gln; asn	lys
5	Asn (N)	gln; his; lys; arg	Gln
	Asp (D)	Glu	Glu
	Cys (C)	Ser	Ser
	Gln (Q)	Asn	Asn
	Glu (E)	Asp	Asp
10	Gly (G)	pro; ala	ala
	His (H)	asn; gln; lys; arg	Arg
	Ile (I)	leu; val; met; ala; phe;	
		norleucina	Leu
	Leu (L)	norleucina; ile; val;	
15		met; ala; phe	Ile
	Lys (K)	arg; gln; asn	Arg
	Met (M)	leu; phe; ile	Leu
	Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	Leu
	Pro (P)	ala	ala
20	Ser (S)	thr	thr
	Thr (T)	Ser	Ser
	Trp (W)	tyr; phe	tyr
	Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
	Val (V)	ile; leu; met; phe;	
25		ala; norleucina	Leu

Modificações substanciais da função ou identidade imunológica de um polipeptídeo ZPA são atingidas por meio da seleção de substituições que difiram significativamente de efeito sobre a manutenção (a) da estrutura da

cadeia principal de polipeptídeo na área da substituição, tal como na forma de folha ou em conformação helicoidal; (b) da carga ou hidrofobicidade da molécula no local desejado; ou (c) do volume da cadeia lateral. Os resíduos de ocorrência natural são divididos em grupos com base nas propriedades comuns da cadeia lateral:

- (1) hidrofóbicos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrofílicos neutros: cys, ser, thr;
- (3) ácidos: asp, glu;
- (4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) resíduos que influenciam a orientação de cadeias: gly, pro; e
- (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Substituições não conservadoras causarão a substituição de um membro de uma dessas classes por outra classe. Esses resíduos substituídos podem também ser introduzidos nos locais de substituição conservadores ou, de maior preferência, nos locais restantes (não conservados).

As variações podem ser elaboradas utilizando métodos conhecidos na técnica, tais como mutagênese mediada por oligonucleotídeos (dirigida a local), varrimento de alanina e mutagênese de PCR. Mutagênese dirigida a local (Carter et al, *Nucl. Acids Res.*, 13: 4331 (1986); Zoller et al, *Nucl. Acids Res.*, 10: 6487 (1987)), mutagênese de conjunto (Wells et al, *Gene*, 34: 315 (1985)), mutagênese de seleção de restrição (Wells et al, *Philos. Trans. R. Soc. London SerA*, 317: 415 (1986)) ou outros métodos conhecidos podem ser realizados sobre o DNA clonado para produzir um DNA variante de ZPA.

Pode-se também empregar análise de aminoácidos de varrimento para identificar um ou mais aminoácidos ao longo de uma seqüência contígua. Em certas realizações, aminoácidos de varrimento são aminoácidos neutros relativamente pequenos. Esses aminoácidos incluem alanina, glicina, serina e

cisteína. Alanina é tipicamente um aminoácido de varrimento preferido dentre este grupo porque elimina a cadeia lateral além do beta-carbono e é menos propensa a alterar a conformação de cadeia principal da variante (Cunningham e Wells, *Science*, 244: 1081-1085 (1989)). Alanina é também tipicamente preferida por ser o aminoácido mais comum. Além disso, ela é freqüentemente encontrada em posições enterrada e exposta (Creighton, *The Proteins* (W. H. Freeman & Co., Nova Iorque); Chothia, *J. Mol. Biol.*, 150: 1 (1976)). Caso a substituição de alanina não gere quantidades adequadas de variante, pode-se utilizar um aminoácido isotérico.

MODIFICAÇÕES DE POLIPEPTÍDEOS ZPA

Modificações covalentes de polipeptídeos ZPA também são incluídas no escopo da presente invenção. Um tipo de modificação covalente inclui a reação de resíduos de aminoácidos desejados de um polipeptídeo ZPA com um agente derivante orgânico que é capaz de reagir com cadeias laterais selecionadas ou os resíduos N ou C-terminais do polipeptídeo ZPA. A derivação com agentes bifuncionais é útil, por exemplo, para reticular o polipeptídeo ZPA em uma superfície ou matriz de suporte insolúvel em água para uso no método de purificação de anticorpos anti-ZPA e vice versa. Os agentes reticulantes comumente utilizados incluem, por exemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldeído, N-hidroxissuccinimido ésteres, tais como ésteres com ácido 4-azidossalicílico, imidoésteres homobifuncionais, incluindo dissuccinimidil ésteres tais como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidas bifuncionais, tais como bis-N-maleimido-1,8-octano, e agentes tais como 3-[(p-azidofenil)ditiopropioimidato de metila.

Outras modificações incluem a desamidação de resíduos glutaminila e asparaginila nos resíduos de glutamila e aspartila correspondentes, respectivamente, hidroxilação de prolina e lisina, fosforilação de grupos hidroxila de resíduos serila ou treonila, metilação dos grupos α -

amino de cadeias laterais de lisina, arginina e histidina (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., São Francisco, págs. 79-86 (1983)), acetilação da amina N-terminal e amidação de qualquer grupo carboxila C-terminal.

5 Um outro tipo de modificação covalente de um polipeptídeo ZAP incluído no escopo da presente invenção compreende a alteração do padrão de glicosilação nativa do polipeptídeo. "Alteração do padrão de glicosilação nativa" destina-se, para os propósitos do presente, a indicar a exclusão de uma ou mais porções carboidrato encontradas no polipeptídeo ZPA de seqüência
10 nativa (seja por meio de remoção do local de glicosilação subjacente ou de exclusão da glicosilação por meios químicos e/ou enzimáticos) e/ou adição de um ou mais locais de glicosilação que não estejam presentes no polipeptídeo ZPA de seqüência nativa. Além disso, a expressão inclui alterações qualitativas na glicosilação das proteínas nativas, que envolvem uma alteração da natureza
15 e das proporções das diversas porções carboidrato presentes.

A adição de locais de glicosilação a um polipeptídeo ZPA pode ser realizada por meio de alteração da seqüência de aminoácidos. A alteração pode também ser feita por meio da adição de um ou mais resíduos de serina ou treonina ao polipeptídeo ZPA de seqüência nativa (para locais de
20 glicosilação O-ligados) ou substituição por estes. A seqüência de aminoácidos ZPA pode ser opcionalmente alterada por meio de mudanças em nível de DNA, particularmente por meio de mutação do DNA que codifica o polipeptídeo ZPA em bases previamente selecionadas, de forma que sejam gerados códons que se traduzirão nos aminoácidos desejados.

25 Outro meio de aumentar a quantidade de porções de carboidrato sobre o polipeptídeo ZPA é por meio de acoplamento químico ou enzimático de glicosídeos ao polipeptídeo. Estes métodos são descritos na técnica, tal como em WO 87/05330, publicada em 11 de setembro de 1987, e em Aplin e

Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, págs. 259-306 (1981).

A remoção de porções carboidratos presentes sobre um polipeptídeo ZPA pode ser realizada química ou enzimaticamente, ou por meio de substituição mutacional de códons que codificam resíduos de aminoácidos
5 que servem de alvos para a glicosilação. Métodos de desglicosilação química são conhecidos na técnica e descritos, por exemplo, por Hakimuddin et al, *Arch. Biochem. Biophys.*, 259: 52 (1987) e por Edge et al, *Anal. Biochem.*, 118:131 (1981). A divisão enzimática de porções de carboidrato sobre polipeptídeos pode ser atingida por meio do uso de uma série de endo e exo-
10 glicosidases, conforme descrito por Thotakura et al, *Meth. Enzymol.*, 138: 350 (1987).

Um outro tipo de modificação covalente de um polipeptídeo ZPA compreende a ligação do polipeptídeo ZPA a um dentre uma série de polímeros não proteínáceos, tais como polietileno glicol (PEG), polipropileno
15 glicol ou polioxialquilenos, da forma descrita nas Patentes Norte-Americanas nº 4.640.835, 4.496.689, 4.301.144, 4.670.417, 4.791.192 ou 4.179.337.

Um polipeptídeo ZPA de acordo com a presente invenção pode também ser modificado de maneira a formar uma molécula quimérica que compreende um polipeptídeo ZPA fundido a uma outra seqüência de
20 aminoácidos ou polipeptídeo heteróloga.

Em uma realização, essa molécula quimérica compreende uma fusão de um polipeptídeo ZPA com um domínio de transdução de proteína que dirige o polipeptídeo ZPA para fornecimento a vários tecidos. Em um aspecto, o polipeptídeo ZPA é dirigido para o cérebro através da barreira de sangue do
25 cérebro, utilizando, por exemplo, o domínio de transdução de proteína da proteína TAT do vírus da imunodeficiência humana (Schwarze et al, 1999, *Science* 285: 1569-72).

Em uma outra realização, essa molécula quimérica compreende

uma fusão do polipeptídeo ZPA com um polipeptídeo de marca que fornece um epítopo ao qual pode unir-se seletivamente um anticorpo anti-marca. A marca de epítopo geralmente é colocada no terminal amino ou carboxila do polipeptídeo ZPA. A presença dessas formas marcadas com epítopo do polipeptídeo ZPA pode ser detectada utilizando um anticorpo contra o polipeptídeo de marca. Além disso, o fornecimento da marca de epítopo permite que o polipeptídeo ZPA seja facilmente purificado por meio de purificação de afinidade utilizando um anticorpo anti-marca ou outro tipo de matriz de afinidade que se una à marca de epítopo. Diversos polipeptídeos de marca e seus anticorpos correspondentes são conhecidos na técnica. Exemplos incluem marcas póli-histidina (póli-his) ou póli-histidina-glicina (póli-His-gly); o polipeptídeo de marca flu HA e seu anticorpo 12CA5 (Field et al, *Mol. Cell. Biol.*, 8: 2159-2165 (1988)); a marca c-myc e seus anticorpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 e 9E10 (Evan et al, *Molecular and Cellular Biology*, 5: 3610-3616 (1985)) e a marca glicoproteína D (gD) do vírus simplex da herpes e seu anticorpo (Paborsky et al, *Protein Engineering*, 3 (6): 547-553 (1990)). Outros peptídeos de marca incluem o peptídeo de marca (Hopp et al, *Bio Technology*, 6: 1204-1210 (1988)); o peptídeo de epítopo KT3 (Martin et al, *Science*, 255: 192-194 (1992)); um peptídeo de epítopo de α -tubulina (Skinner et al, *J. Biol. Chem.*, 266: 15163-15166 (1991)); e a marca de peptídeo de proteína 10 de gene T7 (Lutz-Freyermuth et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 87: 6393-6397 (1990)).

Em uma realização alternativa, a molécula quimérica pode compreender uma fusão de um polipeptídeo ZPA com uma imunoglobulina ou uma região específica de uma imunoglobulina. Para uma forma bivalente da molécula quimérica (também denominada "imunoadesina"), essa fusão poderá ser para a região Fc de uma molécula IgG. Em uma realização, a fusão de imunoglobulina inclui as regiões de articulação, CH2 e CH3 ou de articulação,

CH1, CH2 e CH3 de uma molécula IgG1. Para a produção de fusões de imunoglobulina, vide também a Patente Norte-Americana nº 5.428.130.

PREPARAÇÃO DE UM POLIPEPTÍDEO ZPA

A descrição abaixo refere-se principalmente à produção de polipeptídeos ZPA por meio do cultivo de células transformadas ou transfectadas com um vetor que contém ácido nucleico que codifica polipeptídeos ZPA. Contempla-se, naturalmente, que métodos alternativos, que são bem conhecidos na técnica, podem ser empregados para preparar um polipeptídeo ZPA. Uma seqüência de polipeptídeos ZPA ou suas partes pode ser produzida por meio de síntese direta de peptídeos utilizando métodos de fase sólida. Vide, por exemplo, Stewart et al, *Solid-Phase Peptide Synthesis* (W. H. Freeman Co.: Freeman Co., São Francisco CA (1969); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149-2154 (1963). A síntese de proteínas *in vitro* pode ser realizada utilizando métodos manuais ou automaticamente. Pode-se atingir síntese automatizada utilizando, por exemplo, um Sintetizador de Peptídeos da Applied Biosystems (Foster City CA) seguindo-se as instruções do fabricante. Diversas partes de um polipeptídeo ZPA podem ser quimicamente sintetizadas separadamente e combinadas utilizando métodos químicos ou enzimáticos para produzir o polipeptídeo ZPA de comprimento total.

SELEÇÃO E TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS HOSPEDEIRAS

As células hospedeiras são transfectadas ou transformadas com vetores de clonagem ou expressão descritos no presente para a produção de polipeptídeos ZPA e cultivadas em meios nutrientes convencionais modificados conforme apropriado para a indução de promotores, seleção de transformadores ou amplificação dos genes que codificam as seqüências desejadas. As condições de cultivo, tais como meios, temperatura, pH e similares, podem ser selecionadas pelos técnicos no assunto sem experimentação indevida. De forma geral, princípios, protocolos e métodos

práticos para maximizar a produtividade de cultivos celulares podem ser encontrados em *Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach*, M. J. Butler, ed. (IRL Press, 1991) e Sambrook et al, acima.

São conhecidos métodos de transfecção pelos técnicos comuns no assunto, tais como precipitação de CaPO_4 e eletroporação. Dependendo da célula hospedeira utilizada, a transformação é realizada utilizando métodos padrão apropriados para essas células. O tratamento com cálcio empregando cloreto de cálcio, conforme descrito em Sambrook et al, acima, ou eletroporação, é geralmente utilizado para procariotes ou outras células que contenham barreiras de paredes celulares substanciais. Infecção com *Agrobacterium tumefaciens* é utilizada para a transformação de certas células vegetais, conforme descrito por Shaw et al, *Gene*, 23: 315 (1983) e WO 89/05859, publicada em 29 de junho de 1989. Para células de mamíferos sem essas paredes celulares, pode-se empregar o método de precipitação de fosfato de cálcio de Graham e van der Eb, *Virology*, 52: 456-457 (1978). Aspectos gerais de transformações de sistemas hospedeiros de células de mamíferos foram descritos na Patente Norte-Americana nº 4.399.216. Transformações em levedura são tipicamente conduzidas de acordo com o método de Van Solingen et al, *J. Bact.*, 130: 946 (1977) e Hsiao et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.)*, 76: 3829 (1979). Podem também ser utilizados, entretanto, outros métodos de introdução de DNA em células, tais como por meio de microinjeção nuclear, eletroporação, fusão de protoplastas bacterianos com células intactas, ou policações, tais como polibreno e poliornitina. Para diversos métodos de transformação de células de mamíferos, vide Keown et al, *Methods in Enzymology*, 185: 527-537 (1990); e Mansour et al, *Nature*, 336: 348-352 (1988).

Células hospedeiras apropriadas para clonagem ou expressão do DNA nos vetores do presente incluem células procarióticas, de levedura ou

eucarióticas superiores. Os procariotes apropriados incluem, mas sem limitar-se a eubactérias, tais como organismos Gram-negativos ou Gram-positivos, como enterobactérias, tais como *E. coli*. Diversas linhagens de *E. coli* são disponíveis ao público, tais como linhagem de *E. coli* K12 MM294 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); linhagem de *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) e K5 772 (ATCC 53.635). Outras células procarióticas apropriadas incluem enterobactérias tais como *Escherichia*, como *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, como *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, como *Serratia marcescens*, e *Shigella*, bem como bacilos, tais como *B. subtilis* e *B. licheniformis* (por exemplo, *B. licheniformis* 41P descrito em DD 266.710 publicada em 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tais como *P. aeruginosa*, e *Streptomyces*. Estes exemplos são ilustrativos e não limitadores. Em uma realização, a linhagem W3110 é o hospedeiro ou hospedeiro parental porque é uma linhagem hospedeira comum para fermentações de produtos de DNA recombinante. Em certas realizações, a célula hospedeira secreta quantidades mínimas de enzimas proteolíticas. A linhagem W3110, por exemplo, pode ser modificada para efetuar mutação genética nos genes que codificam proteínas endógenas para o hospedeiro, com exemplos desses hospedeiros incluindo *E. coli* W3110 linhagem 1A2, que contém o genótipo completo *tonA*; *E. coli* W3110 linhagem 9E4, que contém o genótipo completo *tonA ptr3*; *E. coli* W3110 linhagem 27C7 (ATCC 55.244), que contém o genótipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kan^r*; *E. coli* W3110 linhagem 37D6, que contém o genótipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r*; *E. coli* W3110 linhagem 40B4, que é a linhagem 37D6 com mutação de exclusão *degP* não resistente a canamicina; e linhagem de *E. coli* que contém protease periplasmática mutante descrita na Patente Norte-Americana nº 4.946.783 emitida em sete de agosto de 1990. Alternativamente, métodos de clonagem *in vivo* tais como PCR ou outras

reações de polimerase de ácido nucleico são apropriados.

Além de procariotes, micróbios eucarióticos tais como leveduras ou fungos filamentosos são hospedeiros de expressão ou clonagem apropriados para vetores que codificam um polipeptídeo ZPA. *Saccharomyces cerevisiae* é um microorganismo hospedeiro eucariótico inferior comumente utilizado. Outros incluem *Schizosaccharomyces pombe* (Beach e Nurse, *Nature*, 290: 140 (1981); EP 139.383 publicada em dois de maio de 1985); hospedeiros de *Kluyveromyces* (Patente Norte-Americana nº 4.943.529; Fleer et al, *Bio/Technology*, 9: 968-975 (1991), tais como *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt et al, *J. Bacteriol.*, 737 (1983)), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilum* (ATCC 36.906; Van den Berg et al, *Bio/Technology*, 8: 135 (1990)), *K. thermotolerans* e *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070; Sreekrishna et al, *J. Basic Microbiol.*, 28: 265-278 (1988)); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 76: 5259-5263 (1979)); *Schwanniomyces* tal como *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394.538, publicada em 31 de outubro de 1990); e fungos filamentosos, tais como *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357, publicada em dez de janeiro de 1991) e hospedeiros *Aspergillus*, tais como *A. nidulans* (Ballance et al, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112: 284-289 (1983); Tilburn et al, *Gene*, 26: 205-221 (1983); Yelton et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 81: 1470-1474 (1984)) e *A. niger* (Kelly e Hynes, *EMBO J.*, 4: 475-479 (1985)). Leveduras metilotróficas são apropriadas no presente e incluem, mas sem limitar-se a levedura capaz de crescimento sobre metanol selecionada a partir dos gêneros que consistem de *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* e *Rhodotorula*. Uma lista de espécies específicas que são exemplos desta classe de leveduras pode ser encontrada em C. Anthony, *The*

Biochemistry of Methylophs, 269 (1982).

As células hospedeiras apropriadas para a expressão de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo ZPA são derivadas de organismos multicelulares. Exemplos de células de invertebrados incluem células de insetos tais como *Drosophila* S2 e *Spodoptera* Sf9, bem como células vegetais. Exemplos de linhagens de células hospedeiras de mamíferos úteis incluem células COS e de ovário de hamster chinês (CHO). Exemplos mais específicos incluem linhagem CV1 de rim de macaco transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); linhagem de rim embriônico humano (células 293 ou 293 subclonadas para crescimento em cultivo em suspensão, Graham et al, *J. Gen. Virol.*, 36: 59 (1977)); células de ovário de hamster chinês/-DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77: 4216 (1980)); células Sertoli de camundongo (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23: 243-251 (1980)); células de pulmão humano (W138, ATCC CCL 75); células de fígado humano (Hep G2, HB 8065); e tumor mamário de camundongo (MMT 060562, ATCC CCL51). A seleção da célula hospedeira apropriada é considerada dentro do conhecimento da técnica.

SELEÇÃO E USO DE VETOR REPRODUZÍVEL

O ácido nucleico (tal como cDNA ou DNA genômico) que codifica um polipeptídeo ou anticorpo de acordo com a presente invenção pode ser inserido em um vetor reproduzível para clonagem (amplificação do DNA) ou para expressão. Diversos vetores são disponíveis ao público. O vetor pode apresentar-se, por exemplo, na forma de um plasmídeo, cosmídeo, partícula viral ou fago. A sequência de ácido nucleico apropriada pode ser inserida no vetor por meio de uma série de procedimentos. De forma geral, DNA é inserido em local(is) de endonuclease de restrição apropriado(s) utilizando métodos conhecidos na técnica. Os componentes de vetor geralmente incluem, mas sem limitar-se a um ou mais dentre uma sequência de sinal caso a sequência

deva ser secretada, um origem de reprodução, um ou mais genes marcadores, um elemento amplificador, um promotor e uma seqüência de término de transcrição. A construção de vetores apropriados que contêm um ou mais destes componentes emprega técnicas de ligação padrão que são conhecidas dos técnicos no assunto.

O anticorpo ou polipeptídeo de acordo com a presente invenção pode ser produzido de forma recombinante não apenas diretamente, mas também como um polipeptídeo de fusão com um polipeptídeo heterólogo, que pode ser uma seqüência de sinal ou outro polipeptídeo que possui um local de divisão específico no terminal N do polipeptídeo ou proteína madura. De forma geral, a seqüência de sinal pode ser um componente do vetor ou pode ser uma parte do DNA que codifica o polipeptídeo ou anticorpo que é inserido no vetor. A seqüência de sinal pode ser uma seqüência de sinal procariótico selecionada, por exemplo, a partir do grupo de fosfatase alcalina, penicilinase, lpp ou líderes de enterotoxina II estáveis ao calor. Para secreção de leveduras, a seqüência de sinal pode ser, por exemplo, o líder de invertase de levedura, líder fator alfa (que inclui líderes fatores α de *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*), este último descrito na Patente Norte-Americana nº 5.010.182) ou líder de fosfatase ácida, o líder de glucoamilase de *C. albicans* (EP 362.179, publicada em quatro de abril de 1990), ou o sinal descrito em WO 90/13646, publicada em quinze de novembro de 1990. Em expressão de células de mamíferos, seqüências de sinal de mamíferos podem ser utilizadas para dirigir a secreção da proteína, tais como seqüências de sinal de polipeptídeos secretados da mesma espécie ou de espécies relacionadas, bem como líderes de secreção viral.

Tanto os vetores de expressão quanto de clonagem contêm uma seqüência de ácido nucleico que permite que o vetor se reproduza em uma ou mais células hospedeiras selecionadas. Essas seqüências são conhecidas

para uma série de bactérias, levedura e vírus. A origem de reprodução do plasmídeo pBR322 é apropriada para a maior parte das bactérias Gram-negativas, a origem de plasmídeo 2 μ é apropriada para levedura e diversas origens virais (SV40, polioma, adenovírus, VSV ou BPV) são úteis para vetores de clonagem em células de mamíferos.

Os vetores de clonagem e de expressão conterão tipicamente um gene de seleção, também denominado um marcador selecionável. Os genes de seleção típicos codificam proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou outras toxinas, tais como ampicilina, neomicina, metotrexato ou tetraciclina; (b) complementam deficiências auxotróficas; ou (c) fornecem nutrientes fundamentais não disponíveis a partir de meios complexos, tais como o gene codificador de D-alanino racemase para *Bacilli*.

Um exemplo de marcadores selecionáveis apropriados para células de mamíferos são os que permitem a identificação de células competentes para absorção do ácido nucleico codificador do polipeptídeo ou anticorpo, tal como DHFR ou timidino quinase. Uma célula hospedeira apropriada, ao empregar-se DHFR do tipo selvagem, é a linhagem de células de CHO com deficiência na atividade de DHFR, preparada e propagada conforme descrito por Urlaub et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 77: 4216 (1980). Um gene de seleção apropriado para uso em levedura é o gene *trp1* presente no plasmídeo de levedura YRp7. Stinchcomb et al, *Nature* 282: 39 (1979); Kingsman et al, *Gene*, 7: 141 (1979); Tschemper et al, *Gene*, 10: 157 (1980). O gene *trp1* fornece um marcador de seleção para uma linhagem mutante de levedura que não possui a capacidade de crescimento em triptofano, tal como ATCC nº 44076 ou PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85: 12 (1977).

Os vetores de expressão e de clonagem normalmente contêm um promotor ligado operativamente à sequência de ácido nucleico codificadora do polipeptídeo ou anticorpo de acordo com a presente invenção para dirigir a

síntese de mRNA. São bem conhecidos promotores reconhecidos por uma série de células hospedeiras potenciais. Os promotores apropriados para uso com hospedeiros procarióticos incluem os sistemas promotores de β -lactamase e lactose (Chang et al, *Nature*, 275: 615 (1978); Goeddel et al, *Nature*, 281: 544 (1979)), fosfatase alcalina, um sistema promotor de triptofano (trp) (Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8: 4057 (1980); EP 36.776) e promotores híbridos, tais como o promotor tac (deBoer et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 80: 21-25 (1983)). Os promotores para uso em sistemas bacterianos também conterão uma sequência Shine-Dalgarno (S. D.) ligada operativamente ao DNA que codifica o polipeptídeo ou anticorpo de acordo com a presente invenção.

Exemplos de seqüências promotoras apropriadas para uso com hospedeiros de leveduras incluem os promotores para 3-fosfoglicerato quinase (Hitzeman et al, *J. Biol. Chem.*, 255: 2073 (1980)) ou outras enzimas glicolíticas (Hess et al, *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7: 149 (1968); Holland, *Biochemistry*, 17: 4900 (1978)), tais como enolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, hexoquinase, piruvato descarboxilase, fosfofrutoquinase, glicose-6-fosfato isomerase, 3-fosfoglicerato mutase, piruvato quinase, triosefosfato isomerase, fosfoglicose isomerase e glucoquinase.

Outros promotores de leveduras, que são promotores indutíveis que apresentam a vantagem adicional de transcrição controlada por condições de crescimento, são as regiões promotoras para álcool desidrogenase 2, isocitocroma C, fosfatase ácida, enzimas degradadoras associadas ao metabolismo de nitrogênio, metalotioneína, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e enzimas responsáveis pela utilização de maltose e galactose. Os vetores apropriados e promotores para uso na expressão de levedura são adicionalmente descritos em EP 73.657.

A transcrição de ácido nucleico a partir de vetores em células hospedeiras de mamíferos é controlada, por exemplo, por promotores obtidos a

partir dos genomas de vírus tais como vírus de polioma, vírus da catapora (UK 2.211.504 publicada em cinco de julho de 1989), adenovírus (tal como Adenovírus 2), vírus de papiloma bovino, vírus de sarcoma aviário, citomegalovírus, retrovírus, vírus da hepatite B e Vírus Símio 40 (SV40), de
5 promotores de mamíferos heterólogos, tais como o promotor de actina ou promotor de imunoglobulina, e de promotores de choque de calor, desde que esses promotores sejam compatíveis com os sistemas de células hospedeiras.

A transcrição de DNA codificador de um polipeptídeo ou anticorpo de acordo com a presente invenção por eucariotes superiores pode ser
10 aumentada por meio da inserção de uma seqüência amplificadora no vetor. Os amplificadores são elementos de DNA com ação cis, normalmente cerca de 10 a 300 bp, que agem sobre um promotor para aumentar a sua transcrição. Muitas seqüências amplificadoras são agora conhecidas a partir de genes de mamíferos (globina, elastase, albumina, α -fetoproteína e insulina). Tipicamente,
15 entretanto, utilizar-se-á um amplificador de vírus de célula eucariótica. Exemplos incluem o amplificador SV40 do lado posterior da origem de reprodução (bp 100-270), o amplificador promotor precoce de citomegalovírus, o amplificador de polioma do lado posterior da origem de reprodução e amplificadores de adenovírus. O amplificador pode ser dividido no vetor em
20 uma posição 5' ou 3' para a seqüência codificadora de um polipeptídeo ou anticorpo de acordo com a presente invenção, mas encontra-se localizado preferencialmente em um local a 5' do promotor. Os vetores de expressão utilizados em células hospedeiras eucarióticas (células de leveduras, fungos, insetos, plantas, animais, seres humanos ou nucleadas de outros organismos
25 multicelulares) também conterão as seqüências necessárias para o término da transcrição e estabilização do mRNA. Essas seqüências são normalmente disponíveis a partir das regiões não traduzidas 5' e, ocasionalmente, 3' dos DNAs ou cDNAs virais ou eucarióticos. Estas regiões contêm segmentos de

nucleotídeos transcritos na forma de fragmentos poliadenilados na parte não traduzida do mRNA codificador de polipeptídeo ou anticorpo.

Ainda outros métodos, vetores e células hospedeiras apropriadas para adaptação à síntese do polipeptídeo ou anticorpo de acordo com a presente invenção em cultivo de células de vertebrados recombinantes são descritos em Gething et al, *Nature*, 293: 620-625 (1981); Mantei et al, *Nature*, 281: 40-46 (1979); EP 117.060; e EP 117.058.

DETECÇÃO DA EXPRESSÃO/AMPLIFICAÇÃO GENÉTICA

A expressão e/ou amplificação genética pode ser medida em uma amostra diretamente, por exemplo, por meio de Southern Blot, Northern Blot convencional para quantificar a transcrição de mRNA (Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77: 5201-5205 (1980)), dot blot (análise de DNA) ou hibridização *in situ*, utilizando uma sonda adequadamente marcada, com base nas seqüências fornecidas no presente. Alternativamente, podem ser empregados anticorpos que podem reconhecer duplex específicos, incluindo duplex de DNA, duplex de RNA e duplex híbridos de DNA-RNA ou duplex de DNA e proteína. Os anticorpos, por sua vez, podem ser marcados e o teste pode ser conduzido com o duplex unido a superfície, de forma que, mediante a formação de duplex sobre a superfície, a presença de anticorpo unido ao duplex possa ser detectada.

A expressão genética, alternativamente, pode ser medida por meio de métodos imunológicos, tais como manchas imunohistoquímicas de células ou seções de tecidos e teste de cultivo celular ou fluidos do corpo, para quantificar diretamente a expressão de produto genético. Os anticorpos úteis para manchas imunohistoquímicas e/ou teste de fluidos de amostra podem ser monoclonais ou policlonais e podem ser preparados em qualquer mamífero ou podem ser sintetizados (tais como os anticorpos monoclonais de acordo com a presente invenção). Convenientemente, os anticorpos podem ser preparados

contra um polipeptídeo ZPA de seqüência nativa ou contra um peptídeo sintético com base nas seqüências de DNA fornecidas no presente ou contra uma seqüência exógena fundida a DNA que codifica um polipeptídeo ZPA e que codifica um epítipo de anticorpo específico.

5

PURIFICAÇÃO DE POLIPEPTÍDEOS ZPA

Formas de polipeptídeos ZPA podem ser recuperadas de meio de cultivo ou de lisatos de células hospedeiras. Se unido por membrana, ele pode ser liberado da membrana utilizando uma solução de detergente apropriada (tal como TRITON-X® 100) ou por meio de divisão enzimática. Células empregadas na expressão de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo ZPA podem ser rompidas por vários meios físicos ou químicos, tais como ciclo de congelamento e descongelamento, sonicação, rompimento mecânico ou agentes lisantes celulares. Segundo uma realização, é desejável que um polipeptídeo ZPA seja purificado a partir de proteínas de células recombinantes ou polipeptídeos. Os procedimentos a seguir são exemplos de procedimentos de purificação apropriados: fracionamento sobre uma coluna de troca de íons; precipitação em etanol; HPLC de fase reversa; cromatografia sobre sílica ou sobre uma resina de troca de cátions, tal como DEAE; cromatoconcentração; SDS-PAGE, precipitação de sulfato de amônio; filtragem de gel utilizando, por exemplo, Sephadex G-75; colunas de proteína A Sepharose para remover contaminantes tais como IgG; e colunas quelantes metálicas para unir formas marcadas por epítipo do polipeptídeo ZPA. Vários métodos de purificação de proteínas podem ser empregados e esses métodos são conhecidos na técnica e descritos, por exemplo, em Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice* (Springer-Verlag: Nova Iorque, 1982). A(s) etapa(s) de purificação selecionada(s) dependerá(ão), por exemplo, da natureza do processo de produção utilizado e do polipeptídeo ZPA específico produzido. Segundo uma realização, um polipeptídeo ZPA é

purificado por meio de cromatografia de afinidade utilizando um anticorpo de acordo com a presente invenção.

TESTE DE INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

A atividade inibidora de um ou mais agonistas e/ou polipeptídeos ZPA de acordo com a presente invenção sobre o crescimento e a proliferação celular pode ser medida utilizando os testes descritos no presente e outros testes conhecidos na técnica.

Modelos animais de tumores e cânceres (tais como câncer de mama, câncer do cólon, câncer da próstata, câncer do pulmão etc.) incluem animais não recombinantes e recombinantes (transgênicos). Modelos de animais não recombinantes incluem, por exemplo, modelos de roedores, tais como murinos. Esses modelos podem ser gerados por meio da introdução de células de tumores em camundongos singeneicos utilizando técnicas padrão, tais como injeção subcutânea, injeção na veia da cauda, implante no baço, implante intraperitoneal, implante sob a cápsula renal ou implante de ortopinos, tais como células de câncer do cólon implantadas em tecido do cólon. Vide, por exemplo, a Patente PCT nº WO 97/33551, publicada em dezoito de setembro de 1997. Provavelmente, a espécie animal mais freqüentemente utilizada em estudos oncológicos são camundongos imunodeficientes e, particularmente, camundongos brutos. A observação de que o camundongo bruto com hipo/aplasia tímica poderá agir com sucesso como hospedeiro para xenoenxertos de tumor humano gerou o seu uso disseminado com este propósito. O gene *nu* recessivo autossômico foi introduzido em uma quantidade muito grande de linhagens congênicas distintas de camundongos brutos, que incluem, por exemplo, ASW, A/He, AKR, BALB/c, B10.LP, C17, C3H, C57BL, C57, CBA, DBA, DDD, I/st, NC, NFR, NFS, NFS/N, NZB, NZC, NZW, P, RIII e SJL. Além disso, uma ampla variedade de outros animais com defeitos imunológicos herdados diferentes do camundongo bruto foi criada e utilizada

como receptores de xenoenxertos de tumores. Para detalhes adicionais, vide, por exemplo, *The Nude Mouse in Oncology Research*, E. Boven e B. Winograd, eds. (CRC Press, Inc., 1991).

As células introduzidas nesses animais podem ser derivadas de linhagens de células de câncer/tumor conhecidas, tais como quaisquer das linhagens de células de tumores relacionadas acima e, por exemplo, a linhagem de células B104-1-1 (linhagem de células NIH-3T3 estáveis transfectadas com o protooncogene *neu*); células NIH-3T3 transfectadas com *ras*; Caco-2 (ATCC HTB-37); ou uma linhagem de células de adenocarcinoma do cólon humano grau II moderadamente bem diferenciadas, HT-29 (ATCC HTB-38); ou de tumores e cânceres. Amostras de células de câncer ou de tumor podem ser obtidas de pacientes que passam por cirurgia, utilizando condições padrão que envolvem o congelamento e armazenagem em nitrogênio líquido. Karmali et al, *Br. J. Cancer*, 48: 689-696 (1983).

Células de tumores podem ser introduzidas em animais, tais como camundongos brutos, por meio de uma série de procedimentos. O espaço subcutâneo (s. c.) em camundongos é muito apropriado para o implante de tumores. Os tumores podem ser transplantados por via subcutânea na forma de blocos sólidos, de biópsias de agulhas utilizando trocarte ou de suspensões celulares. Para implantes de blocos sólidos ou trocarte, fragmentos de tecidos de tumor com tamanho apropriado são introduzidos no espaço subcutâneo. Suspensões celulares são recém preparadas a partir de tumores primários ou linhagens de células tumorosas estáveis e injetadas por via subcutânea. Células de tumores podem também ser injetadas na forma de implantes subdérmicos. Nesse local, o inoculado é depositado entre a parte inferior do tecido conectivo dérmico e o tecido subcutâneo.

Modelos animais de câncer de mama podem ser gerados, por exemplo, por meio do implante de células de neuroblastoma de ratos (dos

quais o oncogene *neu* foi inicialmente isolado) ou células NIH-3T3 transformadas por *neu* em camundongos brutos, essencialmente conforme descrito por Drebin et al, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 83: 9129-9133 (1986).

De forma similar, modelos de câncer do cólon em animais podem
5 ser gerados por meio da passagem de células de câncer do cólon em animais, tais como camundongos brutos, gerando o surgimento de tumores nesses animais. Um tratamento ortotópico de câncer de cólon humano em camundongos brutos foi descrito, por exemplo, por Wang et al, *Cancer Research*, 54: 4726-4728 (1994) e Too et al, *Cancer Research*, 55: 681-684
10 (1995). Este modelo é baseado no chamado "METAMOUSE®", vendido pela AntiCancer, Inc. (San Diego, Califórnia).

Tumores que surgem em animais podem ser removidos e cultivados *in vitro*. Células dos cultivos *in vitro* podem passar em seguida para animais. Esses tumores podem servir de alvos para testes adicionais ou
15 seleção de drogas. Alternativamente, os tumores resultantes da passagem podem ser isolados e o RNA das células antes da passagem e das células isoladas após uma ou mais rodadas de passagem é analisado para determinar a expressão diferencial de genes de interesse. Essas técnicas de passagem podem ser realizadas com quaisquer linhagens de células de câncer ou tumor
20 conhecidas.

Meth A, CMS4, CMS5, CMS21 e WEHI-164, por exemplo, são fibrossarcomas induzidos quimicamente de fêmeas de camundongos BALB/c (DeLeo et al, *J. Exp. Med.*, 146: 720: 1977)), que fornecem um sistema modelo altamente controlável para estudo das atividades antitumorosas de diversos
25 agentes. Palladino et al, *J. Immunol.*, 138: 4023-4032 (1987). Resumidamente, as células de tumores são propagadas *in vitro* em cultivo celular. Antes da injeção nos animais, as linhagens celulares são lavadas e suspensas em tampão, sob densidade celular de cerca de 10×10^6 a 10×10^7 células/ml. Os

animais são infectados por via subcutânea em seguida com 10 a 100 μ l da suspensão celular, aguardando de uma a três semanas pelo surgimento de um tumor.

Além disso, o carcinoma do pulmão de Lewis (3LL) de camundongos, que é um dos tumores experimentais mais completamente estudados, pode ser utilizado como modelo de tumor para investigação. A eficácia neste modelo de tumor foi correlacionada com efeitos benéficos no tratamento de pacientes humanos diagnosticados com carcinoma do pulmão de células pequenas (SCCL). Este tumor pode ser introduzido em camundongos normais mediante injeção de fragmentos de tumores de um camundongo afetado ou de células mantidas em cultivo. Zupi et al, *Br. J. Cancer*, 41: Supl. 4, 30 (1980). Evidências indicam que tumores podem ser iniciados a partir de injeção de até uma única célula e que uma proporção muito alta das células tumorosas infectadas sobrevive. Para informações adicionais sobre este modelo de tumor, vide Zacharski, *Haemostasis* 16: 300-320 (1986).

Uma forma de avaliar a eficácia de um composto de teste em um modelo animal com um tumor implantado é a medição do tamanho do tumor antes e depois do tratamento. Tradicionalmente, o tamanho de tumores implantados foi medido com paquímetro deslizante em duas ou três dimensões. A medida limitada a duas dimensões não reflete precisamente o tamanho do tumor; ela é, portanto, normalmente convertida no volume correspondente utilizando uma fórmula matemática. A medida do tamanho do tumor é, portanto, muito imprecisa. Os efeitos terapêuticos de uma possível droga podem ser mais bem descritos como atraso do crescimento induzido por tratamento e atraso do crescimento específico. Uma outra variável importante na descrição do crescimento de tumores é o tempo para a dobra do volume de tumor. Programas de computador para o cálculo e a descrição de crescimento de tumores também são disponíveis, tais como o programa relatado por Rygaard e

Spang-Thomsen, *Proc. 6th Int. Workshop on Immune-Deficient Animals*, Wu e Sheng, eds. (Basel, 1989), pág. 301. Observa-se, entretanto, que a necrose e reações inflamatórias após o tratamento podem realmente resultar em um aumento do tamanho do tumor, pelo menos inicialmente. Estas mudanças necessitam, portanto, ser cuidadosamente monitoradas por meio de uma combinação de um método morfométrico e análise citométrica de fluxo.

Além disso, modelos animais recombinantes (transgênicos) podem ser elaborados por meio da introdução da parte de codificação de um gene ZPA identificado no presente no genoma de animais de interesse, utilizando técnicas padrão de produção de animais transgênicos. Os animais que podem servir de alvo para manipulação transgênica incluem, sem limitação, camundongos, ratos, coelhos, cobaias, carneiros, cabras, porcos, peixes-zebra e primatas não humanos, tais como babuínos, chimpanzés e macacos. Os métodos conhecidos na técnica para introduzir um transgene nesses animais incluem microinjeção pronucleica (Patente Norte-Americana nº 4.873.191); transferência genética mediada por retrovírus em linhagens de germens (por exemplo, Van der Putten et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 82: 6148-615 (1985)); direcionamento genético em células-haste embrionárias (Thompson et al, *Cell*, 56: 313-321 (1989)); eletroporação de embriões (Lo, *Mol. Cell. Biol.*, 3: 1803-1814 (1983)); e transferência genética mediada por esperma, Lavitrano et al, *Cell*, 57: 717-73 (1989). Para análise, vide, por exemplo, a Patente Norte-Americana nº 4.736.866.

Para o propósito da presente invenção, os animais transgênicos incluem aqueles que conduzem o transgene somente em uma parte das suas células ("animais mosaico"). O transgene pode ser integrado na forma de um único transgene ou em concatâmeros, tais como conjuntos cabeça a cabeça ou cabeça a cauda. A introdução seletiva de um transgene em um tipo de célula específico também é possível seguindo-se, por exemplo, o método de Lasko et

al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89: 6232-636 (1992). A expressão do transgene em animais transgênicos pode ser monitorada por meio de métodos padrão. Pode-se utilizar análise Southern Blot ou amplificação por PCR, por exemplo, para verificar a integração do transgene. O nível de expressão de mRNA pode ser analisado em seguida utilizando métodos tais como hibridização *in situ*, análise Northern Blot, PCR ou imunocitoquímica. Os animais são adicionalmente examinados em busca de sinais de desenvolvimento de tumores ou câncer.

Alternativamente, podem ser construídos animais knockout, tais como peixe-zebra, que contêm um gene alterado ou defeituoso que codifica um polipeptídeo ZPA identificado no presente, como resultado da recombinação homóloga entre um gene endógeno que codifica um polipeptídeo ZPA e DNA genômico alterado que codifica o mesmo polipeptídeo introduzido em uma célula embriônica do animal. cDNA que codifica um polipeptídeo ZPA específico pode ser utilizado, por exemplo, para clonar DNA genômico que codifica aquele polipeptídeo de acordo com métodos estabelecidos. Uma parte do DNA genômico que codifica um polipeptídeo ZPA específico pode ser excluída ou substituída com outro gene, tal como um gene que codifica um marcador selecionável que pode ser utilizado para monitorar a integração. De forma similar, podem ser elaborados animais knockout diferentes de peixe-zebra que contêm um gene defeituoso ou alterado que codifica um homólogo endógeno de um polipeptídeo ZPA, como resultado de recombinação homóloga entre um gene endógeno que codifica um homólogo de ZPA e DNA genômico alterado que codifica o polipeptídeo ZPA homólogo introduzido em uma célula embriônica do animal. Tipicamente, várias quilobases de DNA lateral inalterado (nas extremidades 5' e 3') são incluídas no vetor. Vide, por exemplo, Thomas e Capecchi, *Cell*, 51: 503 (1987) para uma descrição de vetores recombinantes homólogos. O vetor é introduzido em uma linhagem de

células haste embriônicas (tal como por meio de eletroporação) e as células em que o DNA introduzido recombinau-se de maneira homóloga com o DNA endógeno são selecionadas. Vide, por exemplo, Li et al, *Cell*, 69: 915 (1992). As células selecionadas são injetadas em seguida em um blastocisto de um animal (tal como camundongo ou rato) para formar quimeras de agregação. Vide, por exemplo, Bradley, em *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson, ed. (IRL: Oxford, 1987), págs. 113-152. Pode ser implantado em seguida um embrião quimérico em um feto de animal fêmea pseudoprenha apropriado e o embrião é trazido a termo para criar um animal knockout. A prole que abriga o DNA recombinado de forma homóloga nas suas células germen pode ser identificada por meio de técnicas padrão e utilizada para criar animais em que todas as células do animal contêm o DNA recombinado de forma homóloga. Os animais knockout podem ser caracterizados, por exemplo, pela sua capacidade de defesa contra certas condições patológicas e pelo seu desenvolvimento de condições patológicas, devido à ausência de um ou mais polipeptídeos ZPA.

Podem ser construídos animais knockdown (tais como peixe-zebra), em que se evita que o gene que codifica um polipeptídeo ZPA seja transcrito e/ou traduzido. RNA silenciador ou morfolidos, por exemplo, podem ser utilizados para bloquear a tradução de um ou mais polipeptídeos ZPA. Nesses animais, o gene que codifica um polipeptídeo ZPA permanece intacto, mas a proteína codificada por aquele gene não é produzida.

A eficácia de anticorpos que unem especificamente um polipeptídeo ZPA identificado no presente e as outras possíveis drogas pode também ser testada no tratamento de tumores animais espontâneos. Um alvo apropriado para esses estudos é o carcinoma de células escamosas (SCC) oral felino. SCC oral felino é um tumor maligno altamente invasivo que é a malignidade oral mais comum em gatos, representando mais de 60% dos

tumores orais relatados nessa espécie. Ele raramente sofre metástase para locais distantes, embora essa baixa incidência de metástase possa ser um mero reflexo dos curtos tempos de sobrevivência de gatos com esse tumor. Esses tumores normalmente não são adequados para cirurgia, principalmente devido à anatomia da cavidade oral felina. Atualmente, não há tratamento eficaz desse tumor. Antes do início do estudo, cada gato sofre exame clínico completo e biópsia e é varrido por tomografia computadorizada (CT). Gatos diagnosticados com tumores de células escamosas orais sublinguais são excluídos do estudo. A língua pode paralisar-se como resultado desse tumor e até se o tratamento matar o tumor, os animais podem não ser capazes de alimentar-se. Cada gato é tratado repetidamente por período de tempo mais longo. Fotografias do tumor serão tomadas diariamente durante o período de tratamento e em cada nova verificação subsequente. Após o tratamento, cada gato sofre outro varrimento de CT. Os varrimentos de CT e os radiogramas torácicos são avaliados a cada oito semanas em seguida. Os dados são avaliados para determinar diferenças de sobrevivência, reação e toxicidade em comparação com grupos controle. Reação positiva pode necessitar de evidência de regressão de tumores, preferencialmente com melhoria da qualidade de vida e/ou aumento do período de vida.

Além disso, outros tumores animais espontâneos, tais como fibrossarcoma, adenocarcinoma, linfoma, condroma ou leiomiossarcoma de cães, gatos e babuínos podem também ser testados. Destes, adenocarcinoma mamário em cães e gatos é um modelo preferido, pois a sua aparência e comportamento são muito similares aos de seres humanos. Entretanto, o uso deste modelo é limitado pela rara ocorrência deste tipo de tumor em animais.

ELABORAÇÃO DE PEIXE-ZEBRA TRANSGÊNICO

Peixe-zebra transgênico pode ser elaborado conforme descrito no presente, ou como bem conhecido na técnica (vide, por exemplo, Westerfield,

The Zebrafish Book, A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio). quarta edição, University of Oregon Press: Eugene (2000)).

Construções transgênicas podem ser introduzidas em células de peixes-zebra (tal como no estágio de desenvolvimento de uma a quatro células) e

5 os embriões injetados são mantidos em desenvolvimento em seguida até o momento apropriado para examinar os efeitos do transgene. As construções transgênicas podem ser polinucleotídeos lineares ou circulares e podem incluir opcionalmente seqüências reguladoras conforme descrito no presente. Métodos de introdução da construção transgênica em células
10 de peixe-zebra embriônicos incluem, mas sem limitar-se a microinjeção, eletroporação, bombardeamento com disparador de partículas, infecções virais e por meio de lipossomos. Pode-se incluir uma molécula relatora na construção transgênica para facilidade de determinação da presença do transgene no peixe-zebra adulto (tal como GFP ou alguma outra marca
15 facilmente identificável); em situações em que nenhum relator foi incluído na construção, o ácido nucleico de peixe-zebra (tal como isolado a partir de um corte da cauda de um peixe-zebra adulto) pode ser examinado para determinar a presença do transgene por meio de métodos genéticos bem conhecidos tais como PCR ou Southern Blot.

20 Qualquer linhagem e/ou variedade de peixe-zebra disponível comercialmente ou de laboratório pode ser utilizada nas metodologias descritas no presente. Em algumas realizações, os peixes-zebra são de linhagens congênicas (que incluem, mas sem limitar-se a SJD, C32 e WIK). Em algumas realizações, a visualização da atividade transgênica é facilitada pelo uso de
25 peixe-zebra que contém outras mutações, tais como peixe-zebra mutante “não pigmentado” substancialmente isento de deposição de melanoforos (tais como mutantes albinos) ou deposição de irridiforos (tais como orbison Roy, mutantes transparentes).

TESTES DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE APOPTÓTICA

Testes que são úteis para medir a atividade pró-apoptótica ou anti-apoptótica dos agonistas, progenitores e antagonistas de acordo com a presente invenção incluem os testes do Exemplo 3 ou outros testes apropriados conhecidos na técnica, tais como os incluídos abaixo.

Os testes de atividade apoptótica incluem, por exemplo, testes de citotoxicidade (tais como testes radiométricos ou não radiométricos que medem o aumento da permeabilidade de membrana ou testes colorimétricos que medem a redução da atividade metabólica de mitocôndrias); testes que medem a fragmentação de DNA (que incluem, mas sem limitar-se a tradução por cortes *in situ* (ISNT) e marcação de terminais por cortes X-dUTP mediada por TdT (TUNEL) (Cole e Ross, *Devel. Biol.* 240: 123-142 (2001))); testes que medem alterações da organização e embalagem celular que são precursores da morte celular (tais como alterações da assimetria das membranas (que incluem, mas sem limitar-se à translocalização de fosfatidilserina (Nicoletti et al, *Common Methods for Measuring Apoptotic Cell Death by Flow Cytometry, The Purdue Cytometry CD-ROM Volume 3*, J. Parker, C. Stewart, Editores Convidados, J. Paul Robinson, Editor, Universidade Purdue, West Lafayette, 1997, ISBN 1-890473-02-2) e liberação de citocromo C ou AIF da mitocôndria para o citoplasma); e testes que medem a ativação de uma ou mais cascatas bioquímicas que resultam em apoptose (incluindo, mas sem limitar-se a ativação de caspase (vide, por exemplo, Exemplo 3) e divisão de poli-ADP-ribose polimerase (PARP)). Testes de atividade apoptótica podem ser realizados sobre células isoladas e/ou sobre populações celulares.

ESTUDOS DE UNIÃO DE ANTICORPOS

Estudos de união de anticorpos podem ser conduzidos utilizando métodos de teste conhecidos, tais como ensaios de ligação competitivos, ensaios de sanduíche direto e indireto e ensaios de imunoprecipitação. Zola,

Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques (CRC Press, Inc. 1987), págs. 147-158.

Testes de união competitivos dependem da capacidade de um padrão marcado de competir com o analisado de amostra de teste pela união com uma quantidade limitada de anticorpo. A quantidade de proteína alvo na amostra de teste é inversamente proporcional à quantidade de padrão que se une aos anticorpos. Para facilitar a determinação da quantidade de padrão que se une, os anticorpos podem ser insolubilizados antes ou depois da competição, de forma que o padrão e o analisado que são unidos aos anticorpos possam ser convenientemente separados do padrão e do analisado que permanece não unido.

Testes de sanduíche envolvem o uso de dois anticorpos, cada qual capaz de unir-se a uma parte imunogênica diferente, ou epítopo, da proteína a ser detectada. Em um teste de sanduíche, o analisado de amostra de teste é unido por um primeiro anticorpo que é imobilizado sobre um suporte sólido e, em seguida, um segundo anticorpo une-se ao analisado, de maneira a formar um complexo de três partes insolúvel. Vide, por exemplo, as Patentes Norte-Americanas nº 4.376.110. O segundo anticorpo pode ser ele próprio marcado com uma porção detectável (testes de sanduíche diretos) ou pode ser medido utilizando um anticorpo antiimunoglobulina que é marcado com porção detectável (teste de sanduíche indireto). Um tipo de teste de sanduíche é, por exemplo, teste ELISA, caso em que a porção detectável é uma enzima.

Testes ELISA competitivos podem ser realizados para selecionar polipeptídeos, agonistas ou antagonistas para os que se unem especificamente a um polipeptídeo ZPA, união esta que pode ser inibida por um anticorpo monoclonal de acordo com a presente invenção.

Em um exemplo, um teste ELISA competitivo pode ser conduzido seguindo-se os métodos conhecidos na técnica. Uma forma truncada ou de

comprimento total de uma proteína ZPA nativa (2 µg/ml de PBS) pode ser revestida sobre uma placa de microtítulos a 4 °C por uma noite à temperatura ambiente por duas horas. As cavidades podem ser bloqueadas por meio da adição de 65 µl de BSA a 1% por trinta minutos, seguida por 40 µl de Tween 20 a 1% por outros trinta minutos. Em seguida, as cavidades podem ser lavadas com PBS – 0,05% Tween 20 por cinco vezes. Várias concentrações de anticorpo (em tampão ELISA) podem ser incubadas nas cavidades por trinta minutos à temperatura ambiente. Em seguida, polipeptídeos ou anticorpos a serem testados podem ser adicionados a cavidades diferentes por dez minutos em uma concentração que normalmente produziria capacidade de união de 90% na ausência do anticorpo. Em seguida, as cavidades podem ser lavadas com PBS – 0,05% Tween 20 por cinco vezes. A união pode ser quantificada por meio de métodos conhecidos na técnica.

Para imunohistoquímica, a amostra de tecido pode ser nova ou congelada, ou pode ser embutida em parafina e fixada com um conservante tal como formalina, por exemplo.

TESTES DE TUMORES COM BASE EM CÉLULAS

Testes com base em células e modelos animais de disfunções proliferativas, tais como tumores, podem ser utilizados para verificar a atividade inibidora dos antagonistas de acordo com a presente invenção. Testes apropriados são conhecidos na técnica. Células de um tipo de célula conhecidamente envolvido em uma disfunção proliferativa podem ser transfectadas, por exemplo, com um ou mais cDNAs de ZPA do presente e a capacidade desses cDNAs de inibir o crescimento é analisada na presença ou ausência de um antagonista. Caso a disfunção proliferativa seja câncer, células tumorosas apropriadas incluem, por exemplo, linhagens de células tumorosas estáveis tais como a linhagem de células B104-1-1 (linhagem de células NIH-3T3 estáveis transfectadas com o protooncogene *neu*) e células NIH-3T3

transfectadas com *ras*, que podem ser transfectadas com uma seqüência ZPA e monitoradas para determinar o crescimento tumorigênico. Essas linhagens celulares transfectadas podem ser utilizadas em seguida para testar a capacidade de anticorpos ou composições de anticorpos poli ou monoclonais de inibir o crescimento de células tumorigênicas exercendo atividade citotóxica ou citostática sobre o crescimento das células transformadas, ou mediando a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC).

Além disso, cultivos primários derivados de tumores em animais transgênicos (conforme descrito acima) podem ser utilizados nos testes com base em células do presente, embora sejam preferidas linhagens de células estáveis. Métodos de derivação de linhagens celulares contínuas de animais transgênicos são conhecidos na técnica. Vide, por exemplo, Small et al, *Mol. Cell. Biol.*, 5: 642-648 (1985).

TERAPIA GENÉTICA

São descritos abaixo métodos e composições por meio dos quais sintomas de doenças podem ser melhorados. Os polipeptídeos ZPA (que incluem variantes de polipeptídeos ZPA) descritos no presente e os antagonistas e anticorpos de acordo com a presente invenção podem ser empregados de acordo com a presente invenção por meio de expressão de cada um *in vivo*, o que é freqüentemente denominado terapia genética. Variantes de polipeptídeos ZPA, por exemplo, podem ser expressas em células utilizando estes métodos. Segundo uma realização, os métodos ou vetores utilizados para expressar os polipeptídeos ZPA (incluindo variantes) envolvem o uso de um agente direcionador para dirigir o veículo que contém o polipeptídeo ZPA ou molécula de ácido nucleico para um tecido desejado.

Existem duas abordagens principais para a obtenção do ácido nucleico (opcionalmente contido em um vetor) nas células de mamíferos: *in vivo* e *ex vivo*. Para fornecimento *in vivo*, o ácido nucleico é injetado

diretamente no mamífero, normalmente nos locais em que é necessário o polipeptídeo ZPA, ou seja, o local de síntese do polipeptídeo ZPA, se conhecido, e o local (tal como ferida) em que é necessária atividade biológica do polipeptídeo ZPA. Para tratamento *ex vivo*, as células de mamíferos são removidas, o ácido nucleico é introduzido nessas células isoladas e as células modificadas são administradas ao mamífero diretamente ou, por exemplo, encapsuladas em membranas porosas que são implantadas no mamífero (vide, por exemplo, as Patentes Norte-Americanas nº 4.892.538 e 5.283.187). Existe uma série de métodos disponíveis para a introdução de ácidos nucleicos em células viáveis. As técnicas variam dependendo da transferência ou não do ácido nucleico para células cultivadas *in vitro* ou transfectadas *in vivo* nas células do hospedeiro desejado. Técnicas apropriadas de transferência de ácido nucleico para células de mamíferos *in vitro* incluem o uso de lipossomos, eletroporação, microinjeção, transdução, fusão celular, DEAE-dextran, método de precipitação de fosfato de cálcio etc. A transdução envolve a associação de uma partícula viral (incluindo, mas sem limitar-se a retroviral) recombinante, com defeito de reprodução, com um vetor celular, seguida pela introdução dos ácidos nucleicos contidos pela partícula na célula. Um vetor comumente utilizado para fornecimento *ex vivo* do gene é um retrovírus.

Métodos de transferência de ácido nucleico *in vivo* comumente utilizados incluem transfecção com vetores virais ou não virais (tais como adenovírus, lentivírus, vírus simplex I da Herpes ou vírus adeno-associado (AAV)) e sistemas com base em lipídios (lipídios úteis para a transferência mediada por lipídios do gene são, por exemplo, DOTMA, DOPE e DC-Chol; vide, por exemplo, Tonkinson et al, *Cancer Investigation*, 14 (1): 54-65 (1996)). Estes vetores são utilizados para sintetizar vírus que podem ser empregados como veículos para agentes de fornecimento, tais como antagonistas e moléculas de ácido nucleico de acordo com a presente invenção. Os vetores

mais comumente utilizados para uso em terapia genética são vírus, tais como adenovírus, AAV, lentivírus ou retrovírus. Um vetor viral tal como vetor retroviral inclui pelo menos um promotor/amplificador de transcrição ou elemento(s) que define(m) locais, ou outros elementos que controlam a expressão genética por outros meios tais como divisão alternativa, exportação de RNA nuclear ou modificação pós-tradução de mensageiro. Além disso, um vetor viral tal como um vetor retroviral inclui uma molécula de ácido nucleico que, quando transcrita na presença de um gene que codifica um polipeptídeo ZPA, é ligada operativamente e age como uma sequência de início de tradução. Estas construções de vetor também incluem um sinal de embalagem, repetições de terminais longos (LTRs) ou suas partes e locais de união de primers de fita positivos e negativos apropriados para o vírus utilizado (caso já não estejam presentes no vetor viral). Além disso, esse vetor inclui tipicamente uma sequência de sinal para secreção do polipeptídeo ZPA de uma célula hospedeira na qual é colocado. Em certas realizações, a sequência de sinal para este propósito é uma sequência de sinal de mamífero que inclui, mas sem limitar-se à sequência de sinal nativo para o polipeptídeo ZPA. Opcionalmente, a construção de vetor pode também incluir um sinal que dirige a poliadenilação, bem como um ou mais locais de restrição e uma sequência de término de tradução. Como forma de exemplo, esses vetores incluirão tipicamente um 5'LTR, um local de união de tRNA, um sinal de embalagem, uma origem de síntese de DNA de segunda fita e uma 3' LTR ou uma de suas partes. Podem ser utilizados outros vetores que são não virais, tais como lipídios catiônicos, polilisina e dendrímeros.

Em algumas situações, é desejável fornecer à fonte de ácido nucleico um agente que se dirija às células alvo, tal como um anticorpo específico para uma proteína de membrana da superfície celular ou a célula alvo, um ligante para um receptor sobre a célula alvo etc. Ao empregar-se

lipossomos, proteínas que se unem a uma proteína de membrana da superfície celular associada a endocitose podem ser utilizadas para dirigir e/ou facilitar a absorção, por exemplo, de proteínas de capsida ou seus fragmentos trópicos para um tipo de célula específico, anticorpos para proteínas que sofrem
 5 internalização na ciclização e proteínas que dirigem localização intracelular e aumentam a meia vida intracelular. O método de endocitose mediada por receptor é descrito, por exemplo, por Wu et al, *J. Biol. Chem.*, 262: 4429-4432 (1987); e Wagner et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 87: 3410-3414 (1990). Para uma análise dos protocolos de terapia genética e marcação genética
 10 atualmente conhecidos, vide Anderson et al, *Science*, 256: 808-813 (1992). Vide também WO 93/25673 e as referências ali mencionadas.

Terapia genética apropriada e métodos de elaboração de partículas retrovirais e proteínas estruturais podem ser encontrados, por exemplo, na Patente Norte-Americana nº 5.681.746.

DETECÇÃO DE MUTAÇÕES ZPA

A presente invenção também se refere ao uso do gene que codifica um polipeptídeo ZPA como diagnóstico. A detecção de uma forma que sofreu mutação de um polipeptídeo ZPA pode indicar a propensão de desenvolvimento de uma disfunção relativa a apoptose. A detecção de níveis
 20 do polipeptídeo ZPA no tecido de um peixe-zebra sobre os níveis do mesmo tecido em um peixe-zebra normal pode também indicar uma propensão de desenvolvimento de uma disfunção relativa a apoptose. De forma similar, a detecção de uma forma que sofreu mutação de um homólogo de um polipeptídeo ZPA em um organismo diferente de peixe-zebra pode indicar a
 25 propensão de desenvolvimento de uma disfunção relativa a apoptose. A detecção de níveis de um homólogo de um polipeptídeo ZPA no tecido de um organismo (tal como um mamífero) sobre os níveis do mesmo tecido em um organismo normal pode também indicar uma propensão de desenvolvimento de

uma disfunção relativa a apoptose.

Indivíduos portadores de mutações nos genes que codificam um homólogo humano de um polipeptídeo ZPA podem ser detectados no nível de DNA por meio de uma série de métodos. Ácidos nucleicos para diagnóstico
5 podem ser obtidos a partir de células de um mamífero, tal como de sangue, urina, saliva, biópsia de tecidos e material de autópsia. O DNA genômico pode ser utilizado diretamente para a detecção ou pode ser amplificado enzimaticamente utilizando PCR (Saiki et al, *Nature* 324: 163-166 (1986)) antes da análise. RNA ou cDNA podem também ser utilizados para o mesmo
10 propósito. Primers de PCR complementares ao ácido nucleico que codifica um polipeptídeo ZPA podem ser utilizados, por exemplo, para identificar e analisar mutações no homólogo humano de um polipeptídeo ZPA. Exclusões e inserções podem ser detectadas, por exemplo, por mudança do tamanho do produto amplificado em comparação com o genótipo normal. Mutações
15 pontuais podem ser identificadas por meio de hibridização de DNA amplificado em RNA rádio marcado que codifica um polipeptídeo ZPA ou, alternativamente, seqüências de DNA sem sentido rádio marcadas que codificam um polipeptídeo ZPA. Seqüências perfeitamente coincidentes podem ser diferenciadas de duplex sem coincidência por meio de digestão de RNase A ou
20 de diferenças das temperaturas de fusão.

Testes genéticos com base em diferenças de seqüências de DNA podem ser atingidos por meio de detecção da alteração da mobilidade eletroforética de fragmentos de DNA em géis com ou sem agentes desnaturantes. Inserções e exclusões de seqüências pequenas podem ser
25 visualizadas por meio de eletroforese de gel de alta resolução. Fragmentos de DNA de seqüências diferentes podem ser diferenciados sobre géis de gradiente de formamidina em desnaturação em que as mobilidades de diferentes fragmentos de DNA são retardadas no gel em posições diferentes de

acordo com as suas temperaturas de fusão ou fusão parcial específicas. Vide, por exemplo, Myers et al, *Science* 230: 1242 (1985).

Mudanças de seqüências em locais específicos podem também ser reveladas por meio de testes de proteção de nuclease, tais como proteção de RNase e S1 ou pelo método de divisão química, tal como Cotton et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85: 4397-4401 (1985).

Desta forma, a detecção de uma seqüência de DNA específica pode ser atingida por meio de métodos tais como hibridização, proteção de RNase, divisão química, seqüenciamento direto de DNA ou uso de enzimas de restrição, tais como polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) e Southern Blot de DNA genômico.

Além da eletroforese de gel mais convencional e seqüenciamento de DNA, mutações em um polipeptídeo ZPA podem também ser detectadas por meio de análise *in situ*.

DETECÇÃO DOS NÍVEIS DE ÁCIDO NUCLEICO OU POLIPEPTÍDEO ZPA

Os níveis de moléculas de ácido nucleico ou polipeptídeo ZPA podem ser detectados utilizando, por exemplo, os reagentes descritos no presente em combinação com métodos conhecidos na técnica, tais como hibridização *in situ*, RT-PCR, Northern Blots, Western Blots ou utilizando os Exemplos e reagentes fornecidos no presente. De forma similar, os níveis de polipeptídeos ou moléculas de ácido nucleico homólogos a um polipeptídeo ZPA ou molécula de ácido nucléico podem ser detectados utilizando, por exemplo, os reagentes descritos no presente em combinação com métodos conhecidos na técnica, tais como hibridização *in situ*, RT-PCR, Northern Blots, Western Blots ou utilizando os Exemplos e reagentes fornecidos no presente.

Pode-se empregar um teste de competição em que anticorpos específicos para um polipeptídeo ZPA são ligados a um suporte sólido e um polipeptídeo ZPA marcado e uma amostra derivada do hospedeiro que

compreende pelo menos um polipeptídeo homólogo a um ou mais polipeptídeos ZPA são passados sobre o suporte sólido e a quantidade de marca detectada e ligada ao suporte sólido pode ser correlacionada a uma quantidade do pelo menos um polipeptídeo homólogo a um ou mais polipeptídeos ZPA na amostra. Em uma realização, os anticorpos que unem especificamente um polipeptídeo ZPA conforme descrito no presente são utilizados para monitorar os níveis de polipeptídeo ZPA ou níveis de um homólogo de polipeptídeo ZPA.

TESTES DE SELEÇÃO PARA POSSÍVEIS DROGAS

A presente invenção engloba métodos de seleção de compostos para identificar os que imitam o polipeptídeo ZPA (agonistas) ou evitam o efeito de um polipeptídeo ZPA (antagonistas). Geralmente, um polipeptídeo ZPA é exposto à possível droga por meio de incubação ou contato sob várias condições. Testes de seleção para possíveis drogas antagonistas são projetados para identificar compostos que se unem especificamente a um polipeptídeo ZPA nativo ou formam complexo com ele. Esses testes de seleção incluirão testes apropriados para seleção de alto rendimento de bibliotecas químicas, tornando-as particularmente apropriadas para a identificação de possíveis drogas de moléculas pequenas.

Os testes podem ser realizados em uma série de formatos, que incluem testes de união entre proteínas, testes de seleção bioquímica, imunotestes e testes com base em células em combinação com um polipeptídeo ZPA, seus fragmentos ou células que expressam um polipeptídeo ZPA ou seus fragmentos.

Todos os testes para antagonistas são comuns pelo fato de que convocam o contato da possível droga com um polipeptídeo ZPA codificado por um ácido nucleico identificado no presente sob condições e por um tempo suficiente para permitir a interação entre esses dois componentes.

Nos testes de união, a interação é união e o complexo formado pode ser isolado ou detectado na mistura de reação. A união de um polipeptídeo ZPA a um polipeptídeo com o qual interage normalmente em um ou mais processos bioquímicos na presença ou ausência do possível antagonista, por exemplo, pode ser realizado para avaliar se o antagonista bloqueou a união do polipeptídeo ZPA ou polipeptídeo com o qual interage normalmente. Em uma outra realização, um polipeptídeo ZPA codificado por um gene identificado no presente ou a possível droga é imobilizada sobre uma fase sólida, tal como uma placa de microtítulos, por meio de ligações covalentes ou não covalentes. A ligação não covalente geralmente é realizada por meio de revestimento da superfície sólida com uma solução do polipeptídeo ZPA e secagem. Alternativamente, um anticorpo imobilizado, tal como um anticorpo monoclonal, específico para um polipeptídeo ZPA a ser imobilizado, pode ser utilizado para ancorá-lo a uma superfície sólida. O teste é realizado por meio de adição do componente não imobilizado, que pode ser marcado por uma marca detectável, ao componente imobilizado, tal como a superfície revestida que contém o componente ancorado. Após o término da reação, os componentes não reagidos são removidos, tal como por meio de lavagem, e os complexos ancorados sobre a superfície sólida são detectados. Quando o componente originalmente não imobilizado conduzir uma marca detectável, a detecção de marca imobilizada sobre a superfície indica que ocorreu a formação de complexos. Quando o componente originalmente não imobilizado não conduzir uma marca, a formação de complexos pode ser detectada, por exemplo, utilizando um anticorpo marcado que une especificamente o complexo imobilizado.

Caso o possível composto interaja com um polipeptídeo ZPA específico mas não se una a ele, a sua interação com aquele polipeptídeo pode ser testada por meio de métodos conhecidos de detecção de interações entre

proteínas. Esses testes incluem abordagens tradicionais, tais como retícula, coimunoprecipitação e copurificação por meio de gradientes ou colunas cromatográficas. Além disso, interações entre proteínas podem ser monitoradas utilizando um sistema genético com base em leveduras descrito

5 por Fields e colaboradores (Fields e Song, *Nature (London)* 340: 245-246 (1989); Chien et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 88: 9578-9582 (1991)), conforme descrito por Chevray e Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89: 5789-5793 (1991). Muitos ativadores de transcrição, tais como levedura GAL4, consistem de dois domínios modulares fisicamente discretos, um que age

10 como domínio de união de DNA e o outro que funciona como domínio de ativação de transcrição. O sistema de expressão de levedura descrito nas publicações acima (geralmente denominado "sistema bi-híbrido") utiliza esta propriedade e emprega duas proteínas híbridas, uma em que a proteína alvo é fundida ao domínio de união de DNA de GAL4 e outra em que as possíveis

15 proteínas ativadoras são fundidas ao domínio de ativação. A expressão de um gene relator GAL1-*lacZ* sob o controle de um promotor ativado por GAL4 depende da reconstituição da atividade de GAL4 por meio de interação entre proteínas. As colônias que contêm polipeptídeos em interação são detectadas com um substrato cromogênico para β -galactosidase. Kit completo

20 (MATCHMAKER®) para a identificação de interações entre proteínas entre duas proteínas específicas utilizando o método bi-híbrido é disponível comercialmente por meio da Clontech. Este sistema pode também ser estendido para mapear domínios de proteínas envolvidos em interações de proteínas específicas, bem como para indicar resíduos de aminoácidos que são

25 fundamentais para estas interações.

Os compostos que interferem com a união entre um polipeptídeo ZPA e uma outra proteína, incluindo outro polipeptídeo ZPA, podem ser testados conforme segue: é normalmente preparada uma mistura de reação

que contém o polipeptídeo ZPA e a outra proteína sob condições e por um tempo que permita a interação e a união das duas proteínas. Para testar a capacidade de um possível composto de inibir a união, a reação é conduzida na ausência e na presença do composto de teste. Além disso, pode-se
5 adicionar um placebo a uma terceira mistura de reação, para que sirva de controle positivo. A união (formação de complexos) entre o composto de teste e o outro polipeptídeo presente na mistura é monitorada conforme descrito acima. A formação de um complexo na(s) reação(ões) de controle, mas não na mistura de reação que contém o composto de teste, indica que o composto de
10 teste interfere com a interação do polipeptídeo ZPA e do outro polipeptídeo.

Segundo uma realização, os testes descritos no presente são realizados para testar os antagonistas de acordo com a presente invenção. Alternativamente, antagonistas podem ser detectados combinando-se um polipeptídeo ZPA e um antagonista potencial com polipeptídeo ZPA não
15 marcado sob condições apropriadas para um teste de inibição competitiva. O polipeptídeo ZPA pode ser marcado, tal como por meio de radioatividade ou um método colorimétrico, de tal forma que a quantidade de moléculas de polipeptídeo ZPA unidas possa ser utilizada para determinar a eficácia do potencial antagonista. O polipeptídeo ZPA pode ser marcado por uma série de
20 meios, que incluem a iodização ou inclusão de um local de reconhecimento para quinase de proteína específica de local. Após a fixação e a incubação, as lâminas são submetidas a análise auto-radiográfica.

Possíveis drogas incluem anticorpos anti-ZPA que incluem, sem limitação, anticorpos poli e monoclonais e fragmentos de anticorpos, anticorpos
25 de fita única, anticorpos anti-idiotípicos e versões quiméricas ou humanizadas desses anticorpos ou fragmentos, bem como anticorpos humanos e fragmentos de anticorpos. Alternativamente, uma possível droga pode ser uma proteína relacionada de perto, tal como uma forma que sofreu mutação de um

polipeptídeo ZPA que inibe competitivamente a ação do polipeptídeo ZPA endógeno ou homólogo de polipeptídeo ZPA endógeno.

PROTOCOLOS DE ADMINISTRAÇÃO, CRONOGRAMAS, DOSES E FORMULAÇÕES

As moléculas do presente e seus antagonistas são farmaceuticamente úteis como agentes profiláticos e terapêuticos para várias disfunções e doenças conforme descrito acima.

Composições terapêuticas dos polipeptídeos, agonistas ou antagonistas de acordo com a presente invenção são preparadas para armazenagem por meio de mistura da molécula desejada que possui o grau apropriado de pureza com veículos, excipientes ou estabilizantes farmaceuticamente aceitáveis opcionais (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edição, Osol, A., ed. (1980)), na forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Veículos, excipientes ou estabilizantes aceitáveis são não tóxicos para pacientes nas dosagens e concentrações empregadas e incluem tampões tais como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos, antioxidantes que incluem ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de octadecildimetilbenzil amônio, cloreto de hexametônio, cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio; álcool fenólico, butílico ou benzílico; alquil parabens tais como metil ou propil paraben; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol e m-cresol); polipeptídeos de baixo peso molecular (menos de cerca de dez resíduos); proteínas, tais como albumina de soro, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos, que incluem glicose, manose ou dextrinas; agentes quelantes, tais como EDTA; açúcares, tais como sacarose, manitol, trehalose ou sorbitol; contraíons formadores de sais, tais como sódio; complexos metálicos (tais como complexos de Zn e proteína); e/ou tensoativos não iônicos tais como

TWEEN®, PLURONICS® ou polietileno glicol (PEG).

Exemplos adicionais desses veículos incluem trocadores de íons, alumina, estearato de alumínio, lecitina, proteínas do soro tais como albumina de soro humano, substâncias tampão tais como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potássio, misturas de glicerídeos parciais de ácidos graxos vegetais saturados, água, sais ou eletrólitos tais como sulfato de protamina, hidrogênio fosfato dissódico, hidrogênio fosfato de potássio, cloreto de sódio, sais de zinco, sílica coloidal, trissilicato de magnésio, polivinil pirrolidona, substâncias com base em celulose e polietileno glicol. Veículos para formas locais ou com base em gel de agonista ou antagonista incluem polissacarídeos, tais como carboximetilcelulose de sódio ou metilcelulose, polivinilpirrolidona, poliacrilatos, polímeros de bloco de polioxietileno e polioxipropileno, polietileno glicol e álcoois graxos de madeira. Para todas as administrações, são adequadamente utilizadas formas de depósito convencionais. Essas formas incluem, por exemplo, microcápsulas, nanocápsulas, lipossomos, emplastros, formas de inalação, sprays para o nariz, pastilhas sublinguais e preparações de liberação prolongada. Os polipeptídeos ZPA ou agonistas ou antagonistas serão tipicamente formulados nesses veículos em concentração de cerca de 0,1 mg/ml a 100 mg/ml.

Uma outra formulação compreende a incorporação de um polipeptídeo ZPA ou seu agonista ou antagonista em artigos formados. Esses artigos podem ser utilizados na modulação do crescimento de células endoteliais e angiogênese. Além disso, a invasão de tumores e metástase pode ser modulada com estes artigos.

Os polipeptídeos ZPA ou agonistas ou antagonistas a serem utilizados para administração *in vivo* devem ser estéreis. Isso é facilmente conseguido por meio de filtração através de membranas de filtração estéreis, antes ou depois da liofilização e reconstituição. Os polipeptídeos ZPA

normalmente serão armazenados em forma liofilizada ou em solução caso administrados sistemicamente. Caso em forma liofilizada, um polipeptídeo ZPA ou seu agonista ou antagonista é tipicamente formulado em combinação com outros ingredientes para reconstituição com um diluente apropriado no momento do uso. Um exemplo de formulação líquida de um polipeptídeo ZPA ou agonista ou antagonista é uma solução estéril, transparente, incolor não preservada colocada em uma ampola de dose única para injeção subcutânea. As composições farmacêuticas preservadas apropriadas para uso repetido podem conter, por exemplo, dependendo principalmente da indicação e do tipo de polipeptídeo:

- a. um polipeptídeo ZPA ou seu agonista ou antagonista;
- b. um tampão capaz de manter o pH em uma faixa de estabilidade máxima do polipeptídeo ou outra molécula em solução, tal como pH de cerca de 4 a 8;
- c. um detergente/tensoativo principalmente para estabilizar o polipeptídeo ou molécula contra agregação induzida por agitação;
- d. um isotonicador;
- e. um conservante selecionado a partir do grupo de fenol, álcool benzílico e haleto de benzetônio, tal como cloreto; e
- f. água.

Caso o detergente empregado seja não iônico, ele pode ser, por exemplo, polissorbato (tal como POLYSORBATE® (TWEEN®) 20, 80 etc.) ou poloxâmero (tal como POLOXAMER® 188). O uso de tensoativos não iônicos permite a exposição da formulação a tensões superficiais de corte sem causar desnaturação do polipeptídeo. Além disso, essas formulações que contêm tensoativo podem ser empregadas em dispositivos de aerossol tais como os utilizados em uma dosagem pulmonar e pistolas injetoras a jato sem agulha (vide, por exemplo, EP 257.956).

Um isotonicador pode estar presente para garantir a isotonicidade de uma composição líquida de um polipeptídeo ZPA ou seu agonista ou antagonista e inclui álcoois de açúcar poli-hídricos, tais como tri-hídricos ou álcoois de açúcar superiores, como glicerina, eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol e manitol. Esses álcoois de açúcar podem ser utilizados isoladamente ou em combinação. Alternativamente, cloreto de sódio ou outros sais inorgânicos apropriados podem ser utilizados para tornar as soluções isotônicas.

O tampão pode ser, por exemplo, um tampão de acetato, citrato, succinato ou fosfato, dependendo do pH desejado. O pH de um tipo de formulação líquida de acordo com a presente invenção é tamponado na faixa de cerca de 4 a 8, preferencialmente perto do pH fisiológico.

Os conservantes fenol, álcool benzílico e haletos de benzetônio, tais como cloreto, são agentes antimicrobianos conhecidos que podem ser empregados.

As composições de antagonistas, agonistas e/ou polipeptídeos ZPA terapêuticos são geralmente colocadas em um recipiente que contém uma porta de acesso estéril, tal como uma ampola ou saco de solução intravenosa que contém uma tampa perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica. Em certas realizações, as formulações podem ser administradas na forma de injeções intravenosas (i. v.), subcutâneas (s. c.) ou intramusculares (i. m.) repetidas, ou como formulações de aerossol apropriadas para fornecimento intranasal ou intrapulmonar (para fornecimento intrapulmonar, vide, por exemplo, EP 257.956).

Polipeptídeos ZPA, seus agonistas e/ou antagonistas podem também ser administrados na forma de preparações de liberação prolongada. Exemplos apropriados de preparações de liberação prolongada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos que contenham a

proteína, matrizes estas que se encontram na forma de artigos moldados, tais como filmes ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de liberação prolongada incluem poliésteres, hidrogéis (tais como metacrilato de (poli) 2-hidroxietila), conforme descrito por Langer et al, *J. Biomed. Mater. Res.*, 15; 167-277 (1981) e Langer, *Chem. Tech.*, 12: 98-105 (1982) ou álcool (poli)vinílico), polilactídeos (Patente Norte-Americana nº 3.773.919, EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutâmico e L-glutamato de gama etila (Sidman et al, *Biopolymers*, 22: 547-556 (1983)), etileno-vinil acetato não degradável (Langer et al, acima), copolímeros degradáveis de ácido láctico e ácido glicólico, tais como Lupron Depot® (microesferas injetáveis compostas de copolímero de ácido láctico e ácido glicólico e acetato de leuprolida) e ácido póli-D-(-)-3-hidroxi-butírico (EP 133.988).

Embora polímeros tais como etileno-vinil acetato e ácido láctico-ácido glicólico permitam a liberação de moléculas por mais de cem dias, certos hidrogéis liberam proteínas por períodos de tempo mais curtos. Quando anticorpos encapsulados permanecerem no corpo por um longo período, eles podem desnaturar-se ou agregar-se como resultado da exposição à umidade a 37 °C, o que resulta em perda da atividade biológica e possíveis mudanças de imunogenicidade. Estratégias racionais podem ser idealizadas para estabilização de proteínas, dependendo do mecanismo envolvido. Caso se descubra, por exemplo, que o mecanismo de agregação é a formação de união S-S intermolecular por meio de intercâmbio de tio-dissulfeto, pode-se atingir a estabilização por meio da modificação de resíduos sulfidril, liofilização a partir de soluções ácidas, controle do teor de umidade, uso de aditivos apropriados e desenvolvimento de composições de matriz de polímeros específicas.

Polipeptídeo ZPA de liberação prolongada, composições agonistas e/ou antagonistas também incluem polipeptídeos ZPA capturados de forma lipossomal, agonistas e/ou antagonistas. Lipossomos que contêm um

polipeptídeo ZPA, anticorpo, agonista e/ou antagonista são preparados por meio de métodos intrinsecamente conhecidos: DE 3.218.121; Epstein et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 82: 3688-3692 (1985); Hwang et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 77: 4030-4034 (1980); EP 52.322; EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949; EP 142.641; Pedido de Patente Japonês nº 83-118008; Patentes Norte-Americanas nº 4.485.045 e 4.544.545; e EP 102.324. Normalmente, os lipossomos são do tipo unilamelar pequeno (cerca de 200 a 800 Angstroms), em que o teor de lipídios é de mais de cerca de 30% molar de colesterol, em que a proporção selecionada é ajustada para a terapia ideal.

A dose terapeuticamente eficaz de um polipeptídeo ZPA ou seu agonista ou antagonista variará, naturalmente, dependendo de fatores tais como a condição patológica a ser tratada (incluindo a prevenção), o método de administração, o tipo de composto sendo utilizado para o tratamento, qualquer coterapia envolvida, a idade, peso, condição médica geral, histórico médico etc. do paciente e sua determinação encontra-se bem dentro do conhecimento do praticante da medicina. Conseqüentemente, será necessário que o médico titule a dosagem e modifique a via de administração conforme o necessário para obter o máximo efeito terapêutico. O médico administrará um polipeptídeo ZPA, seu anticorpo, agonista e/ou antagonista até atingir uma dosagem que alcance o efeito desejado de tratamento da condição em questão. Caso o objetivo seja o tratamento de câncer, por exemplo, a quantidade seria aquela que inibe o crescimento do câncer.

Com as orientações acima, a dose eficaz geralmente encontra-se na faixa de cerca de 0,001 a cerca de 1,0 mg/kg, de maior preferência cerca de 0,01 a 1,0 mg/kg e/ou cerca de 0,01 a 0,1 mg/kg.

Para uso não oral no tratamento de disfunções relativas à apoptose, é vantajoso administrar o polipeptídeo ZPA, seu agonista e/ou antagonista na forma de uma injeção a cerca de 0,01 a 50 mg, cerca de 0,05 a

20 mg e/ou cerca de 1 a 20 mg p/ kg de peso do corpo, uma a três vezes por dia por meio de injeção intravenosa. Para administração oral, em certas realizações, uma molécula com base em um polipeptídeo ZPA, agonista e/ou antagonista é administrada a cerca de 5 mg a 1 g e/ou cerca de 10 a 100 mg p/ kg de peso do corpo, uma a três vezes por dia. Dever-se-á apreciar que a contaminação com endotoxina deverá ser mantida em nível mínimo seguro, tal como menos de 0,5 ng/mg de proteína. Além disso, para administração humana, as formulações atendem preferencialmente à esterilidade, pirogenicidade, segurança geral e pureza conforme o exigido pelos padrões de Biologia e do Escritório FDA.

O regime de dosagem de uma composição farmacêutica que contém um polipeptídeo ZPA, agonista e/ou antagonista a ser utilizada em regeneração de tecidos será determinado pelo médico atendente considerando diversos fatores que modificam a ação dos polipeptídeos, tais como quantidade de peso de tecido que se deseja formar, local da lesão, condição do tecido lesionado, tamanho da ferida, tipo de tecido lesionado (tal como osso), idade, sexo e alimentação do paciente, severidade de qualquer infecção, tempo de administração e outros fatores clínicos. A dosagem pode variar com o tipo de matriz utilizado na reconstituição e com a inclusão de outras proteínas na composição farmacêutica. A adição de outros fatores de crescimento conhecidos, tais como IGF-I, por exemplo, à composição final pode também afetar a dosagem. O progresso pode ser monitorado por meio da determinação periódica do crescimento e/ou reparo de tecidos/ossos, tais como raios X, determinações histomorfométricas e marcação com tetraciclina.

O processo de administração de polipeptídeo ZPA, antagonista ou agonista ocorre de acordo com métodos conhecidos, tais como por meio de injeção ou infusão por vias intravenosa, intramuscular, intracerebral, intraperitoneal, intracerebroespinhal, subcutânea, intraocular, intraarticular,

intrassinovial, intratecal, oral, local ou inalatória, ou por meio de sistemas de liberação prolongada conforme indicado abaixo. Um polipeptídeo ZPA, seu agonista e/ou antagonista também são administrados adequadamente por vias intratumoral, peritumoral, intralesional ou perilesional, para exercer efeitos terapêuticos locais e sistêmicos.

Caso um peptídeo ou molécula pequena seja empregado como antagonista ou agonista, ele é preferencialmente administrado oralmente ou não oralmente na forma de líquido ou sólido para mamíferos.

Exemplos de sais farmacologicamente aceitáveis de moléculas que formam sais e são úteis no presente incluem sais de metais alcali (tais como sal de sódio e sal de potássio), sais de metais alcalino-terrosos (tais como sal de cálcio e sal de magnésio), sais de amônio, sais de bases orgânicas (tais como sal de piridina e sal de trietilamina), sais de ácidos inorgânicos (tais como cloridrato, sulfato e nitrato) e sais de ácidos orgânicos (tais como acetato, oxalato e p-toluenossulfonato).

A localização da ação desejada de um polipeptídeo ZPA, seu agonista e/ou antagonista de acordo com a presente invenção pode ser levada em consideração na preparação e administração do polipeptídeo, agonista e/ou antagonista. Quando a ação desejada for localizada de forma intracelular, certas realizações da presente invenção fornecem o polipeptídeo, agonista e/ou antagonista a ser introduzido na célula. Em uma realização, a expressão intracelular de um polipeptídeo, agonista proteináceo e/ou antagonista proteináceo é efetuada por meio da introdução de um ácido nucleico que codifica o polipeptídeo, agonista proteináceo e/ou antagonista proteináceo (que não contém a sequência líder do tipo selvagem e sinais de secreção normalmente associados ao gene que codifica essas moléculas) em uma célula alvo. Qualquer método padrão de introdução de ácidos nucleicos em uma célula pode ser utilizado, incluindo, mas sem limitar-se a microinjeção, injeção

balística, eletroporação, precipitação de fosfato de cálcio, lipossomos e transfecção com vetores de vacinas e virais retrovirais, adenovirais, adeno-associados que conduzem o ácido nucleico de interesse.

Em uma outra realização, são fornecidas moléculas de internalização. Os polipeptídeos podem possuir certas características que aumentam o seu fornecimento às células ou podem ser modificados para que possuam essas características. Métodos para atingir isso são conhecidos na técnica. Cationização, lipofecções ou lipossomos, por exemplo, podem ser utilizados para fornecer o anticorpo para células. A translocação de moléculas em células pode também ser facilitada por meio de conjugação de um peptídeo de inserção com pH baixo ("pHLIP") à molécula a ser movida (tal como por meio de uniões de dissulfeto; vide, por exemplo, Reshetnyak et al, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103 (17): 6460-6465 (2006)) e redução do pH extracelular. Ao utilizar-se fragmentos, o fragmento menor que realiza a função desejada geralmente é vantajoso. Um polipeptídeo ZPA que não contém uma região de âncora de membrana e que, ao mesmo tempo, retém atividade antiapoptótica, por exemplo, pode ser vantajoso para introdução intracelular sobre o polipeptídeo do tipo selvagem. Esses peptídeos podem ser sintetizados quimicamente e/ou produzidos por meio de tecnologia de DNA recombinante.

A entrada de polipeptídeos moduladores, agonistas e antagonistas em células alvo pode ser aprimorada por meio de métodos conhecidos na técnica. Certas seqüências, tais como as derivadas de HIV Tat ou da proteína com homeodomínio de *Antennapedia*, são capazes de dirigir a absorção eficiente de proteínas heterólogas ao longo de membranas celulares. Vide, por exemplo, Chen et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1999), 96: 4325-4329.

Quando a localização da atividade desejada de um polipeptídeo ZPA, agonista e/ou antagonista estiver no cérebro, certas realizações da

presente invenção fornecem o polipeptídeo ZPA, agonista e/ou antagonista para atravessar a barreira entre o sangue e o cérebro. Certas doenças neurodegenerativas são associadas a um aumento da permeabilidade da barreira entre sangue e cérebro, de tal forma que o anticorpo ou fragmento de
 5 união de antígenos possa ser facilmente introduzido no cérebro. Quando a barreira entre sangue e cérebro permanecer intacta, existem várias abordagens conhecidas na técnica para o transporte de moléculas através dela, que incluem, mas sem limitar-se a métodos físicos, métodos com base em lipídios e métodos com base em canais e receptores.

Métodos físicos de transporte do polipeptídeo ZPA, agonista e/ou antagonista através da barreira entre sangue e cérebro incluem, mas sem limitar-se a contornar completamente a barreira entre sangue e cérebro, ou criar aberturas na barreira entre sangue e cérebro. Métodos de contorno incluem, mas sem limitar-se a injeção direta no cérebro (vide, por exemplo,
 10 Papanastassiou et al, *Gene Therapy* 9: 398-406 (2002)), fornecimento aprimorado por convecção/infusão intersticial (vide, por exemplo, Bobo et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91: 2076-2080 (1994)) e implantação de um dispositivo de fornecimento no cérebro (vide, por exemplo, Gill et al, *Nature Med.* 9: 589-595 (2003); e Gliadel Wafers®, Guildford Pharmaceutical).
 15 Métodos de criação de aberturas na barreira incluem, mas sem limitar-se a ultrassom (vide, por exemplo, Patente Norte-Americana nº 2002/0038086), pressão osmótica (tal como por meio de administração de manitol hipertônico (Neuwelt, E. A., *Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation*, Vols. 1 e 2, Plenum Press, Nova Iorque (1989))), permeabilização, por
 20 exemplo, por meio de bradiquinina ou permeabilizante A-7 (vide, por exemplo, Patentes Norte-Americanas nº 5.112.596, 5.268.164, 5.506.206 e 5.686.416) e transfecção de neurônios que introduzem na barreira entre sangue e cérebro vetores que contêm genes que codificam o polipeptídeo ZPA, agonista

proteínáceo e/ou antagonista protéínáceo (vide, por exemplo, a Patente Norte-Americana nº 2003/0083299).

Métodos com base em lipídios de transporte de um polipeptídeo ZPA, agonista e/ou antagonista através da barreira entre sangue e cérebro incluem, mas sem limitar-se à encapsulação do polipeptídeo ZPA, agonista e/ou antagonista em lipossomos que sejam acoplados a fragmentos de união de anticorpos que se unem a receptores sobre o endotélio vascular da barreira entre sangue e cérebro (vide, por exemplo, o Pedido de Patente Norte-Americano nº 20020025313) e revestimento do polipeptídeo ZPA, agonista e/ou antagonista em partículas de lipoproteína com baixa densidade (vide, por exemplo, o Pedido de Patente Norte-Americano nº 20040204354) ou apolipoproteína E (vide, por exemplo, o Pedido de Patente Norte-Americano nº 20040131692).

Métodos com base em canal e receptor de transporte do polipeptídeo ZPA, agonista e/ou antagonista através da barreira entre o sangue e o cérebro incluem, mas sem limitar-se ao uso de bloqueadores de glucocorticóide para aumentar a permeabilidade da barreira entre o sangue e o cérebro (vide, por exemplo, o Pedido de Patente Norte-Americano nº 2002/0065259, 2003/0162695 e 2005/0124533); ativação de canais de potássio (vide, por exemplo, o Pedido de Patente Norte-Americano nº 2005/0089473), inibição de transportadores de drogas ABC (vide, por exemplo, o Pedido de Patente Norte-Americano nº 2003/0073713); revestimento das moléculas com uma transferrina e modulação da atividade de um ou mais receptores de transferrina (vide, por exemplo, o Pedido de Patente Norte-Americano nº 2003/0129186) e cationização das moléculas (vide, por exemplo, a Patente Norte-Americana nº 5.004.697).

TERAPIAS DE COMBINAÇÃO

A eficácia de um polipeptídeo ZPA ou seu agonista ou antagonista

na prevenção ou no tratamento de uma disfunção relativa à apoptose pode ser aprimorada por meio da administração do agente ativo em série ou em combinação com um outro agente que seja eficaz para esses propósitos, seja na mesma composição ou na forma de composições separadas.

5 Para o tratamento de doenças proliferativas celulares, por exemplo, terapia com polipeptídeo ZPA e/ou agonista de polipeptídeo ZPA pode ser combinada com a administração de outros inibidores da proliferação celular, tais como agentes citotóxicos.

 Além disso, polipeptídeos ZPA e/ou agonistas utilizados para o
10 tratamento de câncer podem ser combinados com agentes citotóxicos, quimioterapêuticos ou inibidores do crescimento conforme identificado acima. Além disso, para o tratamento de câncer, um polipeptídeo ZPA e/ou seu agonista é adequadamente administrado em série ou em combinação com tratamentos radiológicos, envolvendo a irradiação ou a administração de
15 substâncias radioativas.

 Caso o tratamento seja para câncer, pode ser desejável também administrarr anticorpos contra antígenos associados a tumores, tais como anticorpos que se unem a um ou mais dentre os receptores ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4 ou VEGF. Alternativa ou adicionalmente, dois ou mais anticorpos
20 que unem o mesmo ou dois ou mais antígenos diferentes descritos no presente podem ser coadministrados ao paciente. Às vezes, pode ser benéfico também administrar uma ou mais citoquinas ao paciente. Em uma realização, um polipeptídeo ZPA e/ou seu agonista descritos no presente são codministrados com um agente inibidor do crescimento. O agente inibidor do crescimento pode
25 ser administrado em primeiro lugar, por exemplo, seguido por um polipeptídeo ZPA e/ou seu agonista de acordo com a presente invenção. Entretanto, a administração simultânea ou a administração de um polipeptídeo ZPA e/ou seu agonista de acordo com a presente invenção em primeiro lugar também é

contemplada. Dosagens apropriadas para o agente inibidor do crescimento são as utilizadas no presente e podem ser reduzidas devido à ação combinada (sinergia) do agente inibidor do crescimento e dos polipeptídeos e agonistas descritos no presente.

5 Em uma realização, a vascularização de tumores é atacada em terapia de combinação. Um polipeptídeo ZPA e/ou seu agonista de acordo com a presente invenção e um anticorpo (tal como anti-VEGF) são administrados a pacientes portadores de tumores em doses terapeuticamente eficazes conforme determinado, por exemplo, por meio da observação de necrose do
10 tumor ou seus focos metastáticos, se houver. Esta terapia prossegue até o momento em que nenhum efeito benéfico adicional é observado ou um exame clínico não exhibe traço do tumor ou nenhum foco metastático. TNF é administrado em seguida, isoladamente ou em combinação com um agente auxiliar tal como alfa, beta ou gama-interferona, anticorpo anti-HER2,
15 heregulina, anticorpo anti-heregulina, fator D, interleucina 1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2), fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) ou agentes que promovem a coagulação microvascular em tumores, tais como anticorpo anti-proteína C, anticorpo anti-proteína S ou proteína de união C4b (vide WO 91/01753, publicada em
20 21 de fevereiro de 1991), calor ou radiação.

As quantidades eficazes dos agentes terapêuticos administrados em combinação com um polipeptídeo ZPA ou seu antagonista estarão a critério do médico ou do veterinário. A administração e o ajuste da dosagem são realizados para atingir administração máxima das condições a serem tratadas.
25 A dose dependerá adicionalmente de fatores tais como o tipo do agente terapêutico a ser utilizado e o paciente específico sendo tratado. Tipicamente, a quantidade empregada será a mesma dose utilizada, caso o dado agente terapêutico receba administração sem um polipeptídeo ZPA.

ARTIGOS INDUSTRIALIZADOS

Um artigo industrializado tal como kit que contém um ou mais polipeptídeos ZPA ou seus agonistas ou antagonistas úteis para o diagnóstico ou tratamento das disfunções descritas acima compreende pelo menos um recipiente e um rótulo. Os recipientes apropriados incluem, por exemplo, garrafas, ampolas, seringas e tubos de ensaio. Os recipientes podem ser formados a partir de uma série de materiais tais como vidro ou plástico. O recipiente contém uma composição que é eficaz para o diagnóstico ou tratamento da condição e pode ter uma porta de acesso estéril (o recipiente pode ser, por exemplo, um saco de solução intravenosa ou uma ampola que contém uma tampa perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica). O agente ativo na composição é um ou mais polipeptídeos ZPA ou um de seus agonistas ou antagonistas. O rótulo sobre o recipiente ou associado a ele indica que a composição é utilizada para o diagnóstico ou tratamento da condição selecionada. O artigo industrializado pode compreender adicionalmente um segundo recipiente que compreende um tampão farmacologicamente aceitável, tal como solução salina tamponada com fosfato, solução de Ringer e solução de dextrose. Ele pode incluir ainda outros materiais desejáveis do ponto de vista de usuário e comercial, que incluem outros tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas e bulas com instruções de uso. O artigo industrializado pode também compreender um segundo ou terceiro recipiente com um outro agente ativo conforme descrito acima.

ANTICORPOS POLICLONAIS

Métodos de preparação de anticorpos policlonais são conhecidos dos técnicos comuns no assunto. Os anticorpos policlonais podem ser levantados em mamífero, tal como por meio de uma ou mais injeções de agente imunizante e, se desejado, um adjuvante. Tipicamente, o agente imunizante e/ou adjuvante será injetado no mamífero por meio de diversas

injeções intraperitoneais ou subcutâneas. O agente imunizante pode incluir um polipeptídeo ZPA ou uma de suas proteínas de fusão. Pode ser útil conjugar o agente imunizante a uma proteína conhecidamente imunogênica no mamífero sendo imunizado. Exemplos dessas proteínas imunogênicas incluem, mas sem
5 limitar-se a hemocianina de conchas, albumina do soro, tiroglobulina bovina e inibidor tripsina de soja. Exemplos de adjuvantes que podem ser empregados incluem adjuvante completo de Freund e adjuvante MPL-TDM (monofosforil Lipídio A ou dicorinomicolato de trehalose sintético). O protocolo de imunização pode ser selecionado pelos técnicos no assunto sem experimentação indevida.

ANTICORPOS MONOCLONAIS

Anticorpos anti-ZPA podem ser anticorpos monoclonais. Os anticorpos monoclonais podem ser fabricados, por exemplo, utilizando métodos de hibridoma, tais como os descritos por Kohler e Milstein, *Nature* 256: 495 (1975), ou podem ser fabricados por meio de métodos de DNA recombinante
15 (Patente Norte-Americana nº 4.816.567) ou podem ser produzidos por meio dos métodos descritos no presente no capítulo de Exemplos. Em um método de hibridoma, um camundongo, hamster ou outro animal hospedeiro apropriado é tipicamente imunizado com um agente imunizante para gerar linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que se unem
20 especificamente ao agente imunizante. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*.

O agente imunizante incluirá tipicamente um polipeptídeo ZPA ou sua proteína de fusão. Geralmente, linfócitos sangüíneos periféricos ("PBLs") são utilizados caso se deseje células de origem humana, ou células do baço ou
25 células dos nódulos linfáticos são utilizadas caso se deseje fontes de mamíferos não humanos. Os linfócitos são fundidos em seguida a uma linhagem celular imortalizada, utilizando um agente de fusão apropriado, tal como polietileno glicol, para formar uma célula de hibridoma. Goding,

Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (Nova Iorque: Academic Press, 1986), págs. 59-103. As linhagens celulares imortalizadas são normalmente células de mamíferos transformadas, particularmente células de mieloma de origem humana, bovina e de roedores. Normalmente, são empregadas linhagens celulares de mieloma de rato ou camundongo. As células de hibridoma podem ser cultivadas em um meio de cultivo apropriado que contém preferencialmente uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou a sobrevivência das células imortalizadas não fundidas. Caso as células parentais não contenham a enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferase (HGPRT ou HPRT), por exemplo, o meio de cultivo para os hibridomas incluirá tipicamente hipoxantina, aminopterina e timidina ("meio HAT"), substâncias que evitam o crescimento de células com deficiência de HGPRT.

Exemplos de linhagens celulares imortalizadas são aquelas que se fundem eficientemente, apóiam a expressão estável em alto nível de anticorpos pelas células produtoras de anticorpos selecionadas e são sensíveis a um meio tal como meio HAT. Em certas realizações, as linhagens celulares imortalizadas são linhagens de mieloma murino, que podem ser obtidas, por exemplo, por meio do Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Califórnia, Estados Unidos, e da Coleção Norte-Americana de Cultivos de Tipos, Manassas, Virgínia, Estados Unidos. Linhagens celulares de mieloma humano e heteromieloma humano/de camundongos também foram descritas para a produção de anticorpos monoclonais humanos. Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications* (Marcel Dekker Inc., Nova Iorque, 1987), págs. 51-63.

O meio de cultivo em que são cultivadas células de hibridoma pode ser testado em seguida para determinar a presença de anticorpos monoclonais dirigidos a um polipeptídeo ZPA. Em certas realizações, a especificidade de união de anticorpos monoclonais produzidos pelas células de

hibridoma é determinada por meio de imunoprecipitação ou de um teste de união *in vitro*, tal como radioimunoensaio (RIA) ou teste imunoabsorvente ligado por enzimas (ELISA). Estes métodos e testes são conhecidos na técnica. A afinidade de união do anticorpo monoclonal pode ser determinada, por exemplo, por meio da análise Scatchard de Munson e Pollard, *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

Após a identificação das células de hibridoma desejadas, os clones podem ser subclonados por meio da limitação de procedimentos de diluição e cultivados por meio de métodos padrão. Goding, acima. Meios de cultivo apropriados para este propósito incluem, por exemplo, Meio Eagle's Modificado da Dulbecco ou meio RPMI-1640. Alternativamente, as células de hibridoma podem ser cultivadas *in vivo* na forma de ascite em mamíferos.

Os anticorpos monoclonais secretados pelos subclones podem ser isolados ou purificados do meio de cultivo ou fluido de ascite por meio de procedimentos convencionais de purificação de imunoglobulina, tais como proteína A Sepharose, cromatografia de hidroxilapatita, eletroforese de gel, diálise ou cromatografia de afinidade.

Os anticorpos monoclonais podem também ser fabricados por meio de métodos de DNA recombinante, tais como os descritos na Patente Norte-Americana nº 4.816.567. O DNA codificador dos anticorpos monoclonais de acordo com a presente invenção pode ser facilmente isolado e seqüenciado utilizando procedimentos convencionais (empregando, por exemplo, sondas de oligonucleotídeos que sejam capazes de unir-se especificamente a genes codificadores das cadeias pesada e leve de anticorpos murinos). As células de hibridoma de acordo com a presente invenção servem de fonte desse DNA. Uma vez isolado, o DNA pode ser colocado em vetores de expressão, que são transfectados em seguida para células hospedeiras, tais como células COS de símios, células de Ovário de Hamster Chinês (CHO) ou células de mieloma

que, de outra forma, não produzem proteína de imunoglobulina, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. O DNA pode também ser modificado, por exemplo, por meio de substituição da seqüência de codificação por domínios constantes de cadeia leve e pesada humana no lugar das seqüências murinas homólogas (Patente Norte-
5 Americana nº 4.816.567; Morrison et al, acima), ou por meio de união covalente da seqüência de codificação de imunoglobulina com a seqüência de codificação para um polipeptídeo não de imunoglobulina, no todo ou em parte. Esse polipeptídeo não de imunoglobulina pode ser substituído pelos domínios
10 constantes de um anticorpo de acordo com a presente invenção, ou pode ser substituído pelos domínios variáveis de um local de combinação de antígenos de um anticorpo de acordo com a presente invenção para criar um anticorpo bivalente quimérico.

Os anticorpos podem ser anticorpos monovalentes. Métodos de
15 preparação de anticorpos monovalentes são conhecidos na técnica. Um método envolve, por exemplo, a expressão recombinante de cadeia leve de imunoglobulina e cadeia pesada modificada. A cadeia pesada geralmente é truncada em qualquer ponto da região Fc, de forma a evitar a retícula de cadeia pesada. Alternativamente, os resíduos de cisteína relevantes são substituídos
20 com um outro resíduo de aminoácido ou são excluídos, de forma a evitar a retícula.

Métodos *in vivo* também são apropriados para a preparação de anticorpos monovalentes. A digestão de anticorpos para produzir seus fragmentos, particularmente fragmentos de Fab, pode ser realizada utilizando
25 métodos conhecidos na técnica.

ANTICORPOS HUMANIZADOS E HUMANOS

Os anticorpos anti-ZPA podem compreender adicionalmente anticorpos humanizados ou anticorpos humanos. Formas humanizadas de

anticorpos não humanos (tais como murinos) são imunoglobulinas quiméricas específicas, cadeias de imunoglobulina ou seus fragmentos (tais como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ ou outras subsequências de união de antígenos de anticorpos) que contêm sequência mínima derivada de imunoglobulina não humana. Os anticorpos humanizados incluem imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor), nas quais os resíduos de uma CDR do paciente são substituídos por resíduos de uma CDR de uma espécie não humana (anticorpo doador), tal como camundongo, rato ou coelho que possui a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Em alguns casos, os resíduos da região de estrutura Fv da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não humanos correspondentes. Os anticorpos humanizados podem também compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo receptor nem nas sequências de estrutura ou CDR importadas. Geralmente, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todos dentre pelo menos um, tipicamente dois domínios variáveis, nos quais todas ou substancialmente todas as regiões CDR correspondem às de imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as regiões FR são as de uma sequência de consenso de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado pode também compreender pelo menos uma parte de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de uma imunoglobulina humana. Jones et al, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al, *Nature*, 332: 323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992).

Métodos de humanização de anticorpos não humanos são bem conhecidos na técnica. Geralmente, um anticorpo humanizado contém um ou mais resíduos de aminoácidos nele introduzidos a partir de uma fonte que não é humana. Estes resíduos de aminoácidos não humanos são freqüentemente denominados resíduos "importados", que são tomados tipicamente de um domínio variável "importado". A humanização pode ser essencialmente

realizada seguindo-se o método de Winter e colaboradores (Jones et al, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al, *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al, *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), por meio da substituição de seqüências de CDR ou CDRs de roedores pelas seqüências correspondentes de um anticorpo humano. Conseqüentemente, esses anticorpos “humanizados” são anticorpos quiméricos (Patente Norte-Americana nº 4.816.567), em que substancialmente menos de um domínio variável humano intacto tenha sido substituído pela seqüência correspondente de uma espécie não humana. Na prática, os anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos, em que alguns resíduos de CDR e possivelmente alguns resíduos de FR são substituídos por resíduos de locais análogos em anticorpos de roedores.

Como alternativa para a humanização, podem ser gerados anticorpos humanos. É agora possível produzir, por exemplo, animais transgênicos (tais como camundongos) que são capazes, mediante imunização, de produzir um repertório completo de anticorpos humanos na ausência da produção de imunoglobulina endógena. Descreveu-se, por exemplo, que a exclusão homozigótica do gene da região de união de cadeia pesada de anticorpos (JH) em camundongos quiméricos e mutantes de linhagem de gérmenes resulta na inibição completa da produção de anticorpos endógenos. A transferência do conjunto de genes de imunoglobulina da linhagem de germen humano nesses camundongos com mutação da linhagem de gérmenes resultará na produção de anticorpos humanos mediante desafio com antígenos. Vide, por exemplo, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al, *Nature*, 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al, *Year in Immuno.*, 7: 33 (1993); Patentes Norte-Americanas nº 5.545.806, 5.569.825, 5.591.669 (todas da GenPharm); 5.545.807; e WO 97/17852. Alternativamente, anticorpos humanos podem ser elaborados por meio da introdução de locais de imunoglobulina humana em animais

transgênicos, tais como camundongos, nos quais os genes de imunoglobulina endógenos foram parcial ou completamente desativados. Mediante desafio, é observada a produção de anticorpos humanos, que relembra de perto a observada em seres humanos em todos os aspectos, incluindo a redistribuição genética, montagem e repertório de anticorpos. Esta abordagem é descrita, por exemplo, nas Patentes Norte-Americanas nº 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425 e 5.661.016 e nas publicações científicas a seguir: Marks et al, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg et al, *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 812-813 (1994); Fishwild et al, *Nature Biotechnology*, 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995).

Alternativamente, pode-se utilizar tecnologia de exibição de fagos (McCafferty et al, *Nature* 348: 552-553 (1990)) para produzir anticorpos humanos e fragmentos de anticorpos *in vitro* a partir de repertórios de genes de domínio variável (V) de imunoglobulina de doadores não imunizados. De acordo com esta técnica, os genes de domínio V de anticorpos são clonados em quadro em um gene de proteína de revestimento maior ou menor de um bacteriófago filamentosos, tal como M13 ou fd, e exibidos na forma de fragmentos de anticorpos funcionais sobre a superfície da partícula de fago. Como a partícula filamentosos contém uma cópia de DNA de fita única do genoma de fago, as seleções baseadas nas propriedades funcionais do anticorpo também resultam na seleção do gene codificador do anticorpo que exibe essas propriedades. Desta forma, o fago imita algumas das propriedades da célula B. A exibição de fago pode ser realizada em uma série de formatos, analisados, por exemplo, em Johnson, Kevin S. e Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3: 564-571 (1993). Diversas fontes de segmentos de gene V podem ser utilizadas para exibição do fago. Clackson et al, *Nature*, 352: 624-628 (1991) isolaram um conjunto diverso de anticorpos anti-oxazolona

a partir de uma pequena biblioteca combinatória aleatória de genes V derivados dos baços de camundongos imunizados. Repertório de genes V de doadores humanos não imunizados pode ser construído e anticorpos para um conjunto diverso de antígenos (incluindo autoantígenos) podem ser isolados seguindo-se essencialmente as técnicas descritas por Marks et al, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991), ou Griffith et al, *EMBO J.* 12:725-734 (1993). Vide também as Patentes Norte-Americanas nº 5.565.332 e 5.573.905.

Conforme discutido acima, anticorpos humanos podem também ser gerados por células B ativadas *in vitro* (vide as Patentes Norte-Americanas nº 5.567.610 e 5.229.275).

Anticorpos humanos podem ser produzidos utilizando diversos métodos conhecidos na técnica, incluindo bibliotecas de exibição de fagos. Hoogenboom e Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991). Os métodos de Cole et al e Boerner et al também são disponíveis para a preparação de anticorpos monoclonais humanos. Cole et al, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pág. 77 (1985); e Boerner et al, *J. Immunol.*, 147 (1): 86-95 (1991).

ANTICORPOS ANTI-ZPA BIESPECÍFICOS

Os anticorpos biespecíficos são anticorpos monoclonais, opcionalmente humanos ou humanizados, que possuem especificidades de união para pelo menos dois antígenos diferentes. No caso presente, uma das especificidades de união é para um polipeptídeo ZPA e a outra é para qualquer outro antígeno.

Métodos de fabricação de anticorpos biespecíficos são conhecidos na técnica. Tradicionalmente, a produção recombinante de anticorpos biespecíficos baseia-se na coexpressão de dois pares de cadeia leve e cadeia pesada de imunoglobulina, em que as duas cadeias pesadas possuem especificidades diferentes. Milstein and Cuello, *Nature*, 305: 537-539

(1983). Devido à disposição aleatória de cadeias leve e pesada de imunoglobulina, estes hibridomas (quadromas) produzem uma mistura potencial de dez moléculas de anticorpos diferentes, das quais apenas uma possui a estrutura biespecífica correta. A purificação da molécula correta é normalmente obtida por meio de etapas de cromatografia de afinidade. Procedimentos similares são descritos em WO 93/08829, publicada em treze de maio de 1993, e em Traunecker et al, *EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991).

Domínios variáveis de anticorpos com as especificidades de união desejadas (locais de combinação de anticorpos e antígenos) podem ser fundidos a seqüências de domínio constante de imunoglobulina. Em certas realizações, a fusão ocorre com um domínio constante de cadeia pesada de imunoglobulina, que compreende pelo menos uma parte das regiões de articulação, CH2 e CH3. Em certas realizações, a primeira região constante de cadeia pesada (CH1) que contém o local necessário para união de cadeia leve está presente em pelo menos uma das fusões. Os DNAs que codificam as fusões de cadeia pesada de imunoglobulina e, se desejado, a cadeia leve de imunoglobulina, são inseridos em vetores de expressão separados e são cotransfectados em um organismo hospedeiro apropriado. Para detalhes adicionais sobre a geração de anticorpos biespecíficos, vide, por exemplo, Suresh et al, *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

Diversas técnicas de elaboração e isolamento de fragmentos de anticorpos biespecíficos diretamente a partir de cultivo celular recombinante também foram descritas. Anticorpos biespecíficos foram produzidos, por exemplo, utilizando fechos de leucina. Kostelny et al, *J. Immunol.*, 148 (5): 1547-1553 (1992). Os peptídeos de fecho de leucina das proteínas Fos e Jun foram ligados às porções Fab' de dois anticorpos diferentes por meio de fusão genética. Os homodímeros de anticorpos foram reduzidos na região de articulação para formar monômeros e, em seguida, novamente oxidados para

formar os heterodímeros de anticorpos. Este método pode também ser utilizado para a produção de homodímeros de anticorpos. A tecnologia de “diacorpos” descrita por Hollinger et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90: 6444-6448 (1993) forneceu um mecanismo alternativo de fabricação de fragmentos de anticorpos biespecíficos. Os fragmentos compreendem um VH conectado a um VL por um ligante que é curto demais para permitir o emparelhamento entre os dois domínios sobre a mesma cadeia. Conseqüentemente, os domínios VH e VL de um fragmento são forçados a emparelhar-se com os domínios VL e VH complementares de um outro fragmento, de maneira a formar dois locais de união de antígenos. Uma outra estratégia de elaboração de fragmentos de anticorpos biespecíficos utilizando dímeros Fv de fita única (sFv) também foi relatada. Vide Gruber et al, *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994).

São contemplados anticorpos com mais de duas valências. Podem ser preparados, por exemplo, anticorpos triespecíficos. Tutt et al, *J. Immunol.* 147: 60 (1991)

ANTICORPOS HETEROCONJUGADOS

Os anticorpos heteroconjugados são compostos de dois anticorpos unidos covalentemente. Esses anticorpos foram propostos, por exemplo, para dirigir células do sistema imunológico a células indesejadas (Patente Norte-Americana nº 4.676.980) e para o tratamento de infecções por HIV. WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089. Contempla-se que os anticorpos podem ser preparados *in vitro*, utilizando métodos conhecidos na química de proteínas sintéticas, incluindo aqueles que envolvem agentes reticulantes. Imunotoxinas, por exemplo, podem ser construídas utilizando uma reação de troca de dissulfeto ou por meio da formação de uma união de tioéter. Exemplos de reagentes apropriados com este propósito incluem iminotiolato e 4-mercaptobutirimidato de metila e os descritos, por exemplo, na Patente Norte-Americana nº 4.676.980.

ELABORAÇÃO DE FUNÇÃO EFETORA

Pode ser desejável modificar o anticorpo de acordo com a presente invenção com relação à função efetora, de forma a aumentar a eficácia do anticorpo no tratamento de câncer, por exemplo. Resíduo(s) de cisteína pode(m) ser introduzido(s), por exemplo, na região Fc, de forma a permitir a formação de uniões de dissulfeto intercadeias nessa região. O anticorpo homodimérico gerado desta forma pode possuir capacidade de internalização aprimorada e/ou morte celular mediada por complemento aprimorada e citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC). Vide Caron et al, *J. Exp. Med.*, 176: 1191-1195 (1992) e Shopes, *J. Immunol.*, 148: 2918-2922 (1992). Anticorpos homodiméricos com atividade antitumoral aprimorada podem também ser preparados utilizando reticulantes heterobifuncionais, conforme descrito em Wolff et al, *Cancer Research*, 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, pode ser construído um anticorpo que possui regiões Fc duplas e pode, portanto, apresentar capacidades de ADCC e lise de complemento aprimoradas. Vide Stevenson et al, *Anti-Cancer Drug Design* 3: 219-230 (1989).

IMUNOCONJUGADOS

A presente invenção também se refere a imunoconjugados que compreendem um anticorpo conjugado a um agente citotóxico tal como um agente quimioterapêutico, toxina (tal como uma toxina enzimaticamente ativa de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, ou seus fragmentos) ou um isótopo radioativo (ou seja, radioconjugado).

Os agentes quimioterapêuticos úteis na geração desses imunoconjugados foram descritos acima. Toxinas enzimaticamente ativas e seus fragmentos que podem ser utilizados incluem cadeia de difteria A, fragmentos ativos não de união da toxina de difteria, cadeia de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia rícina A, cadeia de abrina A, cadeia de

modeccina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII e PAP-S), inibidor *Momordica charantia*, curcina, crotina, inibidor *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina e os tricotecenos. Uma série de radionucleotídeos é disponível para a produção de anticorpos radioconjugados. Exemplos incluem ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y e ^{186}Re .

Os conjugados do anticorpo e agente citotóxico são fabricados utilizando uma série de agentes acopladores de proteínas bifuncionais, tais como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como adipimidato de dimetila HCl), ésteres ativos (tais como suberato de di-succinimidila), aldeídos (tais como glutaraldeído), compostos bis-azido (tais como bis(p-azidobenzoil)-hexanodiamina), derivados de bis-diazônio (tais como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tais como 2,6-diisocianato de tolieno) e compostos de flúor bis-ativo (tais como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Pode-se preparar, por exemplo, imunotoxina rícina, conforme descrito em Vitetta et al, *Science*, 238: 1098 (1987). Ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno triaminopentaacético marcado com carbono 14 (MX-DTPA) é um exemplo de agente quelante para conjugação de radionucleotídeo ao anticorpo. Vide WO 94/11026.

Em uma outra realização, o anticorpo pode ser conjugado a um "receptor" (tal como estreptavidina) para utilização em pré-direcionamento do tumor, em que o conjugado de anticorpo e receptor é administrado ao paciente, seguido pela remoção de conjugado não unido da circulação, utilizando agente limpante e, em seguida, administração de "ligante" (tal como avidina) que é conjugado a um agente citotóxico (tal como radionucleotídeo).

IMUNOLIPOSSOMOS

Os anticorpos descritos no presente podem também ser

formulados como imunolipossomos. Os lipossomos que contêm o anticorpo são preparados por meio de métodos conhecidos na técnica, conforme descrito em Epstein et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 82: 3688 (1985); Hwang et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 77: 4030 (1980); e Patentes Norte-Americanas nº 4.485.045 e 4.544.545. Lipossomos com maior tempo de circulação são descritos na Patente Norte-Americana nº 5.013.556.

Lipossomos particularmente úteis podem ser gerados por meio do método de evaporação de fase reversa com uma composição de lipídios que compreende fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Os lipossomos são extrudados por meio de filtros com tamanho de poro definido para gerar lipossomos com o diâmetro desejado. Os fragmentos de Fab' do anticorpo de acordo com a presente invenção podem ser conjugados aos lipossomos descritos em Martin et al, *J. Biol. Chem.*, 257: 286-288 (1982) por meio de uma reação de intercâmbio de dissulfetos. Um agente quimioterapêutico (tal como doxorubicina) é opcionalmente contido no interior do lipossomo. Vide Gabizon et al, *J. National Cancer Inst.* 81 (19): 1484 (1989).

COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS DE ANTICORPOS

Os anticorpos que unem especificamente um polipeptídeo ZPA identificado no presente, bem como outras moléculas identificadas pelos testes de seleção descritos acima, podem ser administrados para o tratamento de várias disfunções conforme indicado acima e abaixo na forma de composições farmacêuticas.

Lipofectinas ou lipossomos podem ser utilizados para fornecer os polipeptídeos, moléculas de ácido nucleico, anticorpos, antagonistas ou composições de acordo com a presente invenção para células. Ao utilizar-se fragmentos de anticorpos, o menor fragmento inibidor que se une especificamente ao domínio de união da proteína alvo pode ser utilizado. Com base nas seqüências de região variável de um anticorpo, por exemplo, podem

ser projetadas moléculas de peptídeos que retenham a capacidade de união da sequência de proteínas alvo. Esses peptídeos podem ser sintetizados quimicamente e/ou produzidos por meio de tecnologia de DNA recombinante. Vide, por exemplo, Marasco et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90: 7889-7893 (1993).

A formulação do presente pode também conter mais de um composto ativo conforme o necessário para a indicação específica sendo tratada, preferencialmente aqueles com atividades complementares que não se prejudiquem entre si. Alternativa ou adicionalmente, a composição pode compreender um agente que aprimore a sua função, tal como um agente citotóxico, agente quimioterapêutico ou agente inibidor do crescimento. Essas moléculas encontram-se adequadamente presentes em combinação, em quantidades que são eficazes para o propósito pretendido.

Os ingredientes ativos podem também ser capturados em microcápsulas preparadas, por exemplo, por meio de técnicas de acumulação ou polimerização interfacial (por exemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulose ou gelatina e microcápsulas de póli(metilmetacrilato), respectivamente) em sistemas de fornecimento de drogas coloidais (por exemplo, lipossomos, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Estas técnicas são descritas em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, acima.

As formulações a serem utilizadas para administração *in vivo* devem ser estéreis. Isso é facilmente obtido por meio de filtração através de membranas de filtração estéreis.

Podem ser fabricadas preparações de liberação prolongada. Exemplos apropriados de preparações de liberação prolongada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos que contenham o anticorpo, que se encontram na forma de artigos moldados, tais como filmes ou

microcápsulas. Exemplos de matrizes com liberação prolongada incluem poliésteres, hidrogéis (tais como póli(2-hidroxietilmetacrilato) ou álcool (poli)vinílico, polilactidas (Patente Norte-Americana nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e L-glutamato de γ -etila, etileno vinil acetato não degradável, copolímeros degradáveis de ácido láctico e ácido glicólico, tais como LUPRON DEPOT® (microesferas injetáveis compostas de copolímero de ácido láctico e ácido glicólico e acetato de leuprolida) e ácido póli-D-(-)-3-hidroxi- γ -butírico. Embora polímeros tais como etileno-vinil acetato e ácido láctico-ácido glicólico permitam a liberação de moléculas por mais de cem dias, certos hidrogéis liberam proteínas por períodos de tempo mais curtos. Quando anticorpos encapsulados permanecerem no corpo por um longo período, eles podem desnaturar-se ou agregar-se como resultado da exposição à umidade a 37 °C, o que resulta em perda da atividade biológica e possíveis alterações da imunogenicidade. Estratégias racionais podem ser idealizadas para estabilização, dependendo do mecanismo envolvido. Caso se descubra, por exemplo, que o mecanismo de agregação é a formação de união S-S intermolecular por meio de intercâmbio de tio-dissulfeto, pode-se atingir a estabilização por meio da modificação de resíduos sulfidríla, liofilização a partir de soluções ácidas, controle do teor de umidade, uso de aditivos apropriados e desenvolvimento de composições de matriz de polímeros específicas.

MÉTODOS DE TRATAMENTO UTILIZANDO UM ANTICORPO ANTI-ZPA OU SEUS

FRAGMENTOS

Contempla-se que os anticorpos para um polipeptídeo ZPA podem ser utilizados para tratar várias disfunções relativas a apoptose conforme indicado acima. Apreciar-se-á que fragmentos de união de antígenos de um anticorpo de polipeptídeo anti-ZPA podem também ser utilizados nos métodos a seguir.

Os anticorpos são administrados a mamíferos, tais como seres

humanos, de acordo com métodos conhecidos, tais como administração intravenosa na forma de mistura ou de infusão contínua ao longo de um período de tempo, por via intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespínhal, intravenosa, subcutânea, intraarticular, intrassinovial, intratecal, oral, local ou inalatória.

A localização do alvo de união de um anticorpo de acordo com a presente invenção pode ser levada em consideração na preparação e administração do anticorpo. Quando o alvo de união for uma molécula intracelular, certas realizações da presente invenção fornecem o anticorpo ou seu fragmento de união de antígenos a ser introduzido na célula em que o alvo de união está localizado. Em uma realização, um anticorpo de acordo com a presente invenção pode ser expresso de forma intracelular como um intracorpo. O termo "intracorpo", da forma utilizada no presente, indica um anticorpo ou uma de suas partes de união de antígeno que é expresso de forma intracelular e é capaz de união seletiva a uma molécula alvo, conforme descrito em Marasco, *Gene Therapy* 4: 11-15 (1997); Kontermann, *Methods* 34: 163-170 (2004); Patentes Norte-Americanas nº 6.004.940 e 6.329.173; Pedido de Patente Norte-Americano nº 2003/0104402 e Patente PCT nº WO 2003/077945. A expressão intracelular de um intracorpo é efetuada por meio da introdução de um ácido nucleico que codifica o anticorpo desejado ou uma de suas partes de união de antígenos (que não contém a seqüência líder do tipo selvagem e sinais de secreção normalmente associados ao gene que codifica aquele anticorpo ou fragmento de união de antígenos) em uma célula alvo. Qualquer método padrão de introdução de ácidos nucleicos em uma célula pode ser utilizado, incluindo, mas sem limitar-se a microinjeção, injeção balística, eletroporação, precipitação de fosfato de cálcio, lipossomos e transfecção com vetores de vacinas e virais retrovirais, adenovirais e adeno-associados que conduzem o ácido nucleico de interesse. Um ou mais ácidos

nucleicos que codificam, no todo ou em parte, um anticorpo anti-ZPA de acordo com a presente invenção podem ser fornecidos a uma célula alvo, de forma que sejam expressos um ou mais intracópos que são capazes de união intracelular a uma proteína ZPA e modulação de um ou mais processos
5 celulares mediados por ZPA.

Em uma outra realização, são fornecidos anticorpos de internalização. Os anticorpos podem possuir certas características que aumentam o fornecimento de anticorpos às células ou podem ser modificados para que possuam essas características. Métodos para atingir isso são
10 conhecidos na técnica. Sabe-se, por exemplo, que a cationização de um anticorpo facilita a sua absorção nas células (vide, por exemplo, a Patente Norte-Americana nº 6,703,019). Lipofecções ou lipossomos podem ser utilizados para fornecer o anticorpo para células. Ao utilizar-se fragmentos de anticorpos, o menor fragmento inibidor que se une especificamente ao domínio
15 de união da proteína alvo é geralmente vantajoso. Com base nas seqüências de região variável de um anticorpo, por exemplo, podem ser projetadas moléculas de peptídeos que retenham a capacidade de união da seqüência de proteínas alvo. Esses peptídeos podem ser sintetizados quimicamente e/ou produzidos por meio de tecnologia de DNA recombinante. Vide, por exemplo,
20 Marasco et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90: 7889-7893 (1993).

A entrada de anticorpos em células alvo pode ser aprimorada por meio de métodos conhecidos na técnica. Certas seqüências, tais como as derivadas de HIV Tat ou da proteína com homeodomínio de *Antennapedia*, são capazes de dirigir a absorção eficiente de proteínas heterólogas ao longo de
25 membranas celulares. Vide, por exemplo, Chen et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1999), 96: 4325-4329.

Quando o alvo de união está localizado no cérebro, certas realizações da presente invenção proporcionam que o anticorpo ou o seu

fragmento de união de antígenos atravesse a barreira entre o sangue e o cérebro. Certas doenças neurodegenerativas são associadas a um aumento da permeabilidade da barreira entre sangue e cérebro, de tal forma que o anticorpo ou fragmento de união de antígenos possa ser facilmente introduzido no cérebro. Quando a barreira entre sangue e cérebro permanecer intacta, existem várias abordagens conhecidas na técnica para o transporte de moléculas através dela, que incluem, mas sem limitar-se a métodos físicos, métodos com base em lipídios e métodos com base em canais e receptores.

Métodos físicos de transporte do anticorpo ou fragmento de união de antígenos através da barreira entre sangue e cérebro incluem, mas sem limitar-se a contornar completamente a barreira entre sangue e cérebro, ou criar aberturas na barreira entre sangue e cérebro. Métodos de contorno incluem, mas sem limitar-se a injeção direta no cérebro (vide, por exemplo, Papanastassiou et al, *Gene Therapy* 9: 398-406 (2002)), fornecimento aprimorado por convecção/infusão intersticial (vide, por exemplo, Bobo et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91: 2076-2080 (1994)) e implantação de um dispositivo de fornecimento no cérebro (vide, por exemplo, Gill et al, *Nature Med.* 9: 589-595 (2003); e Gliadel Wafers®, Guildford Pharmaceutical). Métodos de criação de aberturas na barreira incluem, mas sem limitar-se a ultrassom (vide, por exemplo, Patente Norte-Americana nº 2002/0038086), pressão osmótica (tal como por meio de administração de manitol hipertônico (Neuwelt, E. A., *Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation*, Vols. 1 e 2, Plenum Press, Nova Iorque (1989))), permeabilização, por exemplo, por meio de bradiquinina ou permeabilizante A-7 (vide, por exemplo, Patentes Norte-Americanas nº 5.112.596, 5.268.164, 5.506.206 e 5.686.416) e transfecção de neurônios que fornecem à barreira de sangue e cérebro vetores que contêm genes que codificam o anticorpo ou fragmento de união de antígenos (vide, por exemplo, a Patente Norte-Americana nº 2003/0083299).

Métodos com base em lipídios de transporte do anticorpo ou fragmento de união de antígenos através da barreira entre sangue e cérebro incluem, mas sem limitar-se à encapsulação do anticorpo ou fragmento de união de antígenos em lipossomos que sejam acoplados a fragmentos de união de anticorpos que se unem a receptores sobre o endotélio vascular da barreira entre sangue e cérebro (vide, por exemplo, o Pedido de Patente Norte-Americano nº 20 020025313) e revestimento do anticorpo ou fragmento de união de antígenos em partículas de lipoproteína com baixa densidade (vide, por exemplo, o Pedido de Patente Norte-Americano nº 20040204354) ou apolipoproteína E (vide, por exemplo, o Pedido de Patente Norte-Americano nº 20040131692).

Métodos com base em canal e receptor de transporte do anticorpo ou fragmento de união de antígenos através da barreira entre o sangue e o cérebro incluem, mas sem limitar-se ao uso de bloqueadores de glucocorticóide para aumentar a permeabilidade da barreira entre o sangue e o cérebro (vide, por exemplo, o Pedido de Patente Norte-Americano nº 2002/0065259, 2003/0162695 e 2005/0124533); ativação de canais de potássio (vide, por exemplo, o Pedido de Patente Norte-Americano nº 2005/0089473), inibição de transportadores de drogas ABC (vide, por exemplo, o Pedido de Patente Norte-Americano nº 2003/0073713); revestimento de anticorpos com uma transferrina e modulação da atividade de um ou mais receptores de transferrina (vide, por exemplo, o Pedido de Patente Norte-Americano nº 2003/0129186) e cationização dos anticorpos (vide, por exemplo, a Patente Norte-Americana nº 5.004.697).

Outros regimes terapêuticos podem ser combinados com a administração dos anticorpos de acordo com a presente invenção, conforme indicado acima. Caso os anticorpos destinem-se ao tratamento de câncer, por exemplo, o paciente a ser tratado com esses anticorpos pode também receber

terapia de radiação. Alternativa ou adicionalmente, pode ser administrado um agente quimioterapêutico ao paciente. Cronogramas de preparação e dosagem para esses agentes quimioterapêuticos podem ser utilizados de acordo com as instruções dos fabricantes ou conforme determinado empiricamente pelos técnicos no assunto. Cronogramas de preparação e dosagem para essa quimioterapia também são descritos em *Chemotherapy Service*, Ed., M. C. Perry (Williams & Wilkins: Baltimore, MD, 1992). O agente quimioterapêutico pode preceder ou seguir-se à administração do anticorpo, ou pode ser administrado simultaneamente com ele. O anticorpo pode ser combinado com composto anti-estrógeno, tal como tamoxifen, EVISTA® ou anti-progesterona, tal como onapristona (vide EP 616.812) em dosagens conhecidas para essas moléculas.

Caso os anticorpos sejam utilizados para o tratamento de câncer, eles podem ser opcionalmente administrados com anticorpos contra um ou mais antígenos associados a tumores, tais como anticorpos que se unem a um ou mais dentre os receptores ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4 ou VEGF. Estes também incluem os agentes definidos acima. Além disso, o anticorpo é adequadamente administrado em série ou em combinação com tratamentos radiológicos, envolvendo a irradiação ou a administração de substâncias radioativas. Alternativa ou adicionalmente, dois ou mais anticorpos que unem o mesmo ou dois ou mais antígenos diferentes descritos no presente podem ser coadministrados ao paciente. Em uma realização, os anticorpos do presente são coadministrados com um agente inibidor do crescimento. O agente inibidor do crescimento pode ser administrado em primeiro lugar, por exemplo, seguido por um anticorpo de acordo com a presente invenção. Entretanto, a administração simultânea ou a administração do anticorpo de acordo com a presente invenção em primeiro lugar também é contemplada. Dosagens apropriadas para o agente inibidor do crescimento são as utilizadas no

presente e podem ser reduzidas devido à ação combinada (sinergia) do agente inibidor do crescimento e do anticorpo do presente.

Em uma realização, a vascularização de tumores é atacada em terapia de combinação. Um anticorpo de polipeptídeo anti-ZPA e um outro anticorpo (tal como anti-VEGF) são administrados a pacientes portadores de tumores em doses terapeuticamente eficazes conforme determinado, por exemplo, por meio da observação de necrose do tumor ou seus focos metastáticos, se houver. Esta terapia prossegue até o momento em que nenhum efeito benéfico adicional é observado ou nenhum exame clínico exhibe traço do tumor ou quaisquer focos metastáticos. TNF é administrado em seguida, isoladamente ou em combinação com um agente auxiliar tal como alfa, beta ou gama-interferona, anticorpo anti-HER2, heregulina, anticorpo anti-heregulina, fator D, interleucina 1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2), fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) ou agentes que promovem a coagulação microvascular em tumores (tais como anticorpo anti-proteína C, anticorpo anti-proteína S ou proteína de união C4b; vide WO 91/01753, publicada em 21 de fevereiro de 1991), calor ou radiação.

Como a eficácia dos agentes auxiliares variará, pode ser desejável comparar o seu impacto sobre o tumor por meio de seleção de matrizes de forma convencional. A administração de um polipeptídeo anti-ZPA e TNF é repetida até atingir-se o efeito clínico desejado. Alternativamente, um anticorpo anti-polipeptídeo ZPA é administrado junto com TNF e, opcionalmente, agente(s) auxiliar(es). Em casos em que tumores sólidos são encontrados nos membros ou em outros locais suscetíveis a isolamento da circulação geral, os agentes terapêuticos descritos no presente são administrados ao órgão ou tumor isolado. Em outras realizações, um antagonista de FGF ou pDGF, tal como um anticorpo neutralizador anti-FGF ou anti-PDGF, é administrado ao paciente em conjunto com um anticorpo anti-

polipeptídeo ZPA.

Para a prevenção ou o tratamento de uma disfunção relativa a apoptose, a dosagem apropriada de um anticorpo do presente dependerá do tipo de doença a ser tratado, conforme definido acima, severidade e curso da
 5 doença, se o anticorpo é administrado para propósitos preventivos ou terapêuticos, terapia anterior, histórico clínico do paciente e reação ao anticorpo e critério do médico atendente. O anticorpo é administrado adequadamente ao paciente em uma vez ou ao longo de uma série de tratamentos.

10 Dependendo do tipo e da severidade da doença, por exemplo, cerca de 1 µg/kg a 50 mg/kg (tal como 0,1 a 20 mg/kg) de anticorpo é uma possível dose inicial para administração ao paciente, seja, por exemplo, por meio de uma ou mais administrações separadas ou de infusão contínua. Uma dosagem diária ou semanal típica poderá variar de cerca de 1 µg/kg a 100
 15 mg/kg ou mais, dependendo dos fatores mencionados acima. Para administrações repetidas ao longo de vários dias ou mais, dependendo da condição, o tratamento é repetido ou mantido até que ocorra uma supressão desejada de sintomas da doença. Entretanto, outros regimes de dosagem podem ser úteis. O andamento desta terapia é facilmente monitorado por meio
 20 de técnicas e testes convencionais, que incluem, por exemplo, formação de imagens de tumores radiográficas.

ARTIGOS INDUSTRIALIZADOS COM ANTICORPOS

Também é fornecido um artigo industrializado que compreende um recipiente com o anticorpo e um rótulo. Esses artigos são descritos acima,
 25 em que o agente ativo é um anticorpo anti-ZPA.

DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DE DISFUNÇÕES RELATIVAS A APOPTOSE UTILIZANDO

ANTICORPOS

Anticorpos dirigidos contra um ou mais polipeptídeos ZPA podem

ser utilizados para diagnosticar e/ou determinar o prognóstico de uma disfunção relativa a apoptose. Anticorpos dirigidos contra um ou mais polipeptídeos ZPA podem ser utilizados, por exemplo, como diagnósticos ou prognósticos de tumores.

5 Anticorpos, incluindo fragmentos de anticorpos de união de antígenos, podem ser utilizados qualitativa ou quantitativamente, por exemplo, para detectar a expressão de genes que incluem o gene que codifica o polipeptídeo ZPA, seja em células intactas ou em lisatos celulares. Em certas realizações, o anticorpo é equipado com uma marca detectável, tal como
10 fluorescente, e a união pode ser monitorada, por exemplo, por meio de microscopia, citometria de fluxo, fluorimetria ou outros métodos conhecidos na técnica. Estes testes de união são realizados essencialmente conforme descrito acima.

Todas as publicações (incluindo as patentes e pedidos de
15 patente) mencionadas no presente são integralmente incorporadas como referência.

Os reagentes disponíveis comercialmente indicados nos Exemplos foram utilizados de acordo com as instruções do fabricante, a menos que indicado em contrário. A fonte dessas células identificadas nos exemplos a
20 seguir e em todo o relatório descritivo por números de acesso ATCC é a Coleção Norte-Americana de Cultivos de Tipos, Manassas VA. A menos que indicado em contrário, a presente invenção utiliza procedimentos padrão de tecnologia de DNA recombinante, tais como os descritos acima e nos livros-texto a seguir: Sambrook et al, acima; Ausubel et al, *Current Protocols in*
25 *Molecular Biology* (Green Publishing Associates e Wiley Interscience, N.Y., 1989); Innis et al, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, Inc.: Nova Iorque, 1990); Harlow et al, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press: Cold Spring Harbor, 1988); Gait,

Oligonucleotide Synthesis (IRL Press: Oxford, 1984); Freshney, *Animal Cell Culture*, 1987; Coligan et al, *Current Protocols in Immunology*, 1991.

Ao longo do presente relatório descritivo e das reivindicações, a palavra “compreende” ou variações tais como “compreendem” ou “que
5 compreende”, será compreendida como indicando a inclusão de um número inteiro indicado um grupo de números inteiros, mas não a exclusão de nenhum outro número inteiro ou grupo de números inteiros.

O relatório descritivo acima é considerado suficiente para permitir que os técnicos no assunto pratiquem a presente invenção. Os Exemplos a
10 seguir são oferecidos unicamente para fins de ilustração e não se destinam a limitar o escopo da presente invenção de nenhuma forma. Na realidade, várias modificações da presente invenção, além das exibidas e descritas no presente, tornar-se-ão evidentes para os técnicos no assunto a partir do relatório descritivo acima e se encontrarão dentro do escopo das reivindicações anexas.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

IDENTIFICAÇÃO DE SUPOSTOS MEMBROS DA FAMÍLIA BCL-2 DE PEIXE-ZEBRA

Homólogos de certos membros da família Bcl-2 humana haviam sido identificados anteriormente em peixe-zebra utilizando metodologias de
20 pesquisa de seqüências tradicionais (Inohara e Nunez, *Cell Death Diff.* 7: 509-510 (2000); Coultas et al., *Cell Death Diff.* 9: 1163-1166 (2002); Aouacheria et al, *Mol. Biol. Evol.* 22 (12): 2395-2416 (2005)). Apesar de esforços significativos de diversos grupos, não haviam sido encontrados equivalentes em peixe-zebra para muitas proteínas importantes no processo apoptótico intrínseco de
25 mamíferos (id). Os depositantes suspeitaram da existência de genes Bcl-2 inovadores e divergentes em peixe-zebra que não apareceriam nos bancos de dados de seqüências mais comuns e que não poderiam ser facilmente descobertos por meio de pesquisas com base em seqüências tradicionais. Foi,

portanto, realizada uma pesquisa abrangente destas seqüências utilizando pesquisa PROSITE e BLAST tradicional em um banco de dados de seqüências customizado e busca em bancos de dados com base em características com Modelos Markov Ocultos customizados em conjunto com o banco de dados Unison (<http://unison-db.org>).

A. PESQUISA EM BANCOS DE DADOS BLAST/PROSITE

Pesquisas BLAST e PROSITE anteriores por outros grupos não conseguiram determinar homólogos de peixe-zebra para vários membros da família Bcl-2, incluindo Bak, Bik, Bim e PUMA (Inohara e Nunez, *Cell Death Diff.* 7: 509-510 (2000); Coultas et al, *Cell Death Diff.* 9: 1163-1166 (2002); Aouacheria et al., *Mol. Biol. Evol.* 22 (12): 2395-2416 (2005)). Para investigar se o banco de dados utilizado para estes estudos anteriores havia sido insuficientemente amplo, foi construído um banco de dados customizado contendo 136.655 seqüências de aminoácidos de peixe-zebra. O banco de dados customizado foi pesquisado por meio de métodos de pesquisa BLAST padrão (versão 2.2.10) e PROSITE (versão 18), utilizando argumentos padrão e membros conhecidos de seres humanos, camundongos e galinhas da família Bcl-2 como consultas.

Esta pesquisa identificou muitas seqüências, duas das quais não haviam sido identificadas anteriormente em pesquisas similares para seqüências relativas a Bcl-2 em peixe-zebra. A primeira seqüência (Ensembl:ENSDARP00000040899 (SEQ ID Nº 1)) foi 33% idêntica a Bax humano sobre 51% da seqüência com um valor e de $1e-14$. Nenhum dos padrões PROSITE BH alinhado a ENSDARP00000040899 nem o banco de dados Ensembl (disponível em www.ensembl.org; Birney et al, *Nucleic Acids Res.* 34: D556-561 (2006)) anotam aquele gene como hipotético. A segunda seqüência (XP_693331 (SEQ ID Nº 3)) foi 33% idêntica a Bad humano ao longo de 68% da seqüência com um valor e de 1,3.

Pesquisa com padrões PROSITE não identificou nenhum dos membros da família Bcl-2 de peixe-zebra conhecidos e nenhuma sequência de peixe-zebra foi identificada utilizando apenas padrões PROSITE.

B. PESQUISA EM BANCOS DE DADOS COM BASE EM CARACTERÍSTICAS

5 Mesmo utilizando um banco de dados de seqüências customizado projetado para seqüências de peixe-zebra (descrito no Exemplo 1 (a)), foi identificado apenas um novo suposto membro da família Bcl-2. Como pesquisa em bancos de dados BLAST e PROSITE padrão foi aparentemente incapaz de identificar membros Bcl-2 de peixe-zebra adicionais, foi considerada a
10 possibilidade que membros da família possam conter seqüências base gerais significativamente diferentes em peixe-zebra e seres humanos, ainda compartilhando funções. Para abordar esta possibilidade, empregou-se pesquisa de seqüências com base em características. A pesquisa com base em características identifica seqüências que coincidem com um conjunto de
15 características especificadas.

(1) FONTES DE SEQÜÊNCIAS DE PESQUISAS COM BASE EM CARACTERÍSTICAS

Realizou-se pesquisa com base em características no banco de dados Unison. Resumidamente, Unison compreende um compêndio não redundante de seqüências de muitos bancos de dados fonte e extensas
20 previsões proteômicas computadas previamente em um banco de dados relacional (<http://unison-db.org>). O esquema Unison, dados não patenteados e previsões, ferramentas e interface com a Internet foram liberados com base na Licença Livre Acadêmica e são disponíveis para uso ou download em <http://unison-db.org/>. No momento do estudo, a Unison incluiu 6,5 milhões de
25 seqüências distintas, incluindo 136.655 seqüências distintas de peixe-zebra do banco de dados RefSeq (Wheeler et al, *Nucl. Acid Res.* 34: D173-180 (2006)); os bancos de dados UniProt/Swiss-Pro e UniProt/TrEMBL (Wu, *Nucl. Acids Res.* 34: D187-191 (2006)) e *Ensembl. Release 35* (Birney et al, *Nucleic Acids*

Res. 34: D556-561 (2006)).

(2) CONSTRUÇÃO DE MODELOS MARKOV OBSTRUÍDOS CUSTOMIZADOS PARA
DOMÍNIOS BH E BCL-2

Diversos alinhamentos de seqüências foram construídos a partir
5 de matrizes e padrões PROSITE (Sigrist et al, *Brief Bioinform.* 3: 265-274
(2002)). Para os padrões PS01080 (BH1), PS01258 (BH2), PS01259 (BH3) e
PS01260 (BH4) e para a matriz PS50063 (BH4), as seqüências negativas
falsas foram incorporadas manualmente ao alinhamento de seqüências
positivas verdadeiras obtidas a partir do Web site PROSITE
10 (<http://us.expasy.org/cgi-bin/nicedoc.po?pdoc00829>). Para a matriz PS50062
(Bcl-2), o alinhamento manual dos três falsos negativos não era óbvio e
somente foram utilizados os positivos verdadeiros. Os alinhamentos foram
utilizados para construir modelos Markov ocultos “globais” (HMM)s utilizando os
programas hmmbuild e hmmscalibrate de HMMER v. 23.2 (Eddy, *Bioinformatics*
15 14: 755-763 (1998)) incorporando os argumentos padrão. A fim de determinar
rechamada e precisão e para determinar limites de avaliação apropriados, os
seis HMMs construídos foram alinhados para o banco de dados de seqüências
UniProt/Swiss-Prot (Figura 1). Os resultados demonstraram que os HMMs
construídos apresentaram rechamada aprimorada sem perda de precisão em
20 limites de avaliação apropriados. A partir dos resultados, foram selecionados
cortes de avaliação de alinhamentos HMM conforme segue: BH1: 21; BH2: 13;
BH3: 12; BH4: 22; matriz BH4: 20; e matriz Bcl2: 20.

A estrutura de atualização com base em conjunto Unison foi
utilizada para conduzir resultados de hmmsearch para todas as 136.655
25 seqüências de peixe-zebra. Os alinhamentos de HMM para todas as
seqüências de peixes-zebra foram computados e carregados em uma cópia
interna de Unison utilizando a função de atualização automática Unison.
Também foi realizada uma análise de domínio transmembrana utilizando

TMHMM v. 2.0c (Krogh et al, *J. Mol. Biol.* 305: 567-580 (2001)) com as opções padrão. Após o carregamento dos resultados, pesquisas com base em características envolveram a elaboração de consultas SQL para representar conjuntos apropriados de previsões proteômicas previamente
 5 computadorizadas. Foi criada uma consulta para identificar todas as seqüências de peixe-zebra que se alinharam a qualquer dos HMMs utilizando os critérios de avaliação definidos acima. A consulta identificou cada seqüência que se sobrepôs genomicamente com um membro de família Bcl-2 conhecido. Os quatro possíveis genes mais promissores não identificados anteriormente
 10 como membros da família Bcl-2 de peixe-zebra foram adicionalmente analisados.

EXEMPLO 2

ANÁLISE DE SEQÜÊNCIAS IDENTIFICADAS

Cada um dos supostos genes de peixe-zebra relativos a Bcl-2
 15 (“B2R”) (ENSDARP0000040899 e XP_693331 identificado a partir da pesquisa BLAST descrita no Exemplo 1 (a) e ENSDARP00000066976, FGENESH00000065416, FGENESH00000065416 e FGENESH00000082230 identificados a partir da pesquisa com base em características descrita no Exemplo 1 (b)) foi adicionalmente analisado para atribuir uma identidade
 20 específica como um membro particular da família Bcl-2. Cada seqüência foi submetida a pesquisa BLAST e alinhada com a seqüência identificada mais homóloga, resultando em um valor e, avaliação, percentual de identidade e percentual de cobertura (vide Tabela 2). Foi determinada a presença ou ausência de um suposto domínio transmembrana na proteína codificada. Os genes vizinhos
 25 no genoma de peixe-zebra também foram examinados, de forma que qualquer sintenia conservada pudesse ser determinada (vide Tabela 2).

A. **zBAK (ENSDARP00000040899)**

Pesquisa BLAST (descrita no Exemplo 1(a)) identificou a

seqüência ENSDARP00000040899 como sendo 33% idêntica a Bax humano ao longo de 51% da seqüência com um valor e de $1e-14$ (vide Tabela 2). A seqüência de aminoácidos de ENSDARP00000040899 e sua seqüência de nucleotídeos de codificação são exibidas abaixo.

5 ENSDARP00000040899:

MACEASQDDQIGEALLIGVVRQELMEVMEVTEGNAAPPALPEAKPISNSQDQILV
 QQLANTIKVIGDKLDQDQAFNDMIDGLVKVADKSSFWKLVEKVFTDGQINWGRIIV
 LFYSVGKLSAKMVVARLPRIVSDILSLSLDYFKRNLLQWIRTVGGWMNSIPALACF
 SVDQFSGSSMRKYSPYVGWVFAFTGGLLLGGFIVSRFQKT (SEQ ID Nº 1)

10 ENSDARG00000030881:

ATGGCTTGTGAAGCCTCACAGGATGATCAGATTGGAGAGGCACTCTTAATA
 GGGGTAGTAAGGCAGGAGCTAATGGAGGTGATGGAGGTGACTGAAGGAA
 ATGCAGCTCCTCCAGCTCTTCCTGAAGCTAAACCAATAAGCAACAGCCAG
 GACCAGATTCTGGTTCAGCAGCTGGCGAACACAATCAAAGTGATCGGTGA
 15 CAAACTCGACCAGGATCAAGCATTTAACGACATGATCGATGGCTTAGTAAA
 GGTAGCTGATAAAAGCAGTTTCTGGAACTTGTGGAAAAGGTGTTACAGA
 TGGCCAGATCAACTGGGGCAGAATTATCGTGCTGTTTTATTCTGTTGGAAA
 ACTGTCAGCCAAGATGGTCGTCGCTCGCCTACCCAGAATTGTTTCAGATAT
 TTTATCATTAAGTCTTGATTACTTCAAAGGAATCTGTTGCAGTGGATTTCGC
 20 ACAGTAGGAGGATGGATGAACAGTATCCCTGCACTGGCCTGTTTCTCTGTT
 GACCAATTTTCTGGTTCTTCAATGAGAAAATATTCTCCTTACGTTGGAGTTG
 TGTTTGCCTTCACTGGTGGCCTACTGCTGGGTGGCTTCATCGTCTCGAGAT
 TTCAGAAAACCTGA (SEQ ID Nº 2)

25 Ensembl indicou ENSDARP00000040899 como sendo hipotético,
 sem identidade atribuída. Nenhum dos padrões PROSITE BH alinhou-se à
 seqüência. Dos HMMs construídos no Exemplo 1 (b), cada um dos HMMs Bcl-
 2, BH1, BH2 e BH3 alinhou-se à seqüência com avaliações de 33, 14, 6,1 e
 2,4, respectivamente, e valores e de $7,5e-7$, 0,031, 110 e 1300,

respectivamente. Um alinhamento da seqüência também foi realizado com os domínios BH3 de vários membros da família Bcl-2 propostos ou conhecidos e examinado utilizando Jalview 2.05 (Clamp et al, *Bioinformatics* 12: 426-427 (2004)) (Figura 2). Apesar da má avaliação do alinhamento BH3 HMM para ENSDAR00000040899, a seqüência exibiu similaridade qualitativamente boa com os domínios BH3 de outros membros da família Bcl-2 e substituições de aminoácidos plausíveis em todas as posições que não foram conservadas (vide Figura 2). Análise TMHMM também previu que a seqüência continha um domínio transmembrana a partir de cerca dos aminoácidos 180 a 202.

A presença de um relacionamento sintênico conservado foi examinado para determinar ENSDAR00000040899 e todas as demais seqüências descritas no presente comparando-se os genes laterais para o gene de peixe-zebra com os genes laterais para o homólogo funcional humano, utilizando o banco de dados ENSEMBL disponível ao público (disponível em www.ensembl.org; Birney et al, *Nucleic Acids Res.* 34: D556-561 (2006)). O gene de peixe-zebra foi designado para compartilhar um relacionamento sintênico conservado com o gene humano caso mais de um gene lateral isolado sobre um ou os dois lados do peixe-zebra apresentassem um equivalente humano também lateral ao gene humano. ENSDAR00000040899 não se encontrava em um relacionamento sintênico conservado com Bak humano, mas sim para Bax humano.

ENSDAR00000040899 também foi incluído em um alinhamento de possíveis membros da família Bcl-2 de peixe-zebra contra seqüências Bcl-2 humanas e vice-versa, utilizando BLAST para identificar os melhores alinhamentos BLAST recíprocos, identidade em pares e cobertura de alinhamento (Tabela 2). Embora o alinhamento da possível seqüência com Bax humano resultasse no melhor valor e, a melhor cobertura de seqüências geral foi obtida por meio de alinhamento com Bak humano. Embora os alinhamentos

BH2 e BH3 HMM não apresentassem resultados significativos, a presença desses domínios no contexto de avaliações significativas para Bcl-2 e BH1, a ausência de um domínio BH4 previsto, a similaridade do domínio BH3 com o de outros membros Bcl-2, a previsão de um domínio TM e a análise BLAST recíproca combinadas sugerem que ENSDAR00000040899 foi um membro pró-apoptótico da família Bcl-2, mais provavelmente funcionalmente homólogo a Bak.

B. zBAD2 (XP 693331)

Conforme descrito no Exemplo 1 (a), XP_693331 também foi identificado por meio de uma busca BLAST em um banco de dados de seqüências de peixe-zebra customizado. A seqüência de aminoácidos de XP_693331 e a seqüência de mRNA que a codifica são descritas abaixo.

XP_693331:

MENTSHDHQDDSSSTLDEKERSHLKGTIKNHGQHQQDRTSANISPQGRVRLYSESQ
VYTVSRWQDTETQDGASVEENGDGLPFRGRSQSAPAALWKAKKYGRQLRRMS
DEFDTWLDKGEVKRANSQKQTYRGWFSFLWSPKEEEGRE (SEQ ID Nº 3)

XM_688239 (nucleotídeos 367-804):

ATGGAGAACACCTCGCATGACCATCAAGATGATTCCAGCACCTTGGATGAA
AAAGAGAGATCACATCTGAAAGGGACAATCAAGAACCATGGACAACATCA
GGATCGAACATCGGCCAACATTTCTCCTCAAGGGCGTGTGCGGCTCTATT
CGGAATCTCAAGTGTATACAGTCAGCCGCTGGCAGGACACAGAGACCCAG
GATGGAGCATCGGTGGAGGAGAACGGAGATGGACTTCCATTGAGGGGTC
GTTCTCAATCAGCACCTGCTGCACTGTGGAAAGCAAAAAGTATGGCCGT
CAGTTGAGGAGAATGAGCGATGAATTCGACACATGGCTCGATAAAGGGGA
GGTCAAGAGAGCGAACAGCCAGAAACAGACCTACCGAGGATGGTTTTTCGT
TCCTCTGGAGTCCCAAAGAAGAAGAGGGGCAGAGAATGA (SEQ ID Nº 4)

A anotação do GenBank para XP_693331 previu que a seqüência era similar à proteína pró-apoptótica somente BH3, Bad. Um alinhamento de

XP_693331 com Bad humano demonstrou que as duas proteínas possuem 33% de identidade ao longo de 72% da sequência. A avaliação HMMer contra o domínio BH3 foi de 12,6 com um valor *e* de 1,3. Uma análise TMHMM de XP_693331 não exibiu domínios transmembrana previstos na sequência, similares a Bad humano. Foi obtido um clone de XP_693331 (Open Biosystems) e as sequências vizinhas no genoma de peixe-zebra foram identificadas.

Os genes adjacentes a XP_693331 diferiram dos adjacentes a Bad humano, de forma que XP_693331 não se encontrava em um relacionamento sistêmico conservado com Bad humano. Outro gene de peixe-zebra (AI332008), entretanto, havia sido identificado anteriormente como possuindo homologia significativa para Bad humano e foi sintênico para Bad humano (Inohara e Nunez, *Cell Death Diff.* 7: 509-510 (2000); Coultas et al, *Cell Death Diff.* 9: 1163-1166 (2002)). XP_693331 foi cerca de 32% idêntica à sequência identificada anteriormente. Desta forma, os dados acima sugeriram que XP_693331 era um membro da família Bcl-2 relativa a Bad humano. Como um gene de peixe-zebra com similaridade de sequências e sintenia conservada para Bad humano era anteriormente conhecido, XP_693331 foi denominado “zBad2” como o segundo gene de peixe-zebra com identidade para Bad humano.

c. zBik (ENSDARP00000066976)

A sequência de peixe-zebra ENSDARP00000066976 foi identificada por meio de pesquisa em bancos de dados com base em características, conforme descrito no Exemplo 1 (b), como uma proteína B2R. A sequência de aminoácidos de ENSDARP00000066976 e a sequência de nucleotídeos que a codifica são descritas abaixo.

ENSDARP00000066976:

MVEETRQQKNATTTLQAGPAEVDHSNLYAFNMRVTQTIGRQLAQIGDEMDNK

WRQEPPVPWQNLNFGIYPYVLSRRVFSGRILANLWGSKIMPIFRTSWLLPQLQ
 NGCQEARKWAAWWSNLHVSDWSRSTTYTLASALLLVTVSIFLVNWNENEYEG
 (SEQ ID N° 5)

ENSDARG00000045549:

5 ATGGTGGAAGAACTAGACAGCAGAAAAACGCCACAACCCTGCAGGCTGG
 ACCTGCTGAGGTTGACCACAGTAATCTCTATGCATTCAATATGAGAGTCAC
 CCAGACTATCGGACGACAGCTGGCTCAAATAGGGGACGAAATGGACAATA
 AATGGCGCCAAGAACCGCCTGTCCCATGGCAGAACCTGAATTTCTGGGATT
 TATCCTTATGTCCTAAGTAGGAGAGTGTTCTCTGGAAGAATCCTCGCTAAT
 10 CTTTGGGGGTCTAAGATTATGCCGATATTCAGGACGTCCTGGTTGCTTCCA
 CAGCTTCAAATGGCTGTCAGGAGGCTAGAAAGTGGGCAGCTTGGGTGTC
 CAACTTGCATGTTTCTGACTGGTCTCGCAGCACTACATACACCCTGGCATC
 TGCTTTACTACTGGTCACTGTGTCTATCTTCCTTGTAACCTGGAATGAGTAT
 GAAGGCTGA (SEQ ID N° 6)

15 Pesquisa de BLAST no banco de dados de seqüências de peixe-
 zebra customizado (conforme descrito no Exemplo 1 (a)) não identificou
 ENSDARP00000066976. Análise TMHMM da seqüência previu a presença de
 um domínio de transmembrana de cerca dos aminoácidos 130 a 149.
 ENSDARP00000066976 não coincidiu com os HMMs BH1, BH2 e BH4. A
 20 seqüência coincidiu com o HMM BH3 com avaliação 18 e valor e de 0,023. A
 presença de uma região relativa a BH3 e um domínio de transmembrana e a
 ausência de regiões relativas a BH1, BH2 e BH4 sugeriram que
 ENSDARP00000066976 poderá ser um membro da subfamília somente BH3
 pró-apoptótica de proteínas Bcl-2.

25 A seqüência ENSDARP00000066976 no genoma de peixe-zebra
 compartilhou um relacionamento sintênico conservado com Bik humano. A
 suposta região BH3 de ENSDARP00000066976 foi comparada com genes Bcl-
 2 de peixe-zebra humanos previamente conhecidos (vide Figura 2). O domínio

BH3 de ENSDARP00000066976 foi mais similar ao de Bid humano apesar da sintenia e similaridade de BLAST com Bik humano (Figura 3B). Com base em uma comparação das duas seqüências, entretanto, ENSDARP00000066976 não continha um suposto local de divisão de caspase, enquanto BID humano contém esse local. A presença do domínio BH3, a ausência de outros domínios BH, a previsão de domínio transmembrana, a similaridade de seqüências geral e análises de relacionamento sistêmico sugeriram que ENSDARP00000066976 era um membro da subfamília Bcl-2 somente BH3 pró-apoptótica de peixe-zebra ortólogo a Bik humano.

D. zBim (FGENESH00000065416)

A seqüência de peixe-zebra FGENESH00000065416 foi identificada por meio de pesquisa em bancos de dados com base em características, conforme descrito no Exemplo 1 (b), como uma proteína B2R. Pesquisa de BLAST no banco de dados de seqüências de peixe-zebra customizado (conforme descrito no Exemplo 1 (a)) não identificou FGENESH00000065416. FGENESH00000065416 não coincidiu com os HMMs BH1, BH2 e BH4. A seqüência coincidiu com o HMM BH3 com avaliação 18 e valor p de 0,023. A presença de uma região relativa a BH3 e um domínio de transmembrana e a ausência de regiões relativas a BH1, BH2 e BH4 sugeriram que FGENESH00000065416 poderá ser um membro da subfamília somente BH3 pró-apoptótica de proteínas Bcl-2.

Alinhamentos de BLAST com a seqüência FGENESH00000065416 demonstram que a metade N-terminal da seqüência era 32% idêntica a Bim humano ao longo de 47% de Bim humano com um valor p de $9e-7$, o que sustenta adicionalmente a cessão de FGENESH00000065416 como um membro da subfamília somente BH3 pró-apoptótica de proteínas Bcl-2. Entretanto, a metade C-terminal de FGENESH00000065416 foi mais similar (32% idêntica) à proteína de união de

RNA regulada por meio de desenvolvimento 1, uma proteína de união de RNA de rato e de camundongo com suposto envolvimento no desenvolvimento neural.

A justaposição de homologia de Bim e homologia para uma função/proteína não relacionada na mesma região contígua pode ser atribuída a um erro de montagem no genoma de peixe-zebra. De fato, nenhum produto de RNA pôde ser amplificado de toda a seqüência ou do fragmento similar a Bim. Apesar do aparente erro de montagem, a presença do domínio BH3, a ausência de outros domínios BH e a similaridade de seqüências sugeriram que pelo menos a parte N-terminal de FGENESH00000065416 era homóloga a Bim humano.

E. zPUMA (FGENESH00000078270)

A seqüência de peixe-zebra FGENESH00000078270 foi identificada por meio de pesquisa em bancos de dados com base em características, conforme descrito no Exemplo 1 (b), como uma proteína B2R. A seqüência de aminoácidos de FGENESH00000078270 e a seqüência de nucleotídeos que a codifica (número de acesso CN323956) são descritas abaixo.

FGENESH00000078270:

MTLCFLNTSAALADEEGDPLPTALINSLDLAVNQPVSGSGFCKLKLANEQTVV
 TLQQLATREPMGDEEEVQGFQSTDPHGTTVCGMARPEMESRVDEHNSGTP
 NSCRMEVLRQDAWPNGSIIQPCHRRRTIATQTSTLSAPLPHIPSHDAFSLDSV
 QQQDSLLRDNSGTEQEVSRLPLPDLLADNQSSSEESTSSSSSTAEEDPTLE
 EQAVERVAVQLRTIGDEMNAVFLQRNAVPHWQNWRLYRGLMALVSDTINAL
 YQHGLR (SEQ ID N° 7)

FGENESH00000078270:

ATGACTTTGTGCTTTTTTAAACACAAGCGCAGCGCTCGCTGATGAAGAGGG
 CGATCCTCTGCCCCACTGCTCTGATAAACAGTCTTGACCTAGCAGTGAATCA
 GCCGGTGTGAGGTTCTGGCTTTTGTAAGTCAAAGTGGCCAATGAGCAAAC

TGTTGTGACTCTCCAACAATTAGCAACAAGAGAACCCATGGGGGATGAAG
 AGGAGGTGCAGGGCTTTCAGAGCACAGACCCACACGGGACAACCTGTATGT
 GGAATGGCCCCGACCAGAGATGGAAAGCAGAGTGGACGAACATAACTCTG
 GCACGCCGAACAGCTGCAGGATGGAGGTGCTGCGTCAGGACGCCTGGCC
 5 AAATGGCAGCATCATCCAGCCCTGCCATCGACGCCGAACCATTGCCACTC
 AAACCAGCACTCTCTCTGCACCACTGCCCCACATCCCCTCACATGATGCCT
 TCAGCTTGGACAGCGTCCAGCAGCAGGACAGTCTACTCAGGGACAATTCA
 GGAACAGAACAGGAAGTGTCCAGGCCTCTTCCTCTGCCAGATCTGCTAGC
 AGACAACCAGAGCTCCTCAGAGGAGTCCACGTCCAGCAGCAGCTCGACC
 10 GCTGAGGAGGACCCACACTGGAGGAGCAGGCTGTGGAGAGGGTGGCC
 GTACAACTGAGGACAATTGGGGACGAGATGAACGCTGTCTTCCTTCAGAG
 GAATGCCGTCCCGCACTGGCAGAACTGGAGAGGCCTGTACCGCGGGCTC
 ATGGCGCTGGTCTCGGACACCATCAATGCCCTCTACCAGCACGGCCTCAG
 ATGA (SEQ ID N° 8)

15 Pesquisa de BLAST no banco de dados de seqüências de peixe-
 zebra customizado (conforme descrito no Exemplo 1 (a)) não identificou
 FGENESH00000078270. Análise TMHMM não previu um domínio
 transmembrana para esta seqüência. FGENESH00000078270 não coincidiu
 com os HMMs BH1, BH2 e BH4. A seqüência coincidiu com o HMM BH3 com
 20 avaliação 13 e valor e de 0,77. FGENESH00000078270 era similar a Puma
 humano com base em um alinhamento de BLAST que exibe 25% de identidade
 com um valor e de 2.1e1. A identificação dos genes em volta de
 FGENESH00000078270 no genoma de peixe-zebra indicou que
 FGENESH00000078270 compartilhou um relacionamento sintênico conservado
 25 com Puma humano.

A presença de uma região relativa a BH3 e uma ausência de
 regiões relativas a BH1, BH2 e BH4 e um domínio transmembrana, combinada
 com a similaridade de seqüências e sintonia conservada, sugeriu fortemente

que FGENESH00000078270 era um membro da subfamília somente BH3 pró-apoptótica de proteínas Bcl-2 e, mais especificamente, era ortóloga a Puma humano.

F. zBmf2 (FGENESH00000082230)

5 A sequência de peixe-zebra FGENESH00000082230 foi identificada por meio de pesquisa em bancos de dados com base em características, conforme descrito no Exemplo 1 (b), como uma proteína B2R. A sequência de aminoácidos de FGENESH00000082230 e a sequência de nucleotídeos que a codifica são descritas abaixo.

10 FGENESH00000082230:

MDDEEDEQLPRCCETPLRNKRSEKRDAHGGDVGQTAHRHASTQTAGSVLNS
ARDADMAPFQGSQREASSLCRVVGARTAFRAPCGTGGLVSLTMGPGARGG
PRALFHGNAGFRAHFPALEFALDGLQNAEQREQDEGRPEEKEEDRDAGISV
EVQIGRKLREMGDQFQQEHLQLILDETRYRI (SEQ ID Nº 9)

15 FGENESH00000082230:

ATGGATGATGAGGAGGATGAACAGCTTCCTCGCTGCTGTGAAACGCCGCT
AAGAAACAAGCGCTCAGAGAAGAGAGACGCCACGGTGGAGACGTGGGA
CAAACAGCTCACAGACACGCATCCACACAGACTGCTGGCTCTGTCCTCAA
TTCAGCGAGAGACGCAGATATGGCACCATTCCAGGGCTCACAGAGAGAAG
20 CATCATCTCTTTGCAGAGTTGTGGGTGCTAGGACTGCATTCAGGGCTCCCT
GTGGAACCTGGGGGCCTTGTGTCACTTACTATGGGCCCCGGAGCCCCGGGG
TGGGCCAAGAGCACTTTTTTCATGGAAACGCTGGATTTCGTGCACACTTCCC
TGCCTGTTCGAACCCGCCCTGGATGGCTTACAAAACGCCGAACAGAGAG
AGCAGGACGAAGGCAGACCAGAAGAAAAAGAAGAGGATCGCGACGCAGG
25 GATTAGCGTGAGGTTTCAGATTGGACGTAAATTACGTGAAATGGGGGATC
AGTTTCAGCAAGAGCATCTTCAGCTGATTATATTAGATGAAACCAGATACA
GGATTAA (SEQ ID Nº 10)

Pesquisa de BLAST no banco de dados de seqüências de

peixe-zebra customizado (conforme descrito no Exemplo 1 (a)) não identificou FGENESH00000082230. Análise TMHMM não previu um domínio transmembrana para esta seqüência. FGENESH00000082230 não coincidiu com os HMMs BH1, BH2 e BH4. A seqüência coincidiu com
 5 o HMM BH3 com avaliação 18,6 e valor e de 0,02. FGENESH00000082230 era similar a Bmf humano com base em alinhamento de BLAST (41% de identidade sobre 42% da molécula com valor e de $2,1e1$). O alinhamento também demonstrou que FGENESH00000082230 continha um suposto domínio de união de cadeia
 10 leve de dineína similar a Bmf humano (Day et al, *Biochem. J.* 377: 597-605 (2004)). A identificação dos genes em volta de FGENESH00000082230 no genoma de peixe-zebra indicou que FGENESH00000082230 também compartilhou um relacionamento sintênico conservado com Bmf humano. A presença de uma região
 15 relativa a BH3 e uma ausência de regiões relativas a BH1, BH2 e BH4 e um domínio transmembrana, combinada com a similaridade de seqüências e sintonia conservada, sugeriu fortemente que FGENESH00000082230 era um membro da subfamília somente BH3 pró-apoptótica de proteínas Bcl-2 e, mais especificamente, era ortóloga a Bmf
 20 humano.

Um outro gene de peixe-zebra homólogo a Bmf humano já foi identificado em peixe-zebra (Coultas et al, *Cell Death Diff.* 9: 1163-1166 (2002); número de acesso BI891121). Aquele gene não compartilhou, entretanto, sintonia conservada com Bmf humano, ao contrário de
 25 FGENESH00000082230. A similaridade entre FGENESH00000082230 e BI891121 foi de 43% sobre 27% da molécula. Conseqüentemente, FGENESH00000082230 foi denominado zBmf2 para diferenciá-lo do gene identificado anteriormente.

TABELA 2**CARACTERÍSTICAS DE SUPOSTOS MEMBROS DE FAMÍLIA BCL-2 EM PEIXE-ZEBRA**

Cessão	Número de acesso de proteína	Valor e	Avaliação	% de identidade	% de cobertura	Gene humano	Sintênico?
zBim	FGENESH00000065416	9e-7	55	32	47	Bim	S
zBak	ENSDARP00000040899	4e-5	50	25	86	Bak	N
		1e-14	81	33	51	Bax	S
zBax	ENSDARP00000023687	2e-6	54	29	68	Bak	N
		2e-47	189	51	98	Bax	N
zBik	ENSDARP00000066976	1,41e4	20	47	12	Bik	S
zPuma	FGENESH00000078270	2,1e1	30	25	49	Puma	S
zBmf2	FGENESH00000082230	0.011	42	41	42	Bmf	S
zBad2	XP_693331	8e-12	64	33	72	Bad	N

G. OBSERVAÇÕES GERAIS COM REFERÊNCIA A GENES B2R DE PEIXE-ZEBRA

De forma geral, os homólogos de peixe-zebra dos genes da família Bcl-2 conhecidos anteriormente e identificados no presente lembraram muito os seus parceiros humanos (Tabela 3), em que os membros da família Bcl-2 com múltiplos domínios possuem o grau de similaridade mais alto (Figura 3A). As proteínas somente BH3 de peixe-zebra foram as mais divergentes com relação aos genes humanos (Figura 3A), com similaridade geral variando de 27% (zPuma) a 46% (zBad e zBmf2) (vide Tabela 3). As proteínas somente BH3, entretanto, são conhecidamente as mais divergentes das subfamílias Bcl-2 de vertebrados. Observou-se um grau de similaridade muito mais alto no próprio domínio BH3, que varia de 66 a 79% (Tabela 3; Figura 3B).

TABELA 3**COMPARAÇÃO ENTRE PROTEÍNAS B2R HUMANAS E DE PEIXE-ZEBRA**

Gene de peixe-zebra	Homólogo de mamíferos	% de homologia	Acesso nº	Cromossomo de peixe	Cromossomo humano	Sintênico?
Pró-sobrevivência						
zBip1	Bcl-x _L	67%	AF317837	5	20q11.21	sim
zBip2	Bcl-2	57%	NM_001030253.1	24	18q21.33	não
zMcl-1a	Mcl-1	43%	NM_131599	19	1q21.2	sim
zMcl-1b	Mcl-1	38%	NM_194394.2	16	1q21.2	sim
zNR13	Boo/ DIVA	30%	AF441285	18	15q21.2	sim
Somente BH3 pró-apoptótico						
zBad1	Bad	46% (79%)	BC097099.1	7	11q13.1	sim
zBad2	Bad	35% (66%)	XP_693331	21	11q13.1	sim
zBid	Bid	30% (66%)	XM_698543.1	18	22q11.21	não
zBik	Bik	38% (66%)	ENSDARP000000 6697	4	22q13.2	sim
zBmf1	Bmf	46% (72%)	XM_695596.1	23	15q15.1	não
zBmf2	Bmf	38% (66%)	FGENESH000000 82230	20	15q15.1	sim
zNoxa	Noxa	27% (66%)	DV595521.1 (EST)	19	18q21.32	não
zPuma	Puma	86%	FGENESH000000 78270	16	19q13.32	sim
zBim	Bim	ND	FGENESH000000 65416	13	2q13	ND
Múltiplos domínios pró-apoptótico						
zBak	Bak	41%	ENSDARP000000 40899	3	6p21.31	para hBax

Gene de peixe-zebra	Homólogo de mamíferos	% de homologia	Acesso nº	Cromossomo de peixe	Cromossomo humano	Sintênico?
zBax	Bax	73%	ENSDARP000000 23687	ND	19q13.33	não
zBok1	Bok	81%	NM_001003612.1	ND	2q37.3	ND
zBok2	Bok	74%	BC053218.1	2	2q37.3	sim

ND indica não determinado. Os percentuais entre parênteses indicam o percentual de homologia somente no domínio BH3.

EXEMPLO 3

VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL DE POSSÍVEIS GENES BCL-2

5 Os estudos nos Exemplos 1 e 2 demonstraram que as proteínas identificadas acima compartilharam homologia com certos membros da família Bcl-2 e foram membros propensos do processo apoptótico intrínseco. Para confirmar essas atribuições, a função de cada proteína foi determinada em peixe-zebra.

A. PADRÕES DE EXPRESSÃO DE GENES B2R DE PEIXE-ZEBRA

10 Para determinar a expressão normal das proteínas B2R de peixe-zebra previamente conhecidas e identificadas no presente, o mRNA que codifica cada proteína foi analisado por meio de RT-PCR em estágios de desenvolvimento específicos e em tecidos adultos específicos (Figuras 3C e 3D). Peixe com barbatanas longas Tubingen adulto foi obtido do Centro
15 Internacional de Recursos de Peixe-Zebra. Os peixes foram mantidos de acordo com o Livro de Peixe-Zebra (Westerfield, *The Zebrafish Book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. quarta edição, University of Oregon Press: Eugene (2000)). RNA foi isolado a partir de embriões de peixe-zebra do tipo selvagem decorionado (100 ng) nos momentos indicados
20 utilizando QiaShredder (Qiagen) por trinta ciclos, seguido por purificação com o Mini kit RNAeasy (Qiagen) utilizando digestão de DNaseI de acordo com as instruções do fabricante. Tecidos adultos foram isolados de um peixe-zebra

fêmea adulto e RNA (50 ng) foi extraído destes tecidos de forma similar à extração do tecido embrionário. GAPDH foi incluído como um controle da quantidade de RNA introduzido. Os produtos resultantes foram resolvidos sobre e-géis a 0,8% (Invitrogen) e fotografados.

5 Com exceção de zBik e zBok, todos os genes B2R de peixe-zebra examinados foram expressos matematicamente (no estágio de 1000 células) (Figura 3C). Após o início de transcrição zigótica (cerca de cinco horas após a fertilização), zBad1, zBik, zBad, zBmf1, zNoxa, zBax, zMcl-1a, zMcl-1b, zBip-1 e zNR13 foram expressos em níveis razoavelmente consistentes (Figura 13C).
10 Por outro lado, a transcrição de zBak, zBmf2 e zBip2 foi reduzida dramaticamente antes de aumentar novamente em um estágio posterior de desenvolvimento (Figura 3C). zBok2 foi fortemente expresso matematicamente, mas era em grande parte ausente em estágios posteriores do desenvolvimento embrionário (Figura 3C).

15 Dos sete tecidos de peixe-zebra adultos examinados, o ovário exibiu transcrição significativa de cada um dos genes, exceto zBmf2 (Figura 3D). Por outro lado, o fígado exibiu expressão apenas fraca de zBid, zMcl-1a e zMcl-1b (Figura 3D). Vários dos genes somente BH3 de peixe-zebra foram expressos em apenas alguns tecidos (Figura 3D).

20 **B. EFEITO APOPTÓTICO DE SUPOSTAS PROTEÍNAS B2R DE PEIXE-ZEBRA IN VIVO**

Foi determinada a capacidade de cada um dos genes B2R de peixe-zebra conhecidos anteriormente e identificados no presente para ativar o processo apoptótico intrínseco. cDNAs de peixe-zebra foram clonados direcionalmente no vetor de expressão pCS108 (Fletcher et al, *Gene Expr.*
25 *Patterns* 5 (2): 225-30 (2004);
http://tropicalis.berkeley.edu/home/genomic_resources/Ests/vectors/cs108.pdf, com data de treze de agosto de 2001), utilizando protocolos padrão. Os primers utilizados para a clonagem foram os seguintes (todos 5' a 3'):

zBak frontal: GGGG GTTGTTGTAAAGTACAGTGG (SEQ ID N° 65)

zBak reverso: TCAGGTTTTCTGAAATCTCGAGACG (SEQ ID N° 66)

5 zBak frontal: ACTGTACTGAGACACATCACAGCAACA (SEQ ID N° 67)

zBik reverso: TCAGCCTTCATACTCATTCCAG (SEQ ID N° 68)

zPuma frontal:
CTAACTGAGTACTCATCTAATGAATTAACACCGCT (SEQ ID N° 69)

10 zPuma reverso: TCATCTGAGGCCGTGCTGGTAGAG (SEQ ID N° 70)

zBmf1 frontal: ATGGATGAGGACGAGGATGAT (SEQ ID N° 71)

zBmf1 reverso: TCACCTGCGGTTCTCTCTG (SEQ ID N° 72)

zBmf2 frontal: ATGGATGATGAGGAGGATGAAC (SEQ ID N° 73)

15 zBmf2 reverso: TTAAATCCTGTATCTGGTTTCATCTA (SEQ ID N° 74)

zBad1 frontal: CTTCCACAACACTTCCACTGGATAC (SEQ ID N° 75)

20 zBad1 reverso: TTCACTGTCAGTCACTCTGCGGGGC (SEQ ID N° 76)

zBlp1 frontal:
GCCGAATTCCACCATGTCTTACTATAACCGAGAACTG (SEQ ID N° 77)

zBlp1 reverso:
GGCCTCGAGTCACAGGCGTTTCTGTGCAATGAGTCC (SEQ ID N° 78)

25 zBlp2 frontal: ATGGCTAACGAAATTAGC (SEQ ID N° 79)

zBlp2 reverso: TCACTTCTGAGCAAAAAAGGC (SEQ ID N° 80)

zBok1 frontal: ATGGAGATGTTGCGCCGCT (SEQ ID N° 81)

zBok1 reverso: TCATTTCTCTCTCAGCAGGTAGAAAAC (SEQ ID

Nº 82)

zBok2 frontal: ATGAACGTGTTTCGCGCGCT (SEQ ID Nº 83)

zBok2 reverso: GCGCAAGTCTACTTCGTCAGGTA (SEQ ID Nº

84)

5 zMcl-1a frontal: AAGGGGCTGCAGCTGGACG (SEQ ID Nº 85)

zMcl-1a reverso: AGCGGGGCTCAGGTCAGTACAG (SEQ ID Nº

86)

zMcl-1b frontal: CATCTTCGATTGATTTGATT (SEQ ID Nº 87)

zMcl-1b reverso: ATAGTTTGAAAGTTCTGAATCC (SEQ ID Nº

10 88)

zNR13 frontal: ATGTCCTGTTGGTTGAGGG (SEQ ID Nº 89)

zNR13 reverso: TCAGCGTACTAAGAGGAAGGT (SEQ ID Nº 90)

O clone para zBad2 foi obtido a partir da Open Biosystems.

mRNA sintético tampado para zBid, zBad1, zBmf1, zBmf2,

15 zPuma, zBik, zNoxa, zBak e zBax foi gerado pela Ambion mMessage
mMachine® (Ambion) de acordo com as instruções do fabricante e purificado
por meio de colunas de centrifugação NucAway (Ambion). O RNA mensageiro
resultante foi diluído até a concentração apropriada (que varia de 0,11 mg/ml a
3,5 x 10⁻⁵ mg/ml) em 1x solução de Danieau que inclui vermelho fenol a 0,2%.
20 Embriões em estágio de uma a quatro células foram injetadas com 4,6 nl da
solução diluída de mRNA utilizando um microinjetor Nanoliter 2000 (World
Precision Instruments). O rosa claro que tingiu os blastômeros foi vermelho
fenol residual da solução de injeção.

Injeção de mRNA sintético que codifica a maior parte das
25 proteínas proapoptóticas somente BH3 ou proteínas Bcl-2 pró-apoptóticas com
múltiplos domínios resultou em apoptose dependente de dosagem,
caracterizada pela desintegração dos blastômeros e célula de gema (Figuras
4A e 4B). zBad, zBok1 e zBok2 não induziram apoptose significativa em

embriões precoces injetados com até 500 pg dos mRNAs sintéticos.

Para confirmar que a expressão ectópica dos genes B2R pró-apoptóticos de peixe-zebra matou os embriões ao conduzir o processo apoptótico, os embriões foram injetados com uma dose baixa de cada mRNA sintético e o grau de ativação resultante do agente de apoptose caspase 3 foi monitorado por meio de imunohistoquímica.

Embriões de peixe-zebra receberam injeção de 500 pg de GFP, 500 pg de zBad, 100 pg de zBid, 20 pg de zBik, 0,8 pg de zBmf1, 4 pg de zBmf2, 20 pg de zNoxa, 20 pg de zPuma, 20 pg de zBak ou 20 pg de zBax no estágio de uma a quatro células. Embriões injetados foram fixados em dez horas após a fertilização em paraformaldeído a 4% em PBS por cerca de quatro horas à temperatura ambiente ou por uma noite a 4 °C. Os embriões foram desidratados em seguida em metanol por pelo menos duas horas. Após a reidratação, os embriões foram lavados com água, permeabilizados em acetona por sete minutos a -20 °C e novamente lavados em água. Embriões foram lavados por várias vezes adicionais com PBS contendo Tween a 0,5% (PBST). Os embriões lavados foram bloqueados por duas horas à temperatura ambiente em soro de feto bovino a 5%, 2 mg/ml de BSA em PBST. Os embriões foram incubados com anticorpo anti-caspase 3 ativada de coelho (Pharminogen) diluído 1:500 em solução de bloqueio por uma noite a 4 °C. Os embriões foram lavados em seguida por várias vezes em PBST antes da incubação com o anticorpo secundário, anti-Cy3 de coelho de cabra (Imunologia de Jackson) diluído a 1:500 em solução de bloqueio, à temperatura ambiente por duas horas. Os embriões foram novamente lavados com PBST antes da visualização com um microscópio de fluorescência Leica MZFL3.

Em comparação com embriões do tipo selvagem e injetados com imitação, a expressão ectópica das proteínas B2R pró-apoptóticas resultou em um aumento dramático da atividade de caspase 3, o que indica que a

expressão ectópica de proteínas B2R somente BH3 e similares a Bax iniciou o programa apoptótico em embriões de peixe zebra (Figura 4C). As únicas exceções foram zBad, zBok1 e zBok2, que também não iniciaram a apoptose quando expressas ectopicamente (Figuras 4A e 4C).

5 **C. RESGATE DE APOPTOSE INDUZIDA POR PROTEÍNA B2R DE PEIXE-ZEBRA**

Caso a expressão ectópica de proteínas B2R pró-apoptóticas de peixe-zebra em embriões de peixe-zebra induzisse a apoptose por meio de um mecanismo similar ao processo apoptótico de mamíferos, deverá ser possível evitar a letalidade por meio da coexpressão de proteínas B2R pró-sobrevivência. zMcl-1a, zMcl-1b, zBip1 e zBip2 foram clonados utilizando os primers e o protocolo estabelecidos no Exemplo 3 (b). mRNA sintético foi criado para cada um dentre zMcl-1a, zMcl-1b, zBip1 e zBip2 e coinjetado em embriões de peixe-zebra, também de acordo com o protocolo descrito no Exemplo 3 (b), com as quantidades de injeção de mRNA de proteína B2R a seguir: 500 pg de cada mRNA pró-sobrevivência, 500 pg de zBid, 20 pg de zBmf1, 100 pg de zBmf2, 50 pg de zNoxa, 100 pg de zBik, 100 pg de zPuma, 100 pg de zBax e 100 pg de zBak. Os resultados são exibidos na Figura 4D. Apoptose induzida por expressão ectópica de zBid, zBik, zBmf1, zBmf2, zNoxa, zPuma ou zBax foi resgatada por meio de co-expressão com zMcl-1a, zMcl-1b, zBip1 ou zBip2 (Figura 4D). A expressão ectópica de zBak, entretanto, foi resgatada por meio de coexpressão com zMcl-1a, zMcl-1b ou zBip1, mas não por meio de coexpressão com zBip2 (Figura 4D), o que sugere que zBak não interagiu com zBip2. Bp2 humano é um homólogo conhecido de Bcl-2. Estudos anteriores haviam demonstrado que Bak humano não interage com Bcl-2 humano. Desta forma, a incapacidade de zBip2 de resgatar apoptose induzida por zBak sustentou adicionalmente a designação de ENSDARP00000040899 como o ortólogo de peixe-zebra de zBak humano.

D. REAÇÃO DO GENE B2R DE PEIXE-ZEBRA A RADIAÇÃO GAMA *IN VIVO*

Para investigar o papel dos genes B2R de peixe-zebra em resposta a um estímulo apoptótico exógeno, os embriões foram submetidos a irradiação gama. Irradiação gama conhecidamente aciona apoptose em células de mamíferos por meio do processo intrínseco, o que resulta em um aumento da atividade de caspase 3 de forma dependente de p53 (Gong et al, *Cell Growth Differ.* 10 (7):491-502 (1999). A capacidade das moléculas pró-sobrevivência de peixe-zebra de proteger os embriões de peixe-zebra contra apoptose mediada por radiação gama foi, portanto, examinada.

Os embriões foram irradiados em cerca de sete horas após a fertilização em 1 ml de meios de embriões com uma dose de irradiação gama de 50 Gy. Os embriões foram movidos em seguida para uma placa de cultivo de tecido em um volume maior de meios de embriões e incubados a 28,5 °C até análise adicional. A expressão ecotópica de cada um dos genes B2R pró-sobrevivência de peixes-zebra (zBlp1, zMcl-1a, zMcl-1b e zBlp2), conforme descrito no Exemplo 3 (b) (modificada para injeções de 500 pg) protegeu embriões contra apoptose induzida por irradiação gama (Figura 5A). Desta forma, a radiação gama acionou a apoptose em embriões de peixe-zebra por meio do processo intrínseco, de forma similar aos seus efeitos em células de mamíferos.

Para determinar quais genes B2R de peixe-zebra foram reponsáveis pela mediação dos efeitos apoptóticos de radiação gama sobre os embriões de peixe-zebra, knockdowns de tradução dos genes de peixe-zebra B2R pró-apoptóticos foram realizados utilizando um abordagem morfolino. Morfolinos para cada gene B2R pró-sobrevivência foram selecionados com base na sua capacidade de anular o resgate mediado por mRNA cognato de zNoxa expresso ectopicamente. Morfolinos para cada gene B2R pró-apoptótico foram selecionados com base na sua capacidade de resgate da expressão

ectópica do mRNA cognato. Como a eficácia de morfolino não pôde ser verificada para zBok1, zBok2 ou zBad (devido ao fato de que estes genes não induziram apoptose quando expressos ectopicamente, vide Figuras 4A e 4C), estes genes não foram incluídos nas análises de knockdown.

5 Morfolinos foram projetados em volta do local de início de tradução de cada transcrito (Nasevicius e Ekker, *Nat. Genet.* 26: 216-220 (2000)) e obtidos por meio da GeneTools. Seqüências morfolino ("MO") foram as seguintes (todas 5' a 3'):

zMcI-1a MO: GCCTAAAATCCAAACTCAGAGCCAT (SEQ ID Nº

10 91)

zMcI-1b MO: TGTCGTTGTTTCTTCCAGCGAACAT (SEQ ID Nº

92)

zBlp1 MO: AGGTTGTTGCTCGTTCTCCGATGTC (SEQ ID Nº 93)

zBlp2 MO: GTCATAGCTAATTTTCGTTAGCCATG (SEQ ID Nº 94)

15

zBax MO: TGAAAATAAGCGAACTGAAGAAGAC (SEQ ID Nº 95)

zBax MO: ATTTTTCGGCTAAAACGTGTATGGG (SEQ ID Nº 96)

zBax MO: GGTCAAAGTTCCTGTTGAAGTCCAT (SEQ ID Nº 97)

zBax MO: ACACATCATCCTCGTCCTCATCCAT (SEQ ID Nº 98)

zNoxa MO: CTTTCTTCGCCATTTTCAGCAAGTTT (SEQ ID Nº 99)

20

zPuma MO: TGCTTTCCATCTCTGGTCGGGCCAT (SEQ ID Nº

100)

zBik MO: CTACAAACAAGGACACAATGGTGGA (SEQ ID Nº 101)

p53 MO: GCGCCATTGCTTTGCAAGAATTG (SEQ ID Nº 102)

MO controle: CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA (SEQ ID Nº

25 103)

O morfolino controle foi projetado para restaurar mensagens de seqüência de mRNA beta globina humana normais que contêm o local de divisão de beta talassemia mutante e esperou-se que não apresentasse efeito

em embriões de peixe-zebra. O p53 morfolino foi de acordo com Langheinrich et al, *Curr. Biol.* 12: 2023-2028 (2002).

Morfolinos foram diluídos até 1 mg/ml em solução de Danieu 1x + 0,2% vermelho fenol. Injetou-se um total de 4,6 ng ou 9,2 ng de morfolino. Em
5 experimentos em que se utilizou uma combinação de dois morfolinos, foram injetados 4,6 ng de cada morfolino. 4,6 ng adicionais de morfolino controle foi adicionados a injeções de morfolino isoladas quando o experimento incluiu comparação com uma amostra de injeção de morfolino duplo, de tal forma que cada amostra recebesse injeção de 9,2 ng de morfolino. Embriões em estágio
10 de uma a quatro células foram injetadas com 4,6 nl de morfolino diluído utilizando um microinjetor Nanoliter 2000 (World Precision Instruments).

Na maior parte dos tipos de células de mamíferos, Bax ou Bak é necessário para a transdução da maior parte dos estímulos apoptóticos (Wei et al, *Science* 292: 727-730 (2001)). Para determinar se zBax e zBak eram
15 funcionalmente redundantes em peixe-zebra, morfolinos dirigidos a zBax e zBak receberam injeção isoladamente ou em pares em embriões e os embriões foram submetidos em seguida a irradiação gama. Knockdown de tradução de zBax foi suficiente para proteger os embriões contra os efeitos de radiação gama (Figuras 5B e 5C). Em um pequeno percentual de conjuntos, knockdown
20 de zBax e zBak foi necessário para anular a ativação de caspase 3 induzida por irradiação gama. Alguma atividade de caspase 3 permaneceu nos embriões irradiados que receberam injeção de zBax e zBak morfolinos (Figuras 5B e 5C), possivelmente devido ao knockdown incompleto ou à função de proteínas maternas presentes no embrião. Concluiu-se que zBax é
25 principalmente responsável pela execução do programa apoptótico em resposta a irradiação gama.

Knockdown da tradução de vários genes pró-apoptóticos somente BH3 revelou que, ao impedir-se a tradução de zPuma, a ativação de caspase 3

era dramaticamente reduzida em resposta à irradiação gama (Figura 5D). O impedimento de zNoxa também reduziu muito a ativação de caspase 3, mas não tão completamente quanto a desativação de zPuma. Este efeito espelhou o efeito protetor de knockdown p53 (Figura 5E) e foi sustentado por estudos anteriores em células de mamíferos, o que indica que Puma é o mediador principal de apoptose induzida por irradiação gama (Erlacher et al, *Blood* 106: 4131-4138 (2005); Jeffers et al, *Cancer Cell* 4: 321-328 (2003)).

Análise PCR quantitativa foi realizada para melhor compreensão das ações de zNoxa e zPuma durante irradiação gama. Análises Taqman foram realizadas utilizando o Sistema PCR em Tempo Real 7500 (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. As seqüências de primer e sonda para cada gene são exibidas abaixo (5' a 3'):

zGAPDH frontal: TGCGTTCGTCTCTGTAGATGT (SEQ ID Nº 104)

zGAPDH reverso: GCCTGTGGAGTGACACTGA (SEQ ID Nº 105)

Sonda de zGPADH: TGTGTGTGTGTGTTAGTTTCTTTTGACAGTATTTG (SEQ ID Nº 106)

zNoxa frontal: CGAACCTGTGACAGAACTTG (SEQ ID Nº 107)

zNoxa reverso: CTGCGCGCACTCTACTACA (SEQ ID Nº 108)

Sonda de zNoxa: CTTTCTTCGCCATTTTCAGCAAGTTT (SEQ ID Nº 109)

zPuma frontal: GAACACACGGGTTACAAAAGAC (SEQ ID Nº 110)

zPuma reverso: GAAAATTCCCAGAGTCTGTAAGTG (SEQ ID Nº 111)

Sonda de zPuma: ACGAGTGCAGGCGCTCTCCTT (SEQ ID Nº 112)

Os embriões foram recolhidos cerca de trinta minutos após a

fertilização e mantidos em meios de embriões para análise adicional. Regiões de codificação para cada gene B2R foram amplificadas por meio de RT PCR utilizando o kit PT PCR OneStep (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Diversos produtos de PT PCR foram seqüenciados para verificar a
 5 seqüência correta de codificação. Cada seqüência amplificada foi clonada por meio de clonagem de Topo TA (Invitrogen) no plasmídeo pCRII (Invitrogen). Os embriões foram irradiados com 50 Gy em sete horas após a fertilização e o RNA foi recolhido em dez horas após a fertilização.

A análise de PCR quantitativa revelou que, embora a transcrição
 10 de zNoxa fosse regulada para cima três a quatro vezes, a transcrição de zPuma foi regulada para cima em cerca de cem vezes em resposta a irradiação gama (Figura 5F). Nenhum dos outros genes somente BH3 de peixe-zebra exibiu um aumento da transcrição em resposta à irradiação gama. A regulação para cima de zPuma foi dependente de p53 (Figura 5F), de tal forma que o
 15 knockdown de p53 reduzisse a regulação para cima de zPuma. Isso sugeriu que, no peixe-zebra, a irradiação gama induzisse atividade p53 que, por sua vez, regulou zPuma para cima em transcrição. A regulação para cima de Puma foi conhecida em sistemas de mamíferos por ativar Bax e Bak (Liu et al, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310 (3): 956-62 (2003)), em correlação com
 20 os dados acima, o que sugere que zBax é fundamental para a indução de apoptose em resposta a irradiação gama. Desta forma, a irradiação gama de embriões de peixe zebra acionou o processo apoptótico intrínseco, particularmente mediado por p53, zPuma e zBax.

E. KNOCKDOWN DE PROTEÍNAS B2R PRÓ-SOBREVIVÊNCIA DE PEIXE-ZEBRA

DURANTE O DESENVOLVIMENTO NORMAL

25 Após estabelecer que o processo apoptótico intrínseco estava presente e funcional em peixe-zebra, o processo intrínseco de peixe-zebra foi comparado com o sistema de processo intrínseco de mamíferos conhecido.

Genes B2R pró-sobrevivência de peixe-zebra foram submetidos a knockdown de morfolino e foram monitorados os efeitos resultantes sobre o embrião em desenvolvimento. Morfolinos foram dirigidos contra o lado de início de tradução de zMcl-1a, zMcl-1b e zBlp2, de acordo com a metodologia descrita no Exemplo 3 (d).

Knockdown de zBlp2 não apresentou efeito óbvio sobre o desenvolvimento inicial de peixe-zebra (Figura 6A). A morfologia bruta do peixe knockdown zBlp2 foi normal. Não houve aumento na atividade de caspase 3 como resultado de knockdown zBlp2. De forma similar, knockdown de zMcl-1a ou zMcl-1b não apresentou efeito evidente sobre a sobrevivência de embriões de peixe. Knockdown de zMcl-1a e zMcl-1b, entretanto, resultou em uma redução variável mas significativa da viabilidade oito horas após a fertilização (Figura 6A). Knockdowns em pares de qualquer dos genes zMcl em combinação com zBlp2 não apresentaram impacto sobre a sobrevivência (Figura 6A). Desta forma, apenas impedir a transcrição de duas cópias de zMcl-1 afetou significativamente a sobrevivência de embriões de peixe-zebra injetados. Notadamente, estudos anteriores haviam demonstrado que knockouts de Mcl-1 de mamíferos em camundongos são letais antes do implante (Rinkenberger et al, *Genes Dev.* 14: 23-27 (2000)).

F. SINALIZAÇÃO APO2L E PROTEÍNAS B2R PRÓ-SBREVIVÊNCIA DE PEIXE-ZEBRA

Embriões de peixe-zebra que receberam injeção de morfolinos zMcl-1a e zMcl-1b exibiram uma faixa significativa de viabilidade (Exemplo 3 (e)). Esta faixa de viabilidade aparentemente varia com a "saúde" geral da ninhada. Uma possível explicação da variabilidade foi que zMcl-1a/b poderá proteger embriões de peixe-zebra precoces contra estímulos apoptóticos ambientais ou endógenos. Mcl-1 havia sido anteriormente relacionado com a mediação da sensibilidade a apoptose induzida por Apo2L em diversas linhagens celulares (Henson et al, *J. Cell Biochem.* 89: 1177-1192 (2003);

Taniai et al, *Cancer Res.* 64: 3517-3524 (2004); Wirth et al., *Cancer Res.* 65: 7393-7402 (2005); Kobayashi et al, *Gastroenterology* 128: 2054-2065 (2005)).
 Desta forma, foi pesquisado o efeito de knockdown de zMcl-1a e zMcl-1b sobre o processo apoptótico extrínseco induzido por Apo2L.

Knockdowns de zMcl-1a e zMcl-1b foram realizados conforme descrito no Exemplo 3 (e). Homólogo de Apo2L de peixe-zebra zDL1b e outros genes relativos a TNF foram clonados conforme descrito no Exemplo 3 (b) utilizando as seqüências de primers a seguir:

zDL1a frontal: ACCATGATGGTCCCGGCGAACAGCCGC (SEQ

ID N° 113)

zDL1a reverso: ACTTTACAGATCCAATCGGAAAGCTCC (SEQ

ID N° 114)

zDL1b frontal: ATCATGGTGCAGCCTAAAAATCGT (SEQ ID N°

115)

zDL1b reverso: CCCTCAGAGGTCAAACAGGAAGGC (SEQ ID N°

116)

zDL2 frontal: CACGCGATGGTCAGCATGACAAGC (SEQ ID N°

117)

zDL2 reverso: TACTGACTAGCTCACCAGAAATGC (SEQ ID N°

118)

zDL3 frontal: ACCATGACATCCAACCTTCCTATCGGT (SEQ ID

N° 119)

zDL3 reverso: AGTTTATTTAATCATGAATGCCCAA (SEQ ID

N° 120)

zFasL frontal: ATGAGTGCTAACTTCGGCCACTCG (SEQ ID N°

121)

zFasL reverso: TCAGTGGATCTTAAAGAGGCCGAA (SEQ ID N°

122)

zTNF1 frontal: GCAACCATGAAGCTTGAGAGTCGGGCGTTT
(SEQ ID Nº 123)

zTNF1 reverso: TTTCGTTACACAAACCAAACACCCCAAAGAA
(SEQ ID Nº 124)

5 zTNF2 frontal: ATGGTGAGATACGAAACAACATTA (SEQ ID Nº
125)

zTNF2 reverso: ATTAAATCACAACGCGAACACCCCGAAGAA
(SEQ ID Nº 126)

mRNA de zDL1b sintético foi produzido e injetado em embriões de
10 peixe-zebra conforme descrito no Exemplo 3 (b).

Em embriões do tipo selvagem, expressão ectópica de ortólogo
zDL1b de Apo2L de peixe-zebra apresentou efeito mínimo sobre a viabilidade
embriônica (Figura 6B). Quando knockdown de zMcl-1a e zMcl-1b foi
combinado com expressão ectópica de zDL1b, entretanto, os embriões
15 passaram rapidamente por morte apoptótica massiva (Figura 6B). O efeito foi
específico de zMcl-1a e zMcl-1b, pois knockdown de zMcl-1a ou zMcl-1b em
conjunto com zBip2 não aumentou a sensibilidade a apoptose induzida por
zDL1b (Figura 6B).

Foram obtidos efeitos diferentes com outras moléculas relativas a
20 Apo2L/TNF além de zDL1b (vide Figura 6C). A expressão ectópica de zDL1a
em conjunto com o knockdown de tradução duplo de zMcl-1a e zMcl-1b, por
exemplo, resultou em redução quase tão grande na sobrevivência de embriões
de peixe-zebra que com zDL1b (Figura 6C). O knockdown duplo também
reduziu notadamente sobrevivência quando zDL3 foi expresso de forma
25 ectópica (Figura 6C). Significativamente menos redução do percentual de
sobrevivência foi obtida quando a expressão de zDL2, zTNF1 ou zTNF2 foi
emparelhada com os knockdowns de tradução de zMcl-1a/b dupla (Figura 6C).
zFasL não induziu a apoptose, seja isoladamente ou em combinação com o

knockdown de zMcl-1a e zMcl-1b. A expressão de receptores para zTNF1, zTNF2 e zFasL sobre células embriônicas ainda não foi estabelecida.

Desta forma, zMcl-1a e zMcl-1b juntos protegeram embriões de peixe-zebra contra apoptose induzida por zDL1a e zDL1b (Apo2L) e apresentaram efeito protetor menor, mas ainda significativamente protetor) contra apoptose induzida por zDL3.

LISTAGEM DE SEQUENCIAS

<110> Genentech, Inc.
 Avi J. Ashkenazi,
 Reece Hart,
 Erica Kratz,
 Kiran Mukhyala,

<120> MÉTODOS E COMPOSIÇÕES RELACIONADOS AOS POLIPEPTÍDEOS ZPA

<130> P2322R1 PCT

<141> 03-05-2007

<150> US 60/797,703

<151> 04-05-2006

<160> 126

<210> 1

<211> 207

<212> PRT

<213> *Danio rerio*

<400> 1

Met	Ala	Cys	Glu	Ala	Ser	Gln	Asp	Asp	Gln	Ile	Gly	Glu	Ala	Leu
1				5					10					15

Leu	Ile	Gly	Val	Val	Arg	Gln	Glu	Leu	Met	Glu	Val	Met	Glu	Val
				20					25					30

Thr	Glu	Gly	Asn	Ala	Ala	Pro	Pro	Ala	Leu	Pro	Glu	Ala	Lys	Pro
				35					40					45

Ile	Ser	Asn	Ser	Gln	Asp	Gln	Ile	Leu	Val	Gln	Gln	Leu	Ala	Asn
				50					55					60

Thr	Ile	Lys	Val	Ile	Gly	Asp	Lys	Leu	Asp	Gln	Asp	Gln	Ala	Phe
				65					70					75

Asn	Asp	Met	Ile	Asp	Gly	Leu	Val	Lys	Val	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser
				80					85					90

Phe	Trp	Lys	Leu	Val	Glu	Lys	Val	Phe	Thr	Asp	Gly	Gln	Ile	Asn
				95					100					105

Trp	Gly	Arg	Ile	Ile	Val	Leu	Phe	Tyr	Ser	Val	Gly	Lys	Leu	Ser
				110					115					120

Ala	Lys	Met	Val	Val	Ala	Arg	Leu	Pro	Arg	Ile	Val	Ser	Asp	Ile
				125					130					135

Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Asp	Tyr	Phe	Lys	Arg	Asn	Leu	Leu	Gln	Trp
				140					145					150

Ile	Arg	Thr	Val	Gly	Gly	Trp	Met	Asn	Ser	Ile	Pro	Ala	Leu	Ala
				155					160					165

Cys	Phe	Ser	Val	Asp	Gln	Phe	Ser	Gly	Ser	Ser	Met	Arg	Lys	Tyr
				170					175					180

Ser	Pro	Tyr	Val	Gly	Val	Val	Phe	Ala	Phe	Thr	Gly	Gly	Leu	Leu
				185					190					195

Leu	Gly	Gly	Phe	Ile	Val	Ser	Arg	Phe	Gln	Lys	Thr
				200					205		

<210> 2

<211> 624

<212> DNA

<213> *Danio rerio*

<400> 2

```

atggcttgtg aagcctcaca ggatgatcag attggagagg cactcttaat 50
aggggtagta aggcaggagc taatggaggt gatggaggtg actgaaggaa 100
atgcagctcc tccagctctt cctgaagcta aaccaataag caacagccag 150
gaccagattc tggttcagca gctggcgaac acaatcaaag tgatcggtga 200
caaactcgac caggatcaag catttaacga catgatcgat ggcttagtaa 250
aggtagctga taaaagcagt ttctggaaac ttgtggaaaa ggtgttcaca 300
gatggccaga tcaactgggg cagaattatc gtgctgtttt attctgttgg 350
aaaactgtca gccaa gatgg tcgtcgctcg cctaccaga attgtttcag 400
atattttatc attaagtctt gattacttca aaaggaatct gttgcagtgg 450
attcgcacag taggaggatg gatgaacagt atccctgcac tggcctgttt 500
ctctgttgac caattttctg gttcttcaat gagaaaatat tctccttacg 550
ttggagtgtg gtttgccttc actggtggcc tactgctggg tggcttcac 600
gtctcgagat ttcagaaaac ctga 624

```

<210> 3

<211> 145

<212> PRT

<213> *Danio rerio*

<400> 3

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

Trp	Gln	Asp	Thr	Glu	Thr	Gln	Asp	Gly	Ala	Ser	Val	Glu	Glu	Asn
				65					70					75
Gly	Asp	Gly	Leu	Pro	Phe	Arg	Gly	Arg	Ser	Gln	Ser	Ala	Pro	Ala
				80					85					90
Ala	Leu	Trp	Lys	Ala	Lys	Lys	Tyr	Gly	Arg	Gln	Leu	Arg	Arg	Met
				95					100					105
Ser	Asp	Glu	Phe	Asp	Thr	Trp	Leu	Asp	Lys	Gly	Glu	Val	Lys	Arg
				110					115					120
Ala	Asn	Ser	Gln	Lys	Gln	Thr	Tyr	Arg	Gly	Trp	Phe	Ser	Phe	Leu
				125					130					135
Trp	Ser	Pro	Lys	Glu	Glu	Glu	Gly	Arg	Glu					
				140					145					

<210> 4
 <211> 438
 <212> DNA
 <213> *Danio rerio*

<400> 4
 atggagaaca cctcgcatga ccatcaagat gattccagca ccttgatga 50
 aaaagagaga tcacatctga aagggacaat caagaaccat ggacaacatc 100
 aggatcgaac atcggccaac atttctcctc aagggcgtgt gcggctctat 150
 tcggaatctc aagtgtatac agtcagccgc tggcaggaca cagagaccca 200
 ggatggagca tcggtggagg agaacggaga tggacttcca ttcagggggtc 250
 gttctcaatc agcacctgct gcactgtgga aagcaaaaaa gtatggccgt 300
 cagttgagga gaatgagcga tgaattcgac acatggctcg ataaagggga 350
 ggtcaagaga gcgaacagcc agaaacagac ctaccgagga tggttttcgt 400
 tcctctggag tcccaaagaa gaagagggca gagaatga 438

<210> 5
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> *Danio rerio*

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

Gln	Asn	Leu	Asn	Phe	Gly	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Val	Leu	Ser	Arg	Arg			
				65					70					75			
Val	Phe	Ser	Gly	Arg	Ile	Leu	Ala	Asn	Leu	Trp	Gly	Ser	Lys	Ile			
				80					85					90			
Met	Pro	Ile	Phe	Arg	Thr	Ser	Trp	Leu	Leu	Pro	Gln	Leu	Gln	Asn			
				95					100					105			
Gly	Cys	Gln	Glu	Ala	Arg	Lys	Trp	Ala	Ala	Trp	Val	Ser	Asn	Leu			
				110					115					120			
His	Val	Ser	Asp	Trp	Ser	Arg	Ser	Thr	Thr	Tyr	Thr	Leu	Ala	Ser			
				125					130					135			
Ala	Leu	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ile	Phe	Leu	Val	Asn	Trp	Asn			
				140					145					150			

Glu Tyr Glu Gly

<210> 6
 <211> 465
 <212> DNA
 <213> *Danio rerio*

<400> 6
 atggtggaag aaactagaca gcagaaaaac gccacaaccc tgcaggctgg 50
 acctgctgag gttgaccaca gtaatctcta tgcattcaat atgagagtca 100
 cccagactat cggacgacag ctgggtcaaa taggggacga aatggacaat 150
 aaatggcgcc aagaaccgcc tgtcccatgg cagaacctga atttcgggat 200
 ttatccttat gtcttaagta ggagagtgtt ctctggaaga atcctcgcta 250
 atctttgggg gtctaagatt atgccgatat tcaggacgtc ctggttgctt 300
 ccacagcttc aaaatggctg tcaggaggct agaaagtggg cagcttgggt 350
 gtccaacttg catgtttctg actggtctcg cagcactaca tacaccctgg 400
 catctgcttt actactggtc actgtgtcta tcttccttgt aaactggaat 450
 gagtatgaag gctga 465

<210> 7
 <211> 266
 <212> PRT
 <213> *Danio rerio*

<400> 7
 Met Thr Leu Cys Phe Leu Asn Thr Ser Ala Ala Leu Ala Asp Glu
 1 5 10 15
 Glu Gly Asp Pro Leu Pro Thr Ala Leu Ile Asn Ser Leu Asp Leu
 20 25 30

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

<210> 8

<211> 801

<212> DNA

<213> *Danio rerio*

<400> 8

atgactttgt gctttttaaa cacaagcgca gcgctcgctg atgaagaggg 50

cgatcctctg cccactgctc tgataaacag tcttgaccta gcagtgaatc 100

agccggtgtc aggttctggc ttttgtaaac tcaaactggc caatgagcaa 150
 actgttgtga ctctccaaca attagcaaca agagaacca tgggggatga 200
 agaggaggtg cagggctttc agagcacaga cccacacggg acaactgtat 250
 gtggaatggc ccgaccagag atggaaagca gagtggacga acataactct 300
 ggcacgccga acagctgcag gatggaggtg ctgcgtcagg acgcctggcc 350
 aaatggcagc atcatccagc cctgccatcg acgccgaacc attgccactc 400
 aaaccagcac tctctctgca ccactgcccc acatcccctc acatgatgcc 450
 ttcagcttgg acagcgtcca gcagcaggac agtctactca gggacaattc 500
 aggaacagaa caggaagtgt ccaggcctct tcctctgcca gatctgctag 550
 cagacaacca gagctcctca gaggagtcca cgtccagcag cagctcgacc 600
 gctgaggagg accccacact ggaggagcag gctgtggaga gggtgggcgt 650
 acaactgagg acaattgggg acgagatgaa cgctgtcttc cttcagagga 700
 atgccgtccc gcaactggcag aactggagag gcctgtaccg cgggctcatg 750
 gcgctggtct cggacaccat caatgccctc taccagcacg gcctcagatg 800
 a 801

<210> 9

<211> 185

<212> PRT

<213> *Danio rerio*

<400> 9

Met	Asp	Asp	Glu	Glu	Asp	Glu	Gln	Leu	Pro	Arg	Cys	Cys	Glu	Thr
1				5					10					15
Pro	Leu	Arg	Asn	Lys	Arg	Ser	Glu	Lys	Arg	Asp	Ala	His	Gly	Gly
				20					25					30
Asp	Val	Gly	Gln	Thr	Ala	His	Arg	His	Ala	Ser	Thr	Gln	Thr	Ala
				35					40					45
Gly	Ser	Val	Leu	Asn	Ser	Ala	Arg	Asp	Ala	Asp	Met	Ala	Pro	Phe
				50					55					60
Gln	Gly	Ser	Gln	Arg	Glu	Ala	Ser	Ser	Leu	Cys	Arg	Val	Val	Gly
				65					70					75
Ala	Arg	Thr	Ala	Phe	Arg	Ala	Pro	Cys	Gly	Thr	Gly	Gly	Leu	Val
				80					85					90
Ser	Leu	Thr	Met	Gly	Pro	Gly	Ala	Arg	Gly	Gly	Pro	Arg	Ala	Leu
				95					100					105
Phe	His	Gly	Asn	Ala	Gly	Phe	Arg	Ala	His	Phe	Pro	Ala	Leu	Phe
				110					115					120

Glu	Pro	Ala	Leu	Asp	Gly	Leu	Gln	Asn	Ala	Glu	Gln	Arg	Glu	Gln	125	130	135
Asp	Glu	Gly	Arg	Pro	Glu	Glu	Lys	Glu	Glu	Asp	Arg	Asp	Ala	Gly	140	145	150
Ile	Ser	Val	Glu	Val	Gln	Ile	Gly	Arg	Lys	Leu	Arg	Glu	Met	Gly	155	160	165
Asp	Gln	Phe	Gln	Gln	Glu	His	Leu	Gln	Leu	Ile	Ile	Leu	Asp	Glu	170	175	180
Thr	Arg	Tyr	Arg	Ile											185		

<210> 10
 <211> 558
 <212> DNA
 <213> *Danio rerio*

<400> 10
 atggatgatg aggaggatga acagcttcct cgctgctgtg aaacgccgct 50
 aagaaacaag cgctcagaga agagagacgc ccacggtgga gacgtgggac 100
 aaacagctca cagacacgca tccacacaga ctgctggctc tgcctcaat 150
 tcagcgagag acgcagatat ggcaccattc cagggtcac agagagaagc 200
 atcatctctt tgcagagttg tgggtgctag gactgcattc agggctccct 250
 gtggaactgg gggccttgtg tcacttacta tgggccccgg agcccggggt 300
 gggccaagag cactttttca tggaaacgct ggatttcgtg cacacttccc 350
 tgcgctgttc gaaccgcgcc tggatggctt acaaaacgcc gaacagagag 400
 agcaggacga aggcagacca gaagaaaaag aagaggatcg cgacgcaggg 450
 attagcgtgg aggttcagat tggacgtaaa ttacgtgaaa tgggggatca 500
 gtttcagcaa gagcatcttc agctgattat attagatgaa accagataca 550
 ggatttaa 558

<210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 11
 Met Glu Asp Cys Leu Ala His Leu Gly Glu Lys Val Ser Gln Glu
 1 5 10 15

<210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Danio rerio*

<400> 12

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

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> *Danio rerio*

<400> 13

Phe Asp Leu Glu Leu Lys Ala Leu Val Gln Asp Val Asn Glu Cys
1 5 10 15

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 14

Ile Pro Glu Cys Ile Lys Gln Val Asp Gln Glu Leu Asn Gly Lys
1 5 10 15

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 15

Ile Val Glu Leu Leu Lys Tyr Ser Gly Asp Gln Leu Glu Arg Lys
1 5 10 15

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 16

Ala Leu Glu Thr Leu Arg Arg Val Gly Asp Gly Val Gln Arg Asn
1 5 10 15

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> *Danio rerio*

<400> 17

Val Leu Ser Thr Met Arg Arg Val Val Asp Asn Leu Ala Val Lys
1 5 10 15

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> *Danio rerio*

<400> 18

Ala Ile Pro Thr Met Lys Arg Val Val Asp Asn Ile Leu Val Lys
1 5 10 15

<210> 19
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 19
 Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Val Gly Asp Ser Met Asp Arg Ser
 1 5 10 15

<210> 20
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Danio rerio*

<400> 20
 Ile Gly Arg Gln Leu Ala Gln Ile Gly Asp Glu Met Asp Asn Lys
 1 5 10 15

<210> 21
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 21
 Leu Ala Leu Arg Leu Ala Cys Ile Gly Asp Glu Met Asp Val Ser
 1 5 10 15

<210> 22
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 22
 Leu Ser Glu Cys Leu Lys Arg Ile Gly Asp Glu Leu Asp Ser Asn
 1 5 10 15

<210> 23
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Danio rerio*

<400> 23
 Leu Ala Gln Cys Leu Gln Gln Ile Gly Asp Glu Leu Asp Gly Asn
 1 5 10 15

<210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Danio rerio*

<400> 24
 Leu Ala Asn Thr Ile Lys Val Ile Gly Asp Lys Leu Asp Gln Asp
 1 5 10 15

<210> 25
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 25

Ile	Ala	Arg	Lys	Leu	Gln	Cys	Ile	Ala	Asp	Gln	Phe	His	Arg	Leu
1				5					10					15

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> *Danio rerio*

<400> 26

Ile	Gly	Gln	Lys	Leu	Gln	Leu	Ile	Gly	Asp	Gln	Phe	Tyr	Gln	Glu
1				5					10					15

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 27

Val	Gly	Arg	Gln	Leu	Ala	Ile	Ile	Gly	Asp	Asp	Ile	Asn	Arg	Arg
1				5					10					15

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 28

Val	His	Leu	Thr	Leu	Arg	Gln	Ala	Gly	Asp	Asp	Phe	Ser	Arg	Arg
1				5					10					15

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 29

Ile	Ala	Gln	Glu	Leu	Arg	Arg	Ile	Gly	Asp	Glu	Phe	Asn	Ala	Tyr
1				5					10					15

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> *Danio rerio*

<400> 30

Val	Ala	Arg	Glu	Leu	Arg	Arg	Ile	Gly	Asp	Glu	Phe	Asn	Arg	Leu
1				5					10					15

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> *Danio rerio*

<400> 31

Val	Ala	Val	Gln	Leu	Arg	Thr	Ile	Gly	Asp	Glu	Met	Asn	Ala	Val
1				5					10					15

<210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Danio rerio*

<400> 32
 Cys Ala Gln Gln Leu Arg Asn Ile Gly Asp Leu Leu Asn Trp Lys
 1 5 10 15

<210> 33
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 33
 Tyr Gly Arg Glu Leu Arg Arg Met Ser Asp Glu Phe Val Asp Ser
 1 5 10 15

<210> 34
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Danio rerio*

<400> 34
 Tyr Gly Gln Gln Leu Arg Arg Met Ser Asp Glu Phe Asp Lys Gly
 1 5 10 15

<210> 35
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 35
 Ile Gly Ala Gln Leu Arg Arg Met Ala Asp Asp Leu Asn Ala Gln
 1 5 10 15

<210> 36
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 36
 Val Lys Gln Ala Leu Arg Glu Ala Gly Asp Glu Phe Glu Leu Arg
 1 5 10 15

<210> 37
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 37
 Leu His Gln Ala Met Arg Ala Ala Gly Asp Glu Phe Glu Thr Arg
 1 5 10 15

<210> 38
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Danio rerio*

<400> 38

Val	Lys	Glu	Ala	Leu	Arg	Asp	Ser	Ala	Asn	Glu	Phe	Glu	Leu	Arg
1				5					10					15

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> *Danio rerio*

<400> 39

Leu	Tyr	Arg	Val	Leu	Arg	Asp	Ala	Gly	Asp	Glu	Ile	Glu	Arg	Ile
1				5					10					15

<210> 40

<211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 40

Thr	Ala	Ala	Arg	Leu	Lys	Ala	Leu	Gly	Asp	Glu	Leu	His	Gln	Arg
1				5					10					15

<210> 41

<211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 41

Val	Cys	Ala	Val	Leu	Leu	Arg	Leu	Gly	Asp	Glu	Leu	Glu	Met	Ile
1				5					10					15

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> *Danio rerio*

<400> 42

Val	Ser	Val	Val	Leu	Leu	Lys	Leu	Gly	Asp	Glu	Leu	Glu	Cys	Met
1				5					10					15

<210> 43

<211> 15

<212> PRT

<213> *Danio rerio*

<400> 43

Met	Ala	Ala	Glu	Leu	Ile	Arg	Ile	Ala	Asp	Leu	Leu	Glu	Gln	Ser
1				5					10					15

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 44

Thr	Lys	Glu	Ser	Leu	Ala	Gln	Thr	Ser	Ser	Thr	Ile	Thr	Glu	Ser
1				5					10					15

<210> 45
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Danio rerio*

<400> 45
 Glu Ala Glu Ala Val Ala Arg Ile Ser Asp Trp Ser Ser Arg Pro
 1 5 10 15

<210> 46
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 46
 Leu Ala Leu Arg Leu Ala Cys Ile Gly Asp Glu Met Asp Val Ser
 1 5 10 15

<210> 47
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 47
 Val Ala Leu Arg Leu Ala Cys Ile Gly Asp Glu Met Asp Leu Cys
 1 5 10 15

<210> 48
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Danio rerio*

<400> 48
 Ile Gly Arg Gln Leu Ala Gln Ile Gly Asp Glu Met Asp Asn Lys
 1 5 10 15

<210> 49
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 49
 Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Val Gly Asp Ser Met Asp Arg Ser
 1 5 10 15

<210> 50
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 50
 Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Ile Gly Asp Glu Met Asp His Asn
 1 5 10 15

<210> 51
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Danio rerio*

<400> 51
 Met Ala Ala Glu Leu Ile Arg Ile Ala Asp Leu Leu Glu Gln Ser
 1 5 10 15

<210> 52
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 52
 Ile Ala Arg Lys Leu Gln Cys Ile Ala Asp Gln Phe His Arg Leu
 1 5 10 15

<210> 53
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 53
 Ile Ala Arg Lys Leu Gln Cys Ile Ala Asp Gln Phe His Arg Leu
 1 5 10 15

<210> 54
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Danio rerio*

<400> 54
 Ile Gly Gln Lys Leu Gln Leu Ile Gly Asp Gln Phe Tyr Gln Glu
 1 5 10 15

<210> 55
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Danio rerio*

<400> 55
 Ile Gly Arg Lys Leu Arg Glu Met Gly Asp Gln Phe Gln Gln Glu
 1 5 10 15

<210> 56
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 56
 Tyr Gly Arg Glu Leu Arg Arg Met Ser Asp Glu Phe Val Asp Ser
 1 5 10 15

<210> 57
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 57
 Tyr Gly Arg Glu Leu Arg Arg Met Ser Asp Glu Phe Glu Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 58
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Danio rerio*

<400> 58
 Tyr Gly Gln Gln Leu Arg Arg Met Ser Asp Glu Phe Asp Lys Gly
 1 5 10 15

<210> 59
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 59
 Cys Ala Thr Gln Leu Arg Arg Phe Gly Asp Lys Leu Asn Phe Arg
 1 5 10 15

<210> 60
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 60
 Glu Cys Ala Gln Leu Arg Arg Ile Gly Asp Lys Val Asn Leu Arg
 1 5 10 15

<210> 61
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Danio rerio*

<400> 61
 Cys Ala Gln Gln Leu Arg Asn Ile Gly Asp Leu Leu Asn Trp Lys
 1 5 10 15

<210> 62
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 62
 Ile Gly Ala Gln Leu Arg Arg Met Ala Asp Asp Leu Asn Ala Gln
 1 5 10 15

<210> 63
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 63
 Ile Gly Ala Gln Leu Arg Arg Met Ala Asp Asp Leu Asn Ala Gln
 1 5 10 15

<210> 64
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Danio rerio*

<400> 64

Val	Ala	Val	Gln	Leu	Arg	Thr	Ile	Gly	Asp	Glu	Met	Asn	Ala	Val
1				5					10					15

<210> 65

<211> 24

<212> DNA

<213> *Danio rerio*

<400> 65

gggggttggt gtaaagtaca gtgg 24

<210> 66

<211> 25

<212> DNA

<213> *Danio rerio*

<400> 66

tcaggttttc tgaaatctcg agacg 25

<210> 67

<211> 27

<212> DNA

<213> *Danio rerio*

<400> 67

actgtactga gacacatcac agcaaca 27

<210> 68

<211> 22

<212> DNA

<213> *Danio rerio*

<400> 68

tcagccttca tactcattcc ag 22

<210> 69

<211> 35

<212> DNA

<213> *Danio rerio*

<400> 69

ctaactgagt actcatctaa tgaattaaca ccgct 35

<210> 70

<211> 24

<212> DNA

<213> *Danio rerio*

<400> 70

tcatctgagg ccgtgctggt agag 24

<210> 71

<211> 21

<212> DNA

<213> *Danio rerio*

<400> 71

atggatgagg acgaggatga t 21

<210> 72

<211> 19

<212> DNA

<213> *Danio rerio*

<400> 72

tcacctgcgg ttctctctg 19

<210> 73

<211> 22

<212> DNA

<213> *Danio rerio*

<400> 73

atggatgatg aggaggatga ac 22

<210> 74

<211> 26

<212> DNA

<213> *Danio rerio*

<400> 74

ttaaattcctg tatctggttt catcta 26

<210> 75

<211> 25

<212> DNA

<213> *Danio rerio*

<400> 75

cttcacaaac acttccactg gatac 25

<210> 76

<211> 25

<212> DNA

<213> *Danio rerio*

<400> 76

ttcactgtca gtcactctgc ggggc 25

<210> 77

<211> 37

<212> DNA

<213> *Danio rerio*

<400> 77

gccgaattcc accatgtctt actataaccg agaactg 37

<210> 78

<211> 36

<212> DNA

<213> *Danio rerio*

<400> 78

ggcctcgagt cacaggcggtt tctgtgcaat gagtcc 36

<210> 79
<211> 18
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 79
atggctaacg aaattagc 18

<210> 80
<211> 21
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 80
tcacttctga gcaaaaaagg c 21

<210> 81
<211> 19
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 81
atggagatgt tgcgccgct 19

<210> 82
<211> 27
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 82
tcatttctct ctcagcaggt agaaaac 27

<210> 83
<211> 19
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 83
atgaacgtgt tcgcgcgct 19

<210> 84
<211> 23
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 84
gcgcaagtct acttcgtcag gta 23

<210> 85
<211> 19
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 85
aaggggctgc agctggacg 19

<210> 86
<211> 22

<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 86
agcggggctc aggtcagtac ag 22

<210> 87
<211> 20
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 87
catcttcgat tgatttgatt 20

<210> 88
<211> 22
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 88
atagtttgaa agttctgaat cc 22

<210> 89
<211> 19
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 89
atgtcctggt gggtgaggg 19

<210> 90
<211> 21
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 90
tcagcgtact aagaggaagg t 21

<210> 91
<211> 25
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 91
gcctaaaatc caaactcaga gccat 25

<210> 92
<211> 25
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 92
tgtcggtggt tcttccagcg aacat 25

<210> 93
<211> 25
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 93
aggttggtgc tcgttctccg atgtc 25

<210> 94
<211> 25
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 94
gtcatagcta atttcgttag ccatg 25

<210> 95
<211> 25
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 95
tgaaaataag cgaactgaag aagac 25

<210> 96
<211> 25
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 96
atttttcggc taaaacgtgt atggg 25

<210> 97
<211> 25
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 97
ggtcaaagtt cctggtgaag tccat 25

<210> 98
<211> 25
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 98
acacatcatc ctctgtcctca tccat 25

<210> 99
<211> 25
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 99
ctttcttcgc catttcagca agttt 25

<210> 100
<211> 25
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 100
tgctttccat ctctggtcgg gccat 25

<210> 101
<211> 25
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 101
ctacaaacaa ggacacaatg gtgga 25

<210> 102
<211> 23
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 102
gcgccattgc tttgcaagaa ttg 23

<210> 103
<211> 25
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 103
cctcttacct cagttacaat ttata 25

<210> 104
<211> 21
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 104
tgcgttcgtc tctgtagatg t 21

<210> 105
<211> 19
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 105
gcctgtggag tgacactga 19

<210> 106
<211> 35
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 106
tgtgtgtgtg tgtagtttc ttttgacagt atttg 35

<210> 107
<211> 21
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 107
cgaacctgtg acagaaactt g 21

<210> 108
<211> 19

<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 108
ctgcgcgcac tctactaca 19

<210> 109
<211> 25
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 109
cgggtttgctc tttcttcgcc atttc 25

<210> 110
<211> 22
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 110
gaacacacgg gttacaaaag ac 22

<210> 111
<211> 24
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 111
gaaaattccc agagtctgta agtg 24

<210> 112
<211> 21
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 112
acgagtgcag gcgctctcct t 21

<210> 113
<211> 27
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 113
accatgatgg tcccggcgaa cagccgc 27

<210> 114
<211> 27
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 114
actttacaga tccaatcgga aagctcc 27

<210> 115
<211> 24
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 115
atcatggtgc agcctaaaaa tcgt 24

<210> 116
<211> 24
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 116
ccctcagagg tcaaacagga aggc 24

<210> 117
<211> 24
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 117
cacgcatgg tcagcatgac aagc 24

<210> 118
<211> 24
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 118
tactgactag ctcaccagaa atgc 24

<210> 119
<211> 27
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 119
accatgacat ccaaccttcc tatcggt 27

<210> 120
<211> 27
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 120
agtttattta atcatgaatg ccccaaa 27

<210> 121
<211> 24
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 121
atgagtgcta acttcggcca ctcg 24

<210> 122
<211> 24
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 122
tcagtggatc ttaaagaggc cgaa 24

<210> 123
<211> 30
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 123
gcaaccatga agcttgagag tcgggcgttt 30

<210> 124
<211> 30
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 124
tttcgttcac aaaccaaaca ccccaaagaa 30

<210> 125
<211> 24
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 125
atggtgagat acgaaacaac atta 24

<210> 126
<211> 30
<212> DNA
<213> *Danio rerio*

<400> 126
attaaatcac aacgcgaaca ccccgaaagaa 30

REIVINDICAÇÕES

1. POLIPEPTÍDEO, que contém uma seqüência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID Nº 1, 5, 7 e 9 ou uma de suas variantes, em que o polipeptídeo é um polipeptídeo pró-apoptótico com múltiplos domínios relativo a Bcl-2 (B2R) de peixe-zebra ou um polipeptídeo pró-apoptótico somente BH3 B2R de peixe-zebra.

2. POLINUCLEOTÍDEO, que contém uma seqüência de nucleotídeos selecionada a partir de SEQ ID Nº 2, 6, 8 e 10 ou uma de suas variantes, em que o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo pró-apoptótico somente BH3 B2R de peixe-zebra.

3. PEIXE-ZEBRA TRANSGÊNICO, em que um ou mais polinucleotídeos codificados por uma seqüência de nucleotídeos selecionada a partir de SEQ ID Nº 2, 6, 8 e 10 é excluído.

4. PEIXE-ZEBRA TRANSGÊNICO, em que a expressão de um ou mais polinucleotídeos selecionados a partir de SEQ ID Nº 2, 6, 8 e 10 é modulada com relação à expressão do um ou mais polinucleotídeos em um peixe-zebra do tipo selvagem.

5. PEIXE-ZEBRA TRANSGÊNICO, de acordo com a reivindicação 4, em que a expressão é aumentada.

6. PEIXE-ZEBRA TRANSGÊNICO, de acordo com a reivindicação 4, em que a expressão é reduzida.

7. PEIXE-ZEBRA TRANSGÊNICO, em que um ou mais polipeptídeos selecionados a partir de SEQ ID Nº 1, 5, 7 e 9 não são expressos.

8. PEIXE-ZEBRA TRANSGÊNICO, em que a expressão de um ou mais polipeptídeos selecionados a partir de SEQ ID Nº 1, 5, 7 e 9 é modulada com relação à expressão do um ou mais polipeptídeos em um peixe-zebra do tipo selvagem.

9. PEIXE-ZEBRA TRANSGÊNICO, de acordo com a reivindicação 8, em que a expressão é aumentada.

10. PEIXE-ZEBRA TRANSGÊNICO, de acordo com a reivindicação 8, em que a expressão é reduzida.

5 11. PEIXE-ZEBRA TRANSGÊNICO, em que um ou mais genes pró-apoptóticos de peixe-zebra (ZPA) endógenos é substituído com um gene ZPA variante ou com um parceiro de gene ZPA de um outro organismo.

12. PEIXE-ZEBRA TRANSGÊNICO, de acordo com a reivindicação 11, em que o parceiro é um mamífero.

10 13. PEIXE-ZEBRA TRANSGÊNICO, de acordo com a reivindicação 11, em que o parceiro é um ser humano.

14. PEIXE-ZEBRA TRANSGÊNICO, de acordo com a reivindicação 11, em que todos os genes ZPA endógenos são substituídos com parceiros de genes ZPA de um outro organismo.

15 15. PEIXE-ZEBRA TRANSGÊNICO, em que um ou mais genes do processo apoptótico intrínseco endógeno são substituídos com um gene variante do processo apoptótico intrínseco ou um gene parceiro do processo apoptótico intrínseco de um outro organismo.

20 16. PEIXE-ZEBRA TRANSGÊNICO, de acordo com a reivindicação 15, em que o parceiro é um mamífero.

17. PEIXE-ZEBRA TRANSGÊNICO, de acordo com a reivindicação 15, em que o parceiro é um ser humano.

25 18. PEIXE-ZEBRA TRANSGÊNICO, de acordo com a reivindicação 15, em que todos os genes do processo apoptótico intrínseco endógeno são substituídos com parceiros de gene de processo apoptótico intrínseco de um outro organismo.

19. PEIXE-ZEBRA TRANSGÊNICO, de acordo com qualquer das reivindicações 11 ou 15, em que o um ou mais genes ZPA endógenos são

selecionados a partir de SEQ ID Nº 2, 6, 8 e 10.

20. MODELO DE SISTEMA, de apoptose que compreende o peixe-zebra de acordo com qualquer das reivindicações 3 a 19.

5 21. MODELO DE SISTEMA, *in vitro* para apoptose que compreende pelo menos um polinucleotídeo codificado por uma sequência de nucleotídeos selecionada a partir de SEQ ID Nº 2, 6, 8 e 10.

22. MODELO DE SISTEMA, de acordo com qualquer das reivindicações 20 ou 21, em que o modelo de sistema para apoptose é um modelo de sistema para o processo apoptótico intrínseco.

10 23. MODELO DE SISTEMA, de apoptose *in vitro* que compreende um ou mais polipeptídeos selecionados a partir de SEQ ID Nº 1, 5, 7 e 9.

24. MODELO DE SISTEMA, de apoptose de acordo com a reivindicação 23, em que o modelo de sistema é um modelo de sistema para o processo apoptótico intrínseco.

15 25. MODELO DE SISTEMA, de apoptose de acordo com a reivindicação 23, em que o modelo de sistema é um modelo de sistema para o processo apoptótico extrínseco.

20 26. MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS, que se unem a um polipeptídeo ZPA, que compreendem o contato de um polipeptídeo ZPA com um composto e determinação se o composto se une ao polipeptídeo ZPA.

27. MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS, que modulam a atividade de um polipeptídeo ZPA, que compreendem o contato de um polipeptídeo ZPA com um composto e determinação se o composto modula a atividade do polipeptídeo ZPA.

25 28. MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES, de redução ou prevenção da apoptose que compreende a administração de pelo menos um agente a um peixe-zebra e determinação se a apoptose é reduzida ou evitada.

29. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 28, que compreende adicionalmente a determinação da presença ou da quantidade de apoptose no peixe-zebra antes da administração do pelo menos um agente.

30. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 28, que
5 compreende adicionalmente o estímulo da apoptose no peixe-zebra antes da administração do pelo menos um agente.

31. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 28, em que o agente reduz ou evita a apoptose por meio do processo apoptótico intrínseco.

32. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 28, em que o
10 agente reduz ou evita a apoptose por meio do processo apoptótico extrínseco.

33. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 28, em que a expressão e/ou atividade de uma ou mais proteínas ZPA no peixe-zebra é aumentada com relação à expressão ou atividade da uma ou mais proteínas ZPA em um peixe-zebra do tipo selvagem.

15 34. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 28, em que uma ou mais proteínas ZPA não são expressas no peixe-zebra.

35. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 28, em que a expressão e/ou atividade de uma ou mais proteínas ZPA no peixe-zebra é reduzida com relação à expressão e/ou atividade da uma ou mais proteínas
20 ZPA em um peixe-zebra do tipo selvagem.

36. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 28, em que o agente é selecionado a partir de um anticorpo, um fragmento de anticorpo, aptâmero e uma molécula pequena.

37. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 28, em que o
25 peixe-zebra é uma larva de peixe-zebra.

38. MÉTODO, conforme a reivindicação 28, em que a etapa de determinação compreende o exame microscópico da viabilidade celular.

39. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 28, em que a

etapa de determinação compreende a determinação da ativação de caspase.

40. MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES, de início e/ou estímulo da apoptose que compreende a administração de pelo menos um agente a um peixe-zebra e determinação se a apoptose é iniciada ou
5 aumentada.

41. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 40, que compreende adicionalmente a determinação da presença ou da quantidade de apoptose no peixe-zebra antes da administração do pelo menos um agente.

42. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 40, que
10 compreende adicionalmente a prevenção e/ou redução da apoptose no peixe-zebra antes da administração do pelo menos um agente.

43. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 40, em que o agente inicia e/ou estimula a apoptose por meio do processo apoptótico intrínseco.

15 44. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 40, em que o agente inicia e/ou estimula a apoptose por meio do processo apoptótico intrínseco.

45. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 40, em que a expressão e/ou atividade de uma ou mais proteínas ZPA no peixe-zebra é
20 aumentada com relação à expressão ou atividade da uma ou mais proteínas ZPA em um peixe-zebra do tipo selvagem.

46. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 40, em que uma ou mais proteínas ZPA não são expressas no peixe-zebra.

47. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 40, em que a
25 expressão e/ou atividade de uma ou mais proteínas ZPA é reduzida no peixe-zebra com relação à expressão e/ou atividade da uma ou mais proteínas ZPA em um peixe-zebra do tipo selvagem.

48. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 40, em que o

agente é selecionado a partir de um anticorpo, um fragmento de anticorpo de união de antígeno, aptâmero e uma molécula pequena.

49. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 40, em que o peixe-zebra é uma larva de peixe-zebra.

5 50. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 40, em que a etapa de determinação compreende o exame microscópico da viabilidade celular.

51. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 40, em que a etapa de determinação compreende a determinação da ativação de caspase.

10 52. MÉTODO DE TRATAMENTO DE DISFUNÇÕES RELATIVAS A APOPTOSE, que compreende a administração a um paciente de pelo menos um polipeptídeo codificado por uma seqüência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID N° 1, 5, 7 e 9.

15 53. MÉTODO DE TRATAMENTO DE DISFUNÇÕES RELATIVAS A APOPTOSE, que compreende a administração a um paciente de um antagonista de pelo menos um polipeptídeo codificado por uma seqüência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID N° 1, 5, 7 e 9.

20 54. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 53, em que o antagonista é selecionado a partir de um aptâmero, um anticorpo, um fragmento de anticorpo de união de antígeno e uma molécula pequena.

55. MÉTODO DE TRATAMENTO DE DISFUNÇÕES RELATIVAS A APOPTOSE, que compreende a administração a um paciente de um agonista de pelo menos um polipeptídeo codificado por uma seqüência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID N° 1, 5, 7 e 9.

25 56. MÉTODO DE TRATAMENTO DE DISFUNÇÕES RELATIVAS A APOPTOSE, que compreende a administração a um paciente de pelo menos um polipeptídeo selecionado a partir do grupo de polipeptídeos codificados pelas seqüências de polinucleotídeos de SEQ ID N° 2, 6, 8 e 10.

57. MÉTODO, de acordo com qualquer das reivindicações 52 a 56, em que a disfunção relativa a apoptose é selecionada a partir de uma disfunção proliferativa celular, uma disfunção de apoptose viral, uma disfunção autoimune, uma disfunção hematológica e uma disfunção neurológica.

5 58. MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES DE PREVENÇÃO OU REDUÇÃO DA APOPTOSE, que compreende o contato de pelo menos um polipeptídeo codificado por uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID Nº 1, 5, 7 e 9 com o agente e determinação da capacidade do agente de bloquear ou reduzir a atividade do pelo menos um
10 polipeptídeo.

59. MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES, de início ou estímulo da apoptose que compreende o contato de pelo menos um polipeptídeo codificado por uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID Nº 1, 5, 7 e 9 com o agente e determinação da capacidade do
15 agente de estimular ou aumentar a atividade do pelo menos um polipeptídeo.

60. MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES, de prevenção ou redução da apoptose que compreende o contato de uma célula que compreende pelo menos um polinucleotídeo codificado por uma sequência de nucleotídeos selecionada a partir de SEQ ID Nº 2, 6, 8 e 10 com o agente e
20 determinação da capacidade do agente de evitar ou reduzir a expressão do pelo menos um polinucleotídeo.

61. MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES, de início ou estímulo da apoptose que compreende o contato de uma célula que compreende pelo menos um polinucleotídeo codificado por uma sequência de
25 nucleotídeos selecionada a partir de SEQ ID Nº 2, 6, 8 e 10 com o agente e determinação da capacidade do agente de estimular ou aumentar a expressão do pelo menos um polinucleotídeo.

62. COMPOSIÇÃO DE AUMENTO DA APOPTOSE, que

compreende um polipeptídeo codificado por uma seqüência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID Nº 1, 5, 7 e 9, ou um de seus agonistas.

63. COMPOSIÇÃO DE REDUÇÃO OU PREVENÇÃO DE APOPTOSE, que compreende um antagonista de um ou mais dentre SEQ ID Nº 1, 5, 7 e 9.

64. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 63, em que o antagonista é selecionado a partir de um anticorpo, um fragmento de anticorpo de união de antígeno, um aptâmero e uma molécula pequena.

65. COMPOSIÇÃO DE REDUÇÃO OU PREVENÇÃO DE APOPTOSE, que compreende um agente que reduz ou inibie a expressão de um ou mais dentre SEQ ID Nº 2, 6, 8 e 10.

66. COMPOSIÇÃO, de acordo com qualquer das reivindicações 62 a 65, que compreende adicionalmente um veículo farmaceuticamente aceitável.

67. MÉTODO DE TRATAMENTO DE UMA DISFUNÇÃO RELATIVA A APOPTOSE, em um paciente necessitado de tratamento, que compreende a administração ao paciente da composição de acordo com qualquer das reivindicações 62 a 65.

68. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 67, em que a disfunção relativa a apoptose é selecionada a partir de uma disfunção proliferativa celular, uma disfunção de apoptose viral, uma disfunção autoimune, uma disfunção hematológica e uma disfunção neurológica.

69. MÉTODO DE DETECÇÃO, da presença ou severidade de uma disfunção relativa a apoptose ou uma predisposição a tanto que compreende a detecção da presença ou quantidade de um homólogo de polipeptídeo ZPA em um paciente com risco de desenvolvimento da disfunção relativa à apoptose.

70. MÉTODO DE DETECÇÃO, da presença ou severidade de

uma disfunção relativa a apoptose ou uma predisposição a tanto que compreende a detecção da presença ou quantidade de expressão de um homólogo de polinucleotídeo ZPA em um paciente com risco de desenvolvimento da disfunção relativa à apoptose.

5 71. KIT, que compreende uma composição de acordo com qualquer das reivindicações 62 a 65 e instruções de uso.

72. KIT, que compreende um sistema de modelo de apoptose *in vitro* de acordo com qualquer das reivindicações 21 a 25 e instruções de uso.

10 73. ARTIGO INDUSTRIALIZADO, que compreende: (a) uma composição de acordo com qualquer das reivindicações 62 a 65; (b) um recipiente que contém a mencionada composição; e (c) um rótulo afixado ao recipiente ou uma bula incluída no recipiente que se refere ao uso da composição no tratamento de uma disfunção relativa à apoptose.

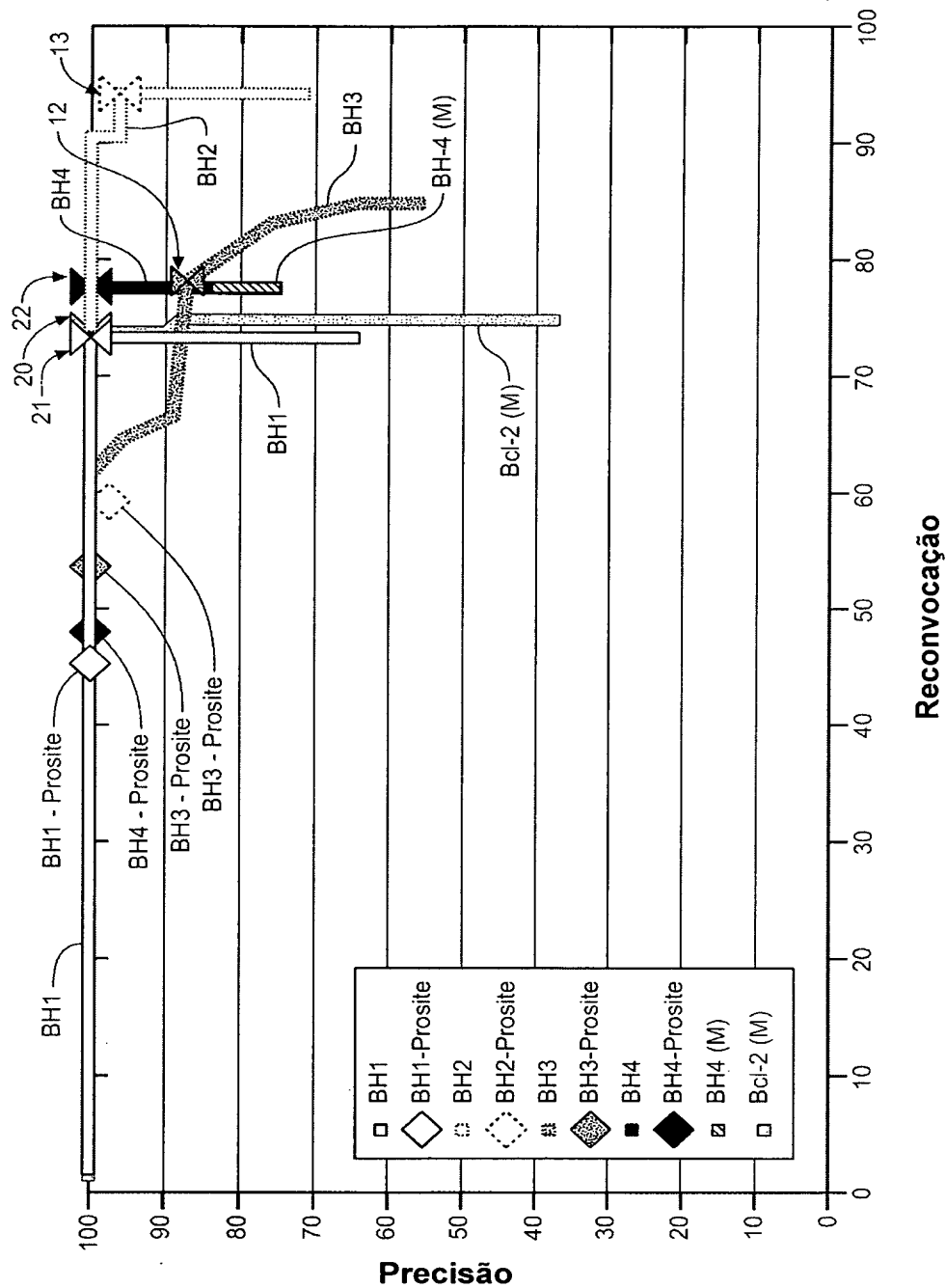
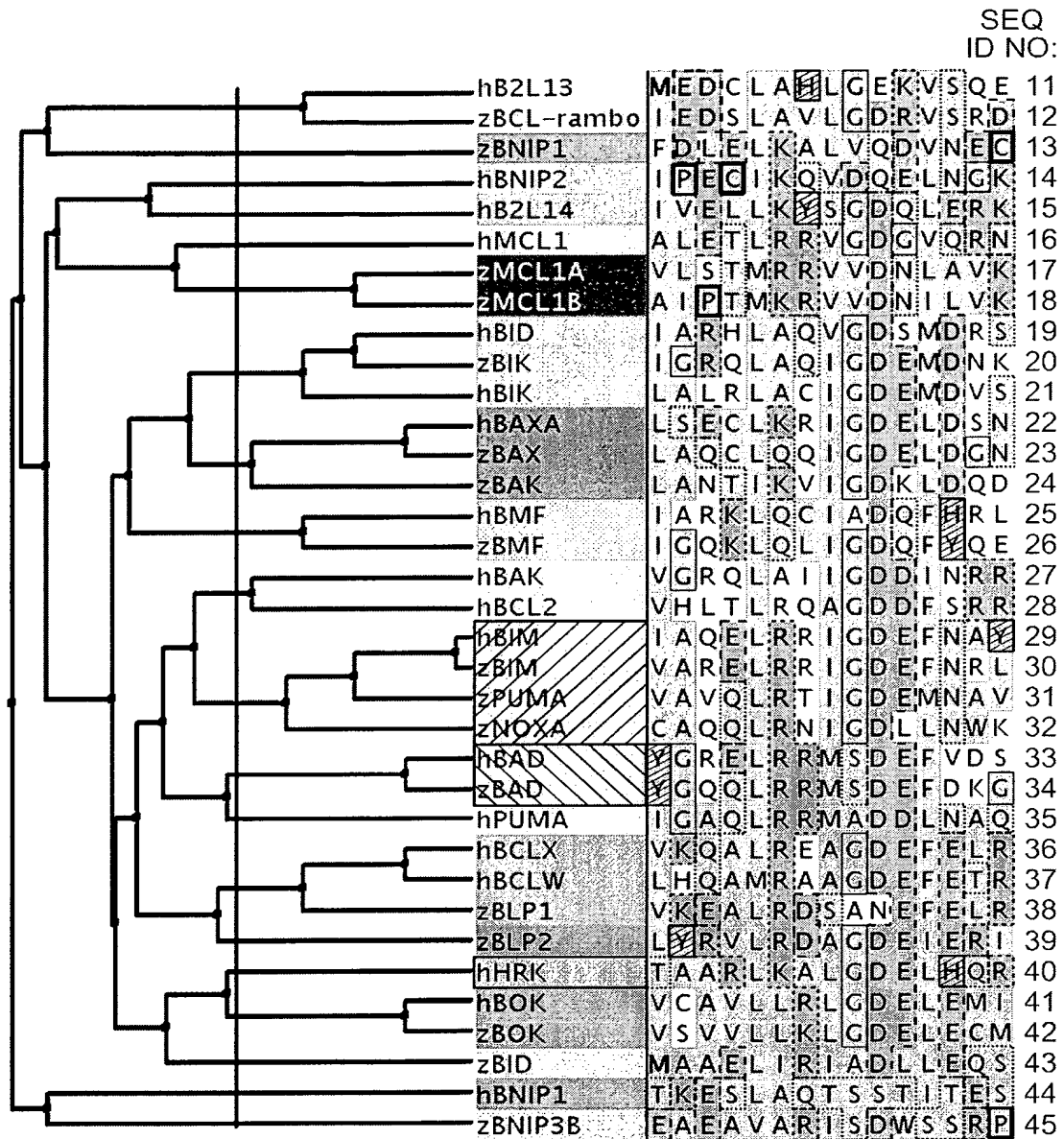
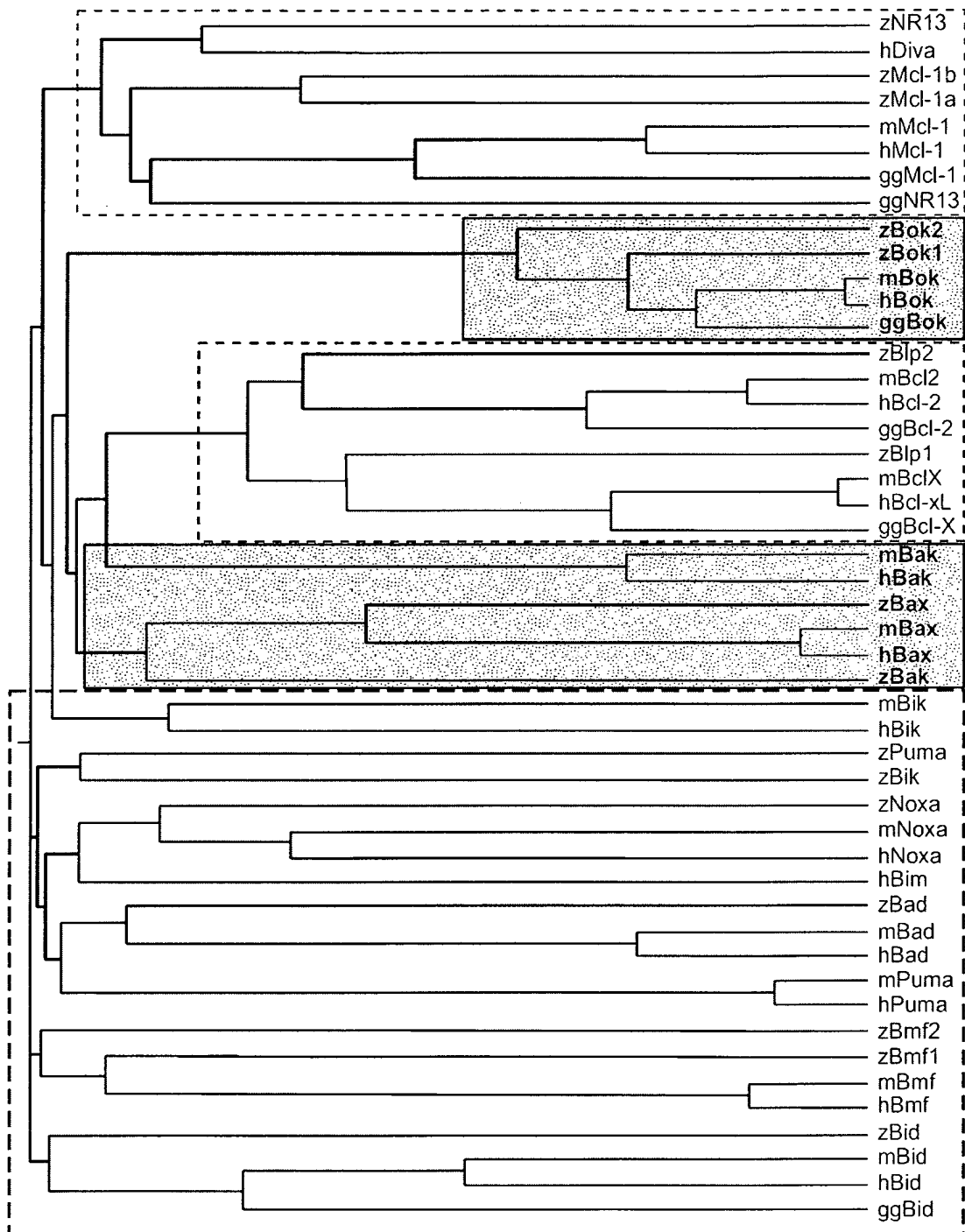


Fig. 1

**Fig. 2**



Escala=0,1 mudanças/resíduo

Fig. 3A

	SEQ ID NO:															
hBik	L	A	L	R	L	A	Q	I	G	D	E	M	D	V	S	46
mBik	V	A	L	R	L	A	Q	I	G	D	E	M	D	L	Q	47
zBik	I	G	R	Q	L	A	Q	I	G	D	E	M	D	N	K	48
hBid	I	A	R	H	L	A	Q	V	G	D	S	M	D	R	S	49
mBid	I	A	R	H	L	A	Q	I	G	D	E	M	D	H	N	50
zBid	M	A	A	E	L	I	R	I	A	D	L	L	E	Q	S	51
hBmf	I	A	R	K	L	Q	Q	I	A	D	Q	F	H	R	L	52
mBmf	I	A	R	K	L	Q	Q	I	A	D	Q	F	H	R	L	53
zBmf1	I	G	Q	K	L	Q	L	I	G	D	Q	F	Y	Q	E	54
zBmf2	I	G	R	K	L	R	E	M	G	D	Q	F	Q	Q	E	55
hBad	Y	G	R	E	L	R	R	M	S	D	E	F	V	D	S	56
mBad	Y	G	R	E	L	R	R	M	S	D	E	F	E	G	S	57
zBad	Y	G	Q	Q	L	R	R	M	S	D	E	F	D	K	G	58
hNoxa	Q	A	T	Q	L	R	R	F	G	D	K	L	N	F	R	59
mNoxa	E	Q	A	Q	L	R	R	I	G	D	K	V	N	L	R	60
zNoxa	Q	A	Q	Q	L	R	N	I	G	D	L	L	N	W	K	61
hPuma	I	G	A	Q	L	R	R	M	A	D	D	L	N	A	Q	62
mPuma	I	G	A	Q	L	R	R	M	A	D	D	L	N	A	Q	63
zPuma	V	A	V	Q	L	R	T	I	G	D	E	M	N	A	V	64

Fig. 3B

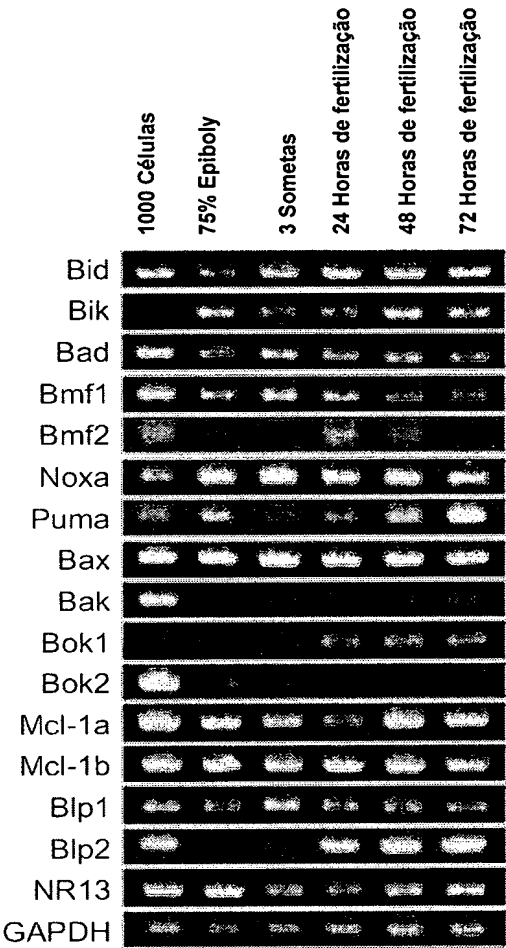


Fig. 3C

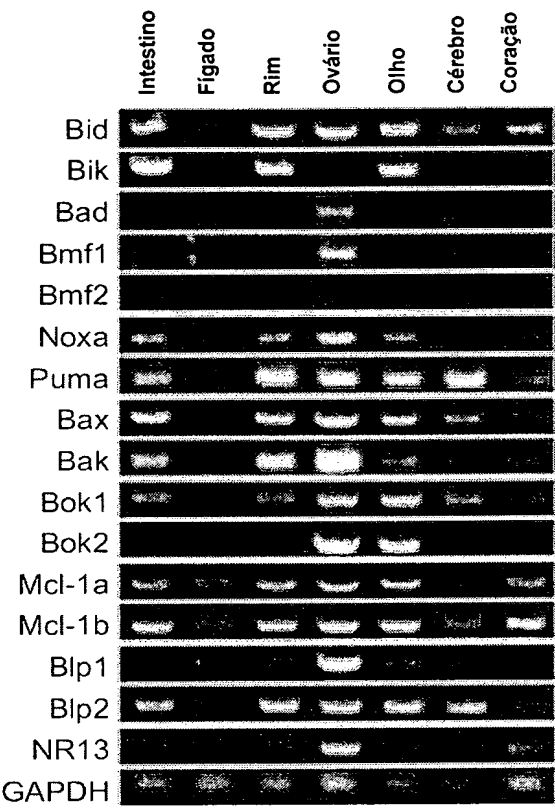
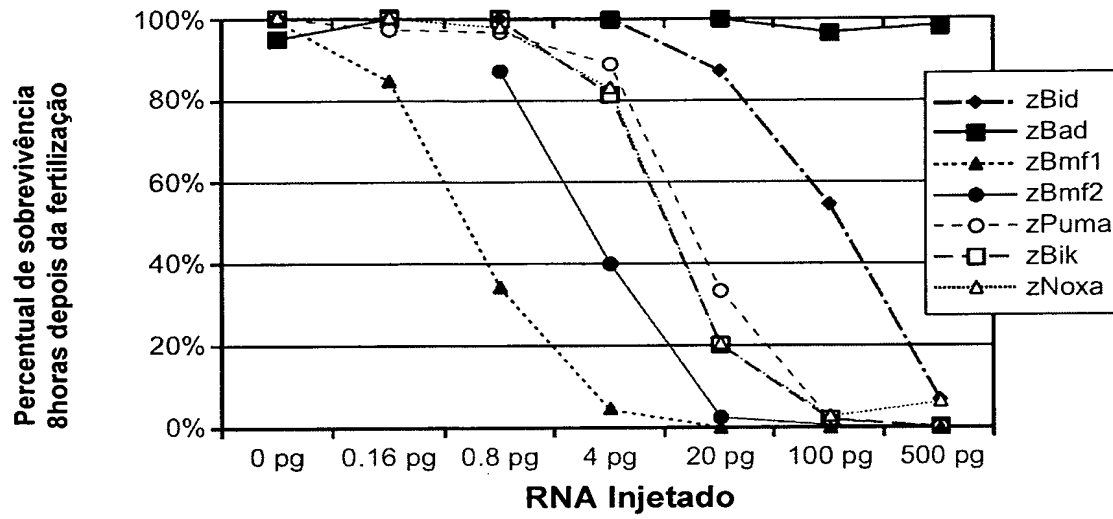
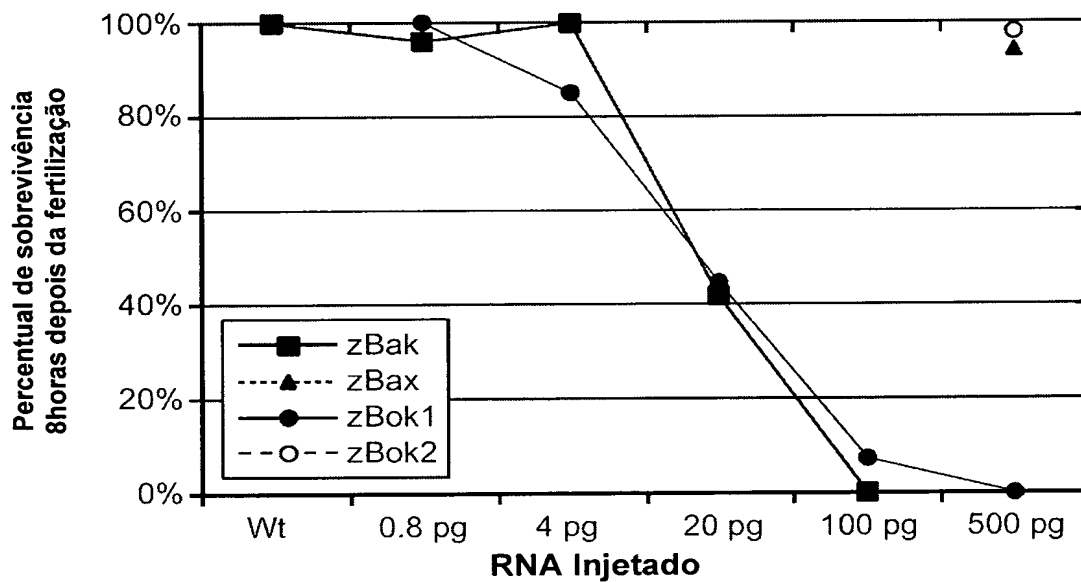
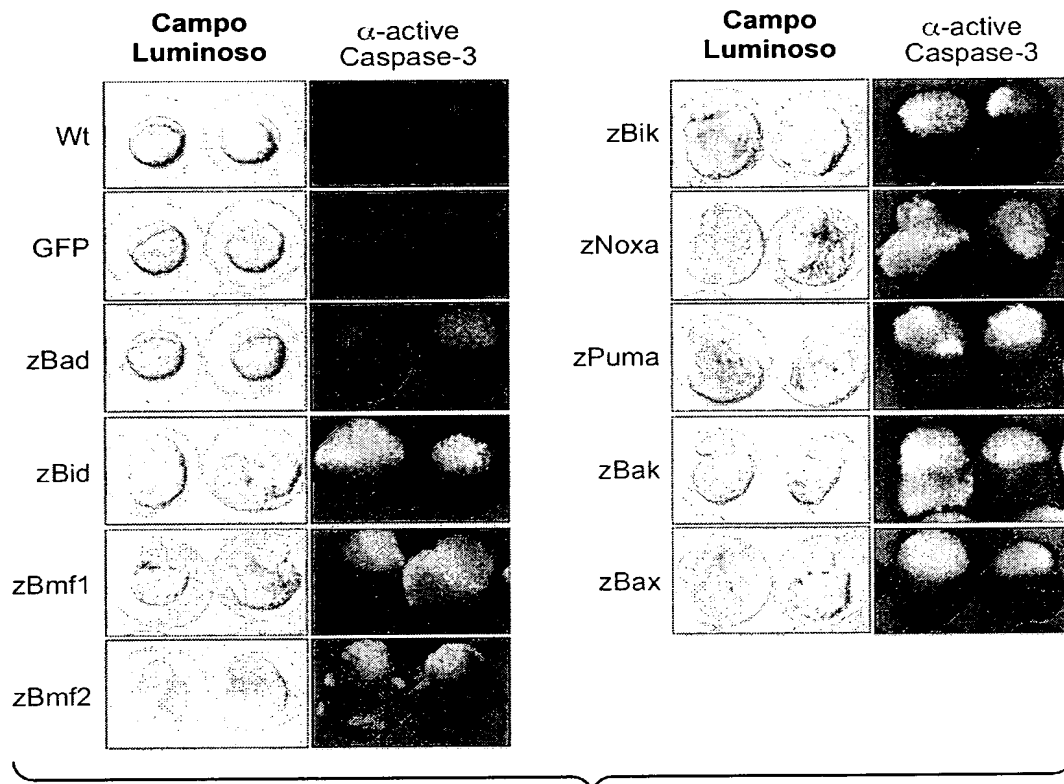


Fig. 3D

**Fig. 4A****Fig. 4B**

**Fig. 4C**

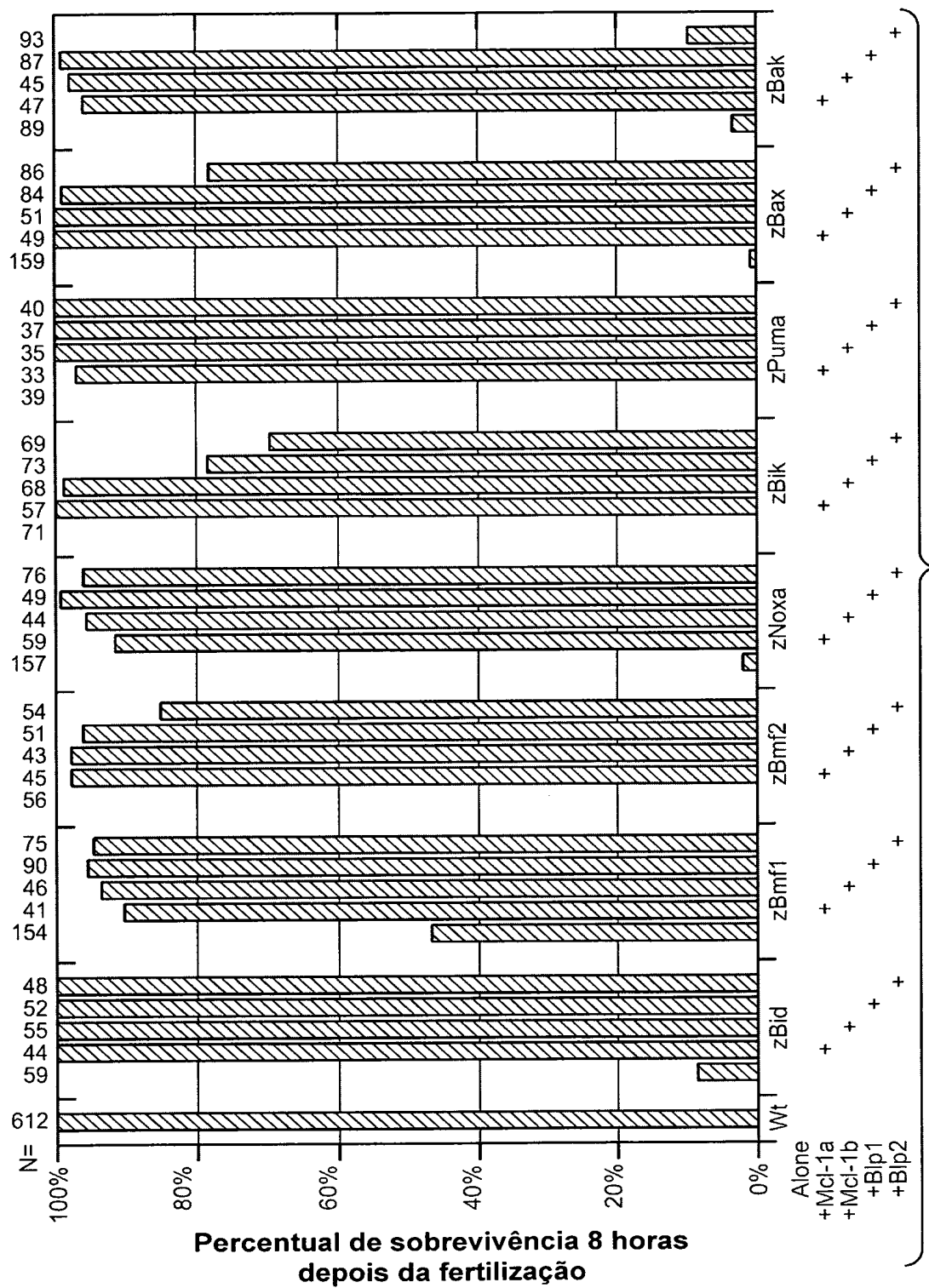
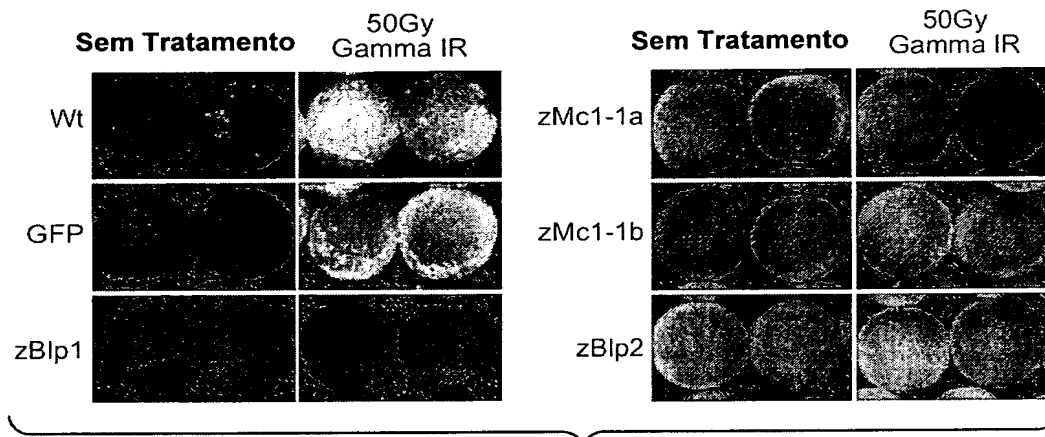
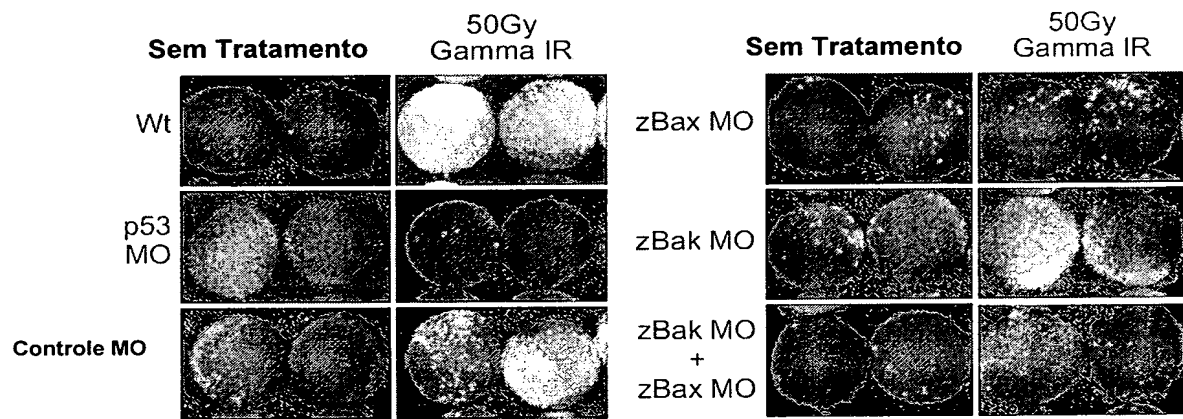
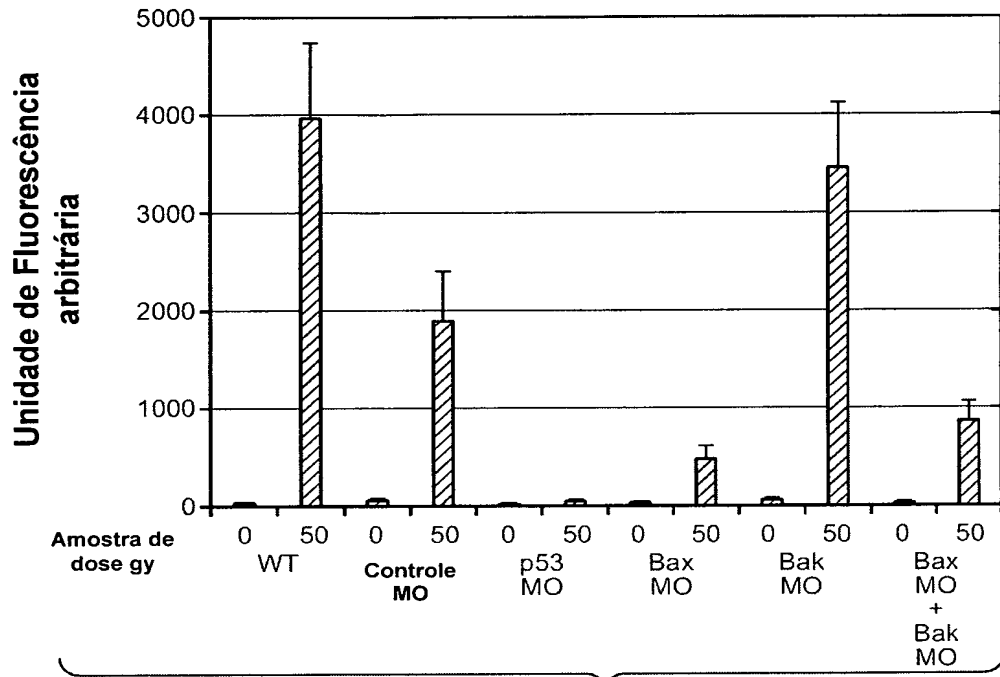
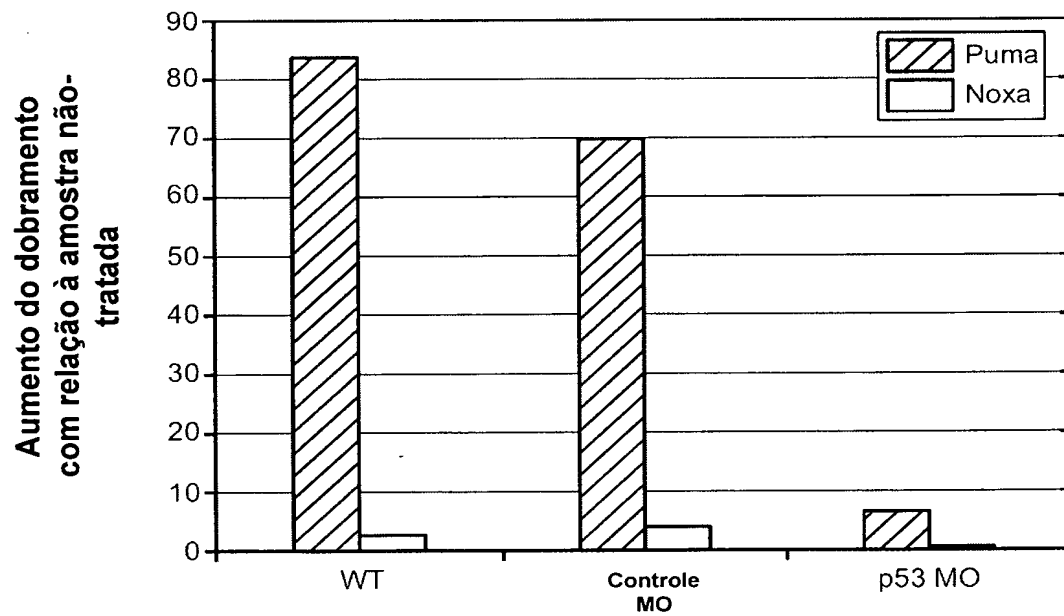
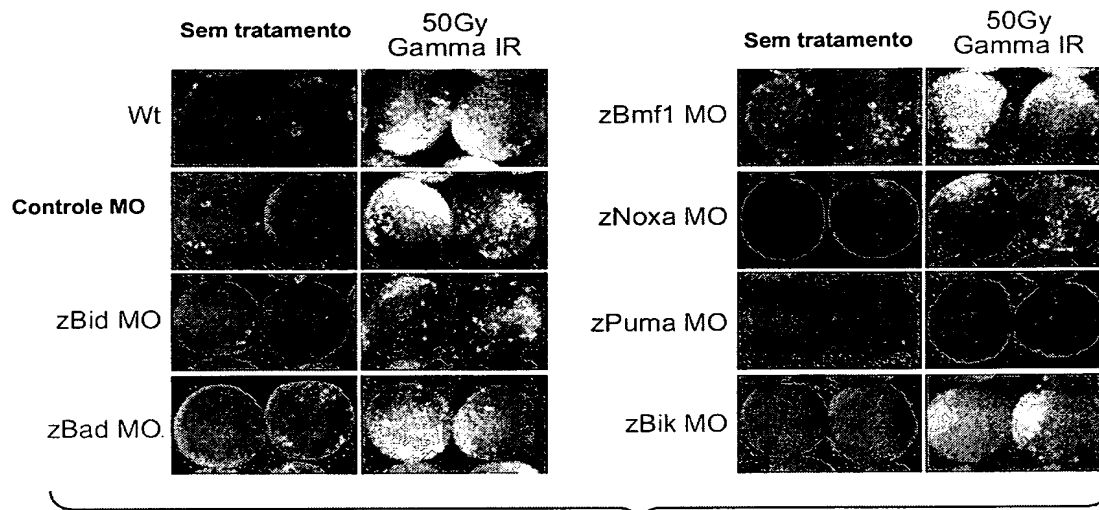
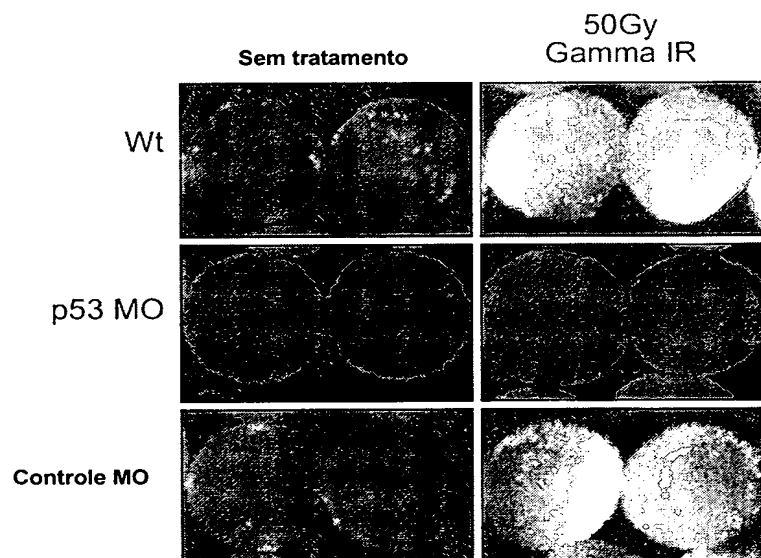
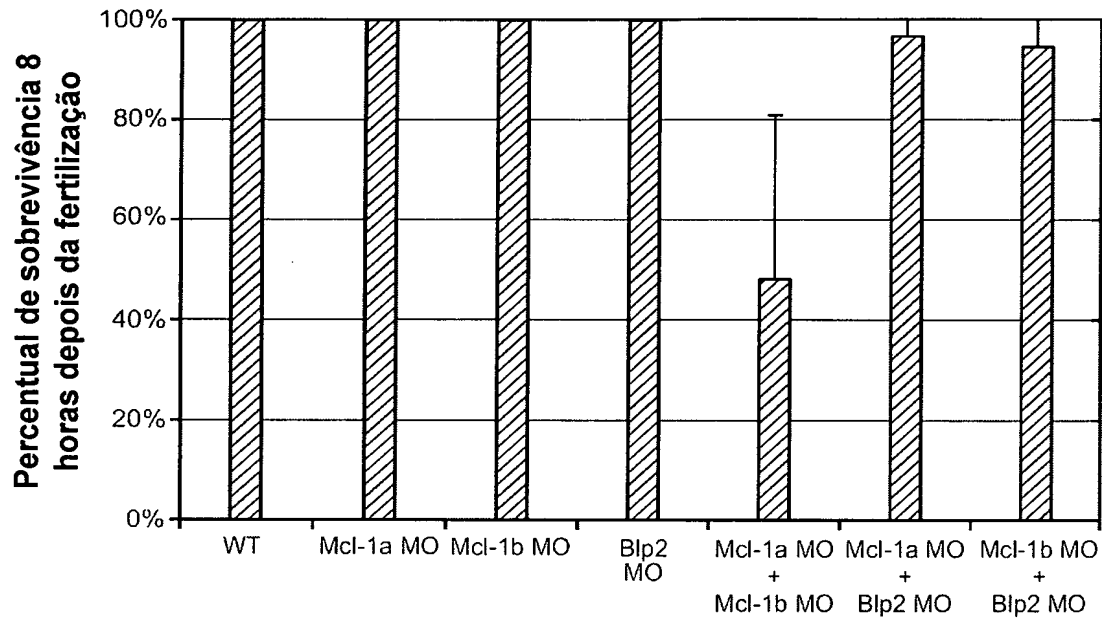
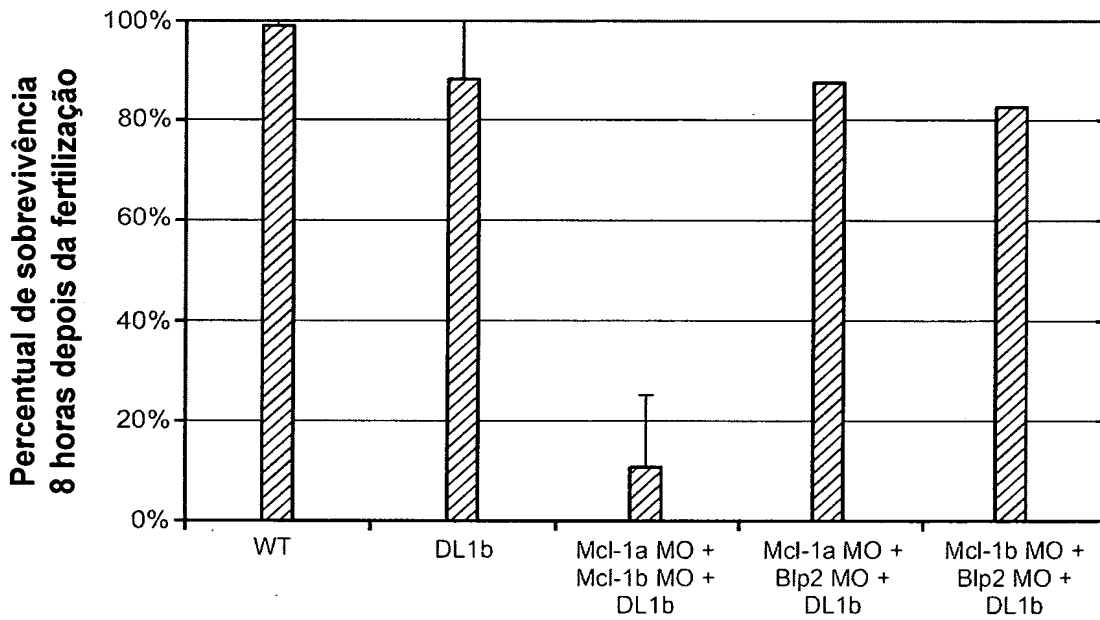


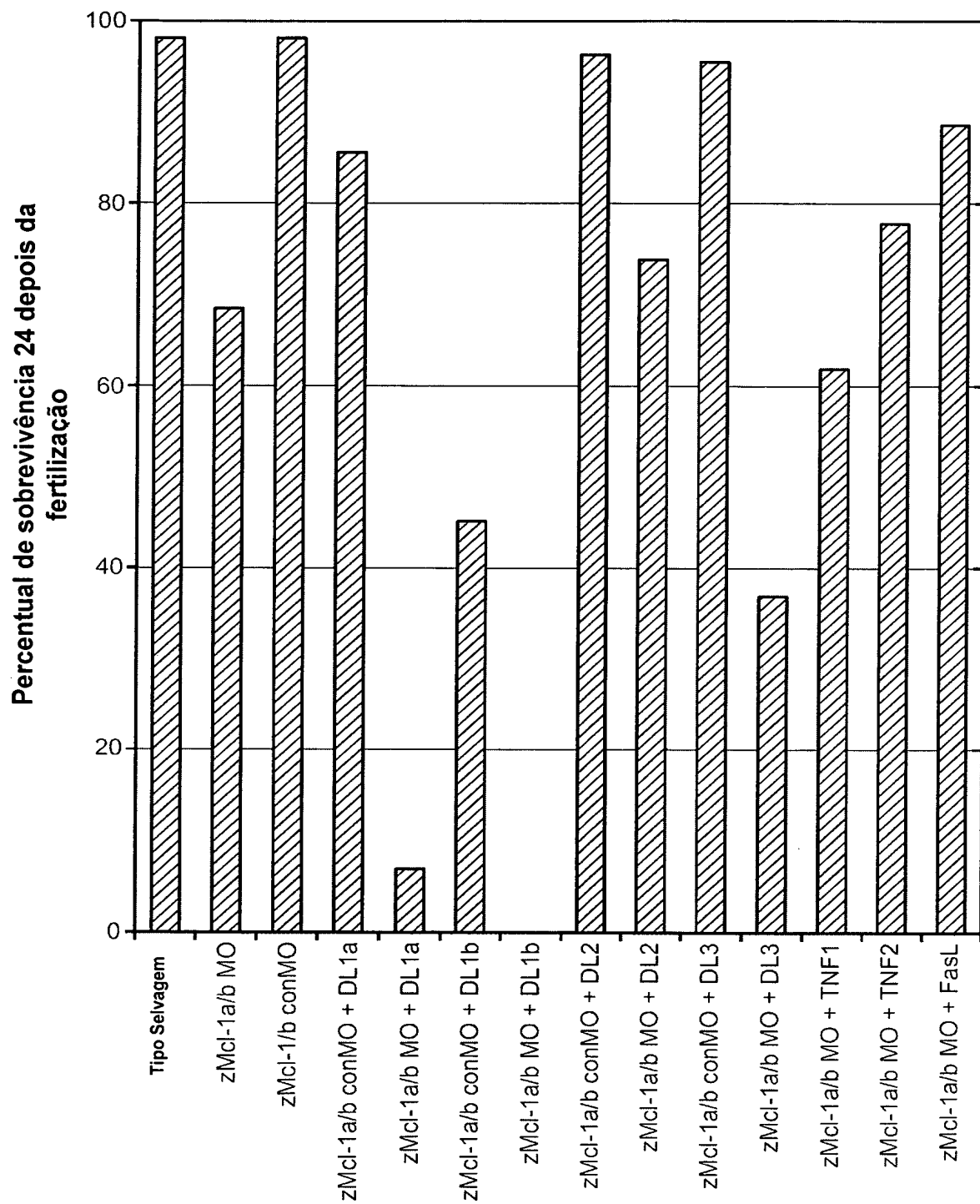
Fig. 4D

**Fig. 5A****Fig. 5B**

**Fig. 5C****Fig. 5F**

**Fig. 5D****Fig. 5E**

**Fig. 6A****Fig. 6B**

**Fig. 6C**

RESUMO

**"POLIPEPTÍDEOS, PEIXES-ZEBRA TRANSGÊNICOS, MODELOS DE
SISTEMAS, MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS, DE
IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES, MÉTODOS DE TRATAMENTO DE
DISFUNÇÕES RELATIVAS A APOPTOSE, MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO
DE AGENTES DE PREVENÇÃO OU REDUÇÃO DA APOPTOSE,
COMPOSIÇÃO DE AUMENTO DA APOPTOSE, COMPOSIÇÕES DE
REDUÇÃO OU PREVENÇÃO DE APOPTOSE, MÉTODO DE DETECÇÃO,
KITS E ARTIGO INDUSTRIALIZADO"**

A presente invenção fornece polipeptídeos ZPA, anticorpos, moléculas de ácido nucleico, antagonistas, agonistas, potencializadores e composições relativas a polipeptídeos ZPA e métodos de sua identificação, elaboração e utilização que são úteis para o tratamento e prevenção de doenças e para diagnóstico e pesquisa médica. A presente invenção também fornece modelos de sistemas para o processo apoptótico intrínseco.