



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0410129-4 B1



(22) Data do Depósito: 10/05/2004

(45) Data de Concessão: 11/02/2020

(54) Título: ANTICORPO ANTI-CS1 ISOLADO, FRAGMENTO DE LIGAÇÃO DE ANTÍGENO, COMPOSTO CONJUGADO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(51) Int.Cl.: A61K 39/395.

(30) Prioridade Unionista: 08/05/2003 US 60/469,211; 29/03/2004 US 60/557,622; 29/03/2004 US 60/557,621; 29/03/2004 US 60/557,620.

(73) Titular(es): ABBVIE BIOTHERAPEUTICS INC.

(72) Inventor(es): MARNA WILLIAMS; J. YUN TSO; NICHOLAS F. LANDOLFI.

(86) Pedido PCT: PCT US2004014866 de 10/05/2004

(87) Publicação PCT: WO 2004/100898 de 25/11/2004

(85) Data do Início da Fase Nacional: 08/11/2005

(57) Resumo: "USO TERAPÊUTICO DE ANTICORPOS ANTI-CS1". A presente invenção é direcionada a antagonistas de CS1 que ligam-se a e neutralizam pelo menos uma atividade biológica de CS1. A invenção também inclui uma composição farmacêutica compreendendo tais anticorpos ou fragmentos de ligação de antígeno destes. A presente invenção também fornece um método de prevenir ou tratar condições de doença, incluindo câncer e distúrbios auto-imunes, em um indivíduo com necessidade deste, compreendendo administrar ao referido indivíduo uma quantidade eficaz de tais antagonistas.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**ANTICORPO ANTI-CS1 ISOLADO, FRAGMENTO DE LIGAÇÃO DE ANTÍGENO, COMPOSTO CONJUGADO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA**".

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A invenção refere-se ao campo de antagonistas e anticorpos no tratamento de doenças, incluindo doenças relacionadas a auto-imune e câncer. A invenção também se refere a métodos para detectar, identificar e modular estas doenças.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

10 Expressão aumentada de imunoglobulina é uma característica de muitas doenças. Secreção de nível elevado de imunoglobulina causa uma variedade de distúrbios, incluindo síndrome da hiperviscosidade, um distúrbio debilitante resultando em fadiga, dores de cabeça, falta de ar, confusão mental, dor de tórax, falência e dano de rim, problemas de visão
15 e o fenômeno de Raynaud (circulação de sangue pobre, particularmente dedos, dedos do pé, nariz e orelhas). Doença de aglutinina fria, crioglobulinemia misturada, hipergamaglobulinemia, síndrome de Sjogren, Líquen mixedematoso, e doença de Gaucher são exemplos de doenças associadas com expressão aumentada de imunoglobulina.

20 Expressão aumentada de imunoglobulina visada para autoproteínas é um marca de autenticidade de doenças auto-imunes. Doença auto-imune é uma falência do sistema imune de reconhecer auto-antígenos como próprios. Em doenças auto-imunes, o sistema imune se ataca erradamente, visando células, tecidos e órgãos, resultando eventualmente na destruição de sistemas
25 fisiológicos. Doenças auto-imunes e de auto-imunidade são multi-fatoriais em origem, com predisposição genética, fatores de hospedeiro (por exemplo, fraqueza de controles de imunorreguladores, defeitos em células T supressoras, ou estimulação policlonal de células B resistentes a controles), fatores ambientais e mecanismos dirigidos por antígeno sendo implicados no desenvolvimento
30 de auto-imunidade e produção de auto-anticorpos a auto-antígenos.

Distúrbios gastrointestinais e Lúpus Eritematoso Sistêmico (SLE) são dois exemplos de doenças auto-imunes. Doença inflamatória de intesti-

no (IBD), um subgrupo distúrbios gastrointestinais, é um grupo distúrbios incuráveis que afetam aproximadamente 4 milhões de indivíduos mundialmente. A etiologia de doença inflamatória de intestino recorrente é atualmente desconhecida. Teorias incluem uma destruição mediada auto-imune de células gastrointestinais, incluindo linfócitos. Agregação homotípica anormal em modelos de doença inflamatória de intestino hereditária foi demonstrada previamente, e mutações em NOD2, um gene implicado em distúrbios auto-imunes, foram mostradas a predispor os pacientes à doença de Crohn. Ni, J. e outros, Immunological abnormality in C3H/HeJ mice with heritable inflammatory bowel disease, *Cell Immunol.* 169:7-15 (1996); Ogura, Y. e outros, A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's Disease, *Nature* 411: 603-606 (2001).

IBDs afetam frequentemente o intestino delgado e cólon, mas pode envolver qualquer porção do trato gastrointestinal. Há mais de 1 milhão de pessoas diagnosticadas com IBD nos Estados Unidos somente, com mais de 10.000 novos casos diagnosticados anualmente. Por causa do efeito drástico na qualidade de vida para pacientes de IBD, dezenas de milhares de horas perdidas são reivindicadas anualmente, igualando-se a 1 bilhão de dólares em dias de trabalho perdidos por ano.

IBD produz uma faixa de sintomas gastrointestinais e extraintestinais, incluindo diarreia, hemorragia retal, dor abdominal, perda de peso, distúrbios de pele e olho, e maturação sexual e crescimento atrasado em crianças. Dois tipos de IBD são colite ulcerativa e doença de Crohn, que compartilham sintomas similares e manifestações fisiológicas, mas se diferem na maneira na qual eles afetam o trato digestivo. Colite ulcerativa é caracterizada por inflamação ulcerativa de toda ou parte da mucosa colônica, mais frequentemente incluindo o reto. Seus sintomas incluem hemorragia retal e urgência, tenesmo, e diarreia. Colite ulcerativa é acompanhada por sérias complicações a curto e longo prazo. As complicações a curto prazo mais sérias são colites fulminantes, megacólon tóxico, e perfuração. Complicações a longo prazo severas incluem osteoporose e câncer colorretal.

A doença de Crohn é uma inflamação transmural crônica que

pode afetar qualquer parte do trato gastrointestinal, da boca ao ânus. A doença de Crohn é descontínua, com áreas não-afetadas espalhadas entre uma ou mais áreas envolvidas. Posteriormente na doença, a mucosa desenvolve uma aparência de paralelepípedo, que resulta de ulcerações longitudinais profundas interlaçadas com mucosa normal interveniente.

A maioria dos pacientes de doença de Crohn apresentam sintomas de delicadeza e dor abdominal, diarreia crônica ou noturna, hemorragia retal, perda de peso, e febre. A doença de Crohn evolui com o passar do tempo de uma doença principalmente inflamatória em um dentre dois padrão clínicos: estreitamento (obstrutiva) ou penetrante (fistulização). Na forma de estreitamento, inflamação transmural produz proliferação fibromuscular na parede intestinal, seguida por estreitamento luminal. Sintomas de obstrução tornam-se comuns como progressos de CD. Na forma penetrante, os tratos dos seios formam como inflamação túneis através da parede do intestino e abrem brechas na superfície serosa, fistulização em tecidos adjacentes e até mesmo através da pele.

Colite ulcerativa e doença de Crohn geralmente são diagnosticadas empregando critérios clínicos, endoscópicos, e histológicos. Entretanto, até agora as técnicas de diagnóstico tradicionais estabeleceram que nenhuma única descoberta é absolutamente diagnóstica para uma doença ou outra. Além disso, aproximadamente 20 % de pacientes têm um quadro clínico que cai entre a doença de Crohn e colite ulcerativa. Pacientes que se encaixam neste perfil são ditos ter colite indeterminada.

Sintomas de IBD podem grandemente impactar o bem-estar de um paciente, qualidade de vida, e capacidade para funcionar. Períodos inflamatórios são prolongados e freqüentes, e dependendo da severidade, incapacitantes de vida. Porque IBD é crônico e tipicamente tem um começo antes de 30 anos de idade, os pacientes geralmente requerem tratamento vitalício. A elucidação de um papel para novas proteínas e compostos em estados de doença para identificação de objetivos potenciais e marcadores diagnósticos é valiosa para melhorar o tratamento atual de pacientes de doença de intestino inflamatória.

SLE é caracterizado pela produção de auto-anticorpos para uma variedade de moléculas ubíquas, que podem ter consequências patológicas incluindo dano a numerosos órgãos e tecidos, incluindo pele, rim, cérebro, e coração. Os tratamentos aprovados atuais para SLE envolvem imunossupressão não-específica e controle de sintoma por meio de esteróides, drogas imunossupressoras, imunomoduladores, e drogas antimaláricas. Entretanto, estes métodos de tratamento resultam em riscos de toxicidade renal e mortalidade precoce. Deste modo, é desejável desenvolver um novo método que especificamente interfere na ativação de linfócito e produção de auto-anticorpo.

Outras doenças auto-imunes em que expressão aumentada de imunoglobulina e/ou células B desempenham um papel significativo incluem trombocitopenia idiopática, artrite reumatóide (RA), anemia hemolítica auto-imune, e Miastenia grave. Evidência para o papel de células de B e/ou imunoglobulina aumentada vem de estudos com pacientes tratados com esteróides, agentes imunossupressores, e/ou anticorpos anti-CD20 (que visam células B). Melhoria em sintomas nestas doenças correlacionam-se com uma diminuição em células B e/ou imunoglobulina de soro, grifando o papel principal que células B desempenham em uma variedade de doenças auto-imunes.

Expressão aumentada de imunoglobulina também pode ser vista em doenças malignas. Como auto-imunes semelhantes, a etiologia de câncer é semelhantemente multifatorial em origem. Câncer, que é a segunda causa principal de morte nos Estados Unidos, foi ligado a mutações em DNA que causam crescimento desenfreado de células. Predisposição genética desempenha um papel grande no desenvolvimento de muitos cânceres, combinada com fatores ambientais, tais como fumo e mutagênese química.

Câncer pode ocorrer em qualquer tecido ou órgão do corpo. Neoplasmas de célula plasmática, incluindo mieloma múltiplo, mieloma "solitário" de osso, plasmacitoma extramedular, leucemia de célula plasmática, macroglobulinemia (incluindo macroglobulinemia de Waldenstrom), doença de cadeia pesada, amiloidose primária, gamopatia monoclonal de signifi-

ção desconhecida (MGUS) são associadas com expressão aumentada de imunoglobulina. Leucemia linfocítica crônica (CLL), um neoplasma de célula não-plasmática, também está associada com níveis elevados de expressão de imunoglobulina.

- 5 Mielomas, ou doença de Kahler, são tumores de células plasmáticas derivados de um único clone, que tipicamente se originam em tecido linfóide secundário e então migram em e residem em tecido de medula óssea. Mielomas afetam geralmente a medula óssea e estruturas de osso adjacentes, com sintomas primários de dor de osso e fraturas patológicas ou
- 10 lesões (lesões de osso osteolíticas), hemorragia anormal, anemia e suscetibilidade aumentada a infecções. Fases avançadas da doença incluem falência renal, deformidades de esqueleto, compactação da medula espinhal, e hipercalcemia. Mieloma afeta células de osso por indução de reabsorção de osteoclasto de osso, então dizimando estrutura de osso e aumentando con-
- 15 centração de cálcio em plasma. A etiologia de mielomas é atualmente desconhecida. Ligação a dano de radiação, mutações em oncogenes, causas familiares e expressão de IL6 anormal foram postuladas.

- Mielomas múltiplos são tumores de célula plasmática com origens múltiplas. Mielomas múltiplos são responsáveis por quase 10 % de
- 20 todas as malignidades de célula plasmática, e são o câncer de tumor de osso mais comum em adultos, com uma taxa incidente anual de 3 a 4 casos por 100.000 pessoas. Nos Estados Unidos, mielomas múltiplos são a segunda malignidade hematológica mais comum após o Linfoma de Não-Hodgkin, com aproximadamente 50.000 casos nos Estados Unidos somen-
- 25 te, e aproximadamente 13.500 novos casos informados todos os anos. A perspectiva de prognóstico para pacientes diagnosticados com mielomas múltiplos é severa, com somente vários meses a um ano para pacientes com formas avançadas da doença.

- Regiões de tratamento tradicionais para mieloma e mielomas
- 30 múltiplos (daqui por diante referidas como "mieloma") consistem em quimioterapia, terapia de radiação, e cirurgia. Além disso, transplantação de medula óssea é recomendada para pacientes que estão de outra maneira em sa-

úde boa. A taxa de cura para pacientes aproxima-se de 30%, e é o único método conhecido que pode curar mielomas. Entretanto, para indivíduos que são mais velhos ou não podem tolerar procedimentos de transplantação de medula óssea, quimioterapia é muito apropriada.

- 5 Procedimentos diagnósticos atuais incluem raios X, aspiração de medula óssea, testes de sangue e urina (para detectar a presença da proteína de Bence Jones), e o ensaio de taxa de sedimentação de eritrócito. Marcadores de superfície de célula potenciais em células plasmáticas mielomatosas também foram identificados, incluindo CD38, CD9, CD10, HLA-DR, e CD20. Ruiz-Aruggelles GJ e San Miguel JF, *Cell Surface Markers in Multiple Myeloma*, Mayo Clin. Proc. 69: 684 - 90 (1994). Outros marcadores de linhagem de célula não-B incluem CD2, CD4, CD13, CD14, CD15, CD23, CD 24, CD25, CD33, CD39, CDw40, CD41, CD45R, CD54, CD56 e CD71, assim como antígenos desagrupados, R1-3, PCA-1, PCA-2, PC1, 62B1, 8A, 8F6 e MM4). Ruiz-Aruggelles, *supra*; Leo R, e outros, *Multiparameter analysis of normal and malignant human plasma cells*, Ann. Hematol. 64: 132 - 9 (1992). Além disso, aparecimento de anticorpos anormais, conhecidos como M-proteína, é um indicador de mieloma múltiplo. A produção aumentada de M-proteína foi ligada a síndrome de hiperviscosidade em mielomas múltiplos, causando efeitos colaterais debilitantes, incluindo fadiga, dores de cabeça, falta de ar, confusão mental, dor de tórax, falência e dano de rim, problemas de visão e o fenômeno de Raynaud (circulação de sangue pobre, particularmente dedos, dedos do pé, nariz e orelhas). Crioglobulinemia ocorre quando M-proteína no sangue forma partículas sob condições frias. Estas partículas podem bloquear vasos sangüíneos pequenos e causar dor e falta de sensação nos dedos do pé, dedos, e outras extremidades durante tempo frio. Indicadores prognósticos, tais como apagamentos cromossômicos, níveis elevados de microglobulina beta-2, níveis de creatinina de soro e isotipagem de IgA também foram estudados. Tricot G, e outros, *Poor prognosis in Multiple Myeloma*, Blood 86: 4250 - 2 (1995).

CS1 (SLAMF7, 19A; Número de Acesso Genbank NM_021181.3, Ref. Boles e Mathew (2001) Immunogenetics 52: 302 - 307;

Bouchon e outros, (2001) J. Immunol. 167: 5517 - 5521; Murphy e outros, (2002) Biochem. J. 361: 431 - 436) é um membro do subconjunto CD2 da superfamília de imunoglobulina. Moléculas da família CD2 são envolvidas em uma ampla faixa de funções imunomoduladoras, tais como co-ativação, diferenciação de proliferação, e adesão de linfócitos, assim como secreção de imunoglobulina, produção de citocina, e citotoxicidade de célula NK. Vários membros da família CD2, tais como CD2, CD58, e CD150, desempenham um papel ou foram propostos para desempenhar um papel em várias doenças auto-imunes e inflamatórias, tais como psoríase, artrite reumatóide, e esclerose múltipla.

CS1 (também conhecido como CRACC, 19A, APEX-1, e FO-AP12) foi isolado e clonado por Boles, K. e outros (ver Immunogenetics 52: 302 - 307 (2001)). Foi informado que CS1 desempenha um papel em citotoxicidade mediada por célula NK e adesão de linfócito (Bouchon, A., e outros, J. of Immuno. 5517 - 5521 (2001); Murphy, J., e outros, Biochem. J. 361: 431 - 436 (2002)).

Pedido PCT PCT/US00/34963 descreve um anticorpo monoclonal contra APEX-1 e o emprego deste para detectar o domínio extracelular recombinante produzido de APEX-1. Entretanto, anticorpos capazes de inibir produção de imunoglobulina por células B e/ou proliferação e/ou desenvolvimento de mielomas não foram desenvolvidos e descritos nas publicações referidas acima. Além disso, evidência de superexpressão de CS-1 em câncer ou doença auto-imune não foi desenvolvida ou descrita nas publicações referidas acima.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A elucidação de um papel para novas proteínas e compostos em estados de doença para identificação de alvos potenciais e marcadores diagnósticos é valiosa para melhorar o tratamento atual de pacientes de câncer e auto-imunes, incluindo pacientes afligidos com IBD, SLE, RA e mieloma. Desta maneira, são fornecidos aqui alvos moleculares para tratamento e diagnose destas doenças, particularmente CS1. Adicionalmente, são fornecidos aqui antagonistas que se ligam a e neutralizam CS1, incluindo anticor-

pos de neutralização tais como anticorpos anti-CS1.

A presente invenção é baseada em parte em nossa descoberta que não há expressão de proteína CS1 significativa detectada em plaquetas, células de sangue vermelhas, células endoteliais (HuVECs), células de rim, células de via aérea bronquial, células de via aérea pequenas, células de próstata, células de fígado ou células de peito. Expressão de CS1 é específica de linfóide, e é detectada em células de pacientes, incluindo células plasmáticas de mieloma múltiplo e pacientes de leucemia de célula plasmática. Expressão é detectada somente em células plasmáticas e não detectável em níveis significantes em outros tipos de célula de amostras de medula óssea. Desta maneira, a presente invenção demonstrou a praticabilidade de empregar anticorpos anti-CS1 como agentes terapêuticos para o tratamento de câncer, incluindo mas não limitados a neoplasmas de célula plasmática, incluindo mieloma, mieloma múltiplo, mieloma "solitário" de osso, plasmacitoma extramedular, leucemia de célula plasmática, macroglobulinemia (incluindo macroglobulinemia de Waldenstrom), doença de cadeia pesada, amiloidose primária, gamopatia monoclonal de significação desconhecida (MGUS). Além disso, neoplasmas de célula não-plasmática associados com expressão aumentada de imunoglobulina, incluindo leucemia linfocítica crônica (CLL), também se beneficiará de terapia anti-CS1.

Além disso, estudos prévios não revelaram a expressão de proteína CS1 em células B de sangue periférico ativadas por PWM *in vitro* (mitógeno de erva dos cânceres), subconjuntos de memória/causador contra linfócitos T e B de sangue periférico *naïve*, ou macrófagos / monócitos de CD14⁺ de sangue periférico. Estudos prévios também não revelaram o papel de CS1 em produção de imunoglobulina. Como resultado, a correlação entre CS1 e doenças auto-imunes não foi previamente estabelecida. A presente invenção também é baseada em parte na descoberta que o RNA de CS1 e expressão de proteína são induzidos fortemente em células B de sangue periférico ativadas, o subconjunto de célula responsável por produção de auto-anticorpo e acreditado desempenhar um papel significativo no desenvolvimento de doenças auto-imunes. Além disso, a presente invenção reve-

lou que expressão do RNA de CS1 em linfócitos B de sangue periférico de paciente de SLE é aumentada em comparação a células B de adultos saudáveis de idade igual, assim como em pacientes afligidos com IBD. A presente invenção revela que CS-1 é expressado em infiltração de células plasmáticas em artrite reumatóide (RA) sinovial. A presente invenção também revelou que CS1 está envolvido em produção de anticorpo e que anticorpos para CS1 diminuem que IgM e IgG secretados por células B de adultos saudáveis e pacientes com lúpus. Subseqüentemente, os dados da presente invenção sugerem que CS1 desempenha um papel importante no estabelecimento de doenças auto-imunes, especialmente SLE, IBD, e RA. Outras doenças associadas com um aumento em imunoglobulina, células B, e/ou produtos de célula B também beneficiariam de tratamento de anti-CS1, incluindo doença de aglutinina fria, doenças imunobolhosas (incluindo penfigóide bolhosa, pênfigo, dermatite herpetiforme, doença de IgA linear, e epidermólise bolhosa adquirida), crioglobulinemia misturada, hipergamaglobulinemia, síndrome de Sjogren, anemia auto-imune, asma, miastenia grave, esclerose múltipla, inflamação pericardial ou miocárdica, dermatite atópica, psoríase, líquen mixedematoso, e doença de Gaucher.

Além disso, estudos não foram conduzidos antes de examinar a viabilidade de empregar anticorpos anti-CS1 para tratar doenças auto-imunes e cânceres de célula plasmática, incluindo mieloma e leucemia de célula plasmática. Um anticorpo terapêutico ideal deveria ligar-se principalmente às células visadas. Ligação a outras células e tecidos podem causar dano potencial àquelas células e tecidos e/ou esvaziar o anticorpo terapêutico de forma que uma quantidade excessiva do anticorpo é exigida para ser liberada ao paciente a fim de alcançar a eficácia de tratamento desejada. Mais importantemente, um anticorpo que se liga a plaquetas pode ter efeitos colaterais, tais como, ativação de plaqueta (que pode levar a coagulação excessiva), ou depleção de plaqueta (que pode levar a falência de coágulo sangüíneo). Por esse motivo, normalmente não é possível empregar um anticorpo como um agente terapêutico se o anticorpo liga-se a tecidos e células múltiplas, especialmente no caso de ligar-se a plaquetas. A presente in-

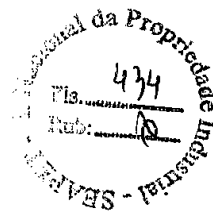
venção é baseada em parte na descoberta que não há expressão de proteína de CS1 significativa detectada em plaquetas, células de sangue vermelhas, HuVECs, células de rim, células de via aérea bronquial, células de via aérea pequenas, células prostáticas, células de fígado e células de peito.

- 5 Desta maneira, a presente invenção demonstrou a viabilidade de empregar anticorpos anti-CS1 como agentes terapêuticos para o tratamento de doenças auto-imunes, e cânceres de célula plasmática, incluindo mieloma e leucemia de célula plasmática.

- 10 A presente invenção, por esse motivo, é direcionada a antagonistas que se ligam a CS1. Modalidades exemplares de tais modalidades incluem neutralização de anticorpos anti-CS1 e fragmentos de anticorpo. Os anticorpos neutralizam pelo menos uma atividade biológica de CS1, em que os referidos anticorpos se ligam a CS1 e são capazes de pelo menos uma das atividades selecionadas a partir do grupo consistido em: (a) inibição de
15 secreção de imunoglobulina e/ou produção por linfócitos; e (b) indução de lise de células que expressam CS1. Os fragmentos de anticorpo ou anticorpo da presente invenção compreendem uma sequência de aminoácido compartilhando pelo menos 85 % de identidade com qualquer um de SEQ ID NOS:3-26. A presente invenção também é direcionada a um anticorpo ou
20 um fragmento de anticorpo, em que o referido anticorpo ou fragmento de anticorpo liga-se substancialmente ao mesmo epítipo como um anticorpo compreendendo uma sequência de aminoácido de qualquer um de SEQ ID NOS:3-26.

- 25 A presente invenção também é direcionada a um anticorpo ou um fragmento de anticorpo, em que o referido anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada madura compreendendo uma sequência de aminoácido de SEQ ID NO:3 e uma região variável de cadeia leve madura compreendendo uma sequência de aminoácido de SEQ ID NO:4.

- 30 A presente invenção também é direcionada a um anticorpo ou um fragmento de anticorpo, em que o referido anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada madura compreendendo uma sequência de aminoácido de SEQ ID NO:5 e uma região variável de cadeia leve madu-



ra compreendendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:6.

A presente invenção também é direcionada a um anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno disso, em que o referido anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada madura compreendendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:7 e uma região variável de cadeia leve madura compreendendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:8.

A presente invenção também é direcionada a uma região de determinação de complementaridade de cadeia pesada (CDR) de um anticorpo compreendendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NOS: 9, 10, 11, 15, 16, 17, 21, 22 ou 23.

A presente invenção também é direcionada a uma região de determinação de complementaridade de cadeia leve (CDR) de um anticorpo compreendendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NOS: 12, 13, 14, 18, 19, 20, 24, 25 ou 26.

A presente invenção também é direcionada a um anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno disso, em que o anticorpo referido compreende uma região variável de cadeia pesada madura compreendendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:27 e uma região variável de cadeia leve madura compreendendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:28.

A presente invenção também é direcionada a uma região de determinação de complementaridade de cadeia pesada (CDR) de um anticorpo compreendendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NOS: 29 e 30. A presente invenção também é direcionado a uma região de determinação de complementaridade de cadeia leve (CDR) de um anticorpo compreendendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 30.

A presente invenção também é direcionada a um anticorpo humanizado ou o fragmento de ligação de antígeno disso, em que o anticorpo referido compreende uma região variável de cadeia pesada madura compreendendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NOS: 27 ou 34 e uma região variável de cadeia leve madura compreendendo uma seqüência

de aminoácido de SEQ ID NO: 28 ou 39. A presente invenção também é direcionada a uma região de determinação de complementaridade de cadeia pesada (CDR) de um anticorpo humanizado compreendendo uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 31.

5 A presente invenção também é direcionada a anticorpos que se ligam substancialmente ao mesmo epítipo de um anticorpo monoclonal produzido por uma linhagem de célula de hibridoma Luc90 tendo número de acesso de ATCC PTA-5091 ou liga-se a um epítipo de não-sobreposição de um anticorpo monoclonal produzido por uma linhagem de célula de hibridoma tendo número de acesso de ATCC PTA-5091.

10 A presente invenção também é direcionada a anticorpos que se ligam substancialmente ao mesmo epítipo de um anticorpo monoclonal produzido pela linhagem de célula de hibridoma Luc63, depositada com o ATCC em 6 de maio de 2004, ou liga-se a um epítipo de não-sobreposição de um anticorpo monoclonal produzido pela linhagem de célula de hibridoma Luc63.

A presente invenção também é direcionada a uma composição farmacêutica compreendendo o anticorpo reivindicado e um veículo farmacêutico.

20 A presente invenção também é direcionada a um método de redução de secreção de imunoglobulina por linfócitos, compreendendo contato dos leucócitos ou linfócitos com uma quantidade eficaz de anticorpo anti-CS1.

25 A presente invenção também é direcionada a um método de indução de citotoxicidade de células expressando CS1, compreendendo contato das células referidas com uma quantidade eficaz de um anticorpo contra CS1.

30 A presente invenção também é direcionada a métodos de emprego dos antagonistas da presente invenção, tais como anticorpos anti-CS1 ou fragmentos de anticorpo, para prevenir ou tratar doenças auto-imunes, tais como SLE e IBD, e câncer, tais como mieloma, em um indivíduo em necessidade disso, compreendendo administração a um indivíduo

referido com uma quantidade eficaz de um antagonista de CS1. De preferência, estes anticorpos se ligam substancialmente ao mesmo epítipo de um anticorpo monoclonal produzido por uma linhagem de célula de híbrido-ma tendo número acesso de ATCC PTA-5091 ou tendo a designação
5 Luc63.

A presente invenção também fornece métodos para determinação da presença ou ausência de uma célula patológica em um paciente associado com doenças auto-imunes e câncer, o método compreendendo detecção de um ácido nucléico compreendendo uma seqüência pelo menos 80
10 % idêntica, de preferência 90 % idêntica, mais preferivelmente 95 % idêntica, a uma seqüência como descrita na Tabela 2, em seguida referida como CS1, em uma amostra biológica do paciente, assim determinando a presença ou ausência da célula patológica. A amostra biológica compreende ácidos nucléicos isolados em que os ácidos nucléicos podem ser mRNA, DNA
15 ou outros ácidos nucléicos. A amostra biológica é tecido de um órgão que é afetado pela patologia, incluindo doenças auto-imunes, incluindo SLE, RA, e IBD, e câncer, tal como mieloma e leucemia de célula plasmática. Uma etapa adicional pode incorporar a amplificação de ácidos nucléicos antes da etapa de detecção do ácido nucléico. A detecção é de uma proteína codificada pelo ácido nucléico, o ácido nucléico compreendendo um CS1. A etapa de detecção pode ser realizada por emprego de uma sonda de ácido nucléico rotulada. A etapa de detecção pode utilizar um biochip compreendendo uma seqüência pelo menos 80 % idêntica a uma seqüência de CS1, de preferência 90 % idêntica, mais preferivelmente 95 % idêntica, ou detecção de
20 um polipeptídeo codificado pelo ácido nucléico. A amostra biológica pode ser derivada de um paciente que está passando por um regime terapêutico para tratar a patologia, ou é suspeito de ter uma doença auto-imune ou patologia de câncer, incluindo mieloma e leucemia de célula plasmática.

Composições também são fornecidas, por exemplo, uma molécula de ácido nucléico isolada compreendendo uma seqüência de CS1, incluindo, por exemplo, aquelas que estão rotuladas; um vetor de expressão compreendendo tal ácido nucléico; uma célula hospedeira compreendendo
30

tal vetor de expressão; um polipeptídeo isolado que é codificado por tal molécula de ácido nucléico compreendendo uma seqüência de CS1; ou um anticorpo que especificamente liga o polipeptídeo. Em modalidades particulares, o anticorpo é: conjugado a um componente causador, é conjugado a um rótulo detectável (incluindo, por exemplo, um rótulo fluorescente, um radioisótopo, ou uma substância química citotóxica), ou é um anticorpo humanizado.

DESCRIÇÃO BREVE DOS DESENHOS

TABELAS

10 A Tabela 1 fornece os resultados mostrando atividades de ligação específica de um painel de anticorpos monoclonais de CS1.

A Tabela 2 fornece o ácido nucléico e seqüências de aminoácido para CS-1.

15 A Tabela 3A e 3B mostra os resultados de tratamento anti-CS1 na redução de produção de IgG por linfócitos de célula B ativados *in vitro*.

A Tabela 4 fornece seqüências de aminoácido da região variável de cadeia pesada (SEQ ID NO: 3) e região variável de cadeia leve (SEQ ID NO: 4) de Luc90; as seqüências de aminoácido da região variável de cadeia pesada (SEQ ID NO: 5) e região variável de cadeia clara (SEQ ID NO: 6) de Luc63; e as seqüências de aminoácido da região variável de cadeia pesada (SEQ ID NO: 7) e região variável cadeia leve (SEQ ID NO: 8) de Luc34. SEQ ID NOS: 9, 10 e 11 descrevem as seqüências de aminoácido da cadeia pesada de Luc90 CDR1, CDR2, e CDR3, respectivamente. SEQ ID NOS: 12, 13, e 14 descrevem as seqüências de aminoácido da cadeia leve de Luc90 CDR1, CDR2, e CDR3, respectivamente. SEQ ID NOS: 15, 16, e 17 descrevem as seqüências de aminoácido da cadeia pesada de Luc63 CDR1, CDR2, e CDR3, respectivamente. SEQ ID NOS: 18, 19, e 20, descrevem as seqüências de aminoácido da cadeia leve de Luc63 CDR1, CDR2, e CDR3, respectivamente. SEQ ID NOS: 21, 22, e 23, descrevem as seqüências de aminoácido da cadeia pesada Luc34 CDR1, CDR2, e CDR3, respectivamente. SEQ ID NOS: 24, 25, e 26 descrevem as seqüências de aminoácido da cadeia leve de Luc34 CDR1, CDR2, e CDR3, respectivamente.

A Tabela 5 fornece seqüências de aminoácido da região variável de cadeia pesada (SEQ ID NO:27) e região variável de cadeia leve (SEQ ID NO:28) de Luc 63. SEQ ID NOS:29-37 descrevem CDR da região variável de cadeia pesada e cadeia leve, respectivamente. SEQ ID NO:33 descreve a mutação de aminoácido simples, de NYT para *NYA* (em *itálico*), em CDR3 da região variável de cadeia pesada de Luc 63.

A Tabela 6 fornece seqüências de aminoácido do Luc 63 de cadeia pesada de camundongo (SEQ ID NO:37), cDNA de região variável de cadeia pesada humana (SEQ ID NO:39), cDNA de JH1 humano (SEQ ID NO:40) e região variável de cadeia pesada de Luc 63 humanizada (SEQ ID NO:41). Da mesma forma fornecidos são as seqüências de aminoácido da região variável de cadeia leve de camundongo (SEQ ID NO:42), cDNA de região variável de cadeia leve humano (SEQ ID NO:43) e região variável de cadeia leve de Luc 63 humanizado (SEQ ID NO:44).

A Tabela 7 fornece um alinhamento das seqüências de aminoácido de região de VH. As seqüências de aminoácido das regiões de VH de MuLuc63 e HuLuc63 (SEQ ID NOS:45 e 47, respectivamente), e os segmentos de E55 3-14 e JH1 de cDNA humano (SEQ ID NO:46) são mostrados em código de única letra. As seqüências de CDR baseadas na definição de Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5º ed., National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) são sublinhadas na seqüência de VH de MuLuc63; numeração é da mesma forma de acordo com Kabat. As seqüências de CDR no segmento de VH humano são omitidas na figura. Os aminoácidos sublinhados simples na seqüência de VH de HuLuc63 foram preditos para contatar as seqüências de CDR e portanto substituídos com os resíduos de camundongo correspondentes. A mutação de treonina (T) para alanina (A) feita em CDR2 para eliminar o sítio de glicosilação ligado por potencial (NYT) é indicada com um sublinhado duplo.

A Tabela 8 fornece um alinhamento das seqüências de aminoácido de região de VL. As seqüências de aminoácido das regiões de VL de MuLuc63 e HuLuc63 (SEQ ID NOS:48 e 50, respectivamente), e a seqüência de III-2R de cDNA humano (SEQ ID NO:49) são mostrados em código

de única letra. As seqüências de CDR baseadas na definição de Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5º ed., National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) são sublinhadas na seqüência de VL de MuLuc63; numeração é da mesma forma de acordo com Kabat. As seqüências de CDR no segmento de VL humano são omitidas na figura. Os aminoácidos sublinhados simples na seqüência de VL de HuLuc63 foram preditos para contatar as seqüências de CDR e portanto substituídos com o resíduo de camundongo correspondente.

A Tabela 9 lista os oligonucleotídeos empregados para a clonagem de genes de VH e VL de HuLuc63.

FIGURAS

A Figura 1A mostra a expressão de CS1 predominantemente em células B de memória e plasma.

A Figura 1B mostra a expressão de CS1 em amostras de rim, coração, linfonodo, fígado, intestino delgado, cérebro, medula óssea, músculo esquelético, baço e tecido pulmonar.

A Figura 2A mostra a expressão de CS1 em leucócitos e outros tecidos de adulto normais.

A Figura 2B mostra expressão de CS1 aumentada em populações de leucócito ativada múltiplas.

A Figura 3 mostra os resultados de ensaios de competição de anticorpos monoclonais anti-CS1.

A Figura 4 mostra a afinidade relativa de anticorpos monoclonais anti-CS1.

A Figura 5A mostra manchamento imunohistológico de células de expressão de CS1 com três dos anticorpos monoclonais anti-CS1 (Luc 23, Luc 38 e Luc 63).

A Figura 5B mostra manchamento imunohistológico de amígdala inflamada com anticorpos monoclonais anti-CS1 e anti-CD138.

A Figura 5C mostra manchamento imunohistológico de tecido de articulação sinovial de um paciente com artrite reumatóide com anticorpos monoclonais anti-CS1 e anti-CD138.

A Figura 6 mostra o manchamento da superfície celular de células mononucleares de sangue periférico versus células mononucleares de sangue periférico não-estimuladas tratadas com mitogênio de erva-dos-cânceres com três dos anticorpos monoclonais anti-CS1 (Luc 63, Luc34 e
5 Luc 38).

A Figura 7 mostra a atividade de ligação de Luc 63 humanizado (NYT tipo selvagem versus mutação de NYA desglicosilada) em ensaios de ligação de CS1 com base em ELISA.

A Figura 8 mostra um modelo tridimensional da região variável
10 de Luc 63 humanizado.

A Figura 9 mostra a supra-regulação da expressão de CS1 em linfócitos B e T de sangue periférico ativado ensaiados por análise de PCR em tempo real.

A Figura 10 mostra a expressão de CS1 aumentada em linfócitos B de sangue periférico de paciente SLE comparados a adultos saudáveis comparados por idade ensaiados por análise de PCR em tempo real.
15

A Figura 11 mostra uma representação gráfica de expressão de CS-1 comparada a células epiteliais colônicas de adulto normal em experiências de microdisposição: expressão de CS-1 é aumentada em pacientes com colite ulcerativa (n=4) e doença de Crohn (n=5) quando comparado a células epiteliais colônicas de adulto normal. Os números sobre os símbolos de barra indicam o número de alteração em células epiteliais colônicas para cada amostra.
20

A Figura 12 mostra a supra-regulação de expressão de CS1 em pacientes com doença de intestino inflamatória com quantificação de PCR em tempo real. A expressão de CS-1 é aumentada em pacientes com colite ulcerativa (n=2) e doença de Crohn (n=3) quando comparado a amostras de tecido de intestino grosso de adulto normal agrupadas. Os números sobre os símbolos de barra indicam o número de alteração em tecido de intestino grosso de adulto normal para cada amostra.
25
30

A Figura 13 mostra a expressão proeminente de CS1 em células de mieloma.

A Figura 14A-14H mostra a expressão de CS1 em células plasmáticas de medula óssea de pacientes com mieloma múltiplo.

A Figura 14I mostra a expressão de CS1 em células de sangue periférico de um paciente com leucemia de célula plasmática.

5 A Figura 15 mostra a expressão de CS1 em subtipos de célula de medula óssea.

A Figura 16 mostra a inibição de secreção de IgM *in vitro* de PBMCs ativados por anticorpos monoclonais anti-CS1.

10 A Figura 17 mostra a inibição de secreção de IgM *in vitro* de linfócitos por anticorpos monoclonais anti-CS1 comparado a anticorpos monoclonais anti-CD2.

A Figura 18 mostra a inibição de secreção de IgG *in vitro* de linfócitos de adulto saudável e pacientes com doença auto-imune por anticorpos monoclonais anti-CS1.

15 A Figura 19A mostra a inibição de produção de IgG humana *in vivo* em modelo de camundongo SCID-HuPBMC por anticorpos monoclonais anti-CS1.

20 A Figura 19B mostra uma comparação de inibição de produção de IgG humana *in vivo* em modelo de camundongo SCID-HuPBMC por anticorpos monoclonais anti-CS1 Luc 90 e 63.

A Figura 19C mostra um resumo da inibição de produção de IgG humana *in vivo* em modelo de camundongo SCID-HuPBMC por anticorpos monoclonais anti-CS1.

25 A Figura 20 mostra a indução de citotoxicidade celular dependente de anticorpo por anticorpos monoclonais anti-CS1 Luc90 e Luc63.

A Figura 21A mostra a indução de citotoxicidade celular dependente de anticorpo por anticorpos monoclonais Luc90 quiméricos anti-CS1 que é realçada por anticorpos quiméricos com níveis diminuídos de fucose.

30 A Figura 21B mostra a indução de citotoxicidade celular dependente de anticorpo de células OPM2 de mieloma múltiplo por anticorpos monoclonais Luc90 quiméricos anti-CS1.

A Figura 21C mostra a indução de citotoxicidade celular depen-

dente de anticorpo de células L363 de mieloma múltiplo por anticorpos monoclonais Luc90 quiméricos anti-CS1.

A Figura 22 mostra volumes de tumor diminuídos em modelos de mieloma múltiplo de xenoenxerto de camundongo tratados com anticorpos anti-CS1 Luc 90 e Luc 63 versus anticorpos de controle de isótipo.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Conforme os objetivos esboçados acima, a presente invenção fornece novos métodos para tratamento de vários distúrbios, por exemplo, distúrbios auto-imunes e várias condições cancerosas, incluindo várias formas de mieloma. Da mesma forma fornecidos são os métodos para a avaliação de diagnose e prognose de tais distúrbios, bem como métodos por avaliar quanto as composições que modulam tais condições. A presente invenção da mesma forma fornece métodos de monitorar a eficácia terapêutica de tal tratamento, incluindo o monitoramento e avaliação de marcadores relativamente expressos nos referidos distúrbios.

Em particular, a identificação de de marcadores seletivamente expressos em distúrbios auto-imunes, tais como SLE, RA e IBD, e condições cancerosas, tais como mieloma e leucemia de célula plasmática, permitem o uso daquela expressão em métodos de diagnóstico, prognóstico ou terapêuticos. Como tal, a invenção define várias composições, por exemplo, ácidos nucleicos, polipeptídeos, anticorpos e agonistas/antagonistas de molécula pequena, que serão úteis para seletivamente identificar aqueles marcadores. Os marcadores podem ser úteis para caracterização molecular de subgrupos das doenças, e esses subgrupos podem de fato requerer tratamentos muito diferentes. Além disso, os marcadores podem ser da mesma forma importantes em doenças relacionadas a distúrbios auto-imunes, mieloma e leucemia de célula plasmática, por exemplo, que afetam tecidos similares como em tais condições ou têm mecanismos similares de indução/manutenção. Por exemplo, as características ou processos do tumor podem da mesma forma ser alvejados. Os usos de diagnóstico e prognóstico tornam-se disponíveis, por exemplo, em doenças relacionadas ao subgrupo porém distintas, em estágios diferenciados de mieloma de distúrbios

auto-imunes ou leucemia de célula plasmática ou para determinar a estratégia de tratamento de tais condições. Os métodos de detecção podem ser baseados em ácido nucléico, por exemplo, técnicas de hibridização e PCR ou proteína, por exemplo, ELISA, imageamento, IHC, etc. A diagnose pode ser qualitativa ou quantitativa e pode detectar aumentos ou diminuições em níveis de expressão.

Definições

O termo "proteína de CS1" ou "polinucleotídeo de CS1" ou "transcrição associada a CS1" refere-se às variantes polimórficas de ácido nucléico e polipeptídeo, alelos, mutantes e homólogos de interespecies que:

10 (1) tem uma seqüência de nucleotídeo que tem mais que cerca de 60% de identidade de seqüência de nucleotídeo, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, preferivelmente cerca de 92%, 94%, 96%, 97%, 98% ou 99% ou mais identidade de seqüência de nucleotídeo, preferivelmente em uma região de pelo

15 menos cerca de 25, 50, 100, 200, 500, 1000 ou mais nucleotídeos, em uma seqüência de nucleotídeo de ou associado com o gene CS1 (Tabela 2), ligação do gene CS1 (Tabela 2) em pares de ligação, por exemplo, anticorpos policlonais, aumentados contra um imunógeno compreendendo uma seqüência de aminoácido codificada por uma seqüência de nucleotídeo de

20 ou associado com o gene CS1 (Tabela 2) e variantes conservativamente modificadas destas; (3) especificamente hibridiza sob condições de hibridização severas em uma seqüência de ácido nucléico ou o complemento desta de CS1 (Tabela 2) e variantes conservativamente modificadas desta; ou

25 (4) tem uma seqüência de aminoácido que tem mais do que cerca de 60% de identidade de seqüência de aminoácido, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, preferivelmente 90%, 91%, 93%, 95%, 97%, 98%, ou 99% ou mais identidade de seqüência de aminoácido, preferivelmente em uma região de pelo menos cerca de 25, 50, 100, 200, 500, 1000 ou mais aminoácidos, em uma seqüência de aminoácido codificada por uma seqüência de nucleotídeo de

30 ou associada com o gene CS1 (Tabela 2). Uma seqüência de polinucleotídeo ou polipeptídeo é tipicamente de um mamífero incluindo, porém não limitado a, primata, por exemplo, ser humano; roedor, por exemplo, rato,

camundongo, *hamster*, vaca, porco, cavalo, ovelha ou outro mamífero. Um "polipeptídeo de CS1" e um "polinucleotídeo de CS1", incluem ambas as formas recombinantes ou de ocorrência natural.

Um ácido nucléico ou proteína de CS1 de "tamanho natural" refere-se a uma seqüência de polinucleotídeo ou polipeptídeo de CS1, ou uma variante desta, que contém elementos normalmente contidos em uma ou mais seqüências de polipeptídeo ou polinucleotídeo de CS1 tipo selvagem de ocorrência natural. A de "tamanho natural" pode estar antes ou após, vários estágios de junção ou processamento pós-traducional, incluindo junção alternativa.

"Amostra biológica" quando aqui empregado é uma amostra de fluido ou tecido biológico que contém ácidos nucléico ou polipeptídeos, por exemplo, de uma transcrição, polinucleotídeo ou proteína de CS1. Tais amostras incluem, porém não são limitados a, tecido isolado de primatas, por exemplo, seres humanos ou roedores, por exemplo, camundongos e ratos. As amostras biológicas podem da mesma forma incluir seções de tecidos tal como amostras de biópsia e autópsia, seções congeladas tiradas para propósitos histológicos, amostras arquivadas, sangue, plasma, soro, esputo, fezes, lágrimas, muco, cabelo, pele, etc. As amostras biológicas também incluem explantes e culturas celulares transformadas e /ou primárias derivadas de tecidos de pacientes. Uma amostra biológica é tipicamente obtida de um organismo eucariótico, mais preferivelmente um mamífero tal como um primata, por exemplo, chimpanzé ou ser humano; vaca; cão; gato; um roedor, por exemplo, cobaia, rato, camundongo; coelho; ou um pássaro; réptil; ou peixe. Os animais domésticos e de criação são de interesse.

"Fornecer uma amostra biológica" significa obter uma amostra biológica para uso em métodos descritos nesta invenção. Frequentemente, isto será feito removendo-se uma amostra de células de um animal, porém pode da mesma forma ser realizado empregando-se células previamente isoladas (por exemplo, por outra pessoa, em outra vez e /ou para outro propósito) ou realizando-se os métodos da invenção *in vivo*. Os materiais ou tecidos arquivados, tendo história de resultado ou tratamento, serão particu-

larmente úteis.

Os termos "idêntico" ou "identidade" em porcentagem, no contexto de duas ou mais seqüências de polipeptídeo ou ácidos nucleicos, refere-se a duas ou mais seqüências ou subseqüências que são as mesmas ou

5 têm uma porcentagem especificada de resíduos de aminoácido ou nucleotídeos que são os mesmos (por exemplo, cerca de 70% de identidade, preferivelmente 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99%, identidade mais alta em uma região específica, quando comparado e alinhado

10 para correspondência máxima em uma janela de comparação ou região designada) quando avaliados empregando-se, por exemplo, algoritmos de comparação de seqüência de BLAST ou BLAST 2.0 com parâmetros básicos descritos abaixo ou por alinhamento manual e inspeção visual. Tais seqüências são em seguida referidas ser "substancialmente idênticas". Esta

15 definição da mesma forma refere-se a, ou pode ser aplicada, ao complemento de uma seqüência de teste. A definição da mesma forma inclui seqüências que têm deleções e /ou inserções, substituições e de ocorrência natural, por exemplo, variantes alélicas ou polimórficas e variantes feitas pelo homem. Como descrito abaixo, os algoritmos preferidos podem ser responsáveis por intervalos e similares. Preferivelmente, a identidade existe

20 em uma região que é pelo menos cerca de 25 aminoácidos ou nucleotídeos em comprimento, ou mais preferivelmente em uma região que é cerca de 50-100 aminoácidos ou nucleotídeos em comprimento.

Para comparação de seqüência, tipicamente uma seqüência age como uma seqüência de referência, a qual seqüências teste são comparadas. Ao empregar um algoritmo de comparação de seqüência, seqüências

25 de referência e teste são registradas em um computador, coordenadas de subseqüência são designadas, se necessário e parâmetros de programa de algoritmo de seqüência são designados. Preferivelmente, parâmetros de programa básicos podem ser empregados ou parâmetros alternativos podem ser designados. O algoritmo de comparação de seqüência em seguida

30 calcula as identidades de seqüência em porcentagem para as seqüências teste relativas à seqüência de referência, com base nos parâmetros de pro-

grama.

- Uma "janela de comparação", quando aqui empregada, inclui referência a um segmento de posições contíguas selecionadas do grupo que consiste tipicamente a partir de cerca de 20 a 600, normalmente cerca de 50 a 200, mais normalmente cerca de 100 a 150, em que uma seqüência pode ser comparada a uma seqüência de referência do mesmo número de posições contíguas depois que as duas seqüências são da melhor forma alinhadas. Os métodos de alinhamento de seqüências para comparação são bem-conhecidos. O alinhamento ideal de seqüências para comparação pode ser conduzido, por exemplo, pelo algoritmo de homologia local de Smith e Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489, pelo algoritmo de alinhamento de homologia de Needleman e Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443-453, pela pesquisa para o método de similaridade de Pearson e Lipman (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444-2448, por implementações computadorizadas destes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA no Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), ou por alinhamento manual e inspeção visual (veja, por exemplo, Ausubel, e outros (eds. 1995 e suplementos) Current Protocols in Molecular Biology Wiley).
- Os exemplos preferidos de algoritmos que são adequados para determinar identidade de seqüência em porcentagem e similaridade de seqüência incluem os algoritmos BLAST e BLAST 2.0, que são descritos em Altschul e outros (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402 e Altschul, e outros (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410. BLAST e BLAST 2.0 são empregados, com os parâmetros aqui descritos, para determinar a identidade de seqüência em porcentagem para os ácidos nucléico e proteínas da invenção. O *software* para realizar as análises de BLAST está publicamente disponível pelo National Center for Biotechnology Information. Este algoritmo envolve primeiro identificar pares de seqüência de alta classificação (HSPs) identificando-se palavras curtas de comprimento *W* na seqüência de interrogação, que compara-se ou satisfaz algum escore de valor limiar de valor positivo *T* quando alinhado com uma palavra do mesmo comprimento em uma seqüência de

base de dados. T é referido como o valor limiar de escore de palavra de vizinhança (Altschul, e outros, supra). Estes acertos de palavra de vizinhança inicial agem como sementes para pesquisas de iniciação para procurar HSPs mais longos contendo-os. Os acertos de palavra são estendidos em

5 ambas as direções ao longo de cada seqüência para até o escore de alinhamento cumulativo poder ser aumentado. Os escores cumulativos são calculados empregando-se, por exemplo, para seqüências de nucleotídeo, os parâmetros M (escore de recompensa para um par de resíduos de combinação; sempre > 0) and N (escore de penalidade para resíduos de má

10 combinação; sempre < 0). Para seqüências de aminoácido, uma matriz de classificação é empregada para calcular o escore cumulativo. A extensão dos acertos de palavra em cada direção é detida quando: o escore de alinhamento cumulativo cai pela quantidade X de seu valor máximo obtido; o escore cumulativo vai a zero ou abaixo, devido ao acúmulo de um ou mais

15 alinhamentos de resíduo de classificação negativa; ou a extremidade de cada seqüência é alcançada. Os parâmetros de algoritmo BLAST W, T e X determinam a sensibilidade e velocidade do alinhamento. O programa BLASTN (para seqüências de nucleotídeo) emprega como parâmetros um comprimento de palavra (W) de 11, uma expectativa (E) de 10, $M=5$, $N=-4$ e

20 uma comparação de ambos os filamentos. Para seqüências de aminoácido, o programa BLASTP emprega como parâmetros um comprimento de palavra de 3, e expectativa (E) de 10, e a matriz de classificação BLOSUM62 (veja Henikoff e Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-919) alinhamentos (B) de 50, expectativa (E) de 10, $M=5$, $N=-4$, e uma comparação

25 de ambos os filamentos.

O algoritmo BLAST da mesma forma realiza uma análise estatística da similaridade entre duas seqüências. Veja, por exemplo, Karlin e Altschul (1993) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787. Uma medida de similaridade fornecida pelo algoritmo BLAST é a probabilidade de soma menor

30 (P(N)) que fornece uma indicação da probabilidade pela qual uma comparação entre duas seqüências de nucleotídeo ou aminoácido ocorreria por acaso. Por exemplo, um ácido nucléico é considerado similar a uma seqüência

de referência se a probabilidade de soma menor em uma comparação do ácido nucléico teste ao ácido nucléico de referência for menor do que cerca de 0,2, mais preferivelmente menor do que cerca de 0,01, e ainda mais preferivelmente menor do que cerca de 0,001. Valores de log podem ser números grandes negativos, por exemplo, 5, 10, 20, 30, 40, 40, 70, 90, 110, 150, 170, etc.

Uma indicação que duas seqüências de ácido nucléico são substancialmente idênticas é que o polipeptídeo codificado pelo primeiro ácido nucléico é imunologicamente reativo cruzado com os anticorpos elevados contra o polipeptídeo codificado pelo segundo ácido nucléico. Desse modo, um polipeptídeo é tipicamente substancialmente idêntico a um segundo polipeptídeo, por exemplo, onde os dois peptídeos diferem-se apenas por substituições conservadoras. Outra indicação que duas seqüências de ácido nucléico são substancialmente idênticas é que as duas moléculas ou seus complementos hibridizam entre si sob condições severas. Ainda outra indicação que duas seqüências de ácido nucléico são substancialmente idênticas é que os mesmos iniciadores podem ser empregados para amplificar as seqüências.

Uma "célula hospedeira" é uma célula de ocorrência natural ou uma célula transformada que contém um vetor de expressão e suporta a replicação ou expressão do vetor de expressão. Células hospedeiras podem ser células cultivadas, explantes, células *in vivo* e similares. Células hospedeiras podem ser células procarióticas tais como *E. coli* ou células eucarióticas tais como levedura, inseto, anfíbio ou células mamíferas tais como CHO, HeLa e similares (veja, por exemplo, o *web site* American Type Culture Collection).

Os termos "isolado", "purificado" ou "biologicamente puro" referem-se ao material que é substancialmente ou essencialmente livre dos componentes que normalmente o acompanham como constatado em seu estado nativo. Pureza e homogeneidade são tipicamente determinadas empregando técnicas de química analítica tais como eletroforese em gel de poliacrilamida ou cromatografia líquida de alto desempenho. Uma proteína

ou ácido nucléico que é a espécie predominante presente em uma preparação é substancialmente purificada. Em particular, um ácido nucléico isolado é separado de alguns quadros de leitura abertos que naturalmente flanqueiam o gene e codificam proteínas exceto proteína codificada pelo gene. O termo "purificado" em algumas modalidades denota que um ácido nucléico ou proteína dá origem a essencialmente uma faixa em um gel eletroforético. Preferivelmente, significa que o ácido nucléico ou proteína é pelo menos cerca de 85% puro, mais preferivelmente pelo menos 95% puro e ainda mais preferivelmente pelo menos 99% puro. "Purificar" ou "purificação" em outras modalidades significa remover pelo menos um contaminante ou componente da composição a ser purificado. Neste sentido, a purificação não requer que o composto purificado seja homogêneo, por exemplo, 100% puro.

Os termos "polipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" são empregados intercambialmente aqui para se referir a um polímero de resíduos de aminoácido. Os termos aplicam-se a polímeros de aminoácido em que um ou mais resíduo de aminoácido é um mimético químico artificial de um aminoácido de ocorrência natural correspondente, bem como aos polímeros de aminoácido de ocorrência natural, aqueles contendo resíduos modificados e polímeros de aminoácido de ocorrência não-natural.

O termo "aminoácido" refere-se aos aminoácidos sintéticos e de ocorrência natural, bem como análogos de aminoácido e miméticos de aminoácido que funcionam similarmente aos aminoácidos de ocorrência natural. Aminoácidos de ocorrência natural são aqueles codificados pelo código genético, bem como aqueles aminoácidos que são modificados depois, por exemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato e O-fosfoserina. Análogos de aminoácido referem-se aos compostos que têm a mesma estrutura química básica como um aminoácido de ocorrência natural, por exemplo, um α carbono que é ligado a um hidrogênio, um grupo carboxila, um grupo amino e um grupo R, por exemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfônio. Tais análogos podem ter grupos R modificados (por exemplo, norleucina) ou cadeias principais de peptídeo modificadas, porém

mantém alguma estrutura química básica como um aminoácido de ocorrência natural. Mimético de aminoácido refere-se a um composto químico que tem uma estrutura que é diferente da estrutura química geral de um aminoácido, porém que funciona similarmente a outro aminoácido.

5 Os aminoácidos podem ser referidos aqui por seus símbolos de três letras geralmente conhecidos ou pelos símbolos de uma letra recomendados por IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission. Os nucleotídeos, igualmente, podem ser referidos por seus códigos de única letra geralmente aceitos.

10 "Variante de modo conservador modificada" aplica-se igualmente a seqüências de aminoácido e ácido nucléico. Com respeito a seqüências de ácido nucléico particulares, as variantes de modo conservador modificadas referem-se àqueles ácidos nucléicos que codificam seqüências de aminoácido idênticas ou essencialmente idênticas, ou onde o ácido nucléico
15 não codifica uma seqüência de aminoácido, para seqüências essencialmente idênticas ou associadas, por exemplo, naturalmente contíguas. Por causa da degeneração do código genético, um grande número de ácidos nucléicos funcionalmente idênticos codifica a maioria das proteínas. Por exemplo, os códons GCA, GCC, GCG e GCU cada qual codifica a alanina de aminoácido.
20 Assim, em cada posição onde uma alanina é especificada por um códon, o códon pode ser alterado para outro dos códons correspondentes descritos sem alterar o polipeptídeo codificado. Tais variações de ácido nucléico são "variações silenciosas", que são espécies de variações de modo conservador modificadas. Cada seqüência de ácido nucléico aqui que codifica um
25 polipeptídeo da mesma forma descreve variações silenciosas do ácido nucléico. Em certos contextos cada códon em um ácido nucléico (menos AUG, que ordinariamente é o único códon para metionina e TGG, que ordinariamente é o único códon para triptofano) pode ser modificado para render uma molécula funcionalmente similar. Conseqüentemente, uma variação
30 silenciosa de um ácido nucléico que codifica um polipeptídeo está implícita em uma seqüência descrita com respeito ao produto de expressão, porém não necessariamente com respeito a seqüências de sonda atuais.

Quanto às seqüências de aminoácido, alguém versado reconhecerá que adições, deleções ou substituições individuais em um ácido nucléico, peptídeo, polipeptídeo ou seqüência de proteína que altera, adiciona, ou deleta um único aminoácido ou uma porcentagem pequena de aminoácidos na seqüência codificada é uma "variante de modo conservador modificada" onde a alteração resulta na substituição de um aminoácido com um aminoácido quimicamente similar. A tabela de substituição conservadora que fornece aminoácidos funcionalmente similares é bem-conhecida. Tais variantes de modo conservador modificadas são além de e não excluem variantes polimórficas, homólogos de interespecies e alelos da invenção. Substituições tipicamente conservadoras incluem entre si: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutâmico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptofano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); e 8) Cisteína (C), Metionina (M) (veja, por exemplo, Creighton (1984) *Proteins: Structure and Molecular Properties* Freeman).

Estruturas macromoleculares tais como estruturas de polipeptídeo podem ser descritas em termos de vários níveis de organização. Para uma discussão geral desta organização, veja, por exemplo, Alberts, e outros (eds. 2001) *Molecular Biology of the Cell* (4^o ed.) Garland; e Cantor e Schimmel (1980) *Biophysical Chemistry Part I: The Conformation of Biological Macromolecules* Freeman. "Estrutura primária" refere-se à seqüência de aminoácido de um peptídeo particular. "Estrutura secundária" refere-se a, estruturas tridimensionais, localmente ordenadas dentro de um polipeptídeo. Estas estruturas são geralmente conhecidas como domínios. Os domínios são porções de um polipeptídeo que freqüentemente formam uma unidade compacta do polipeptídeo e são tipicamente 25 a aproximadamente 500 aminoácidos de comprimento. Os domínios típicos são preparados a partir de seções de menos organização tais estiramentos de lâmina β e hélices α . "Estrutura terciária" refere-se à estrutura tridimensional completa de um monômero de polipeptídeo. "Estrutura quaternária" refere-se à estrutura tridimensional formada, normalmente pela associação não-covalente de unida-

des terciárias independentes. Os termos anisotrópicos são da mesma forma conhecidos como termos de energia.

"Ácido nucléico" ou "oligonucleotídeo" ou "polinucleotídeo" ou equivalentes gramaticais aqui empregados significam pelo menos dois nucleotídeos covalentemente ligados entre si. Oligonucleotídeos são tipicamente de cerca de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 25, 30, 40, 50, ou mais nucleotídeos em comprimento, até cerca de 100 nucleotídeos em comprimento. Ácidos nucléicos e polinucleotídeos são um polímero de qualquer comprimento, incluindo comprimentos mais longos, por exemplo, 200, 300, 500, 1000, 2000, 3000, 5000, 7000, 10.000, etc. Um ácido nucléico da presente invenção geralmente conterá ligações de fosfodiéster, embora em alguns casos, análogos de ácido nucléico sejam incluídos os quais possam ter pelo menos uma ligação diferente, por exemplo, ligações de fosforamidato, fosforotioato, fosforoditioato ou O-metilfosforoamidita (veja Eckstein (1992) *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach* Oxford Univ. Press); e ligações e cadeias principais de ácido nucléico de peptídeo. Outros ácidos nucléicos análogos incluem aqueles com cadeias principais positivas; cadeias principais não-iônicas e cadeias principais de não-ribose, incluindo aquelas descritas nas Patentes U.S. N°s 5.235.033 e 5.034.506, e Capítulos 6 e 7 de Sanghvi e Cook (eds. 1994) *Carbohydrate Modifications in Antisense Research* ACS Symposium Series 580. Os ácidos nucléicos que contêm um ou mais açúcares carbocíclicos estão da mesma forma incluídos dentro de uma definição de ácidos nucléicos. Modificações da cadeia principal de ribose-fosfato podem ser feitas por uma variedade de razões, por exemplo, para aumentar a estabilidade e meia-vida de tais moléculas em ambientes fisiológicos ou como sondas em um biochip. As misturas de análogos e ácidos nucléicos de ocorrência natural; alternativamente, misturas de análogos de ácido nucléico diferentes, e misturas de análogos e ácidos nucléicos de ocorrência natural podem ser feitas.

Uma variedade de referências descreve tais análogos de ácido nucléico, incluindo, por exemplo, fosforamidato (Beaucage, e outros (1993) *Tetrahedron* 49:1925-1963 e referências aqui; Letsinger (1970) *J. Org.*

- Chem. 35:3800-3803; Sprinzl, e outros (1977) Eur. J. Biochem. 81:579-589; Letsinger, e outros (1986) Nucl. Acids Res. 14:3487-499; Sawai, e outros (1984) Chem. Lett. 805; Letsinger, e outros (1988) J. Am. Chem. Soc. 110:4470-4471; e Pauwels, e outros (1986) Chemica Scripta 26:141-149),
- 5 fosforotioato (Mag, e outros (1991) Nucleic Acids Res. 19:1437-441; e Patente U.S. Nº 5.644.048), fosforoditioato (Brill, e outros (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:2321-2322), O-metilfosforoamidita (veja Eckstein (1992) Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford Univ. Press), e ligações e cadeias principais de ácido nucléico de peptídeo (veja Egholm (1992)
- 10 J. Am. Chem. Soc. 114:1895-1897; Meier, e outros (1992) Chem. Int. Ed. Engl. 31:1008-1010; Nielsen (1993) Nature 365:566-568; Carlsson, e outros (1996) Nature 380:207, todos os quais são incorporados por referência). Outros ácidos nucléico análogos incluem aqueles com cadeias principais positivas (Denpcy, e outros (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6097-101; ca-
- 15 deias principais não-iônicas (Patentes U.S. Nºs 5.386.023, 5.637.684, 5.602.240, 5.216.141 e 4.469.863; Kiedrowski, e outros (1991) Angew. Chem. Intl. Ed. English 30:423-426; Letsinger, e outros (1988) J. Am. Chem. Soc. 110:4470-4471; Letsinger, e outros (1994) Nucleoside and Nucleotide 13:1597; Capítulos 2 e 3 em Sanghvi e Cook (eds. 1994) Carbohydrate Mo-
- 20 difications in Antisense Research ACS Symposium Series 580; Mesmaeker, e outros (1994) Bioorganic and Medicinal Chem. Lett. 4:395-398; Jeffs, e outros (1994) J. Biomolecular NMR 34:17; Horn, e outros (1996) Tetrahedron Lett. 37:743) e cadeias principais de não-ribose, incluindo aquelas descritas na Patentes U.S. Nºs 5.235.033 e 5.034.506, e Capítulos 6 e 7 em
- 25 Sanghvi e Cook (eds. 1994) Carbohydrate Modifications in Antisense Research ACS Symposium Series 580. Ácidos nucléicos que contêm um ou mais açúcares carbocíclicos estão da mesma forma incluídos dentro de uma definição de ácidos nucléico (veja Jenkins, e outros (1995) Chem. Soc. Rev. pp 169-176). Vários análogos de ácido nucléico são descritos em Rawls (página
- 30 na 35, 2 de junho de 1997) C&E News.

Particularmente preferido são os ácidos nucléicos de peptídeo (PNA) que incluem análogos de ácido nucléico de peptídeo. Os ácidos nu-

cléicos de peptídeo têm cadeias principais feitas de unidades de N-(2-aminoetil)-glicina de repetição ligadas por ligações de peptídeo. As bases diferentes (purinas e pirimidinas) são ligadas à cadeia principal por ligações de metileno carbonila. Estas cadeias principais são substancialmente não-
5 iônicas sob condições neutras, em contraste com a cadeia principal de fosfodiéster altamente carregada de ácidos nucléico de ocorrência natural. Isto resulta em pelo menos duas vantagens. A cadeia principal de PNA exhibe cinéticos de hibridização melhorados, resultando em ligação mais forte entre os filamentos de PNA/DNA, do que entre filamentos de PNA e filamentos de
10 DNA. PNAs têm alterações maiores na temperatura de fusão (T_m) para pares de base mal combinados versus perfeitamente combinados. DNA e RNA tipicamente exibem uma gota de 2 - 4°C em T_m para uma ligação imperfeita. Com a cadeia principal de PNA não-iônica, a gota é mais densa a 7- 9°C. Similarmente, devido à sua natureza não-iônica, a hibridização das bases
15 ligadas a estas cadeias principais é relativamente insensível à concentração de sal. Além disso, PNAs não são degradados por enzimas celulares e desse modo podem ser mais estáveis.

Os ácidos nucléicos podem ser de filamento único ou filamento duplo, como especificado, ou contêm porções de ambas seqüências de filamento único ou filamento duplo. A representação de um filamento único da
20 mesma forma define a seqüência do filamento complementar; desse modo as seqüências descritas aqui da mesma forma fornecem o complemento da seqüência. O ácido nucléico pode ser DNA, ambos genômicos e cDNA, RNA ou um híbrido, onde o ácido nucléico pode conter combinações de desoxirribo- e ribonucleotídeos e combinações de bases, incluindo uracila, adenina,
25 timina, citosina, guanina, inosina, hipoxantina, xantina, isocitosina, isoguanina, etc. "Transcrição" tipicamente refere-se a um RNA de ocorrência natural, por exemplo, a pré-mRNA, hnRNA or mRNA. Como empregado aqui, o termo "nucleosídeo" inclui nucleotídeos e nucleosídeo e análogos de nucleotídeo e nucleosídeos modificados tais como nucleosídeos modificados por
30 amino. Além disso, "nucleosídeo" inclui estruturas de análogo de ocorrência não-natural. Desse modo, por exemplo, as unidades individuais de um ácido

nucléico de peptídeo, cada contendo uma base, são referidas aqui como nucleosídeo.

Um "rótulo" ou uma "porção detectável" é uma composição detectável por espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, imunoquímicos, fisiológicos, químicos, ou outros meios físicos. Em geral, os rótulos caem em três classes: a) rótulos isotópicos, que podem ser isótopos radioativos ou pesados; b) rótulos imunes, que podem ser rótulos de anticorpos, antígenos ou epítipo; e c) tinturas coloridas ou fluorescentes. Os rótulos podem ser incorporados em ácidos nucleicos de CS1, proteínas, e anticorpos. Por exemplo, o rótulo deveria ser capaz de produzir, diretamente ou indiretamente, um sinal detectável. A porção detectável pode ser um radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S ou ^{125}I , reagentes densos de elétron, um composto fluorescente ou quimiluminescente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina ou luciferina, ou uma enzima (por exemplo, como comumente empregada em um ELISA), biotina, digoxigenina ou haptenos e proteínas ou outras entidades que podem ser tornadas detectáveis tal como fosfatase alcalina, beta-galactosidase ou peroxidase de rábano silvestre. Métodos são conhecidos para conjugar o anticorpo ao rótulo. Veja, por exemplo, Hunter, e outros (1962) *Nature* 144:945; David, e outros (1974) *Biochemistry* 13:1014-1021; Pain e outros (1981) *J. Immunol. Meth.* 40:219-230; e Nygren (1982) *J. Histochem. e Cytochem.* 30:407-412.

Um "efetor" ou "porção efetora" ou "componente efetor" é uma molécula que é ligada (ou unida ou conjugada), covalentemente, através de um ligante ou uma ligação química, ou monocovalentemente, através de ligações iônicas, van der Waals, eletrostáticas ou hidrogênio, a um anticorpo. O "efetor" pode ser uma variedade de moléculas incluindo, por exemplo, porções de detecção incluindo compostos radioativos, compostos fluorescentes, enzimas ou substratos, rótulos tais como rótulos de epítipo, toxinas; porções ativáveis, agentes quimioterapêuticos; lipases; antibióticos; porções quimioatrativas, moduladores imunes (micA/B) ou radioisótopos, por exemplo, imitando radiação beta "brusca".

Um "oligonucleotídeo ou sonda de ácido nucléico rotulada" é

aquele que é ligado, por exemplo, covalentemente, através de um ligante ou uma ligação química, ou não-covalentemente, através de ligações iônicas, van der Waals, eletrostáticas ou hidrogênio em um rótulo tal que a presença da sonda pode ser detectada detectando-se a presença do rótulo ligado à sonda. Alternativamente, métodos empregando interações de alta afinidade podem obter os mesmos resultados onde um de um par de pares de ligação liga-se ao outro, por exemplo, biotina, estreptavidina.

Como empregado aqui um "oligonucleotídeo ou sonda de ácido nucléico" é um ácido nucléico capaz de ligar a um ácido nucléico alvo de seqüência complementar através de um ou mais tipos de ligações químicas, usualmente através de emparelhamento de base complementar, por exemplo, através de formação de ligação de hidrogênio. Como empregado aqui, uma sonda pode incluir bases naturais (por exemplo, A, G, C ou T) ou modificadas (7-deazaguanosina, inosina etc.). Além disso, as bases em uma sonda podem ser unidas por uma ligação exceto uma ligação de fosforodiesté, preferivelmente aquela que não interfere funcionalmente com a hibridização. Desse modo, por exemplo, as sondas podem ser ácidos nucléicos de peptídeo em que as bases constituintes são unidas por ligações de peptídeo em vez de ligações de fosfodiéster. As sondas podem ligar seqüências alvo necessitando de complementaridade completa com a seqüência de sonda dependendo da severidade das condições de hibridização. As sondas são preferivelmente diretamente rotuladas, por exemplo, com isótopos, cromóforos, lumifóros, cromogênios ou indiretamente rotulados, por exemplo, com biotina a qual um complexo de estreptavidina pode ligar-se depois. Ensaiaando-se quanto a presença ou ausência da sonda, alguém pode detectar a presença ou ausência da subseqüência ou seqüência escolhida. O diagnóstico ou prognóstico pode ser com base no nível genômico ou no nível de RNA ou expressão de proteína.

O termo "recombinante" quando empregado com referência, por exemplo, em uma célula ou ácido nucléico, proteína ou vetor, indica que a célula, ácido nucléico, proteína ou vetor foi modificado pela introdução de um ácido nucléico heterólogo ou proteína ou a alteração de uma proteína ou

ácido nucléico nativo ou que a célula é derivada de uma célula desse modo modificada. Desse modo, por exemplo, células recombinantes expressam genes que não são encontrados dentro da forma nativa (não-recombinante) da célula ou expressam genes nativos que são de outra maneira anormalmente expressos, sob-expressos ou não expressam de modo algum. Pelo termo "ácido nucléico recombinante" aqui é significado ácido nucléico, originalmente formado *in vitro*, em geral, pela manipulação de ácido nucléico, por exemplo, empregando polimerases e endonucleases, em uma forma não normalmente encontrada na natureza. Desta maneira, operavelmente ligação de seqüências diferentes é obtida. Desse modo, um ácido nucléico isolado, em uma forma linear, ou um vetor de expressão formado *in vitro* ligando-se moléculas de DNA que normalmente não são unidas, é igualmente considerado recombinante para os propósitos desta invenção. É entendido que logo que um ácido nucléico recombinante é feito e reintroduzido em um organismo ou célula hospedeira, ele replicará não recombinantemente, por exemplo, empregando o mecanismo celular *in vivo* da célula hospedeira em vez de manipulações *in vitro*; entretanto, tais ácidos nucléicos, logo que produzidos recombinantemente, embora subseqüentemente replicados não recombinantemente, são ainda considerados recombinantes para os propósitos da invenção.

Similarmente, uma "proteína recombinante" é uma proteína feita empregando técnicas recombinantes, por exemplo, através da expressão de um ácido nucléico recombinante como descrito acima. Uma proteína recombinante é distinguida de proteína de ocorrência natural por pelo menos uma ou mais características. A proteína pode ser isolada ou purificada ao longo de algumas ou a maioria das proteínas e compostos com os quais está normalmente associada em seu hospedeiro tipo selvagem, e desse modo pode ser substancialmente pura. Uma proteína isolada é desacompanhada por pelo menos algum do material com o qual está normalmente associado em seu estado natural, preferivelmente constituindo pelo menos cerca de 0,5%, mais preferivelmente pelo menos cerca de 5% em peso da proteína total em uma determinada amostra. Uma proteína substancialmente pura compreen-

de pelo menos cerca de 75% em peso da proteína total, com pelo menos cerca de 80% sendo preferido e pelo menos cerca de 90% sendo particularmente preferido. A definição inclui a produção de uma proteína de CS1 de um organismo em um organismo diferente ou célula hospedeira.

- 5 Alternativamente, a proteína pode ser feita a uma concentração significativamente mais alta do que é normalmente visto, embora o uso de um promotor induzível ou promotor de expressão alta, tal que a proteína é feita em níveis de concentração aumentados. Alternativamente, a proteína pode ser em uma forma não normalmente encontrada na natureza, como na
- 10 adição de um rótulo de epítipo ou substituições de aminoácido, inserções e deleções, como discutido abaixo.

- O termo "heterólogo" quando empregado com referência às porções de um ácido nucléico indica que o ácido nucléico compreende duas ou mais subsequências que não são normalmente encontradas na mesma relação entre si na natureza. Por exemplo, o ácido nucléico é tipicamente re-
- 15 combinantemente produzido, tendo duas ou mais seqüências, por exemplo, de genes não relacionados dispostos para preparar um novo ácido nucléico funcional, por exemplo, um promotor de uma fonte e uma região de codificação de outra fonte. Similarmente, uma proteína heteróloga freqüentemente
- 20 referirá a duas ou mais subsequências que não são encontradas na mesma relação entre si na natureza (por exemplo, uma proteína de fusão).

- Um "promotor" é tipicamente uma disposição de seqüências de controle de ácido nucléico que direciona a transcrição de um ácido nucléico. Como empregado aqui, um promotor inclui seqüências de ácido nucléico
- 25 necessárias perto do sítio de iniciação de transcrição, tal como, no caso de um promotor tipo polimerase II, um elemento de TATA. Um promotor da mesma forma opcionalmente inclui os elementos repressores ou realçadores distais, que podem estar localizados em tanto quanto vários mil pares de base do sítio de iniciação da transcrição. Um promotor "constitutivo" é um
- 30 promotor que é ativo sob condições mais ambientais e condições de desenvolvimento. Um promotor "induzível" é ativo sob regulação ambiental ou de desenvolvimento. O termo "operavelmente ligado" refere-se a uma ligação

funcional entre uma seqüência de controle de expressão de ácido nucléico (tal como um promotor, ou disposição de sítios de ligação de fator de transcrição) e uma segunda seqüência de ácido nucléico, por exemplo, onde a seqüência de controle de expressão direciona a transcrição do ácido nucléico correspondendo à segunda seqüência.

Um "vetor de expressão" é um constructo de ácido nucléico, gerado recombinantemente ou sinteticamente, com uma série de elementos de ácido nucléico especificado que permite a transcrição de um ácido nucléico particular em uma célula hospedeira. O vetor de expressão pode ser parte de um plasmídeo, vírus ou fragmento de ácido nucléico. Tipicamente, o vetor de expressão inclui um ácido nucléico a ser transcrito em ligação operável a um promotor.

A frase "seletivamente (ou especificamente) hibridiza para" refere-se à ligação, duplexação, ou hibridização de uma molécula seletivamente para uma seqüência de nucleotídeo particular sob condições de hibridização rigorosas quando aquela seqüência está presente em uma mistura complexa (por exemplo, DNA ou RNA de biblioteca ou celular total).

A frase "condições de hibridização rigorosa" refere-se a condições sob as quais uma sonda hibridizará para sua subseqüência alvo, tipicamente em uma mistura complexa de ácidos nucléicos, porém para nenhuma outra seqüência. Condições rigorosas são dependentes de seqüência e serão diferentes em diferentes circunstâncias. Seqüências mais longas hibridizam especificamente em temperaturas maiores. Uma orientação extensa para a hibridização de ácidos nucléicos é encontrada em "Overview of principles of hibridization and the strategy of nucleic acid assays" in Tijssen (1993) Hybridization with Nucleic Probes (Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology) (vol. 24) Elsevier. Geralmente, condições rigorosas são selecionadas para serem de cerca de 5 as 10°C menores do que o ponto de fusão térmica (T_m) para a seqüência específica em um pH de resistência iônica definida. O T_m é a temperatura térmica (sob resistência iônica definida, pH, e concentração nucléica) na qual 50% das sondas complementares ao alvo hibridizam para a seqüência alvo em equilíbrio (quando as

seqüências alvo estão presentes em excesso, em T_m , 50% das sondas são ocupadas em equilíbrio). As condições rigorosas serão aquelas nas quais a concentração de sal é menor do que cerca de 1,0 M íon de sódio, tipicamente cerca de 0,01 - 1,0 M de concentração de íon de sódio (ou outros sais) em pH 7,0 a 8,3 e a temperatura é pelo menos de cerca de 30°C para sondas curtas (por exemplo, cerca de 10 a 50 nucleotídeos) e pelo menos cerca de 60°C para sondas longas (por exemplo, maior do que cerca de 50 nucleotídeos). Condições rigorosas podem também ser obtidas com a adição de agentes de desestabilização tal como formamida. Para hibridização seletiva ou específica, um sinal positivo é tipicamente pelo menos duas vezes a base, preferivelmente 10 vezes a hibridização de base. Condições de hibridização rigorosas exemplares podem ser como o seguinte: 50% de formamida, 5x SSC, e 1% de SDS, incubando a 42°C, ou, 5x SSC, 1% de SDS, incubando a 65°C, com lavagem em 0,2x SSC, e 0,1% de SDS a 65°C. Para PCR, a temperaturas de cerca de 36°C é típica para amplificação de baixa rigorosidade, embora as temperaturas de recozimento possam variar entre cerca de 32° a 48°C dependendo do comprimento do iniciador. Para amplificação por PCR de rigorosidade elevada, uma temperatura de cerca de 62°C é típica, embora as temperaturas de recozimento de rigorosidade elevada possam variar de cerca de 50 a 65°C, dependendo da especificidade e comprimento do iniciador. As condições típicas de ciclo tanto para amplificações de rigorosidade elevada quanto baixa incluem uma fase de desnaturação de 90 a 95°C durante 30 a 120 segundos, uma fase de recozimento durante 30 a 120 segundos, e uma fase de extensão de cerca de 72°C durante 1 a 2 minutos. Protocolos e normas para reações de amplificação de rigorosidade baixa e elevada são fornecidos, por exemplo, em Innis, e outro (1990) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications Academic Press, NY.

Os ácidos nucléicos que não hibridizam de um para o outro sob condições rigorosas são também substancialmente idênticos se os polipeptídeos que eles codificam forem substancialmente idênticos. Isto ocorre, por exemplo, quando uma cópia de um ácido nucléico é criada empregando-se

a degeneração de códon máxima permitida pelo código genético. Em tais casos, os ácidos nucleicos tipicamente hibridizam sob condições de hibridização moderadamente rigorosas. As "condições de hibridização moderadamente rigorosas" exemplares" incluem uma hibridização em um tampão de 5 40% de formamida, 1 M de NaCl, 1% de SDS a 37°C, e uma lavagem em 1X SSC a 45°C. Uma hibridização positiva é tipicamente pelo menos duas vezes a base. As condições de lavagem e hibridização alternativa podem ser utilizadas para fornecer as condições de rigorosidade similares. As normas adicionais para determinar os parâmetros de hibridização são fornecidas em 10 numerosas referências, por exemplo, Ausubel, e outro (eds. 1991 e suplementos) Current Protocols in Molecular Biology Wiley.

A frase "alterações em morfologia celular" ou "alterações em características celulares" refere-se a qualquer alteração em morfologia celular ou características de proliferação *in vitro* ou *in vivo*, tal como viabilidade 15 celular, crescimento celular, secreção de crescimento ou fatores de quimioquina, alterações em morfologia celular, ganho ou perda de marcadores específicos de inflamação, capacidade de induzir ou suprimir a inflamação quando injetados em hospedeiros animais adequados, e/ou indução de um estado de doença em hospedeiros adequados, por exemplo, distúrbios auto- 20 imunes e condições cancerosas. Veja, por exemplo, pp. 231-241 em Freshney (1994) Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique (Segunda Edição) Wiley-Liss.

"Células doentes" refere-se a alterações fenotípicas induzidas ou espontâneas que não envolvem necessariamente a absorção de novo 25 material genético. Por exemplo, embora a formação de mieloma possa originar-se de infecção com um vírus transformante e incorporação de novo DNA genômico, ou absorção de DNA exógeno, pode também originar-se espontaneamente ou a seguir de exposição a um agente, desse modo induzindo a expressão ou alteração de um gene existente. O crescimento de tumor está 30 associado com alterações de expressão de proteína e fenotípica, tais como alterações morfológicas, crescimento de célula aberrante, e/ou alterações não-morfológicas. Veja, Freshney (2000) Culture of Animal Cells: A Manual

of Basic Technique (4ª edição) Wiley-Liss. Similarmente, as células afetadas por processos de doença auto-imune são também associadas com alterações de expressão de proteína e fenotípicas.

5 Por uma quantidade "eficaz" de uma molécula, ou um anticorpo, ou uma droga ou agente farmacologicamente ativo ou formulação farmacêutica significa uma quantidade suficiente da molécula, anticorpo, droga, agente ou formulação para fornecer o efeito desejado.

10 Um "indivíduo" ou "paciente" é empregado alternadamente aqui, que refere-se a um vertebrado, preferivelmente um mamífero, mais preferivelmente um ser humano.

Como aqui empregado, o termo "anticorpo" ou "imunoglobulina" refere-se a uma proteína consistindo em um ou mais polipeptídeos substancialmente codificados por genes de imunoglobulina incluem os genes de região constante kapa, lambda, alfa, gama (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄), delta, 15 epsilon e mu, bem como os genes de região V variável de imunoglobulina miríade (como indicado abaixo, existem genes V para ambas as cadeias H - pesada e L - leve). As "cadeias leves" de imunoglobulina de comprimento natural (cerca de 25 Kd ou 214 aminoácidos) são codificadas por um gene de região variável, V-kapa ou V-lambda, na terminação NH₂ (cerca de 110 20 aminoácidos) e, respectivamente, um gene de região constante lambda ou kapa na terminal-COOH. As "cadeias pesadas" de imunoglobulina de tamanho natural (cerca de 50 Kd ou 446 aminoácidos), são similarmente codificadas por um gene de região variável (cerca de 116 aminoácidos) e um dos outros genes de região constante anteriormente mencionados, por exemplo, 25 gama (codificando cerca de 330 aminoácidos).

Uma forma de imunoglobulina constitui a unidade estrutural básica de um anticorpo. Esta forma é um tetrâmero e consiste em dois pares idênticos de cadeias de imunoglobulina, cada par tendo uma cadeia leve e uma pesada. Em cada par, as regiões variáveis de cadeia leve e pesada 30 são conjuntamente responsáveis pela ligação a um antígeno, e as regiões constantes são responsáveis pelas funções efetoras do anticorpo. Em adição aos anticorpos tetraméricos, as imunoglobulinas podem existir em uma

variedade de outras formas incluindo, por exemplo, Fv, Fab, e (Fab')₂, bem como anticorpos híbridos bifuncionais (por exemplo, Lanzavecchias e outros, Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)) e em cadeias simples (por exemplo, Huston e outro, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 5879-5883 (1988) e Bird e outro, Science, 242, 423-426 (1988), que são incorporados aqui por referência). (Veja, geralmente, Hood e outro, "Immunology", Benjamin, Nova Iorque, Segunda Edição (1984), e Hunkapiller e Hood, Nature, 323, 15-16 (1986), que são aqui incorporados por referência).

Anticorpos também existem, por exemplo, como um número de fragmentos bem caracterizados produzidos por digestão com várias peptidases. Desse modo, por exemplo, a pepsina digere um anticorpo abaixo das ligações de dissulfeto na região de articulação para produzir F(ab')₂, um dímero de Fab que em si é uma cadeia leve ligada a V_H-C_H¹ por uma ligação de dissulfeto. A F(ab')₂ pode ser reduzida sob condições amenas para romper a ligação de dissulfeto na região de articulação, desse modo convertendo o dímero F(ab')₂ em um monômero Fab'. O monômero Fab' é essencialmente Fab com parte da região de articulação (observe Paul (ed. 1999) Fundamental Immunology (4ª Edição) Raven. Enquanto vários fragmentos de anticorpo são definidos em termos da digestão de um anticorpo intacto, alguém versado apreciará que tais fragmentos podem ser sintetizados de novo ou quimicamente ou empregando-se metodologia de DNA recombinante. Desse modo, o termo anticorpo, como aqui empregado, também inclui fragmentos de anticorpo ou produzidos pela modificação de anticorpos inteiros, ou aqueles sintetizados de novo empregando-se metodologias de DNA recombinante (por exemplo, Fv de cadeia simples) ou aqueles identificados empregando-se bibliotecas de exibição de fago (observe, por exemplo, McCafferty, e outro (1990) Nature 348: 552-554).

Um "anticorpo quimérico" é uma molécula de anticorpo na qual (a) a região constante, ou uma porção dela, é alterada, substituída, ou permutada de modo que o sítio de ligação de antígeno (região variável) seja ligado a uma região constante de uma classe diferente ou alterada, e/ou espécies, ou uma molécula totalmente diferente que confira novas proprieda-

des ao anticorpo quimérico, por exemplo, uma enzima, toxina, hormônio, fator de crescimento, droga, função efetora, quimioatrativo, imunomodulador, etc.; ou (b) a região variável, ou uma porção desta, é alterada, substituída, ou permutada com uma região variável tendo uma especificidade de antígeno diferente ou alterada.

O termo "anticorpo humanizado" ou "imunoglobulina humanizada" refere-se a uma imunoglobulina compreendendo uma estrutura humana, pelo menos uma e preferivelmente todas as regiões de determinação de complementaridade (CDRs) de um anticorpo não-humano, e na qual qualquer região constante presente é substancialmente idêntica a uma região constante de imunoglobulina humana, isto é, pelo menos cerca de 85 a 90%, preferivelmente pelo menos 95% idêntica. Portanto, todas as partes de uma imunoglobulina humanizada, exceto possivelmente as CDRs, são substancialmente idênticas a partes correspondentes de uma ou mais seqüências de imunoglobulina humana nativa. Observe, por exemplo, Queen e outro, Patentes U.S. nºs 5.301.101, 5.585.089, 5.693.762, e 6.180.370 (Estas e outras Patentes/pedidos de patente U.S. são incorporados por referência em sua totalidade).

Para a preparação de anticorpos, por exemplo, anticorpos recombinantes, monoclonais ou policlonais, muitas técnicas conhecidas. Observe, por exemplo, Kohler e Milstein (1975) *Nature* 256: 495 - 497; Kozbor, e outros (1983) *Immunology Today* 4: 72; Cole, e outro (1985) pp. 77-96 em Reisfeld and Sell (1985) *Monoclonal Antibodies and Myeloma Therapy* Liss; Coligan (1991) *Current Protocols in Immunology* Lippincott; Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* CSH Press; e Goding (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2ª edição) Academic Press. Técnicas para a produção de anticorpos de cadeia simples (Patente U.S. nº 4.946.778) podem ser adaptadas para produzir anticorpos para polipeptídeos desta invenção. Além disso, os camundongos transgênicos, ou outros mamíferos, podem ser empregados para expressar anticorpos humanizados. Alternativamente, a tecnologia de exibição de fago pode ser empregada para identificar anticorpos e fragmentos Fab heteroméricos que especifica-

mente ligam-se a antígenos selecionados. Observe, por exemplo, McCafferty, e outros. (1990) *Nature* 348: 552-554; Marks, e outros (1992) *Biotechnology* 10: 779-783.

- O termo "epítipo" refere-se a qualquer porção (determinante) de uma proteína que é capaz de eliciar uma resposta imune e ser especificamente ligada por um anticorpo. Os determinantes de epítipo usualmente consiste em agrupamentos tensoativos de moléculas tais como cadeias laterais de GAG ou aminoácidos e usualmente têm características estruturais tridimensionais específicas, bem como características de carga específica.
- Dois anticorpos são ditos ligarem-se substancialmente ao mesmo epítipo de uma proteína (ou o epítipo de sobreposição de uma proteína) se as mutações de aminoácido nas proteína que reduzem ou eliminam a ligação de um anticorpo também reduzem ou eliminam a ligação do outro anticorpo, e/ou se os anticorpos competem para a ligação à proteína, isto é, ligação de um anticorpo à proteína reduz ou elimina a ligação do outro anticorpo. A determinação de se dois anticorpos ligam-se substancialmente ao mesmo epítipo é acompanhada pelos métodos conhecidos nas técnica, tal como um ensaio de competição. Na condução de um estudo de competição de anticorpo entre um anticorpo de controle (por exemplo, um dos anticorpos anti-CS1 descritos aqui) e qualquer anticorpo de teste, alguém pode primeiro rotular o anticorpo de controle com um rótulo detectável, tal como, biotina, enzimático, rótulo radioativo, ou rótulo fluorescente para possibilitar a subsequente identificação. Um anticorpo de teste (não-rotulado) que liga-se substancialmente ao mesmo epítipo como o anticorpo de controle (rotulado) deve ser capaz de bloquear a ligação de anticorpo de controle e desse modo deve reduzir a ligação de anticorpo de controle.

- Em uma modalidade exemplar, se um anticorpo liga-se substancialmente ao mesmo epítipo de um anticorpo monoclonal Luc (anticorpos monoclonais Luc referem-se aos anticorpos monoclonais anti-CS1 produzidos da presente invenção), o anticorpo deve se ligar a um epítipo de Cs1 que se sobrepõe com o epítipo CS1 com o qual o anticorpo Luc se liga. A região de sobreposição pode variar de um resíduo de aminoácido a diversas

centenas de resíduos de aminoácido. Este anticorpo deve então competir com e/ou bloquear a ligação do anticorpo monoclonal Luc a CS1 e desse modo diminuir a ligação do anticorpo monoclonal Luc a CS1, preferivelmente em pelo menos cerca de 50% em um ensaio de competição.

- 5 O termo "derivado de" significa "obtido de" ou "produzido por" ou "descendente de".

Anticorpos e Antígenos de CS1

- 10 SEQ ID NO: 2 representa as seqüências de aminoácido do DS1 humano tipo selvagem de tamanho natural. Um fragmento ou derivado de CS1 "funcionalmente ativo" exibe uma ou mais atividades funcionais associadas com uma proteína CS1 tipo selvagem, de tamanho natural, tal como atividade antigênica ou imunogênica, capacidade de ligar substratos celulares naturais, etc. A atividade funcional de proteínas CS1, derivados e fragmentos pode ser ensaiada por vários métodos conhecidos por alguém versado na técnica (Current Protocols in Protein Science, Coligan e outro, eds., John Wiley & Sons, Inc., Somerset, Nova Jersey (1998)). Para os propósitos inclusos, fragmentos funcionalmente ativos também incluem aqueles fragmentos que compreendem um ou mais domínios estruturais de um polipeptídeo de CS1, tal como um domínio de ligação. Os domínios de proteína podem ser identificados empregando-se o programa PFAM (Bateman A., e outros, Nucleic Acids Res. 27: 260-2 (1999)).

- 25 Os derivados de polipeptídeo de CS1 tipicamente compartilham um certo grau de identidade de seqüência ou similaridade de seqüência com as SEQ ID NO: 2 ou um fragmento desta. Os derivados de CS1 podem ser produzidos por vários métodos conhecidos na técnica. As manipulações que resultam em sua produção podem ocorrer no nível de gene ou proteína. Por exemplo, uma seqüência de gene CS1 clonado (por exemplo, SEQ ID NO: 1) pode ser clivada em sítios apropriados com endonuclease(s) de restrição (Wells e outro, Philos. Trans. R. Soc. London SerA 317:415 (1986)), seguido por outra modificação enzimática, se desejado, então isolado, e ligado *in vitro*, e expresso para produzir o derivado desejado. Alternativamente, um gene CS1 pode ser mutado *in vitro* ou *in vivo* para criar e/ou destruir as se-

quências de tradução, iniciação e/ou terminação, ou para criar variações em regiões de codificação e/ou para formar novos sítios de endonuclease de restrição ou destruir aqueles preexistentes, para facilitar outra modificação *in vitro*. Uma variedade de técnicas de mutagênese é conhecida na técnica tal
5 como mutagênese química, mutagênese direcionada ao sítio *in vitro* (Carter e outro, Nucl. Acids Res. 13: 4331 (1986)), ou uso de ligantes TAB (disponibilizados pela Pfizer, Inc.).

Em um aspecto, os anticorpos da presente invenção neutralizam pelo menos uma, ou preferivelmente todas, as atividades biológicas de CS1.
10 As atividades biológicas de CS1 incluem: 1) atividades de ligação de seus substratos celulares, tais como seus ligandos (por exemplo, estes anticorpos neutralizantes devem ser capazes de competir com ou completamente bloquear a ligação de CS1 em pelo menos um, e preferivelmente todos os seus ligandos); 2) atividades de transdução de sinalização; e 3) respostas celulares
15 induzidas por CS1.

A presente invenção provê as linhagens celulares de hibridoma: Luc2, Luc3, Luc15, Luc22, Luc23, Luc29, Luc32, Luc34, Luc35, Luc37, Luc38, Luc39, Luc56, Luc60, Luc63 ou Luc90. A linhagem de célula de hibridoma Luc90 foi depositada com a American Type Culture Collection
20 (ATCC) em P. O Box 1549, Manassas, VA 20108, como número de acesso PTA 5091. O depósito desta linhagem de célula de hibridoma foi recebido pela ATCC em 26 de março de 2003. A linhagem de célula de hibridoma Luc63 foi também depositada com a ATCC no endereço listado acima. O depósito do anticorpo Luc63 foi recebido pela ATCC em 6 de maio de 2004.

25 A presente invenção provê anticorpos monoclonais produzidos pelas linhagens de célula de hibridoma: Luc2, Luc3, Luc15, Luc22, Luc23, Luc29, Luc32, Luc34, Luc35, Luc37, Luc38, Luc39, Luc56, Luc60, Luc63 ou Luc90 (Número de Acesso ATCC PTA 5091). Estes anticorpos monoclonais são denominados como os anticorpos: Luc2, Luc3, Luc15, Luc22, Luc23,
30 Luc29, Luc32, Luc34, Luc35, Luc37, Luc38, Luc39, Luc56, Luc60, Luc63 ou Luc90, respectivamente, a seguir.

A presente invenção prove anticorpos, preferivelmente anticor-

pos monoclonais, que se ligam substancialmente ao mesmo epítopo como qualquer um dos anticorpos monoclonais Luc descritos aqui.

A presente invenção provê anticorpos, preferivelmente anticorpos monoclonais, que não se ligam substancialmente ao mesmo epítopo
5 como um ou mais dos anticorpos monoclonais Luc acima descritos.

Uma variedade de ensaios de análise imunológica para avaliação da competição de anticorpo pode ser empregada para identificar os anticorpos que se ligam substancialmente ao mesmo epítopo de um anticorpo da presente invenção ou ligam-se a um epítopo diferente daquele de um
10 anticorpo da presente invenção.

Na condução de um estudo de competição de anticorpo entre um anticorpo de controle e qualquer anticorpo de teste (irrespective de espécies ou isótipo), alguém pode primeiro rotular o controle com um rótulo detectável, tal como, biotina ou um rótulo enzimático (ou mesmo radioativo)
15 para possibilitar subsequente identificação. Neste caso, alguém pré-misturará ou incubará o anticorpo não-rotulado com células expressando a proteína CS1. O anticorpo rotulado é então adicionado às células pré-incubadas. A intensidade do rótulo de ligação é medida. Se o anticorpo rotulado compete com o anticorpo não-rotulado por ligação a um epítopo de sobreposição, a intensidade será diminuída com relação à ligação pelo anti-
20 corpo não-rotulado de controle negativo (um anticorpo conhecido que não se liga à CS1).

O ensaio pode ser qualquer um de um faixa de ensaios imunológicos com base na competição de anticorpo, e os anticorpos de controle
25 seriam detectados por meio de detecção de seu rótulo, por exemplo, empregando-se estreptavidina no caso de anticorpos biotinilados ou empregando-se um substrato cromogênico em conexão com um rótulo enzimático (tal como substrato de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) com enzima de peroxidase) ou simplesmente detectando um rótulo radioativo ou um rótulo
30 de fluorescência. Um anticorpo que se liga ao mesmo epítopo como os anticorpos de controle será capaz de eficazmente competir para ligação e desse modo significativamente reduzirá (por exemplo, em pelo menos 50%) a liga-

ção de anticorpo de controle, como evidenciado por uma redução no rótulo de ligação.

A reatividade dos anticorpos de controle (rotulados) na ausência de um anticorpo completamente irrelevante seria o valor elevado de controle. O valor baixo de controle será obtido incubando-se os anticorpos de teste não-rotulados com células expressando CS1 e em seguida incubando-se a mistura de célula/anticorpo com anticorpos de controle rotulados exatamente do mesmo tipo, quando a competição ocorrerá e reduzirá a ligação dos anticorpos rotulados. Em um ensaio de teste, uma redução significativa em reatividade de anticorpo rotulado na presença de um anticorpo de teste é indicativo de um anticorpo de teste que reconhece substancialmente o mesmo epítopo.

Anticorpos contra CS1 de todas as espécies de origens são incluídos na presente invenção. Anticorpos naturais exemplares não limitantes incluem anticorpos derivados de ser humano, frango, cabras e roedores (por exemplo, ratos, camundongos, hamsters e coelhos), incluindo roedores transgênicos geneticamente construídos para produzir anticorpos humanos (veja, por exemplo, Lonberg e outros, WO 93/12227; Patente U.S. nº 5.545.806; e Kucherlapati, e outros, WO 91/10741, Patente U.S. nº 6.150.584, que são aqui incorporadas por referência em sua totalidade). Os anticorpos naturais são os anticorpos produzidos por um animal hospedeiro após ser imunizado com um antígeno, tal como um polipeptídeo, preferivelmente um polipeptídeo humano. Em uma modalidade preferida, o anticorpo da presente invenção é um anticorpo natural isolado que se liga a e/ou neutraliza CS1.

Os anticorpos anti-CS1 geneticamente alterados devem ser funcionalmente equivalentes aos anticorpos naturais acima mencionados. Os anticorpos modificados fornecendo estabilidade melhorada e/ou eficácia terapêutica são preferidos. Exemplos de anticorpos modificados incluem aqueles com substituições conservativas de resíduos de aminoácido, e uma ou mais deleções ou adições de aminoácidos que não significantemente deletariam a utilidade de ligação de antígeno. As substituições podem

variar de carga ou modificação de um ou mais resíduos de aminoácido para replanejamento completo de uma região contanto que a utilidade terapêutica seja mantida. Os anticorpos desta invenção podem ser modificados post-traducionalmente (por exemplo, acetilação, e/ou fosforilação) ou podem ser modificados sinteticamente (por exemplo, a ligação de um grupo rotulagem). Os anticorpos geneticamente alterados preferidos são anticorpos quiméricos e anticorpos humanizados.

O anticorpo quimérico é um anticorpo tendo uma região variável e uma região constante derivadas de dois anticorpos diferentes, preferivelmente derivados de espécies separadas. Preferivelmente, a região variável do anticorpo quimérico é derivada de murino e a região constante é derivada de ser humano.

Em uma modalidade, as regiões variáveis de murino são derivadas de qualquer um dos anticorpos monoclonais aqui descritos. A fim de produzir os anticorpos quiméricos, as porções derivadas de duas espécies diferentes (por exemplo, região constante humana e variável de murino ou região de ligação) podem ser unidas uma à outra quimicamente por técnicas convencionais ou podem ser preparadas como proteínas contíguas simples empregando-se técnicas de engenharia genética. As moléculas de DNA codificando as proteínas de ambas as porções de cadeia leve e cadeia pesada do anticorpo quimérico podem ser expressas como proteínas contíguas. O método de preparar anticorpos quiméricos é descrito na Patente U.S. nº 5.677.427, Patente U.S. nº 6.120.767; e Patente U.S. nº 6.329.508, cada das quais é incorporada por referência em sua totalidade.

Os anticorpos geneticamente alterados empregados na presente invenção incluem anticorpos humanizados que se ligam a e neutralizam CS1. Em uma modalidade, o referido anticorpo humanizado compreendendo CDRs de uma imunoglobulina doadora de camundongo e estruturas de cadeia pesada e cadeia leve e regiões constantes de uma imunoglobulina receptora humana. Em um exemplo, os anticorpos humanizados são as versões humanizadas de qualquer um dos anticorpos aqui descritos. O método de preparar anticorpo humanizado é descrito nas Patentes U.S. nºs

5.530.101, 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762, e 6.180.370, cada das quais é aqui incorporada por referência em sua totalidade.

Os anticorpos totalmente humanos anti-CS1 são também incluídos na presente invenção. Em uma modalidade preferida da presente invenção, os referidos anticorpos totalmente humanos são anticorpos humanos isolados que neutralizam as atividades de CS1 aqui descritas.

Os anticorpos totalmente humanos contra CS1 são produzidos por uma variedade de técnicas. Um exemplo é a metodologia de trioma. O método básico e um parceiro de fusão de célula exemplar, SPAZ-4, para uso neste método foi descrito por Oestberg e outros, Hybridoma 2:361-367 (1983); Oestberb, Patente U.S. nº 4.634.664; e Engleman e outros, Patente U.S. nº 4.634.666 (cada das quais é incorporada por referência em sua totalidade).

Os anticorpos humanos contra CS1 podem também ser produzidos de animais transgênicos não-humanos tendo transgenes codificando pelo menos um segmento do local de imunoglobulina humana. A produção e propriedades de animais tendo estas propriedades são descritas em detalhes por, observe, por exemplo, Longerg e outros, WO 93/12227; Patente US nº 5.545.806, e Kucherlaspati, e outros, WO 91/10741, Patente US nº 6.150.584, que são aqui incorporadas por referência em sua totalidade.

Várias tecnologias de biblioteca de anticorpo recombinante podem também ser utilizadas para produzir anticorpos totalmente humanos. Por exemplo, um método é avaliar uma bibliotecas de DNA de células B humanas de acordo com o protocolo geral delineado por Huse e outros, Science 246: 1275-1281 (1989). Anticorpos ligando CS1 ou um fragmento deste são selecionados. As seqüências codificando tais anticorpos (ou ligando fragmentos) são então clonadas e amplificadas. O protocolo descrito por Huse é tornado mais eficiente em combinação com tecnologia de exibição de fago. Observe, por exemplo, Dower e outros, WO 91/17271 e McCafferty e outros, WO 92/01047, Patente US nº 5.969.108, (cada das quais é incorporada por referência em sua totalidade). Nestes métodos, bibliotecas de fago são produzidas, nas quais membros exibem diferentes anticorpos sobre

suas superfícies externas. Anticorpos são usualmente exibidos como fragmentos Fv ou Fab. Os fagos exibindo anticorpos com uma especificidade desejada são selecionados por enriquecimento por afinidade a CS1 ou fragmento deste.

- 5 Ribossomas eucarióticos podem também ser empregados como métodos para exibir uma biblioteca de anticorpos e isolar os anticorpos humanos de ligação por avaliação contra o antígeno alvo, tal como CS1, como descrito em Coia G, e outros, J. Immunol. Methods 1: 254 (1-2): 191-7 (2001); Hanes J. e outros, Nat. Biotechnol. 18 (12): 1287-92 (2000); Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95 (24): 14130-5 (1998); Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94 (10): 4937-42 (1997), cada dos quais é incorporado por referência em sua totalidade.

- 15 O sistema de levedura é também adequado para avaliar a superfície celular mamífera ou proteínas secretadas, tais como anticorpos. As bibliotecas de anticorpo podem ser exibidas sobre a superfície de células de levedura para o propósito de obter os anticorpos humanos contra um antígeno alvo. Este método é descrito por Yeung, e outros, Biotechnol. Prog. 18(2): 212-20 (2002); Boeder, E. T., e outros, Nat. Biotechnol. 15(6): 553-7 (1997), cada dos quais é aqui incorporado por referência em sua totalidade.
- 20 Alternativamente, as bibliotecas de anticorpo humano podem ser expressas intracelularmente e analisadas por meio de sistema de dois híbridos de levedura (WO 0200729A2, que é incorporado por referência em sua totalidade).

- 25 Os fragmentos dos anticorpos anti-CS1, que retêm a especificidade de ligação a Cs1, são também incluídos na presente invenção. Exemplos destes fragmentos de ligação de antígeno incluem, porém não estão limitados a, cadeias leves ou cadeias pesadas parcial ou totais, regiões variáveis, ou regiões de CDR de quaisquer anticorpos anti-CS1 descritos aqui.

- 30 Em uma modalidade preferida da invenção, os fragmentos de anticorpo são cadeias truncadas (truncadas na extremidade carboxila). Preferivelmente, estas cadeias truncadas possuem uma ou mais atividades de imunoglobulina (por exemplo, atividade de fixação de complemento). Exem-

plos de cadeias truncadas incluem, porém não estão limitadas a, fragmentos Fab (consistindo em domínios VL, VH, CL e CH1); fragmentos Fd (consistindo nos domínios VH e CH1); fragmentos de Fv (consistindo em domínios VL e VH de uma cadeia simples de um anticorpo); fragmentos de dab (consistindo em um domínio VH; regiões de CDR isoladas, fragmentos de (Fab')₂, fragmentos bivalentes (compreendendo dois fragmentos de Fab ligado por uma ponte de dissulfeto na região de articulação). As cadeias truncadas podem ser produzidas por técnicas de bioquímica convencionais, tais como clivagem de enzima, ou técnicas de DNA recombinante, cada dos quais é conhecida na técnica. Estes fragmentos de polipeptídeo podem ser empregados por clivagem proteolítica de anticorpos intactos por métodos bem conhecidos na técnica, ou inserindo-se códons de interrupção nas localizações desejadas nos vetores empregando-se mutagênese direcionada ao sítio, tal como após CH1 para produzir os fragmentos de Fab ou após a região de articulação para produzir fragmentos de (Fab')₂. Os anticorpos de cadeia leve podem ser produzidos unindo-se as regiões de codificação V_L e V_H com um DNA que codifica um ligante de peptídeo conectando os fragmentos de proteína VL e VH.

Uma vez que os genes relacionados a imunoglobulina contêm regiões funcionais separadas, cada tendo uma ou mais atividades biológicas distintas, os genes dos fragmentos de anticorpo podem ser fundidos em regiões funcionais de outros genes (por exemplo, enzimas, Patente US Nº 5.004.692, que é incorporada por referência em sua totalidade) para produzir proteínas de fusão (por exemplo, imunotoxinas) ou conjugados tendo novas propriedades.

A presente invenção compreende o uso de anticorpos anti-CS1 em imunotoxinas. Os conjugados que são imunotoxinas incluindo anticorpos foram descritos amplamente na técnica. As toxinas podem ser acopladas aos anticorpos por técnicas de acoplamento convencionais ou imunotoxinas contendo porções de toxina de proteína podem ser produzidas como proteínas de fusão. Os conjugados da presente invenção podem ser empregados de uma maneira correspondente para obter tais imunotoxinas. Ilustrativas de

tais imunotoxinas são aquelas descritas por Byers, B. S. e outros, *Seminars Cell Biol* 2:59-70 (1991) e por Fanger, M. W. e outros, *Immunol Today* 12:51-54 (1991).

5 Técnicas de DNA recombinante podem ser empregadas para produzir os anticorpos anti-CS1 recombinantes, bem como anticorpos anti-CS1 humanizados ou quiméricos ou quaisquer outros anticorpos geneticamente alterados anti-CS1 e os fragmentos ou conjugados destes em quaisquer sistemas de expressão incluindo ambos sistemas de expressão eucariótico e procariótico, tais como bactérias, levedura, células de inseto, células
10 de planta e células mamíferas (por exemplo, células de NSO).

Logo que produzidos, os anticorpos inteiros, seus dímeros, cadeias pesadas e leves individuais, ou outras formas de imunoglobulina da presente invenção podem ser purificados de acordo com procedimentos padrão da técnica, incluindo precipitação de sulfato de amônio, colunas de afinidade, cromatografia de coluna, eletroforese em gel e similares (veja, geralmente, Scopes, R., *Protein Purification* (Springer-Verlag, N.Y., 1982)).
15 Imunoglobulinas substancialmente puras de pelo menos cerca de 90 a 95% de homogeneidade são preferidas e 98 a 99% ou mais de homogeneidade mais preferidas, para usos farmacêuticos. Logo que purificados, parcialmente ou em homogeneidade como desejado, os polipeptídeos podem então ser empregados terapeuticamente (incluindo extracorporeamente) ou desenvolvendo-se e realizando-se procedimentos de ensaio, manchamentos imuno-
20 fluorescentes, e similares. (Veja, geralmente, *Immunological Methods*, Vols. I e II (Lefkovits e Pernis, eds., Academic Press, NY, 1979 e 1981). Os anticorpos anti-CS1 isolados ou purificados podem da mesma forma ser avaliados quanto à sua capacidade de neutralizar as atividades biológicas de CS1 como descrito nos Exemplos.

Uso de ácidos nucleicos de CS1

Como descrito anteriormente, as seqüências de CS1 são identificadas inicialmente por ligação ou homologia de seqüência de aminoácido
30 e/ou ácido nucleico substancial às seqüências de CS1 da Tabela 2. Tal homologia pode ser baseada na seqüência de aminoácido ou ácido nucleico

total, e é geralmente determinada empregando condições de hibridização ou programas de homologia. Tipicamente, as seqüências ligadas em um mRNA são encontradas na mesma molécula.

Percentual de identidade de uma seqüência pode ser determinado empregando um algoritmo tal como BLAST. Um método preferido utiliza o módulo BLASTN do grupo WU-BLAST-2 aos parâmetros básicos, com grupo ponte de sobreposição e fração de sobreposição em 1 e 0,125, respectivamente. O alinhamento pode incluir a introdução de aberturas nas seqüências a ser alinhadas. Além disso, para seqüências que contêm mais ou menos nucleotídeos do que aqueles dos ácidos nucléicos descritos, a porcentagem de homologia pode ser determinada com base no número de nucleosídeos homólogos em relação ao número total de nucleosídeos. Desse modo, por exemplo, homologia de seqüências mais curtas do que aquela das seqüências identificadas será determinada empregando o número de nucleosídeos na seqüência mais curta.

Em uma modalidade, homologia de ácido nucléico é determinada através de estudos de hibridização. Desse modo, por exemplo, ácidos nucléicos que hibridizam sob alta rigorosidade em um ácido nucléico descrito ou seu complemento ou é da mesma forma encontrado em mRNAs de ocorrência natural é considerado uma seqüência homóloga. Em outra modalidade, condições de hibridização menos rigorosas são empregadas; por exemplo, condições de rigorosidade baixa ou moderada podem ser empregadas; veja Ausubel, supra e Tijssen, supra.

As seqüências de ácido nucléico de CS1 da invenção, por exemplo, as seqüências na Tabela 2, podem ser fragmentos de genes maiores, por exemplo, elas são segmentos de ácido nucléico. "Genes" neste contexto incluem regiões de codificação, regiões de não-codificação e misturas de regiões de codificação e não-codificação. Adequadamente, usando as seqüências fornecidas aqui, seqüências prolongadas, em qualquer direção, dos genes de CS1 podem ser obtidas, empregando técnicas bem-conhecidas para clonar seqüências mais longas ou as seqüências de tamanho natural; veja Ausubel, eoutros, supra. Muito pode ser feito por informáti-

ca e muitas seqüências podem ser agrupadas para incluir seqüências múltiplas que correspondem a um único gene, por exemplo, sistemas tal como UniGene.

O ácido nucléico de CS1 da presente invenção é empregado de várias maneiras. Em uma modalidade, sondas de ácido nucléico em CS1 são feitas e ligadas em biochips a ser empregados em métodos de avaliação e diagnósticos, como esboçado abaixo, ou para administração, por exemplo, para terapia de gene, vacina, RNAi, e/ou aplicações de anti-sentido. Alternativamente, ácidos nucléicos de CS1 que incluem regiões de codificação de proteína de CS1 podem ser colocados em vetores de expressão para a expressão de proteína de CS1, novamente para avaliar os propósitos ou para administração em um paciente.

Em outra modalidade, sondas de ácido nucléico em ácido nucléico de CS1 (ambas as seqüências de ácido nucléico esboçadas nas figuras e/ou complementos destes) são feitas. As sondas de ácido nucléico ligadas ao biochip são designadas ser substancialmente complementares ao ácido nucléico de CS1, por exemplo, a seqüência alvo (a seqüência alvo da amostra ou em outras seqüências de sonda, por exemplo, em ensaios sanduíche), tal que a hibridização da seqüência alvo e as sondas da presente invenção ocorrem. Como esboçado abaixo, esta complementaridade não necessita ser perfeita; pode haver qualquer número de ligações imperfeitas de par de base que interferirá com hibridização entre a seqüência alvo e os ácidos nucléicos de filamento único da presente invenção. Entretanto, se o número de mutações é tão grande que nenhuma hibridação pode ocorrer sob até mesmo a rigorosidade menor de condições de hibridização, a seqüência não é uma seqüência alvo complementar. Desse modo, por "substancialmente complementar" aqui é entendido que as sondas são suficientemente complementares às seqüências alvo para hibridizar sob condições de reação normais, particularmente condições de alta rigorosidade, como esboçado aqui.

Uma sonda de ácido nucléico é geralmente de filamento único porém pode ser de filamento parcialmente única e parcialmente duplo. A

filamentação da sonda é imposto pela estrutura, composição e propriedades da sequência alvo. Em geral, as sondas de ácido nucléico variam de cerca de 8-100 bases longas, com cerca de 10-80 bases sendo preferidas, e de cerca de 30-50 bases sendo particularmente preferidas. Isto é, geralmente

5 genes inteiros não são empregados. Em algumas modalidades, ácidos nucléicos muito mais longos podem ser empregados, até centenas de bases.

Em outra modalidade, mais do que uma sonda por sequência é empregada, com sondas de sobreposição ou sondas em seções diferentes do alvo a ser empregado. Isto é, dois, três, quatro ou mais sondas, com três

10 sendo preferidas, são empregadas para construir em uma redundância para um alvo particular. As sondas podem ser sobrepostas (por exemplo, ter alguma sequência em comum), ou separadas. Em alguns casos, iniciadores de PCR podem ser empregados para amplificar sinal para sensibilidade mais alta.

15 Ácidos nucléicos podem ser ligados ou imobilizados em um suporte sólido em uma ampla variedade de maneiras. Por equivalentes gramáticos e "imobilizados" aqui é entendido a associação ou ligação entre a sonda de ácido nucléico e o suporte sólido é suficiente para ser estável sob as condições de ligação, lavagem, análise e remoção como esboçado. A ligação

20 pode tipicamente ser covalente ou não-covalente. Por "ligação não-covalente" e equivalentes gramáticos aqui é entendido uma ou mais interações eletrostáticas, hidrofílicas e hidrofóbicas. Incluído em ligação não-covalente é a ligação covalente de uma molécula, por exemplo, estreptavidina ao suporte e a ligação não-covalente da sonda biotinilada à estreptavidina. Por "ligação covalente" e equivalentes gramáticos aqui é entendido

25 que as duas porções, o suporte sólido e a sonda, são ligadas por pelo menos uma ligação, incluindo ligações sigma, ligações pi e ligações de coordenação. Ligações covalentes podem ser formadas diretamente entre a sonda e o suporte sólido ou podem ser formadas por um reticulador ou por

30 inclusão de um grupo reativo específico no suporte sólido ou na sonda ou ambas as moléculas. A imobilização pode da mesma forma envolver uma combinação de interações covalentes e não-covalentes.

Em geral, as sondas são ligadas ao biochip em uma ampla variedade de maneiras. Como descrito aqui, os ácidos nucleicos podem ser sintetizados primeiro, com ligação subsequente ao biochip, ou podem ser sintetizados diretamente no biochip.

5 O biochip compreende um substrato sólido adequado. Por "substrato" ou "suporte sólido" ou outros equivalentes gramáticos aqui é significado um material que pode ser modificado para a ligação ou associação das sondas de ácido nucleico e é receptivo por pelo menos um método de detecção. Frequentemente, o substrato podem conter sítios individuais discretos apropriados para identificação e divisão individual. O número de possíveis substratos é muito grande, e inclui, porém não são limitados a, vidro e vidro funcionalizado ou modificado, plásticos (incluindo acrílicos, poliestireno e copolímeros de estireno e outros materiais, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliuretanos, Teflon J, etc.), polissacarídeos, náilon ou nitrocelulose, resinas, sílica ou materiais com base em sílica incluindo silício e silício modificado, carbonos, metais, vidros inorgânicos, plásticos, etc. Em geral, os substratos permitem a detecção óptica e não fluorescem apreciavelmente. Veja WO 0055627.

20 Geralmente o substrato é planar, embora outras configurações de substratos possam ser empregadas também. Por exemplo, as sondas podem ser colocadas na superfície interior de um tubo para análise de amostra através de fluxo para minimizar o volume de amostra. Similarmente, o substrato pode ser flexível, tal como uma espuma flexível, incluindo espumas de célula fechadas feitas de plásticos particulares.

25 Em uma modalidade, a superfície do biochip e a sonda podem ser derivadas com grupos funcionais químicos para ligação subsequente das duas. Desse modo, por exemplo, o biochip é derivado com um grupo funcional químico incluindo, porém não limitado a, grupos amino, grupos carboxi, grupos oxo e grupos tiol, com grupos amino sendo particularmente preferidos. Empregando estes grupos funcionais, as sondas podem ser ligadas empregando grupos funcionais nas sondas. Por exemplo, ácidos nucleicos contendo grupos amino podem ser ligados às superfícies compreen-

30

dendo grupos amino, por exemplo, empregando ligantes; por exemplo, ligantes homo- ou heterobifuncionais visto que são bem-conhecidos (veja catálogo de 1994 Pierce Chemical Company, seção técnica em reticuladores, páginas 155-200). Além disso, em alguns casos, ligantes adicionais, tais como grupos alquila (incluindo grupos heteroalquila e substituídos) podem ser empregados.

Nesta modalidade, oligonucleotídeos são sintetizados, e em seguida ligados à superfície do suporte sólido. Os terminais 5' ou 3' podem ser ligados ao suporte sólido, ou a ligação pode ser por meio da ligação em um nucleosídeo interno. Em outra modalidade, a imobilização ao suporte sólido pode ser muito forte, contudo não-covalente. Por exemplo, oligonucleotídeos biotinizados podem ser feitos, cuja ligação em superfícies covalentemente revestidas com estreptavidina, resultando na união.

Alternativamente, os oligonucleotídeos podem ser sintetizados na superfície. Por exemplo, técnicas de fotoativação utilizando técnicas e compostos de fotopolimerização são empregadas. Em outra modalidade, os ácidos nucléicos podem ser sintetizados *in situ*, empregando técnicas fotolitográficas, tais como aquelas descritas em WO 95/25116; WO 95/35505; Patente US N°s 5.700.637 e 5.445.934; e referências citadas dentro de todas das quais são expressamente incorporadas por referência; estes métodos de ligação formam a base da tecnologia de Affymetrix GENECHIP® (*chip* de Microdisposição de DNA).

Freqüentemente, ensaios com base na amplificação são realizados para medir o nível de expressão de seqüências associadas a CS1. Estes ensaios são tipicamente realizados junto com a transcrição reversa. Em tais ensaios, uma seqüência de ácido nucléico associada a CS1 age como um padrão em uma reação de amplificação (por exemplo, Reação em Cadeia de Polimerase, ou PCR). Em uma amplificação quantitativa, a quantidade do produto de amplificação será proporcional à quantidade do padrão na amostra original. A comparação em controles apropriados fornece uma medida da quantidade de RNA associado a CS1. Métodos de amplificação quantitativa são bem-conhecidos. Protocolos detalhados para PCR quantita-

tiva, por exemplo, em Innis, e outros. (1990) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications Academic Press.

Em algumas modalidades, um ensaio com base em TAQMAN® (uma sonda de oligonucleotídeo fluorogênica) é empregado para medir a expressão. Ensaio com base em TAQMAN® empregam uma sonda de oligonucleotídeo fluorogênica que contém uma tintura fluorescente 5' e um agente de extinção 3'. A sonda hibridiza para um produto de PCR, porém não pode por si mesmo ser prolongada devido a um agente de bloqueio na extremidade 3'. Quando o produto de PCR é amplificado em ciclos subsequentes, a atividade de 5' nuclease da polimerase, por exemplo, AMPLITAQ® (DNA polimerase), resulta na clivagem da sonda TAQMAN®. Esta clivagem separa a tintura fluorescente 5' e o agente de extinção 3', desse modo resultando em um aumento na fluorescência como uma função de amplificação (veja, por exemplo, a literatura fornecida por Perkin-Elmer).

Outros métodos de amplificação adequados incluem, porém não são limitados a, reação de cadeia de ligase (LCR) (veja Wu e Wallace (1989) Genomics 4:560-569, Landegren, e outros (1988) Science 241:1077-1080 e Barringer, e outros (1990) Gene 89:117-122), amplificação de transcrição (Kwoh, e outros (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177), replicação de sequência auto-sustentada (Guatelli, e outros (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878), PCR em ponto, PCR adaptadora de ligante, etc.

Expressão de proteína de CS1 de ácidos nucleicos

Em uma modalidade, ácido nucleico de CS1, por exemplo, codificando proteína de CS1, são empregadas para preparar uma variedade de vetores de expressão para expressar a proteína de CS1 que pode ser em seguida empregada no desenvolvimento de reagentes para ensaios diagnósticos como descrito abaixo. Vetores de expressão e tecnologia de DNA recombinante são bem-conhecidos (veja, por exemplo, Ausubel, supra, e Fernandez e Hoeffler (eds. 1999) Gene Expression Systems Academic Press) para expressar as proteínas. Os vetores de expressão podem ser vetores extra-cromossômicos de auto-replicação ou vetores que integram

em um genoma hospedeiro. Geralmente, estes vetores de expressão incluem ácido nucléico transcricional e traducional operavelmente ligado ao ácido nucléico codificando a proteína de CS1. O termo "seqüências de controle" refere-se às seqüências de DNA empregadas para a expressão de uma seqüência de codificação operavelmente ligada em um organismo hospedeiro particular. As seqüências de controle que são adequados para procariotas, por exemplo, incluem um promotor, opcionalmente uma seqüência operadora e um sítio de ligação de ribossoma. Células eucarióticas são conhecidas para utilizar os promotores, sinais de poliadenilação e realçadores.

10 Ácido nucléico é "operavelmente ligado" quando é colocado em uma relação funcional com outra seqüência de ácido nucléico. Por exemplo, DNA para uma pré-seqüência ou líder segregador é operavelmente ligado ao DNA para um polipeptídeo se for expresso como uma pré-proteína que participa na segregação do polipeptídeo; um promotor ou realçador é operavelmente ligado a uma seqüência de codificação se ele afeta a transcrição da seqüência; ou um sítio de ligação de ribossoma é operavelmente ligado a uma seqüência de codificação se estiver posicionado para facilitar a tradução. Geralmente, "operavelmente ligada" significa que as seqüências de DNA a ser ligadas são contíguas, e, no caso de um líder segregador, contíguas e em fase de leitura. Entretanto, os realçadores não têm que ser contíguos. A ligação é tipicamente realizada por ligação em sítios de restrição convenientes. Se tais sítios não existirem, ligantes ou adaptadores de oligonucleotídeo sintéticos são empregados de acordo com a prática convencional. Ácido nucléico regulador transcricional e traducional geralmente será
25 apropriado à célula hospedeira empregada para expressar a proteína de CS1. Tipos numerosos de vetores de expressão apropriados e seqüências reguladoras adequadas são conhecidos por uma variedade de células hospedeiras.

30 Em geral, seqüências reguladoras transcricionais e traducionais podem incluir, porém não são limitadas a, seqüências promotoras, sítios de ligação ribossômicos, seqüências de interrupção e iniciação transcricionais, seqüências de interrupção e iniciação traducionais, seqüências ativadoras e

realçadoras. Em uma modalidade, as seqüências reguladoras incluem seqüências de interrupção e iniciação transcricionais e promotoras.

Seqüências promotoras podem ser promotores constitutivos ou induzíveis. Os promotores podem ser promotores de ocorrência natural ou
5 promotores híbridos. Promotores híbridos, que combinam elementos de mais do que um promotor, são da mesma forma conhecidos, e são úteis na presente invenção.

Um vetor de expressão pode compreender elementos adicionais. Por exemplo, o vetor de expressão pode ter dois sistemas de replica-
10 ção, desse modo permitindo ser mantido em dois organismos, por exemplo, em células de inseto ou mamíferos para expressão e em um hospedeiro procariótico para clonagem e amplificação. Além disso, para integrar vetores de expressão, o vetor de expressão freqüentemente contém pelo menos uma seqüência homóloga ao genoma de célula hospedeira, e preferivelmen-
15 te duas seqüências homólogas que flanqueiam o constructo de expressão. O vetor de integração pode ser direcionado a um local específico na célula hospedeira selecionando-se a seqüência homóloga apropriada para inclusão no vetor. Os constructos para integrar vetores são disponíveis. Veja, por exemplo, Fernandez and Hoeffler, supra; e Kitamura, e outros (1995) Proc.
20 Nat'l Acad. Sci. USA 92:9146-9150.

Além disso, em outra modalidade, o vetor de expressão contém um gene marcador selecionável para permitir a seleção de células hospedeiras transformadas. Genes de seleção são bem-conhecidos e variarão com a célula hospedeira empregada.

25 A proteína de CS1 da presente invenção é normalmente produzida cultivando-se uma célula hospedeira transformada com um vetor de expressão contendo ácido nucléico codificando uma proteína de CS1, sob as condições apropriadas para induzir ou causar expressão da proteína de CS1. Condições apropriadas para expressão de proteína de CS1 variarão
30 com a escolha do vetor de expressão e da célula hospedeira, e será facilmente verificado através da otimização ou experimentação de rotina. Por exemplo, o uso de promotores constitutivos no vetor de expressão requererá

a otimização do crescimento e proliferação da célula hospedeira, ao mesmo tempo que o uso de um promotor induzível requer as condições de crescimento apropriadas para indução. Além disso, em algumas modalidades, a cronometragem da colheita é importante. Por exemplo, os sistemas baculo-
5 virais empregados na expressão de célula de inseto são vírus líticos, e desse modo a seleção de tempo da colheita pode ser crucial para o rendimento do produto.

Células hospedeiras apropriadas incluem levedura, bactérias, arqueobactérias, fungos e células de inseto e animal, incluindo células de
10 mamífero. De interesse particular são *Saccharomyces cerevisiae* e outras leveduras, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, células Sf9, células C129, células 293, Neurospora, BHK, CHO, COS, células HeLa, HUVEC (células endoteliais de veia umbilical humana), células THP1 (uma linhagem de célula de macrófago), e várias outras células humanas e linhagens de célula.

15 Em uma modalidade, as proteínas de CS1 são expressas em células de mamíferos. Sistemas de expressão de mamíferos podem ser empregados, e incluem sistemas retrovirais e adenovirais. Um sistema de vetor de expressão é um sistema de vetor retroviral tal como é geralmente descrito em PCT/US97/01019 e PCT/US97/01048. De uso particular como promotores mamíferos são os promotores de genes virais de mamífero, desde que
20 os genes virais sejam freqüentemente altamente expressos e tenham uma ampla faixa de hospedeiro. Exemplos incluem o promotor precoce SV40, promotor de LTR de vírus de tumor mamário de camundongo, promotor tardio principal de adenovírus, promotor de vírus do herpes simples e o promotor de CMV (veja, por exemplo, Fernandez e Hoeffler, supra). Tipicamente, seqüências de poliadenilação e terminação de transcrição reconhecidas por
25 células de mamífero são regiões reguladoras localizadas em 3' ao códon de interrupção de tradução e desse modo, juntas com os elementos promotores, flanqueiam a seqüência de codificação. Exemplos de sinais de poliadenilação e terminadores de transcrição incluem aqueles derivados de SV40.
30

Métodos de introduzir ácido nucléico exógeno em hospedeiros mamíferos, bem como outros hospedeiros, são disponíveis, e variarão com

a célula hospedeira empregada. As técnicas incluem transfecção mediada por dextrano, precipitação de fosfato de cálcio, transfecção mediada por polibreno, fusão de protoplasto, eletroporação, infecção viral, encapsulação do(s) polinucleotídeo(s) em lipossomas e microinjeção direta do DNA em

5 núcleos.

Em outra modalidade, proteína de CS1 é expressado em sistemas bacterianos. Promotores de bacteriófago podem da mesma forma ser empregados. Além disso, os promotores sintéticos e promotores híbridos são da mesma forma úteis; por exemplo, o promotor tac é um híbrido das

10 seqüências de promotor trp e lac. Além disso, um promotor bacteriano pode incluir promotores de ocorrência natural de origem não-bacteriana que tem a capacidade de ligar RNA polimerase bacteriana e iniciar a transcrição. Além de uma seqüência de promotor de funcionamento, um sítio de ligação de ribossoma eficiente é desejável. O vetor de expressão pode da mesma forma

15 incluir uma seqüência de peptídeo de sinal que fornece segregação da proteína de CS1 em bactérias. A proteína é segregada nos meios de crescimento (bactérias gram-positivas) ou no espaço periplásmico, localizado entre a membrana interna e externa da célula (bactérias gram-negativas). O vetor de expressão bacteriano pode da mesma forma incluir um gene marcador selecionável para permitir a seleção de cepas bacterianas que foram transformadas. Genes de seleção adequados incluem genes que tornam as

20 bactérias resistentes às drogas tal como ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, canamicina, neomicina e tetraciclina. Marcadores selecionáveis da mesma forma incluem genes biossintéticos, tais como aqueles nas trilhas biossintéticas de histidina, triptofano e leucina. Estes componentes são reunidos em vetores de expressão. Vetores de expressão para bactérias são bem-conhecidos, e incluem vetores para *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Streptococcus cremoris* e *Streptococcus lividans*, entre outros (por exemplo, Fernandez e Hoeffler, supra). Os vetores de expressão bacterianos são trans-

25 formados em células hospedeiras bacterianas empregando técnicas tal como tratamento de cloreto de cálcio, eletroporação e outros.

30

Em uma modalidade, proteína de CS1 é produzida em células

de inseto empregando, por exemplo, vetores de expressão para a transformação de células de inseto e em particular, vetores de expressão com base em baculovírus.

Em outra modalidade, uma proteína de CS1 é produzida em células de levedura. Sistemas de expressão de levedura são bem-conhecidos e incluem vetores de expressão para *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* e *C. maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis* e *K. lactis*, *Pichia guillerimondii* e *P. pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Yarrowia lipolytica*.

10 A proteína de CS1 pode ser feita da mesma forma como uma proteína de fusão, empregando técnicas disponíveis. Desse modo, por exemplo, para a criação de anticorpos monoclonais, se o epítipo desejado for pequeno, a proteína de CS1 pode ser fundida em uma proteína carreadora para formar um imunógeno. Alternativamente, a proteína de CS1 pode
15 ser feita como uma proteína de fusão para aumentar a expressão, ou por outras razões. Por exemplo, quando a proteína de CS1 for um peptídeo de CS1, o ácido nucléico codificando o peptídeo pode ser ligado a outro ácido nucléico para propósitos de expressão. Fusão com rótulos de epítipo de detecção pode ser feita, por exemplo, com FLAG, His6, myc, HA, etc.

20 Em ainda outra modalidade, a proteína de CS1 é purificada ou isolada depois da expressão. A proteína de CS1 pode ser isolada ou purificada em uma variedade de maneiras dependendo de quais outros componentes estão presentes na amostra e as exigências para produto purificado, por exemplo, conformação natural ou desnaturado. Métodos de purificação
25 padrão incluem técnicas de precipitações de sulfato de amônio, eletroforéticas, moleculares, imunológicas, e cromatográficas, incluindo permuta de íon, hidrofóbico, afinidade e cromatografia de HPLC de fase reversa e cromatofocalização. Por exemplo, a proteína de CS1 pode ser purificada empregando uma coluna de anticorpo de proteína anti-CS1 padrão. Técnicas
30 de ultrafiltração e diafiltração, junto com concentração de proteína, são da mesma forma úteis. Veja, por exemplo, Walsh (2002) *Proteins: Biochemistry e Biotechnology* Wiley; Hardin, e outros (eds. 2001) *Cloning, Gene Expres-*

sion and Protein Purification Oxford Univ. Press; Wilson, e outros. (eds. 2000) Encyclopedia of Separation Science Academic Press; and Scopes (1993) Protein Purification Springer-Verlag. O grau de purificação necessário variará dependendo do uso da proteína de CS1. Em alguns exemplos nenhuma purificação será necessária.

Logo que expressas e purificadas se necessário, as proteínas de CS1 e ácidos nucléico são úteis em várias aplicações. Eles podem ser empregadas como reagentes de imunosseleção; como reagentes de vacina, como agentes de avaliação, entidades terapêuticas, para produção de anticorpos, como inibidores de transcrição ou tradução, etc.

Variantes de proteínas de CS1

Da mesma forma incluídos dentro de uma modalidade de proteínas de CS1 são variantes de aminoácido das seqüências de ocorrência natural, como determinado aqui. Preferivelmente, as variantes são preferivelmente maiores do que cerca de 75% homólogas à seqüência tipo selvagem, mais preferivelmente maiores do que cerca de 80%, ainda mais preferivelmente maiores do que cerca de 85%, e mais preferivelmente maiores do que 90%. Em algumas modalidades, a homologia será tão alta quanto cerca de 93-95% ou 98%. Quanto aos ácidos nucléicos, a homologia neste contexto significa identidade ou similaridade de seqüência, com identidade sendo preferida. Esta homologia será determinada empregando técnicas padrão, visto que são esboçadas anteriormente para homologias de ácido nucléico.

Proteína de CS1 da presente invenção pode ser mais curta ou mais longa do que as seqüências de aminoácido do tipo selvagem. Desse modo, em uma modalidade, incluídas dentro da definição de proteínas de CS1 são porções ou fragmentos das seqüências do tipo selvagem aqui. Além disso, como esboçado anteriormente, o ácido nucléico de CS1 da invenção pode ser empregado para obter regiões de codificação adicionais, e desse modo seqüência de proteína adicional.

Em uma modalidade, proteínas de CS1 são proteínas de CS1 variantes ou derivadas quando comparadas à seqüência de tipo selvagem.

Isto é, como esboçado mais completamente abaixo, o peptídeo de CS1 derivado conterá freqüentemente pelo menos uma inserção, deleção ou substituição de aminoácido, com substituições de aminoácido sendo particularmente preferidas. A deleção, inserção ou substituição de aminoácido pode
5 ocorrer em muitas posições de resíduo dentro do peptídeo de CS1.

Da mesma forma incluídas dentro de uma modalidade de proteínas de CS1 da presente invenção são variantes de seqüência de aminoácido. Estas variantes tipicamente caem em uma ou mais dentre três classes: variantes substitucionais, insercionais ou delecionais. Estas variantes ordi-
10 nariamente são preparadas por mutagênese específica de sítio de nucleotídeos no DNA codificando a proteína de CS1, empregando cassete ou mutagênese de PCR ou outras técnicas, para produzir DNA codificando a variante, e conseqüentemente expressando o DNA em cultura de célula recombinante como esboçadas anteriormente. Entretanto, fragmentos de proteína
15 de CS1 de variante tendo até cerca de 100-150 resíduos podem ser preparados por síntese *in vitro* empregando técnicas estabelecidas. Variantes de seqüência de aminoácido são caracterizadas pela natureza predeterminada da variação, uma característica que os fixa a parte da variação de interesse ou alélicas de ocorrência natural da seqüência de aminoácido de proteína de CS1. As variantes tipicamente exibem uma atividade biológica qua-
20 litativa similar como um análogo de ocorrência natural, embora as variantes possam da mesma forma ser selecionadas as quais têm características modificadas.

Ao mesmo tempo que o sítio ou região para introduzir uma varia-
25 ção de seqüência de aminoácido é freqüentemente predeterminada, a mutação por si própria não necessita ser predeterminada. Por exemplo, a fim de otimizar o desempenho de uma mutação em um determinado sítio, a mutagênese aleatória pode ser conduzida na região ou códon alvo e as variantes de CS1 expressas avaliadas quanto à combinação ideal da atividade
30 desejada. Técnicas para preparar mutações de substituição em sítios predeterminados em DNA tendo uma seqüência conhecida são bem-conhecidas, por exemplo, mutagênese de iniciador de M13 e mutagênese de PCR. A

avaliação de mutantes é freqüentemente feita empregando ensaios de atividades de proteína de CS1.

Substituições de aminoácido são tipicamente de resíduos únicos; inserções usualmente estarão na ordem de cerca de 1-20 aminoácidos, embora as inserções consideravelmente maiores possam ser toleradas. As deleções geralmente variam de cerca de 1-20 resíduos, embora em alguns casos as deleções possam ser muito maiores.

Substituições, deleções, inserções, ou combinação destas podem ser empregadas para surgir em um derivado final. Geralmente estas mudanças são feitas em alguns aminoácidos para minimizar a alteração da molécula. Entretanto, mudanças maiores podem ser toleradas em certas circunstâncias. Quando pequenas alterações nas características da proteína de CS1 são desejadas, as substituições são geralmente feitas de acordo com as relações de substituição de aminoácido descritas.

As variantes tipicamente exibem essencialmente a mesma atividade biológica qualitativa e extrairão a mesma resposta imune como um análogo de ocorrência natural, embora as variantes da mesma forma sejam selecionadas para modificar as características de proteínas de CS1 quando necessário. Alternativamente, a variante pode ser projetada tal que uma atividade biológica da proteína de CS1 é alterada. Por exemplo, sítios de glicosilação podem ser adicionados, alterados ou removidos.

Mudanças significativas na função ou identidade imunológica são às vezes feitas selecionando-se substituições que são menos conservadoras do que aquelas descritas anteriormente. Por exemplo, as substituições podem ser feitas as quais mais significativamente afetam: a estrutura da cadeia principal do polipeptídeo na área da alteração, por exemplo a estrutura alfa-helicoidal ou lâmina beta; a carga de hidrofobicidade da molécula no sítio alvo; ou a carga da cadeia lateral. Substituições que geralmente são esperadas produzir as mudanças maiores nas propriedades do polipeptídeo são aquelas em que (a) um resíduo hidrofílico, por exemplo, serina ou treonina é substituído para (ou por) um resíduo hidrofóbico, por exemplo, leucina, isoleucina, fenilalanina, valina ou alanina; (b) uma cisteína ou proli-

na é substituída para (ou por) outro resíduo; (c) um resíduo tendo uma cadeia lateral eletropositiva, por exemplo, lisina, arginina ou histidina, é substituído para (ou por) um resíduo eletronegativo, por exemplo, ácido glutâmico ou aspártico; (d) um resíduo tendo uma cadeia lateral volumosa, por exemplo, fenilalanina, é substituído para (ou por) algum não tendo uma cadeia lateral, por exemplo, glicina; ou (e) um resíduo de prolina é incorporado ou substituído, o qual muda o grau de liberdade rotacional da ligação de peptídica.

As variantes tipicamente exibem uma atividade biológica qualitativa similar e eliciará a mesma resposta imune como o análogo de ocorrência natural, embora as variantes sejam da mesma forma selecionadas para modificar as características das proteínas de CS1 da pele quando necessário. Alternativamente, a variante pode ser projetada tal que a atividade biológica da proteína de CS1 é alterada. Por exemplo, os sítios de glicosilação podem ser alterados ou removidos.

Modificações covalentes de polipeptídeos de CS1 são incluídas no escopo desta invenção. Um tipo de modificação covalente inclui reagir os resíduos de aminoácido alvejados de um polipeptídeo de CS1 com um agente de derivatização orgânico que é capaz de reagir com cadeias laterais selecionadas ou os resíduos de terminal N ou C de um polipeptídeo de CS1. A derivatização com agentes bifuncionais é útil, por exemplo, para reticular polipeptídeos de CS1 em uma superfície ou matriz de suporte insolúvel em água para uso em um método para purificar anticorpos de polipeptídeo anti-CS1 ou avaliar ensaios, como é descrito mais completamente abaixo. Agentes de reticulação geralmente empregados incluem, por exemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldeído, ésteres de N-hidroxissuccinimida, por exemplo, ésteres com ácido 4-azidossalicílico, imidoésteres homobifuncionais, incluindo ésteres de dissuccinimidila tal como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidas bifuncionais tal como bis-N-maleimido-1,8-octano e agentes tal como metil-3-((p-azidofenil)ditio)propioimidato.

Outras modificações incluem desamidação de resíduos de glu-

taminila e asparaginila aos resíduos de aspartila e glutamila correspondentes, respectivamente, hidroxilação de prolina e lisina, fosforilação de grupos hidroxila de resíduos de serinila, treonila ou tirosila, metilação dos grupos amino das cadeias laterais de lisina, arginina, e histidina (por exemplo, pp. 79-86, Creighton (1992) *Proteins: Structure and Molecular Properties* Freeman), acetilação da amina de terminal N e amidação de um grupo carboxila de terminal C.

Outro tipo de modificação covalente do polipeptídeo de CS1 incluído dentro do escopo desta invenção compreende alterar o padrão de glicosilação nativo do polipeptídeo. "Alterar o padrão de glicosilação nativo" é destinado para propósitos aqui para significar a deleção de uma ou mais porções de carboidrato encontradas em polipeptídeo de CS1 de sequência nativa e/ou adição de um ou mais sítios de glicosilação que não estão presentes no polipeptídeo de CS1 de sequência nativa. Padrão de glicosilação podem ser alterados de muitas maneiras. Tipos de célula diferentes para expressar seqüências associadas a CS1 podem resultar em padrão de glicosilação diferentes.

A adição de sítios de glicosilação em polipeptídeos de CS1 pode ser realizada da mesma forma alterando-se a seqüência de aminoácido destes. A alteração pode ser feita, por exemplo, pela adição de, ou substituição por, um ou mais resíduos de serina ou treonina ao polipeptídeo de CS1 de sequência nativa (para sítios de glicosilação ligados por O). A seqüência de aminoácido de CS1 pode opcionalmente ser alterada através de mudanças no nível de DNA, particularmente mutando-se o DNA codificando o polipeptídeo de CS1 em bases pré-selecionadas tal que os códons são gerados os quais se traduzirão nos aminoácidos desejados.

Outros meios de aumentar o número de porções de carboidrato no polipeptídeo de CS1 são por acoplamento enzimático ou químico de glicosídeos ao polipeptídeo. Veja, por exemplo, WO 87/05330; pp. 259-306 em Aplin e Wriston (1981) *CRC Crit. Rev. Biochem.*

A remoção das porções de carboidrato presentes no polipeptídeo de CS1 pode ser realizada quimicamente ou enzimaticamente ou por

substituição mutacional de códons codificando para resíduos de aminoácido que servem como alvos para glicosilação. Técnicas de desglicosilação químicas são aplicáveis. Veja, por exemplo, Sojar and Bahl (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52-57 e Edge, e outros (1981) Anal. Biochem. 118:131-137. A clivagem enzimática de porções de carboidrato em polipeptídeos pode ser obtida pelo uso de uma variedade de endo-e exo-glicosidases. Veja, por exemplo, Thotakura, e outros (1987) Meth. Enzymol. 138:350-359.

Outro tipo de modificação covalente de polipeptídeos de CS1 compreende ligar o polipeptídeo de CS1 a um dentre uma variedade de polímeros não proteináceos, por exemplo, polietileno glicol, polipropileno glicol ou polioxialquilenos, na maneira mencionada na Patente US N°s 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ou 4.179.337.

Os polipeptídeos de CS1 da presente invenção podem da mesma forma ser modificados de uma maneira para formar moléculas quiméricas compreendendo um polipeptídeo de CS1 fundido a outro polipeptídeo heterólogo ou seqüência de aminoácido. Em uma modalidade, uma tal molécula quimérica compreende uma fusão de um polipeptídeo de CS1 com um polipeptídeo de rótulo que fornece um epítipo ao qual um anticorpo anti-rótulo pode seletivamente se ligar. O rótulo de epítipo é geralmente colocado no terminal amino ou carboxila do polipeptídeo de CS1. A presença de tais formas rotuladas por epítipo de um polipeptídeo de CS1 pode ser detectada empregando um anticorpo contra o polipeptídeo de rótulo. Da mesma forma, a provisão do rótulo de epítipo permite polipeptídeo de CS1 ser purificado facilmente por purificação de afinidade empregando um anticorpo anti-rótulo ou outro tipo de matriz de afinidade que se liga ao rótulo de epítipo. Em uma modalidade alternativa, a molécula quimérica pode compreender uma fusão de um polipeptídeo de CS1 com uma imunoglobulina ou uma região particular de uma imunoglobulina. Para uma forma bivalente da molécula quimérica, uma tal fusão pode ser para a região de Fc de uma molécula de IgG.

Vários polipeptídeos de rótulo e seus anticorpos respectivos estão disponíveis. Exemplos incluem rótulos de poli-histidina (poli-his) ou poli-

histidina-glicina (poli-his-gli); rótulos de HIS6 e quelação de metal, o polipeptídeo de rótulo flu HA e seu anticorpo 12CA5 (Field, e outros. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:2159-2165); o rótulo c-myc e os anticorpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 e 9E10 também (Evan, e outros. (1985) Molecular and Cellular Biology 5:3610-3616); e o rótulo de glicoproteína D (gD) do vírus do Herpes Simplex e seu anticorpo (Paborsky, e outros (1990) Protein Engineering 3(6):547-553). Outros polipeptídeos de rótulo incluem o Flag-peptídeo (Hopp, e outros (1988) BioTechnology 6:1204-1210); o peptídeo de epítipo KT3 (Martin, e outros (1992) Science 255:192-194); peptídeo de epítipo de tubulina (Skinner, e outros (1991) J. Biol. Chem. 266:15163-15166); e o rótulo de peptídeo de proteína 10 de gene T7 (Lutz-Freyermuth, e outros. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87:6393-6397).

Da mesma forma incluídas são as proteínas de CS1 de outros organismos, que são clonados e expressos como esboçado abaixo. Desse modo, a sonda ou seqüências de iniciador de reação em cadeia da polimerase (PCR) degeneradas podem ser empregadas para encontrar outras proteínas de CS1 relacionadas de seres humanos ou outros organismos. Seqüências de iniciador de PCR e/ou sonda particularmente úteis incluem as únicas áreas da seqüência de ácido nucléico de CS1. Iniciadores de PCR preferidos são de cerca de 15-35 nucleotídeos no comprimento, com cerca de 20-30 sendo preferidos e podem conter inosina quando necessário. As condições para reação de PCR foram bem descritas (por exemplo, Innis, PCR Protocols, supra).

Além disso, as proteínas de CS1 podem ser feitas as quais são mais longas do que aqueles codificadas pelos ácidos nucléicos da Tabela 2, por exemplo, pela elucidação das seqüências prolongadas, a adição de epítipo ou rótulos de purificação, a adição de outras proteínas de fusão, etc.

As proteínas de CS1 podem da mesma forma ser identificadas como sendo codificadas por ácidos nucléicos de CS1. Desse modo, as proteínas de CS1 são codificadas por ácidos nucléicos que hibridizarão para as seqüências das listagens de seqüência ou seus complementos, como esboçado aqui.

Pares de Ligação para proteínas de CS1

Anticorpos de CS1

Os anticorpos de CS1 da invenção especificamente ligam-se às proteínas de CS1. Por "especificamente ligar" aqui é significado que os anticorpos ligam-se à proteína com um K_d de pelo menos cerca de 0,1 mM, mais
5 usualmente pelo menos cerca de 1 μ M, preferivelmente pelo menos cerca de 0,1 μ M ou melhor, e mais preferivelmente, 0,01 μ M ou melhor. A seletividade de ligação ao alvo específico e não para seqüências relacionadas é freqüentemente da mesma forma importante.

10 Em uma modalidade, quando a proteína de CS1 deve ser empregada para gerar pares de ligação, por exemplo, anticorpos para imunodiagnóstico, a proteína de CS1 deve compartilhar pelo menos um epítopo ou determinante com a proteína de tamanho natural. Por "epítopo" ou "determinante" aqui é tipicamente significado uma porção de uma proteína que gera-
15 rá e/ou ligará um anticorpo ou receptor de célula T no contexto de MHC. Desse modo, na maioria dos exemplos, os anticorpos feitos em uma proteína de CS1 menor será capaz de se ligar à proteína de tamanho natural, particularmente epítopos lineares. Em outra modalidade, o epítopo é único; isto é, anticorpos gerados em um único epítopo mostram pouca ou nenhuma
20 reatividade cruzada. Em ainda outra modalidade, o epítopo é selecionado de uma seqüência de proteína demonstrada na tabela.

Métodos de preparar anticorpos policlonais existem (por exemplo, Coligan, supra; e Harlow and Lane, supra). Anticorpos policlonais podem ser elevados em um mamífero, por exemplo, por uma ou mais injeções
25 de um agente de imunização e, se desejado, um adjuvante. Tipicamente, o agente de imunização e/ou adjuvante serão injetados no mamífero por injeções intraperitoneais ou subcutâneas múltiplas. O agente de imunização pode incluir uma proteína codificada por um ácido nucléico da Tabela 2 ou fragmento deste ou uma proteína de fusão deste. Pode ser útil conjugar o
30 agente de imunização em uma proteína conhecida ser imunogênica no mamífero a ser imunizado. Exemplos de tais proteínas imunogênicas incluem porém não são limitados a hemocianina de lapa de buraco de fechadura,

albumina de soro, tiroglobulina bovina e inibidor de tripsina de soja. Exemplos de adjuvantes que podem ser empregados incluem o adjuvante completo de Freund e adjuvante de MPL-TDM (Lipídio A de monofosforila, dicorinomicolato de trealose sintético). Vários protocolos de imunização podem
5 ser empregados.

Os anticorpos podem, alternativamente, ser anticorpos monoclonais. Os anticorpos monoclonais podem ser preparados empregando métodos de hibridoma, tal como aqueles descritos por Kohler e Milstein (1975) Nature 256:495. Em um método de hibridoma, um camundongo, *hamster* ou
10 outro animal hospedeiro apropriado é imunizado tipicamente com um agente de imunização para eliciar os linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que especificamente ligarão ao agente de imunização. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. O agente de
15 imunização tipicamente incluirá um polipeptídeo codificado por um ácido nucléico da tabela ou fragmento deste, ou uma proteína de fusão desta. Geralmente, linfócitos de sangue periférico ("PBLs") são empregados se as células de origem humana forem desejadas, ou as células de baço ou células de linfonodo forem empregadas se as fontes de mamíferos não-humanos
20 forem desejadas. Os linfócitos são fundidos em seguida com uma linhagem de célula imortalizada empregando um agente de fusão adequado, tal como polietileno glicol, para formar uma célula de hibridoma (por exemplo, pp. 59-103 em Goding (1986) Monoclonal Antibodies: Principles and Practice Academic Press). Linhagens de células imortalizadas são células de mamífero
25 usualmente transformadas, particularmente células de roedor, bovino ou origem humana. Normalmente, linhagens de camundongo ou rato são empregadas. As células de hibridoma podem ser cultivadas em um meio de cultura adequado que preferivelmente contém uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou sobrevivência das células imortalizadas, não-fundidas. Por exemplo, se as células parentais necessitam da enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cul-
30 tura para os hibridomas tipicamente incluirá hipoxantina, aminopterina e timidina ("meio de HAT"), cujas substâncias impedem o crescimento de célu-

las deficientes em HGPRT.

Em uma modalidade, os anticorpos são anticorpos biespecíficos. Anticorpos biespecíficos anticorpos monoclonais, preferivelmente humanos ou humanizados, que têm especificidades de ligação para pelo menos dois
5 antígenos diferentes ou que têm especificidades de ligação para dois epítopos no mesmo antígeno. Em uma modalidade, um das especificidades de ligação é para uma proteína codificada por um ácido nucléico da tabela ou um fragmento deste, a outra é para outro antígeno, e preferivelmente para uma proteína de superfície de célula ou subunidade de receptor, preferivel-
10 mente aquele que seja específico de CS1. Alternativamente, a tecnologia tipo tetrâmero pode criar reagentes multivalentes.

Em outra modalidade, os anticorpos têm baixos níveis ou necessitam de fucose. Anticorpos necessitando de fucose foram correlacionados com atividade de ADCC realçada (citotoxicidade celular dependente de anti-
15 corpo), especialmente em baixas doses de anticorpo. Shield, R.L., e outros, (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Shinkawa, T. e outros, (2003), J. Biol. Chem. 278:3466. Métodos de preparar anticorpos sem fucose incluem o crescimento em células YB2/0 de mieloma de rato (ATCC CRL 1662). Células YB2/0 expressam baixos níveis de mRNA de FUT8, que codificam uma
20 enzima (α 1,6-fucosiltransferase) necessária para fucosilação de polipeptídeos.

Métodos alternativos para aumentar a atividade de ADCC incluem mutações na porção de Fc de um anticorpo de CS1, particularmente mutações que aumentam a afinidade de anticorpo para um receptor de Fc γ R.
25 Uma correlação entre ligação Fc γ R aumentado ligando com Fc mutado foi demonstrada empregando ensaios com base em célula de citotoxicidade alvejada. Shields, R.L. e outros. (2001) J. Biol. Chem 276:6591-6604; Presta e outros. (2002), Biochem Soc. Trans. 30:487-490. Métodos para aumentar a atividade de ADCC através das mutações de região de Fc específicas inclu-
30 em as variantes de Fc compreendendo pelo menos uma substituição de aminoácido em uma posição selecionada do grupo que consiste em: 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269,

- 296, 297, 298, 299, 313, 325, 327, 328, 329, 330 e 332, em que a numeração dos resíduos na região de Fc é aquela do índice EU como em Kabat. Em uma modalidade preferida, as referidas variantes de Fc compreendem pelo menos uma substituição selecionada do grupo consistindo em L234D,
- 5 L234E, L234N, L234Q, L234T, L234H, L234Y, L234I, L234V, L234F, L235D, L235S, L235N, L235Q, L235T, L235H, L235Y, L235I, L235V, L235F, S239D, S239E, S239N, S239Q, S239F, S239T, S239H, S239Y, V240I, V240A, V240T, V240M, F241W, F241L, F241Y, F241E, F241R, F243W, F243L, F243Y, F243R, F243Q, P244H, P245A, P247V, P247G, V262I,
- 10 V262A, V262T, V262E, V263I, V263A, V263T, V263M, V264L, V264I, V264W, V264T, V264R, V264F, V264M, V264Y, V264E, D265G, D265N, D265Q, D265Y, D265F, D265V, D265I, D265L, D265H, D265T, V266I, V266A, V266T, V266M, S267Q, S267L, E269H, E269Y, E269F, E269R, Y296E, Y296Q, Y296D, Y296N, Y296S, Y296T, Y296L, Y296I, Y296H,
- 15 N297S, N297D, N297E, A298H, T299I, T299L, T299A, T299S, T299V, T299H, T299F, T299E, W313F, N325Q, N325L, N325I, N325D, N325E, N325A, N325T, N325V, N325H, A327N, A327L, L328M, L328D, L328E, L328N, L328Q, L328F, L328I, L328V, L328T, L328H, L328A, P329F, A330L, A330Y, A330V, A330I, A330F, A330R, A330H, I332D, I332E, I332N, I332Q,
- 20 I332T, I332H, I332Y e I332A, em que a numeração dos resíduos na região de Fc é aquela do índice EU como em Kabat. As variantes de Fc podem da mesma forma ser selecionadas do grupo consistindo em V264L, V264I, F241W, F241L, F243W, F243L, F241L/F243L/V262I/V264I, F241W/F243W, F241W/F243W/V262A/V264A, F241L/V262I, F243L/V264I, F243L/V262I/
- 25 V264W, F241Y/F243Y/V262T/V264T, F241E/F243R/V262E/V264R, F241E/F243Q/V262T/V264E, F241R/F243Q/V262T/V264R, F241E/F243Y/V262T/V264R, L328M, L328E, L328F, I332E, L328M/I332E, P244H, P245A, P247V, W313F, P244H/P245A/P247V, P247G, V264I/I332E, F241E/F243R/V262E/V264R/I332E, F241E/F243Q/V262T/V264E/I332E, F241R/F243Q/V262T/V264R/I332E, F241E/F243Y/V262T/V264R/I332E, S298A/I332E,
- 30 S239E/I332E, S239Q/I332E, S239E, D265G, D265N, S239E/D265G, S239E/D265N, S239E/D265Q, Y296E, Y296Q, T299I, A327N,

S267Q/A327S, S267L/A327S, A327L, P329F, A330L, A330Y, I332D, N297S, N297D, N297S/I332E, N297D/I332E, N297E/I332E, D265Y/N297D/I332E, D265Y/N297D/T299L/I332E, D265F/N297E/I332E, L328I/I332E, L328Q/I332E, I332N, I332Q, V264T, V264F, V240I, V263I, V266I, T299A,

5 T299S, T299V, N325Q, N325L, N325I, S239D, S239N, S239F, S239D/I332D, S239D/I332E, S239D/I332N, S239D/I332Q, S239E/I332D, S239E/I332N, S239E/I332Q, S239N/I332D, S239N/I332E, S239N/I332N, S239N/I332Q, S239Q/I332D, S239Q/I332N, S239Q/I332Q, Y296D, Y296N, F241Y/F243Y/V262T/V264T/N297D/I332E, A330Y/I332E, V264I/A330Y/I

10 I332E, A330L/I332E, V264I/A330L/I332E, L234D, L234E, L234N, L234Q, L234T, L234H, L234Y, L234I, L234V, L234F, L235D, L235S, L235N, L235Q, L235T, L235H, L235Y, L235I, L235V, L235F, S239T, S239H, S239Y, V240A, V240T, V240M, V263A, V263T, V263M, V264M, V264Y, V266A, V266T, V266M, E269H, E269Y, E269F, E269R, Y296S, Y296T, Y296L,

15 Y296I, A298H, T299H, A330V, A330I, A330F, A330R, A330H, N325D, N325E, N325A, N325T, N325V, N325H, L328D/I332E, L328E/I332E, L328N/I332E, L328Q/I332E, L328V/I332E, L328T/I332E, L328H/I332E, L328I/I332E, L328A, I332T, I332H, I332Y, I332A, S239E/V264I/I332E, S239Q/V264I/I332E, S239E/V264I/A330Y/I332E, S239E/V264I/S298A/

20 A330Y/I332E, S239D/N297D/I332E, S239E/N297D/I332E, S239D/D265V/N297D/I332E, S239D/D265I/N297D/I332E, S239D/D265L/N297D/I332E, S239D/D265F/N297D/I332E, S239D/D265Y/N297D/I332E, S239D/D265H/N297D/I332E, S239D/D265T/N297D/I332E, V264E/N297D/I332E, Y296D/N297D/I332E, Y296E/N297D/I332E, Y296N/N297D/I332E, Y296Q/N297D/

25 I332E, Y296H/N297D/I332E, Y296T/N297D/I332E, N297D/T299V/I332E, N297D/T299I/I332E, N297D/T299L/I332E, N297D/T299F/I332E, N297D/T299H/I332E, N297D/T299E/I332E, N297D/A330Y/I332E, N297D/S298A/A330Y/I332E, S239D/A330Y/I332E, S239N/A330Y/I332E, S239D/A330L/I332E, S239N/A330L/I332E, V264I/S298A/I332E, S239D/S298A/I332E,

30 S239N/S298A/I332E, S239D/V264I/I332E, S239D/V264I/S298A/I332E, E S239D/264I/A330L/I332E, em que a numeração dos resíduos na região de Fc é aquela do índice EU como em Kabat. Veja da mesma forma PCT WO

2004/029207, 8 de abril de 2004, incorporado aqui por referência.

Atividade de ADCC associada ao anticorpo pode ser monitorada e quantificada através da medida de liberação de lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante, que é liberado rapidamente no dano à membrana plasmática.

Outras modalidades alternativas para promover a citotoxicidade de células com tratamento de anticorpo incluem a estimulação mediada por anticorpo de cascatas de sinalização resultando na morte de célula à célula ligada por anticorpo. Além disso, a estimulação mediada por anticorpo do sistema imune inato (por exemplo através das células NK) pode da mesma forma resultar em morte das células de tumor ou células viralmente infectadas.

Deteccção de seqüência de CS1 para aplicações diagnósticas

Em um aspecto, os níveis de expressão de RNA de genes são determinados para estados celulares diferentes no distúrbio auto-imune ou canceroso, por exemplo, mieloma, fenótipo. Níveis de expressão de genes em tecido normal (por exemplo, não sofrendo um distúrbio) e em tecido doente (e em alguns casos, para variar gravidades de distúrbios que se referem ao prognóstico, como esboçado abaixo) são avaliados para fornecer os perfis de expressão. Um perfil de expressão de gene de um estado de célula particular ou ponto de desenvolvimento é essencialmente uma "impressão digital" do estado da célula. Enquanto dois estados podem ter um gene particular similarmente expresso, a avaliação de vários genes simultaneamente permite a geração de um perfil de expressão de gene que é refletivo do estado da célula. Comparando-se os perfis de expressão das células em estados diferentes, a informação com respeito a quais genes são importantes (incluindo igualmente supra- e infra-regulação de genes) em cada destes estados é obtida. Em seguida, o diagnóstico pode ser realizado ou confirmado para determinar se uma amostra de tecido tem o perfil de expressão de gene de tecido normal ou doente. Isto fornecerá o diagnóstico molecular de condições relacionadas.

"Expressão diferencial", ou equivalentes gramáticos como em-

pregados aqui, se referem às diferenças qualitativas ou quantitativas nos padrão de expressão de gene celular e/ou temporal dentro e entre as células e tecido. Desse modo, um gene diferencialmente expresso pode qualitativamente ter sua expressão alterada, incluindo uma ativação ou inativação, em, por exemplo, tecido normal versus doente. Os genes podem ser ligados ou desligados em um estado particular, relativo a outro estado desse modo permitindo a comparação de dois ou mais estados. Um gene qualitativamente regulado exibirá um padrão de expressão dentro de um estado ou tipo de célula que é detectável por técnicas padrão. Alguns genes serão expressos em um estado ou tipo de célula, porém não em ambos. Alternativamente, a diferença na expressão pode ser quantitativa, por exemplo, nessa expressão é aumentada ou diminuída; por exemplo, expressão de gene é supra-regulada, resultando em uma quantidade aumentada de transcrição, ou infra-regulada, resultando em uma quantidade diminuída de transcrição. O grau ao qual a expressão difere necessita apenas ser grande o suficiente para quantificar por meio de técnicas de caracterização padrão como esboçado abaixo, tal como por uso de disposições de expressão de Affymetrix GENECHIP® (disposição de *microchip* de DNA). Veja, Lockhart (1996) Nature Biotechnology 14:1675-1680. Outras técnicas incluem, porém não estão limitadas a, PCR de transcriptase reversa quantitativa, análise do norte, e proteção de RNase. Como esboçado anteriormente, preferivelmente a mudança na expressão (por exemplo, supra-regulação ou infra-regulação) é pelo menos 50%, mais preferivelmente pelo menos cerca de 100%, mais preferivelmente pelo menos cerca de 150%, mais preferivelmente pelo menos cerca de 200%, com de 300 a pelo menos 1000% sendo especialmente preferido.

A avaliação pode estar na transcrição de gene ou no nível de proteína. A quantidade de expressão de gene pode ser monitorada empregando sondas de ácido nucléico ao equivalente de RNA ou DNA da transcrição de gene e a quantificação de níveis de expressão de gene, ou, alternativamente, o produto de gene final propriamente dito (proteína) pode ser monitorado, por exemplo, com anticorpos para proteína de CS1 e imunoensai-

os padrão (ELISAs, etc.) ou outras técnicas, incluindo ensaios de espectroscopia de massa, ensaios de eletroforese de gel 2D, etc. Proteínas correspondentes a CS1, por exemplo, aquelas identificadas como sendo importantes em um fenótipo de doença, podem ser avaliados em um teste de diagnóstico de doença. Em outra modalidade, o monitoramento de expressão de gene é realizado simultaneamente em vários genes. O monitoramento de expressão de proteína múltiplo pode ser realizado também.

10 Nesta modalidade, as sondas de ácido nucléico de CS1 são ligadas aos biochips como esboçado aqui para a detecção e quantificação de seqüências de CS1 em uma célula particular. Os ensaios são da mesma forma descritos abaixo no exemplo. Técnicas de PCR podem ser empregadas para fornecer maior sensibilidade.

15 Em uma modalidade, ácidos nucléicos codificando CS1 são detectados. Embora DNA ou RNA codificando proteína de CS1 possa ser detectado, de interesse particular são métodos em que um mRNA codificando uma proteína de CS1 é detectado. As sondas para detectar mRNA podem ser uma sonda de nucleotídeo/desoxinucleotídeo que é complementar a e hibridiza com o mRNA e inclui, porém não é limitado a, oligonucleotídeos, cDNA ou RNA. As sondas também deveriam conter um rótulo detectável, como definido aqui. Em um método, o mRNA é detectado depois de imobilizar o ácido nucléico a ser examinado em um suporte sólido tal como membranas de náilon e hibridizar a sonda com a amostra. Seguindo a lavagem para remover a sonda não especificamente ligada, o rótulo é detectado. Em outro método, a detecção do mRNA é realizada *in situ*. Neste método, células permeabilizadas ou amostras de tecido são contatadas com uma sonda de ácido nucléico detectavelmente rotulada por tempo suficiente para permitir a sonda hibridizar com o mRNA alvo. Seguindo a lavagem para remover a sonda não especificamente ligada, o rótulo é detectado. Por exemplo, uma ribossonda rotulada por digoxigenina (sonda de RNA) que é complementar ao mRNA codificando uma mielomaproteína é detectada ligando-se a digoxigenina com um anticorpo secundário antidigoxigenina e desenvolvida com tetrazólio azul de nitro e fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indoila.

Em outra modalidade, várias proteínas das três classes de proteínas como descrito aqui (proteínas segregadas, transmembrana ou intracelulares) são empregadas em ensaios diagnósticos. As proteínas de CS1, anticorpos, ácidos nucleicos, proteínas modificadas e células contendo seqüências de CS1 são empregadas em ensaios diagnósticos. Isto pode ser realizado em um gene individual ou nível de polipeptídeo correspondente. Em uma modalidade, os perfis de expressão são empregados, preferivelmente junto com técnicas de avaliação de rendimento alto para permitir o monitoramento quanto aos genes de perfil de expressão e /ou polipeptídeos correspondentes.

Como descrito e definido aqui, proteína de CS1 encontra uso como um marcador de doença de distúrbios auto-imunes, tais como SLE, RA, e IBD e condições cancerosas, tais como mieloma e leucemia de célula de plasma. Adicionalmente, CS1 encontra uso como um marcador para propósitos de prognóstico ou diagnóstico. A detecção destas proteínas em tecido doente putativo permite a detecção, prognóstico ou diagnósticos de tais condições e para seleção de estratégia terapêutica. Em uma modalidade, os anticorpos são empregados para detectar CS1. Um método preferido separa as proteínas de uma amostra por eletroforese em um gel (tipicamente desnaturando e reduzindo gel de proteína, porém pode ser outro tipo de gel, incluindo géis de focalização isoeletrica e similares). Seguindo a separação das proteínas, CS1 é detectado, por exemplo, por imunomanchamento com anticorpos elevados contra CS1.

Em outro método, anticorpos para CS1 encontram uso em técnicas de imageamento *in situ*, em histologia. Veja, por exemplo, Asai, e outros (eds. 1993) *Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology* (vol. 37) Academic Press. Neste método, as células são contatadas com de um a muitos anticorpos à(s) proteína(s) de mieloma. Seguindo a lavagem para remover a ligação de anticorpo não-específico, a presença do anticorpo ou anticorpos é detectada. Em uma modalidade, o anticorpo é detectado incubando-se com um anticorpo secundário que contém um rótulo detectável. Em outro método, o anticorpo primário para CS1 contém um rótulo detectável, por e-

xemplo, um marcador de enzima que pode agir sobre o substrato. Em outra modalidade, cada um dos anticorpos primários múltiplos contém um rótulo detectável e distinto. Este método encontra uso particular na avaliação simultânea para CS1 junto com outros marcadores das condições anteriormente mencionadas. Muitas outras técnicas de imageamento histológicas são da mesma forma fornecidas pela invenção.

Em uma modalidade, o rótulo é detectado em um fluorômetro que tem a capacidade de detectar e distinguir as emissões de comprimentos de onda diferentes. Além disso, um separador de célula ativada por fluorescência (FACS) pode ser empregado no método.

Em outra modalidade, anticorpos encontram uso no diagnóstico de distúrbios auto-imunes, tal como SLE, RA e IBD e câncer, tal como mieloma e leucemia de célula de plasma, de sangue, soro, plasma, fezes e outras amostras. Tais amostras, portanto, são úteis como amostras a ser sondadas ou testadas quanto à presença de CS1. Os anticorpos podem ser empregados para detectar CS1 por técnicas de imunoensaio previamente descritas incluindo ELISA, imunomanchamento (Western blot), imunoprecipitação, tecnologia de BIACORE e similares. Inversamente, a presença de anticorpos pode indicar uma resposta imune contra uma proteína de CS1 endógena.

Em outra modalidade, hibridização *in situ* de sondas de ácido nucléico de CS1 rotuladas para disposições de tecido é feita. Por exemplo, disposições de amostras de tecido, incluindo tecido doente e/ou tecido normal, são feitas. Hibridização *in situ* (veja, por exemplo, Ausubel, supra) é em seguida realizada. Ao comparar as impressões digitais entre um indivíduo e um padrão, um diagnóstico, um prognóstico ou uma predição pode ser baseado nas descobertas. É também entendido que os genes que indicam o diagnóstico podem se diferir daqueles que indicam o prognóstico e perfilamento molecular da condição das células pode levar as distinções entre condições responsivas ou refratárias ou pode ser predizível de resultados.

Em uma modalidade, as proteínas de CS1, anticorpos, ácidos nucléicos, proteínas modificadas e células contendo seqüências de CS1 são

empregadas em ensaios prognósticos. Como acima, os perfis de expressão de gene podem ser gerados os quais correlacionam a um estado de doença, clínico, patológico ou outra informação, em termos de prognóstico a longo prazo. Novamente, isto pode ser feito em uma proteína ou nível de gene, com o uso de genes sendo preferido. Genes múltiplos ou únicos podem ser úteis em várias combinações. Como acima, as sondas de CS1 podem ser ligadas a biochips para a detecção e quantificação de seqüências de CS1 em um tecido ou paciente. Os ensaios procedem como esboçado acima para diagnóstico. O método de PCR pode fornecer quantificação mais sensível e precisa.

Genes úteis em ensaios prognósticos são genes que são diferencialmente expressos de acordo com o estágio da doença do paciente. Em uma modalidade, os genes podem ser expressos exclusivamente de acordo com o estágio do paciente. Em outra modalidade, os genes podem ser expressos em níveis diferenciais de acordo com o estágio do paciente. Por exemplo, em mieloma, os pacientes estão de acordo com três estágios diferentes de acordo com a extensão e localização da doença: Estágios I, II e III. No Estágio I, os sintomas são moderados a não existentes, com muitos pacientes não mostrando sintomas de mieloma. Um diagnóstico positivo é a presença de células de tumor; entretanto, o número de hemácias é normal ou ligeiramente abaixo de faixa normal, não há aumento detectável no cálcio no sangue, há níveis muito baixos de proteína M no sangue ou urina e nenhum dano ósseo detectável pode ser visto em raios X. No Estágio II, as células de câncer são predominantes em números mais altos. A função de rim pode ser afetada, que piora o diagnóstico de prognóstico para a maioria dos pacientes. O estágio II realiza anemia, hipercalcemia, dano ósseo avançado e níveis altos de proteína M no sangue e urina. A correlação da expressão de proteína com estágios diferentes em distúrbio auto-imune pode da mesma forma mostrar ser útil na determinação do prognóstico de tais distúrbios. A correlação de genes expressos nos estágios diferentes, unicamente expressos ou tendo níveis de expressão diferenciais de acordo com o estágio, pode ser empregada para determinar a viabilidade de induzir a re-

missão em um paciente. Isto seria especialmente útil nos estágios mais precoces da doença, onde os pacientes com mieloma exibem poucos sintomas. Além disso, genes que são expressos indicando o começo de complicações a longo prazo, tal como microglobulina de beta-2 (indicador de dano no rim), bem como níveis altos de albumina de soro e lactato desidrogenase, podem ser da mesma forma úteis como uma ferramenta prognóstica.

A correlação de genes expressos em estágios diferentes, exclusivamente expressos ou tendo níveis de expressão diferenciais de acordo com o estágio, pode da mesma forma ser monitorada para determinar a eficácia do tratamento empregando os terapêuticos descritos na presente invenção. Por exemplo, pacientes tratados com antagonistas da presente invenção podem ser monitorados quanto a eficácia terapêutica dos referidos antagonistas através do monitoramento de marcadores, incluindo por exemplo, CS1 ou CS1 em combinação com marcadores específicos de distúrbio (por exemplo, o monitoramento da proteína M para o tratamento de mieloma). O monitoramento destes marcadores específicos será importante na determinação da eficácia da invenção terapêutica, bem como na determinação da dosagem e método de considerações de tratamento para as indicações diferentes da presente invenção.

20 Indução de distúrbios de doença como sistemas modelo *in vivo*

Doença de Intestino Inflamatória

Modelos *in vivo* experimentais foram desenvolvidos para a investigação de processos patológicos de doença de intestino inflamatória. Sartor RB, Aliment. Pharmacol. Ther. 11:89-96 (1997). Por exemplo, camundongos transgênicos de nocaute podem ser feitos, em que o gene da doença de intestino inflamatória é rompido ou em que um gene de doença de intestino inflamatória é inserido. Camundongos transgênicos de nocaute podem ser feitos por inserção de um gene marcador ou outro gene heterólogo no sítio de gene de doença de intestino inflamatória endógeno no genoma do camundongo por meio da recombinação homóloga. Tais camundongos podem da mesma forma ser feitos substituindo-se o gene de doença de intestino inflamatória endógeno com uma versão mutada do gene de do-

ença de intestino inflamatória, ou mutando-se o gene de doença de intestino inflamatória endógeno, por exemplo, por exposição aos carcinógenos.

Um constructo de DNA é introduzido nos núcleos de células-tronco embrionárias. As células contendo a lesão genética recentemente construída são injetadas em um embrião de camundongo hospedeiro, que é reimplantado em uma fêmea receptora. Alguns destes embriões desenvolvem-se em camundongos quiméricos que possuem células de germe parcialmente derivadas da linhagem de célula mutante. Portanto, originando-se os camundongos quiméricos é possível obter uma linhagem nova de camundongos contendo a lesão genética introduzida (veja, por exemplo, Capocchi, e outros (1989) *Science* 244:1288-1292). Camundongos alveados quiméricos podem ser derivados de acordo com Hogan, e outros (1988) *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* CSH Press; e Robertson (ed. 1987) *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach* IRL Press, Washington, D.C.

Outros métodos podem ser construídos empregando manipulação não-genética de modelos animais. Um modelo em particular foi extensivamente empregado na avaliação de molécula pequena. Este modelo induz colite em ratos ou camundongos por um único desafio intracolônico com uma solução do ácido hapteno 2,4-trinitrobenzenossulfônico (TNBS). Morris GP e outros, *Gastroenterology* 96:795-803 (1989); Boughton-Smith NK, Br. J. Pharmacol. 94:65-72 (1988). O tratamento com TNBS produz uma intensa resposta inflamatória local que alcança seu nadir depois de 2 a 3 dias e pode durar até 21 dias, dependendo da gravidade do desafio.

A resposta inflamatória produzida por tratamento de TNBS é considerada para reproduzir muitas dentre as indicações macroscópicas, histológicas e imunológicas da doença de Crohn. Grisham MB e outros, *Gastroenterology* 101:540-547 (1991); Yamada Y e outros, *Gastroenterology* 102:524-534 (1992); Torres MI e outros, *Dig. Dis. Sci* 44:2523-29 (1999); Neruath M, Fuss I, Strober W, *Int. Rev. Immunol.* 19:51-62 (2000). Ulceração aberta é observada, com inflamação transmural e espessamento da parede do intestino. Características histológicas incluem arquitetura de cripta torci-

da, atrofia de cripta, granulomata, células gigantes, agregados de linfóides basais e a presença de um infiltrado inflamatório.

O modelo foi empregado para estudar e validar a inflamação colônica, e dirigir aspectos de doença de intestino inflamatória. Hoffman P e outros, Gut 41:195-202 (1997); Jacobson K, McHugh K, Collins SM, Gastroenterology 112:156-62 (1997).

Outros modelos animais incluem ratos transgênicos HLA-B27 (Hammer RE e outros, Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 e Human b2M: An animal model of HLA-B27 associated human disorders, Cell 63:1088-1112 (1990)), camundongos deficientes transgênicos IL-2 (Baumgart DC e outros, Mechanisms of intestinal epithelial cell injury and colitis in interleukin 2 deficient mice, Cell Immunol. 187:52-66 (1998)), camundongos deficientes mdr1a (Panwala CM e outros, A Novel Model of Inflammatory Bowel Disease: Mice deficient for the multiple drug resistance gene, mdr1a, spontaneously develop colitis, J. Immunol. 161:5733-44 (1998)), e camundongos deficientes IL 10 (Freeman HJ, Studies on the interleukin-10 gene in animal models of colitis, Canadian Gastroenterology (2003)).

Mieloma

Modelos *in vivo* experimentais foram desenvolvidos para a investigação de processos patológicos de mieloma. Sartor RB, Aliment. Pharmacol. Ther. 11:89-96 (1997). Por exemplo, camundongos transgênicos de nocaute podem ser feitos, em que o gene de mieloma é rompido ou em que um gene de mieloma é inserido. Camundongos transgênicos de nocaute podem ser feitos por inserção de um gene marcador ou outro gene heterólogo no sítio de gene de mieloma endógeno no genoma do camundongo por meio da recombinação homóloga. Tais camundongos podem da mesma forma ser feitos substituindo-se o gene de mieloma endógeno com uma versão mutada do gene de mieloma, ou mutando-se o gene de mieloma endógeno, por exemplo, por exposição aos carcinógenos.

Um constructo de DNA é introduzido nos núcleos de células-tronco embrionárias. As células contendo a lesão genética recentemente

construída são injetadas em um embrião de camundongo hospedeiro, que é reimplantado em uma fêmea receptora. Alguns destes embriões desenvolvem-se em camundongos quiméricos que possuem células de germe parcialmente derivadas da linhagem de célula mutante. Portanto, originando-se os camundongos quiméricos é possível obter uma linhagem nova de camundongos contendo a lesão genética introduzida (veja, por exemplo, Capocchi, e outros (1989) Science 244:1288-1292). Camundongos alvejados quiméricos podem ser derivados de acordo com Hogan, e outros (1988) Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual CSH Press; e Robertson (ed. 1987) Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach IRL Press, Washington, D.C.

Outros modelos podem ser construídos empregando manipulação não-genética de modelos animais. Por exemplo, injetar camundongos C57BL/6J com tumores de célula B (por exemplo, células LLC) podem induzir metástase de pulmão. Outros modelos animais utilizam camundongos SCID e injetam linhagens de tumor de célula B (por exemplo, células HsSultan (ATCC) ou linhagens de mieloma múltiplos, (por exemplo, porém não limitado a, L363, LP-1, OPM-2, ou RPMI 8226) para induzir características como mieloma. Ainda outros modelos animais incluem um modelo de camundongo NOD/SCID para mieloma múltiplo humano gerado implantando-se ossos fetais humanos (FBs) em sítios subcutâneos de camundongos NOD/SCID, seguidos por inoculação com células mononucleares de medula óssea primária obtidas de pacientes com mieloma múltiplo nos FBs. Veja Shang-Yi H, e outros, Amer. J. Invest. Pathol. 164:747-756 (2004). Modelos de plasmacitoma de camundongo, cuja formação é induzida através do tratamento com óleo de *pristane* (2,6, 10, 12-tetrametilpentadecano) podem da mesma forma ser empregados. Além disso, os modelos de camundongo em que a injeção de células de mieloma diretamente na medula óssea (modelo de injeção ortotópico) de SCID, SCID/beige ou camundongos NOD/SCID, podem da mesma forma ser empregados.

Células que sofrem transformação, como em células de mieloma, liberam uma quantidade aumentada de certos fatores (em seguida

"marcadores específicos de mieloma") do que as contrapartes normais. Por exemplo, CD38, CD9, CD10, HLA-DR, e CD20 são aumentados na expressão em células de mieloma. Ruiz-Aruggles GJ e San Miguel JF, *Cell Surface Markers in Multiple Myeloma*, Mayo Clin. Proc. 69:684-90 (1994).

- 5 Várias técnicas que medem a liberação destes fatores são descritas em Freshney (1998), supra. Da mesma forma, veja, Unkeless, e outros (1974) J. Biol. Chem. 249:4295- 4305; Strickland e Beers (1976) J. Biol. Chem. 251:5694-5702; Whur, e outros (1980) Br. J. Cancer 42:305-312; Gullino "Angiogenesis, tumor vascularization and potential interference with tumor growth" pp. 178-184 em Mihich (ed. 1985) Biological Responses in cancer Plenum; Freshney (1985) Cancer Res. 5:111-130.
- 10

Métodos Terapêuticos

Tratamento de Doença Auto-imune

- Em um aspecto, a presente invenção é direcionada a um método de reduzir a proliferação, adesão, diferenciação, ativação e/ou de co-ativação de leucócitos, compreendendo contatar os leucócitos com antagonista de CS1 descrito aqui.
- 15

- Em outro aspecto, a presente invenção é direcionada a um método de reduzir a segregação (ou produção) de imunoglobulina por linfócitos (tal como células B), compreendendo contatar os linfócitos com um antagonista de CS1 descrito aqui. Os antagonistas da presente invenção podem reduzir a produção de imunoglobulina (tal como, IgM, IgG, IgD, IgA, e IgE) por pelo menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, ou 50%. A mudança da porcentagem é calculada subtraindo-se a concentração de imunoglobulina antes da administração da primeira dose do anticorpo (dia 0) da concentração de imunoglobulina após dose (dia x), dividindo-se pela concentração de imunoglobulina antes da primeira dose (dia 0), e multiplicando-se por 100, por exemplo, $[(\text{dia } x - \text{dia } 0) / \text{dia } 0] \times 100$.
- 20
- 25

- Em ainda outro aspecto, a presente invenção é direcionada a um método de induzir a apoptose ou citólise das células expressando CS1 compreendendo contatar as células com um anticorpo contra CS1 descrito aqui. Em uma modalidade preferida, a indução é obtida por meio da citotóxi-
- 30

dade celular dependente de anticorpo (ADCC). Em geral, os anticorpos da presente invenção ligam antígenos sobre a superfície de células alvo (células que expressam CS1) na presença de células efetoras (tal como células exterminadoras naturais ou macrófagos). Receptores de Fc em células efetoras reconhecem anticorpos ligados. A reticulação de receptores de Fc sinalizam as células efetoras para matar as células alvo por citólise ou apoptose. A citólise pode ser detectada por meio da detecção da liberação do rótulo ou lactato desidrogenase das células lisadas ou detecção da viabilidade de célula alvo reduzida (por exemplo, ensaio de anexina). Os ensaios para apoptose podem ser realizados por ensaio de rotulagem (TUNEL) de extremidade de entalhe de digoxigenin-11-dUTP mediado por desoxinucleotidil transferase (Lazebnik e outros, Nature: 371, 346 (1994). A citotoxicidade pode da mesma forma ser detectada diretamente por *kits* de detecção conhecidos na técnica, tal como Cytotoxicity Detection Kit de Roche Applied Science (Indianapolis, IN). Preferivelmente, os anticorpos da presente invenção induzem pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, ou 80% de citotoxicidade das células alvo. A porcentagem é calculada pelos métodos descritos nos Exemplos.

Os antagonistas podem estabelecer contato com os leucócitos *in vitro* (tal como, adicionado-se os antagonistas em um ambiente de cultura de célula onde os leucócitos são cultivados), *ex vivo* ou *in vivo* (por exemplo, administrando-se os antagonistas em um indivíduo).

Em uma modalidade preferida, os leucócitos são a) leucócitos ativados, tal como células B e/ou células T, preferivelmente células B CD19+ e/ou células T CD3+; b) células *naïve* e/ou ativadas CD14+; c) células dendríticas não-ativadas e/ou ativadas; e/ou c) células NKT e/ou CD56⁺ NK.

Em um aspecto preferido, a presente invenção fornece um método de reduzir a segregação de imunoglobulina por células B, em um indivíduo em necessidade deste, compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um antagonista de CS1 no referido indivíduo.

Em outro aspecto preferido, a presente invenção fornece um método de induzir a citotoxicidade, citólise e/ou apoptose de células expres-

sando CS1 em um indivíduo em necessidade deste, compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um anticorpo de CS1 no referido indivíduo.

Os antagonistas, preferivelmente anticorpos da presente invenção, podem ser empregados para a prevenção ou tratamento de doenças auto-imunes, incluindo, porém não limitadas a, doença de Addison, doenças auto-imunes do ouvido, doenças auto-imunes do olho tal como uveíte, hepatite auto-imune, doença de Crohn, diabetes (Tipo I), epididimite, glomerulonefrite, doença de Graves, síndrome de Guillain-Barre, doença de Hashimoto, anemia hemolítica, lúpus eritematoso sistêmico (SLE), esclerose múltipla, miastenia grave, pênfigo vulgar, psoríase, artrite reumática, sarcoidose, escleroderma, psoríase, síndrome de Sjogren, espondiloartropatias, tireoidite, colite ulcerativa, e/ou vasculite.

Em uma modalidade preferida, a doença auto-imune que pode ser prevenida e/ou tratada com os métodos da presente invenção é SLE, RA ou IBD. Depois de ser administrado em um indivíduo que tem desenvolvido os sintomas de SLE, RA, ou IBD, os anticorpos anti-CS1 deveriam ser capazes de reduzir a gravidade dos sintomas. Alternativamente, os anticorpos anti-CS1 podem ser administrados a um indivíduo antes que o indivíduo desenvolvesse quaisquer manifestações clínicas de SLE, RA, ou IBD. Uma tal administração preventiva dos anticorpos deveria prevenir completamente o indivíduo de desenvolver quaisquer sintomas de SLE, RA, ou IBD ou pelo menos deveria prevenir o indivíduo de desenvolver tantos sintomas graves quanto na condição sem o tratamento de anticorpo. A gravidade dos sintomas de SLE, RA, ou IBD pode ser medida pelo teste clínico padrão para SLE, RA, ou IBD conhecido na técnica, tal como nível de soro de anticorpos anti-DNA, proteinúria e a taxa de mortalidade dos pacientes.

Métodos terapêuticos são usualmente aplicados em pacientes humanos porém podem ser aplicados em outros mamíferos.

Tratamento de Câncer

Métodos terapêuticos para reduzir a proliferação de células de mieloma são da mesma forma incluídos, compreendendo contatar células de mieloma com um antagonista de uma proteína de mieloma, preferivelmente

um anticorpo ou outro antagonista, tal como os anticorpos de CS1 descritos aqui. Por exemplo, os anticorpos podem fazer contato com células de mieloma *in vitro* (tal como, adicionando-se os antagonistas em um ambiente de cultura de célula onde as células de mieloma são cultivadas), *ex vivo*, ou *in vivo* (por exemplo, administrando-se os antagonistas em um indivíduo). Em outro aspecto, a presente invenção fornece um método de reduzir a proliferação de células de mieloma, compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um antagonista de proteína de mieloma no referido indivíduo.

Em um aspecto, os antagonistas, preferivelmente anticorpos da presente invenção, podem ser empregados para a prevenção ou tratamento de mieloma. Depois de ser administrado em um indivíduo que tem desenvolvido os sintomas de mieloma, os anticorpos ou antagonista deveriam ser capazes de reduzir a severidade dos sintomas. Alternativamente, os anticorpos da presente invenção podem ser administrados em um indivíduo antes que o indivíduo desenvolvesse quaisquer manifestações clínicas de mieloma. A gravidade de sintomas de mieloma pode ser avaliada pelo teste clínico padrão para mieloma conhecido na técnica, tal como análise de raio X de densidade óssea, níveis de microglobulina de beta-2 ou hipercalcemia. Métodos terapêuticos são usualmente aplicados a pacientes humanos porém podem ser aplicados a outros mamíferos.

Em ainda outro aspecto, a presente invenção é direcionada a um método de induzir apoptose ou citólise de células expressando CS1 compreendendo contatar as células com um anticorpo contra CS1 descrito aqui. Em uma modalidade preferida, a indução é obtida por meio de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). Em geral, os anticorpos da presente invenção ligam antígenos na superfície de células alvo (células que expressam CS1) na presença de células efetoras (tal como células exterminadoras naturais ou macrófagos). Receptores Fc em células efetoras reconhecem anticorpos ligados. A reticulação de receptores de Fc sinaliza as células efetoras para matar as células alvo por citólise ou apoptose. A citólise pode ser detectada por meio da liberação de rótulo ou lactato desidrogenase das células lisadas, ou detecção de viabilidade de célula alvo reduzida

(por exemplo, ensaio de anexina). Ensaios para apoptose podem ser realizados por ensaio de rotulagem (TUNEL) de extremidade de entalhe de digoxigenin-11-dUTP mediado por desoxinucleotidil transferase terminal (Lazebnik e outros, Nature: 371, 346 (1994)). A citotoxicidade pode ser diretamente detectada por *kits* de detecção conhecidos na técnica, tal como Cytotoxicity Detection Kit from Roche Applied Science (Indianapolis, IN). Preferivelmente, os anticorpos da presente invenção induzem pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, ou 80% de citotoxicidade das células alvo. A porcentagem é calculada pelos métodos descritos nos Exemplos.

10 Os antagonistas podem da mesma forma fazer contato com leucócitos *in vitro* (tal como, adicionando-se os antagonistas em um ambiente de cultura de célula onde os leucócitos são cultivados), *ex vivo*, ou *in vivo* (por exemplo, administrando-se os antagonistas em um indivíduo).

Em uma modalidade preferida, os leucócitos são a) linfócitos
15 ativados, tal como células B e/ou células T, preferivelmente células B CD19⁺ e/ou células T CD3⁺; b) células *naïve* e/ou ativadas CD14⁺; c) células dendríticas não ativadas e/ou ativadas; e/ou c) células NKT e/ou NK CD56⁺.

Em um aspecto preferido, a presente invenção fornece um método de reduzir a segregação de imunoglobulina por células B, em um indivíduo em necessidade deste, compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um antagonista de CS1 no referido indivíduo. Tal redução de segregação de imunoglobulina por células B pode ajudar a abrandar as complicações de mieloma, incluindo síndrome de hiperviscosidade.

Em outro aspecto preferido, a presente invenção fornece um
25 método de induzir a citotoxicidade, citólise e/ou apoptose de células expressando CS1 em um indivíduo em necessidade deste, compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um anticorpo de CS1 no referido indivíduo.

Administração de Agentes Terapêuticos

Há vários métodos de administrar os antagonistas, por exemplo,
30 anticorpos da presente invenção. Administração parenteral é preferida. O anticorpo pode ser administrado em um paciente intravenosamente como um bolo ou por infusão contínua durante um período de tempo; ou por roti-

nas intramuscular, subcutânea, intraperitoneal ou intra-cerebroespinhal. Rotinas oral, tópica, inalação, ou outros meios de liberação conhecidos por aqueles versados na técnica são da mesma forma incluídas na presente invenção.

5 As composições farmacêuticas da presente invenção comumente compreendem uma solução de antagonistas (por exemplo, anticorpos), ou um coquetel desta dissolvido aqui em veículo aceitável, preferivelmente um veículo aquoso. Uma variedade de veículos aquosos pode ser empregada, por exemplo, água para injeção (WFI) ou água tamponada com fosfato, citrato, acetato, etc. em um pH tipicamente de 5,0 a 8,0, mais freqüentemente 10 6,0 a 7,0, e/ou contendo sais tal como cloreto de sódio, cloreto de potássio, etc. para tornar isotônico. O veículo pode da mesma forma conter excipientes tal como albumina sérica humana, polissorbato 80, açúcares ou aminoácidos para proteger a proteína ativa. A concentração de um antagonista (por exemplo, anticorpo) nestas formulações varia amplamente de cerca de 0,1 a 15 100 mg/ml porém está freqüentemente na faixa de 1 a 10 mg/ml. O anticorpo monoclonal formulado é particularmente adequado para administração parenteral e pode ser administrado como uma infusão intravenosa ou por injeção subcutânea, intramuscular ou intravenosa. Métodos atuais para preparar composições parenteralmente administráveis são conhecidos ou evi- 20 dentes por aqueles versados na técnica e são descritos em mais detalhes em, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Science (15^o Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1980) que é incorporado aqui por referência. A presente invenção fornece uma composição farmacêutica compreendendo 25 qualquer um dos anticorpos descritos aqui.

As composições podem ser administradas para tratamentos terapêuticos e/ou profiláticos, compreendendo inibir as interações entre um CS1 e seu substrato celular, inibindo a adesão de células doentes ou prevenir e/ou reduzir os sintomas clínicos dos distúrbios acima. Uma quantidade 30 adequada para realizar qualquer um destes efeitos desejados é definida como uma "quantidade eficaz". Os anticorpos podem ser liberados em um paciente por administrações múltiplas ou únicas.

Para propósito de tratamento de doença, a dosagem apropriada dos antagonistas (por exemplo, anticorpos) dependerá da gravidade e curso de doença, da resposta e história clínica do paciente, da toxicidade dos anticorpos, e da discricção do médico assistente. Os antagonistas são administrados adequadamente ao paciente de uma vez ou durante uma série de tratamentos. A dosagem candidata inicial pode ser administrada em um paciente. A própria dosagem e regime de tratamento podem ser estabelecidos monitorando-se o progresso de terapia empregando técnicas convencionais conhecidas pelas pessoas versadas na técnica.

- Adicionalmente, o antagonista (tal como anticorpos) pode ser utilizado sozinho em forma substancialmente pura, ou junto com agentes terapêuticos para doenças auto-imunes conhecidas por aqueles versados na técnica. Outras terapias que podem ser empregadas junto com tratamento com os anticorpos incluem a administração de moléculas de ácido nucléico anti-sentido ou biológicas, tal como anticorpos terapêuticos adicionais. Dessa maneira, o tratamento da presente invenção é formulado de uma maneira permitindo ser administrado consecutivamente ou em combinação com outro agente para o tratamento de doenças auto-imunes. Por tratar distúrbios auto-imunes e mieloma, o anticorpo será administrado frequentemente depois ou em combinação com uma ou mais outras drogas imunossupressoras e imunomoduladoras.

Kits para Uso em Aplicações Prognósticas e/ou Diagnósticas

- Para uso em aplicações de pesquisa e diagnósticas sugeridas acima, *kits* são da mesma forma fornecidos pela invenção. Em aplicações de pesquisa e diagnósticas, tais *kits* podem incluir pelo menos um dos seguintes: reagentes de ensaio, tampões, ácidos nucléicos específicos de CS1 ou anticorpos, iniciadores e/ou sondas de hibridização, polinucleotídeos anti-sentidos, ribozimas, polipeptídeos ou polinucleotídeos de CS1 negativos dominantes, inibidores de molécula pequena de seqüências associadas de CS1 etc.

Além disso, os *kits* podem incluir materiais instrutivos contendo instruções (por exemplo, protocolos) para a prática dos métodos desta in-

venção. Enquanto os materiais instrutivos tipicamente compreendem materiais impressos ou escritos, eles não são limitados para tais. Um meio capaz de armazenar tais instruções e comunicá-las a um usuário final é considerado por esta invenção. Tais meios incluem, porém não são limitados a, meios de armazenagem eletrônicos (por exemplo, discos magnéticos, fitas, cartuchos, *chips*), meio ótico (por exemplo, CD ROM), e similares. Tais meios podem incluir endereços para *sites* de *internet* que fornecem tais materiais instrutivos.

A presente invenção da mesma forma fornece *kits* para avaliar quanto aos moduladores de seqüências associadas a CS1. Tais *kits* podem ser preparados de reagentes e materiais facilmente disponíveis. Por exemplo, tais *kits* podem compreender um ou mais dos seguintes materiais: um polipeptídeo ou polinucleotídeo associado a CS1, tubos de reação e instruções para testar atividade associada a CS1. Opcionalmente, o *kit* contém proteína de CS1 biologicamente ativa. Uma ampla variedade de *kits* e componentes pode ser preparada de acordo com a presente invenção, dependendo do usuário destinado do *kit* e das necessidades particulares do usuário. Diagnóstico tipicamente envolveria avaliação de uma pluralidade de genes ou produtos. Os genes tipicamente serão selecionados com base nas correlações com parâmetros importantes em doença que podem ser identificados em dados de resultado ou históricos.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Isolamento e Identificação de CS1

CS1 foi identificado de uma biblioteca de subtração de cDNA de subgrupos célula B (células B *naïve* vs. memória + plasma) de sangue periférico de adulto sadio normal. CS1 foi preferencialmente expresso entre as células B de memória e plasma. Bibliotecas de subtração foram produzidas seguindo-se o protocolo descrito abaixo:

Isolamento de subgrupos célula B:

Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foram isoladas de nove doadores adultos sadios com gradientes Ficoll-hypaque padrão. Células B foram isoladas das PBMCs seguindo-se um protocolo de

seleção negativo padrão. As PBMCs foram incubadas em um coquetel de anticorpo de CD2, CD3, CD4, CD14, CD16, CD56, CD66 e glicoforina A anti-humano de camundongo purificado. Depois da incubação e lavagem, contas Dynal magnéticas de cabra-anticamundongo foram adicionadas em 7-10
 5 contas por célula. Subseqüentemente, as células ligadas por anticorpo foram isoladas com um fixador magnético Dynal padrão para deixar as células B enriquecidas nos sobrenadantes. Os sobrenadantes coletados foram em seguida lavados com RPMI + 10% de soro bovino fetal (FBS).

Classificação de subgrupos Célula B (células B Naïve vs. Memória + Plasma):

10

Células B enriquecidas de Dynal foram manchadas com IgD-FITC, CD38-cicromo, CD19-APC, e CD27-PE seguindo-se os protocolos de manchamento padrão. As duas populações separadas de células B *naïve* (IgD⁺CD19⁺CD38^{int/-}CD27⁻) versus células B de memória e plasma (IgD⁺
 15 CD19⁺CD38^{int/+}CD27⁺) foram classificadas em um citômetro de Fluxo de Alto Desempenho MoFlo - MLS, que é equipado com um leiser de argônio resfriado a ar de físicos de espectros (488 nm) e um laser de diodo de 635-nm e com filtros para detecção de FITC em 530/40nm, PE em 580/30 nm, APC em 670/20 nm, e cicromo (PE-Cy5) em 670/30 nm. As células B classifica-
 20 das foram analisadas no citômetro MoFlo quanto à pureza e foram constatadas ser de 97% (células B de memória e plasma) e 98% (células B *naïve*) de pureza. As células classificadas foram colocadas em Trizol e armazenadas a -70°C.

Produção de Biblioteca de cDNA:

25

As bibliotecas de subtração de cDNA foram feitas dos subgrupos célula B classificadas empregando-se um protocolo de hibridização subtrativo de análise de diferença representacional padrão. As bibliotecas de subtração incluíram a biblioteca de cDNA de célula B de memória + plasma, onde o cDNA *naïve* foi subtraído duas vezes e a biblioteca de cDNA de célula B *naïve* onde o cDNA de memória + plasma foi subtraído duas vezes.
 30 Com técnicas de biologia molecular padrão, a biblioteca de subtração de cDNA foi ligada em um vetor de plasmídeo padrão e transformada em células

de *E. coli* eletrocomponentes (DH-10B). As células de *E. coli* transformadas foram semeadas em placas de ágar LB na presença de antibióticos de seleção. Colônias bacterianas únicas, cada representando uma inserção específica, foram amplificadas empregando PCR de colônia padrão.

5 Avaliação e Confirmação da Expressão Diferencial:

As inserções de biblioteca de subtração de cDNA foram desnaturadas e manchadas em 2 filtros de náilon idênticos e hibridizadas separadamente com duas sondas rotuladas diferente-(memória + plasma) - cDNA *naïve* (subtraído duas vezes) e *naïve* - (memória + plasma) cDNA (subtraído duas vezes). Uma inserção de cDNA de biblioteca de subtração foi considerada positiva se a inserção seletivamente hibridizasse preferencialmente com uma das duas sondas. Os clones de cDNA para CS1 hibridizado preferencialmente com a sonda de cDNA de (memória + plasma) - cDNA *naïve* (subtraída duas vezes).

15 Identificação de CS1:

Células bacterianas transformadas com clones positivos foram crescidas e DNA foi isolado com um *kit* Qiagen® Mini-Prep (preparações diagnósticas *in vitro*) seguindo o protocolo do fabricante (Qiagen, Valencia, California). Os plasmídeos purificados foram seqüenciados e a identidade da seqüência de DNA foi determinada pesquisando-se as bases de dados de NCBI.

20 Caracterização e Confirmação de Expressão de Gene CS1:

Expressão preferencial dos clones positivos selecionados, incluindo CS1, foi confirmada por análise de mancha em ponto. Quantidades iguais de (não subtraído) cDNA (20 ng) isolado de células B *naïve* versus memória + plasma isoladas foram manchadas em filtros de náilon e hibridizadas com inserção de cDNA rotulado para o clone positivo. Para estes ensaios, cDNA foi sintetizado de subgrupos célula B de sangue periférico obtidos de 2 classificações separadas (n=9 adultos sadios e n=10 adultos sadios, pureza > 97% e > 98%, respectivamente). Filtros foram lavados e sinal de sondas hibridizadas foi detectado por auto-radiografia. Um clone foi considerado positivo se cDNA preferencialmente hibridizasse para o cDNA de

célula B de memória + plasma através de ambos os grupos células B *naïve* versus memória + plasma classificadas. Como mostrado na Figura 1A, os dados indicaram que CS1 é predominantemente expressado em células B de plasma e memória.

5 CS1 é principalmente expressado em tecido linfóide:

Manchas em ponto foram preparadas de cDNA sintetizado de polIA⁺ RNA, que foi comprado de Clontech (Palo Alto, California) e feito dos seguintes tecidos: baço, linfonodo, medula óssea, intestino delgado, cérebro, pulmão, músculo esquelético, coração, rim e fígado. Manchas em ponto
10 foram sondadas com DNA de CS1 rotulado por digoxigenina (DIG) e visualizadas por quimiluminescência (anticorpo anti-DIG rotulado por fosfatase alcalina e CDP-Star) seguindo as recomendações do fabricante (*kit* Boehringer-Mannheim DIG). Como mostrado na Figura 1B, os resultados indicam que CS1 é principalmente expressado em tecidos linfóides (baço, linfonodo,
15 medula óssea e intestino delgado—possivelmente devido aos linfócitos residuais em emplastros de Peyer) e está ausente ou baixo em outros órgãos não-linfóides (cérebro, pulmão, músculo esquelético, coração, rim e fígado).

Exemplo 2: Expressão Diferencial de CS1

Células Humanas:

20 Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foram obtidas por isolamento de gradientes Ficoll-hypaque padrão. PBMCs isoladas foram em seguida ressuspensas em 2×10^6 de células/ml em um meio de cultura fresco. PBMCs foram estimuladas com fitoemaglutinina (PHA) em uma concentração de 3 µg/ml durante 3 dias ou com mitogênio de erva-dos-
25 cânceres (PWM) em uma concentração de 10 µg/ml durante 8 dias. PBMCs de controle não estimuladas foram preparadas sem qualquer estímulo. Células foram cultivadas a 37°C em 7% de CO₂ em meio de RPMI com 10% de FBS, penicilina, estreptomicina e aditivos de glicose.

Células de Camundongo:

30 Baços foram obtidos de dois camundongos Balb/c. Os baços foram colocados em filtros de 100 microns. Células foram desagregadas e lavadas com PBS e centrifugadas em 1.500 rpm durante 10 minutos. Hemá-

cias foram lisadas com 2 ml de tampão de lise a 37°C durante 2 minutos. As células foram lavadas duas vezes, ressuspensas em 10 ml do meio e contadas. Uma porção das células não estimuladas foi diretamente congelada. As células restantes foram estimuladas com *con A* em uma concentração de 5 µg/ml durante 3 dias ou com LPS em uma concentração de 1 µg/ml durante 3 dias. Células foram cultivadas em um meio de DMEM com 10% de FBS, antibióticos e aditivos de glicose.

Linfócitos B de Paciente com Lúpus versus Indivíduos Sadios Igualados por Idade:

10 Células B foram classificadas de células mononucleares de sangue periférico de paciente com lúpus e indivíduos sadios, manchando-se as células com anticorpo de CD19 anti-humano rotulado por FITC. Células foram classificadas em Citômetro de Fluxo de Alto Desempenho MoFlo - MLS como descrito em Exemplo 1. Células foram coletadas em meio estéril para 15 síntese de RNA.

Isolamento de RNA Total para PCR em Tempo Real:

Células foram lavadas uma vez e colocadas em Trizol® (Life Technologies, Gaithersburg, Maryland) e o RNA total foi isolado seguindo o protocolo do fabricante. O RNA total foi tratado com DNase livre de RNase 20 (GenHunter, Nashville, Tennessee). O RNA digerido por DNase foi extraído com fenol/clorofórmio e precipitado durante a noite com etanol. O RNA foi lavado com 75% de etanol e dissolvido em água livre de nuclease. O RNA isolado foi quantificado e sua integridade foi analisada em um gel de agarose.

25 PCR em Tempo Real:

RNA total (2 µg) foi transcrito reverso do paciente com lúpus versus os linfócitos B classificados de indivíduos sadios em 100 µl de mistura de reação empregando-se os reagentes de transcrição reversa Taqman padrão (Applied Biosystems, Foster City, California). Reações de PCR foram 30 estabelecidas empregando mistura principal de PCR verde de SYBR de Applied Biosystems. Iniciadores de CS1 foram incorporados na mistura para examinar os níveis de expressão de CS1 em paciente com lúpus e cDNA de

indivíduos sadios. Iniciadores de CS1 foram designados das seqüências publicadas (número de acesso de Genbank XM-001635, AF390894). Iniciadores de 18S rRNA e β -Actina foram empregados como controles para normalização. Os iniciadores foram designados empregando *software* Primer Express comprados de Applied Biosystems. Os produtos amplificados de PCR foram 85bp para iniciadores de CS1, 84bp para iniciadores de β -actina, e 61bp para iniciadores de 18S rRNA. PCR em Tempo Real foi realizada em um sistema GeneAmp 5700 SDS de Applied Biosystems, empregando o protocolo recomendado.

10 PCR em Tempo Real de Ly9 Novo de Camundongo:

RNA total (2 μ g) foi transcrito reverso de amostras não estimuladas, LPS e conA em 100 μ l de mistura de reação empregando reagentes de transcrição reversa de Taqman padrão (Applied Biosystems). Uma reação de PCR foi estabelecida empregando mistura principal de PCR verde de SYBR de Applied Biosystems. Iniciadores específicos para Ly9 novo de camundongo foram designados da seqüência publicada (número de acesso de Genbank AF467909) e incorporados na mistura para examinar os níveis de expressão em amostras de cDNA estimuladas vs não estimuladas. Os iniciadores de rRNA 18S foram empregados para normalização. Os iniciadores foram designados empregando-se *software* Primer Express comprado de Applied Biosystems. Os produtos amplificados de PCR foram 65bp para os iniciadores de Ly9 de camundongo e 61bp para os iniciadores de rRNA 18S. PCR em tempo real foi realizada em um Sistema de Detecção de Seqüência GeneAmp 5700 de Applied Biosystems, empregando o protocolo recomendado.

25 Ensaio de microdisposição: preparação de amostra, rotulando microchips e impressões digitais

Perfis de expressão de populações de leucócitos não ativadas e ativadas foram determinados e analisados empregando *chips* de gene. A microdisposição de oligonucleotídeo Affymetrix GeneChip® de costume permite a interrogação de aproximadamente 35.000 transcrições de mRNA únicas.

O RNA foi isolado e análise de *chip* de gene foi realizada como descrito (Veja Henshall e outros (2003) *Cancer Research* 63:4196-4203; Henshall e outros (2003) *Oncogene* 22:6005-12; Glynne, e outros (2000) *Nature* 403:672-676; Zhao, e outros (2000) *Genes Dev.* 14:981-993, aqui incorporado em sua totalidade).

• Purificar poly A + mRNA de RNA total ou limpar o RNA total com kit RNE-ASY® de Qiagen (purificação de poly A⁺ mRNA de RNA total)

A suspensão de oligotex foi aquecida a 37°C e imediatamente misturada antes de adicionar ao RNA. O Tampão de Eluição foi incubado a 70°C. Nota-se que o Tampão de Ligação de 2 x pode ser aquecido a 65°C se houver precipitado no tampão. O RNA total foi misturado com água tratada por DEPC, Tampão de Ligação de 2 x, e Oligotex de acordo com a Tabela 2 na página 16 do Manual de Oligotex. A mistura foi incubada durante 3 minutos a 65°C, e em seguida incubada durante 10 minutos em temperatura ambiente.

Os tubos foram centrifugados durante 2 minutos em 14.000 a 18.000 g. Nota-se que se a centrifuga tem um "ajuste ameno," ela deveria ser empregada. O sobrenadante foi removido sem perturbar o pélete de Oligotex. Uma quantidade pequena de solução pode ser deixada para trás para reduzir a perda de Oligotex. O sobrenadante deveria ser protegido até certo que a eluição e ligação satisfatórias poli A⁺ mRNA tenham ocorrido.

O pélete foi suavemente ressuspense em Tampão de Lavagem OW2 e pipetado sobre a coluna de rotação. A coluna de rotação foi centrifugada em velocidade máxima (ajuste ameno se possível) durante 1 minuto.

Depois da centrifugação, a coluna de rotação foi transferida para um tubo de coleção novo e suavemente ressuspensa em Tampão de Lavagem OW2 e recentrifugada como descrito aqui.

A coluna de rotação foi transferida para um novo tubo e eluída com 20 a 100 µl de Tampão de Eluição pré-aquecido (70°C). A resina de Oligotex foi suavemente ressuspensa pipetando-se para cima e para baixo, e em seguida centrifugada como anteriormente. O procedimento de eluição foi repetido com tampão de eluição fresco. Caso contrário, se o volume de

eluição baixo for necessário, somente o primeiro eluato pode ser empregado.

A absorvência foi lida, empregando o Tampão de Eluição diluído como o absoluto.

5 • Precipitação de etanol

Antes de proceder com síntese de cDNA, o mRNA foi precipitado. Alguma sobra no componente ou no Tampão de Eluição do procedimento de purificação de Oligotex inibirá reações enzimáticas a jusante do mRNA.

10 0,4 vol. de 7,5 M de NH₄OAc + 2,5 vol. de etanol a 100% frio foram adicionados ao eluato. A solução foi precipitada a -20°C 1 hora a durante a noite (ou 20-30 minutos a -70°C). A solução precipitada foi centrifugada em 14.000-16.000 x g durante 30 minutos a 4°C. O pélete foi lavado com 0,5 ml de etanol a 80% (-20°C) em seguida centrifugada em 14.000-
15 16.000 x g durante 5 minutos em temperatura ambiente. Lavagem com etanol a 80% foi repetida 1X. O pélete foi secado na coifa. (Não apressar o vácuo). O pélete foi suspenso em DEPC H₂O em 1 ug/μl de concentração.

• Limpar RNA total empregando o kit RNeasy de Qiagen

20 Não mais do que 100 μg de RNA devem ser adicionados a uma coluna de RNeasy. O volume da amostra foi ajustado para 100 μl com água livre de RNase, e 350 μl de Tampão RLT em seguida 250 μl de Etanol (100%) foram adicionados à amostra. A solução foi misturada pipetando-se (não centrifugar) em seguida a amostra aplicada a uma coluna de minirrotação de RNeasy. A coluna de minirrotação foi centrifugada durante 15 se-
25 gundos em >10.000 rpm. Se considerado com respeito à produção, a passagem de fluxo pode ser reaplicada à coluna e pode ser centrifugada novamente.

30 A coluna foi transferida para um novo tubo de coleção de 2 ml e 500 μl de Tampão RPE foram adicionados e centrifugados durante 15 segundos em >10.000 rpm. A passagem de fluxo foi descartada. 500 μl de Tampão RPE foram adicionados à coluna de minirrotação novamente, e centrifugados durante 15 segundos em >10.000 rpm. A passagem de fluxo

foi novamente descartada, em seguida centrifugada durante 2 minutos em velocidade máxima para secar a membrana de coluna. A coluna foi transferida para um novo tubo de coleção de 1,5 ml e 30-50 µl de água livre de RNase foram diretamente aplicados sobre a membrana de coluna. A coluna
5 foi centrifugada durante 1 minuto em >10.000 rpm e a eluição repetida.

Uma leitura de absorvência foi seguida. Se necessário, o eluato pode ser precipitado com acetato de amônio e 2,5 X o volume de etanol a 100%.

10 Preparar CDNA empregando Sistema de Escolha "SUPERScript® de Gibco para kit de Síntese de cDNA"

• Primeira Síntese de Filamento de cDNA

5 µg de RNA total ou 1 µg de polyA+ mRNA foram empregados como material de partida. Para RNA total, 2 µl de SUPERScript® RT (kit com transcriptase reversa para síntese de cDNA) foram empregados (para
15 polyA+mRNA, usar 1 µl de SUPERScript® RT). O volume final da primeira mistura de síntese de filamento deveria ser 20 µl. O RNA deve estar em um volume não maior do que 10 µl. O RNA foi incubado com 1 µl de 100 pmol de oligo T7-T24 durante 10 minutos a 70°C. Em gelo, 7 µl de: 4 µl de 5X de 1º Tampão de Filamento, 2 µl de 0,1M de DTT, e 1 µl de 10mM de mistura
20 de dNTP foram adicionados. A mistura foi incubada a 37°C durante 2 minutos, em seguida SUPERScript® RT foi adicionado.

A mistura foi incubada a 37°C durante 1 hora.

• Segunda Síntese de Filamento

25 As 1ªs reações de filamento foram colocadas sobre gelo.

À mistura foram adicionados:

91 µl de DEPC H₂O

30 µl de 5X de 2º Tampão de Filamento

3 µl de 10mM de mistura de dNTP

1 µl de 10U/µl de DNA Ligase de *E.coli*

30 4 µl de 10U/µl de DNA Polimerase de *E.coli*

1 µl de 2U/µl de RNase H

A anterior deveria ser feita em uma mistura se houver mais do

que 2 amostras. A mistura adicionada foi incubada durante 2 horas a 16°C.

2 µl de T4 DNA Polimerase foram adicionados e também incubados durante 5 minutos a 16°C. 10 µl de 0,5M de EDTA foram adicionados para interromper a reação.

5 • Limpar cDNA

O cDNA foi limpo empregando purificação de Fenol:Clorofórmio:Álcool de Isoamila (25:24:1) em tubos de gel:

Os tubos de PLG (gel de trava de fase) foram centrifugados durante 30 segundos em velocidade máxima, e transferidos para um novo tubo de PLG. Um volume igual de fenol:clorofórmio:álcool de isoamila foi adicionado e vigorosamente agitado (não vortexar). Os tubos foram centrifugados durante 5 minutos em velocidade máxima. A solução de camada aquosa de topo foi transferida para um novo tubo. A solução aquosa foi precipitada com etanol adicionando-se 7,5X de 5M de NH₄Oac e 2,5X de volume de etanol a 100%. Os tubos foram imediatamente centrifugados em temperatura ambiente durante 20 minutos, velocidade máxima. O sobrenadante foi removido e o pélete lavado 2X com etanol a 80% frio. Remover a lavagem de etanol tanto quanto possível, em seguida deixar o pélete secar ao ar. O pélete foi ressuspensão em 3 µl de água livre de RNase.

20 • Rotulação e Transcrição *In vitro* (IVT) com biotina

1,5 µl de cDNA foi pipetado em um tubo de PCR de parede fina. A mistura de rotulação de NTP foi adicionada em temperatura ambiente ao tubo de PCR.

Mistura da rotulação de NTP:

25	2 µl	7T 10xATP (75 mM) (Ambion)
	2 µl	7T 10xGTP (75 mM) (Ambion)
	1,5 µl	7T 10xCTP (75 mM) (Ambion)
	1,5 µl	7T 10xUTP (75 mM) (Ambion)
	3,75 µl	10 mM de Bio-11-CTP
30	0,75 µl	10 mM de Bio-16-UTP
	2 µl	10x de tampão de transcrição T7 (Ambion)
	2 µl	10x de mistura de enzima T7 (Ambion)

O volume final da reação total foi 20 µl. Os tubos foram incubados durante 6 horas em 37°C em uma máquina de PCR.

Limpeza total de RNeasy do produto de IVT

Observe acima para o procedimento.

- 5 O cRNA rotulado é etanol precipitado e ressuspenso em um volume compatível com a etapa de fragmentação.

• Fragmentação

- 10 Aproximadamente 15 µg de RNA rotulado foram fragmentados empregando a seguinte técnica. O volume da reação de fragmentação foi minimizado para aproximadamente 10 µl de volume, porém não mais do que 20 µl devido aos problemas de precipitação de magnésio com o tampão de hibridização.

O RNA foi fragmentado incubando-se a 94°C durante 35 minutos em 1 x de tampão de Fragmentação.

- 15 5 x de tampão de Fragmentação:

200 mM de Tris-acetato, pH 8,1,

500 mM de KOAc

150 mM de MgOAc

- 20 A transcrição de RNA rotulado foi analisada antes e após a fragmentação. As amostras foram aquecidas à 65°C durante 15 minutos e eletroforadas em 1% de géis de agarose/ TBE para ter uma idéia aproximada da faixa de tamanho de transcrição.

• Disposição do *microchip*

- 25 A disposição do *microchip* EOS HuO3 empregado em todas as experiências é uma disposição de oligonucleotídeo GENECHIP® Affymetric customizada compreendendo 59.680 grupos sondas representando 46.000 seqüências únicas incluindo ambos éxons preditos FGENESH e conhecidos que foram com base no primeiro desenho do genoma humano. Os grupos sondas de HuO3 consistem em sondas pareadas perfeitas somente, a maioria dos grupos sondas tendo 6 ou 7 sondas.

- 30

• Hibridização na Disposição do *Microchip*

200 µl (10 µg de cRNA) de mistura de hibridização foram pipeta-

dos sobre o *chip*. Se hibridizações múltiplas estão para serem feitas (tal como ciclagens através de um grupo 5 *chips*), então é recomendado que uma mistura de hibridização inicial de 300 μ l ou mais seja feita.

Mistura de Hibridização: RNA rotulado fragmentado (50ng / μ l de concentra-

5 ção final.)

50 pM de oligo de controle 948-b

1,5 pM de BioB

5 pM de BioC

25 pM de BioD

10 100 pM de CRE

0,1 mg/ml de DNA de esperma de arenque

0,5 mg/ml de BSA acetilado

para 300 μ l com 1x de tampão de hibridização MES

Os sinais de hibridização foram visualizados empregando strepta-

15 vidina conjugada por ficoeritina.

• Normalização dos Dados de Expressão de Gene

Os dados de expressão de gene foram normalizados ajustando-se os dados de intensidade do nível da sonda de cada disposição a uma γ -distribuição fixa, empregando uma função γ inversa para mapear a distribuição cumulativa empírica de intensidades para a distribuição γ desejada. Este procedimento é similar a outros procedimentos de normalização por *chip*, tal como fixar a média e SD de cada *chip* para um valor padrão, exceto que é mais rigoroso pelo fato de que fixa a distribuição total de intensidades em vez de um ou dois parâmetros. O propósito da normalização por *chip* é remover as variações entre o *chip*, na suposição que é atribuível a fatores não biológicos, isto é, ruídos técnicos. O parâmetro da escala para a distribuição foi escolhido para produzir uma distribuição com um valor médio arbitrário de 300, e o parâmetro de forma de 0,81 foi escolhido reproduzir a forma típica da distribuição empírica observada em amostras boas.

30 Uma única medição da intensidade média foi calculada para cada grupo sonda empregando a trimédia de Tukey da intensidade das sondas constituintes. A trimédia é uma medição de tendência central que é resis-

te aos efeitos circundantes. Finalmente, uma subtração anterior foi aplicada a cada medição de intensidade média para corrigir quanto à hibridização não-específica. A medição da intensidade média de um grupo sonda "nulo" consistindo em 491 grupos sonda com sequência misturada foi subtraída de todos os outros grupos sonda no *chip*.

Os manuais de instrução para os produtos empregados nisto estão incorporados aqui em sua totalidade.

Protocolo de Rotulação Fornecido Aqui

Reação da hibridação:

10 Começa com IVT não biotinilado (purificado por colunas de RNeasy) (observe o exemplo 1 para as etapas de tecido para IVT)

RNA de anti-sentido de IVT; 4 µg: µl

Hexâmeros aleatórios (1 µg /µl): 4 µl

H₂O: µl

15 Volume total: 14 µl

- Incubar à 70°C, 10 minutos. Pôr no gelo.

Transcrição inversa:

5X Primeiro tampão padrão (BRL): 6 µl

0,1 M de DTT: 3 µl

20 50 X de mistura de dNTP: 0,6 µl

H₂O: 2,4 µl

dUTP de Cy3 ou Cy5 (1mM): 3 µl

SS RT II (BRL): 1 µl

Volume total: 16 µl

25 - Adicionar à reação de hibridação.

- Incubar 30 minutos, 42°C.

- Adicionar 1 µl de SSII e deixar durante outra uma hora.

Colocar no gelo.

- 50X de mistura de dNTP (25mM de dATP frio, dCTP, e dGTP,

30 10mM de dTTP: 25 µl de cada um de 100mM de dATP, dCTP, dGTP; 10 µl de 100mM de dTTP para 15 µL de H₂O)

Degradação de RNA:

- Adicionar 1,5 µl de 1M de NaOH / 2mM de EDTA, incubar em 65°C, 10 minutos.

H₂O 86 µl

10N de NaOH 10 µl

5 50mM de EDTA 4 µl

U-Con 30

500 µl de TE/ rotação da amostra (TE/rotação da amostra) em 7000g durante 10 minutos, exceto fluxo por para purificação,

Purificação Qiagen:

10 - suspender o material recuperado u-con em 500 µl de tampão PB

- proceder w / protocolo Qiagen normal

Digestão DNase:

15 - Adicionar 1 µl de 1/100 de diluição de DNase/ 30 µl de Rx e incubar em 37°C durante 15 minutos.

- 5 minutos, 95°C para desnaturar a enzima

Preparação da Amostra:

- Adicionar:

DNA Cot-1: 10 µl

20 50X de dNTPs: 1µl

20X de SSC: 2,3 µl

Fosfato na pyro: 7,5 µl

10 mg/ml de DNA de esperma de arenque 1 µl de 1/10 de diluição

Volume final: 21,8 µl

25 - Secar em vácuo acelerado.

- Ressuspender em 15 µL de H₂O.

- Adicionar 0,38 µl de SDS 10%.

- Aquecer em 95°C, 2 minutos.

- Diminuir o esfriamento em temperatura ambiente durante 20

30 minutos.

Pôr a lâmina e hibridizar durante a noite à 64°C.

Lavar após a hibridização:

3X de SSC/0,03% de SDS: 2 minutos, 37,5 mls de 20X de SSC+0,75mls

de SDS 10% em 250 mls de H₂O

1X de SSC: 5 minutos 12,5 mls de 20X de SSC em 250

5 mls de H₂O

0,2 X de SSC: 5 minutos 2,5 mls de 20X de SSC em 250 mls

de H₂O

Secar as lâminas em centrífuga, 1000 RPM, 1 minuto.

Varredura em ajustes de Photomultiplier Tube apropriados canais de fluorescência.

CS1 é superexpressa em leucócitos, porém não em vários tipos de tecidos não linfóide

Para avaliar o perfil de expressão de CS1, o mRNA isolado de leucócitos e outros tecidos foi analisado por PCR em tempo real. Como mostrado na Figura 2A, o nível de expressão de mRNA foi muito mais elevado em leucócitos do que aquele da maioria dos outros tecidos de adulto de normais. Outros tecidos de adulto normais que não mostraram a expressão de CS1 acima dos níveis de valor básico incluíram glândula gordurosa, adrenal, aorta, válvula aórtica, apêndice, artéria coronária, bexiga, osso, medula óssea, peito, brônquio, cerviz, cérebro, espinha dorsal, diafragma, endométrio, epidídimo, esôfago, vesícula biliar, gânglio, coração, laringe, lábio, fígado, pulmão, músculo, miométrio, nervo vago, omento, mucosa oral, ovário, pâncreas, paratireóide, mucosa faríngea, placenta, próstata, retina, glândula salival, pele, estômago, sinóvia, testículos, timo, tireóide, língua, traquéia, cordão umbilical, ureter, útero, vagina, ou veia. MRNA de CS1 foi expresso em amostras selecionadas de cólon (2/11), rim (1/20), intestino delgado (1/3), baço, e tonsila (2/4). Os resultados indicaram que CS1 é principalmente expressado em leucócitos e deveria ser um bom alvo para doenças auto-imunes.

30 Expressão de CS1 aumenta em múltiplas populações de leucócito ativado

Para avaliar a correlação entre a expressão de CS1 e ativação de leucócitos, a expressão de mRNA de CS1 foi analisada em múltiplas po-

pulações de leucócitos ativados e não ativados. Como mostrado na Figura 2B, a expressão de CS1 aumentou nas células B ativadas, células DC maduras, células CD3 ativadas (aumento de baixo para moderado), células CD4 ativadas (aumento de nível baixo), e células CD8 ativadas (aumento de baixo para moderado, dependendo do doador) em comparação com suas populações de controle não ativadas correspondentes. Estes resultados indicaram que a superexpressão de CS1 se correlaciona com a ativação de vários subgrupos leucócito.

Exemplo 3: Produção de Antígenos para Geração de Anticorpos Monoclonais Contra CS1

Clonagem:

O domínio extracelular (ECD) de CS1 ficou isolado de células de Raji empregando os iniciadores que flanqueiam o domínio extracelular de CS1 (ECD de CS1). O produto de PCR foi o gel purificado e ligado em um vetor codificando a região constante de IgG3 (Fc- γ 3 humano). O plasmídeo contendo ECD-Fc γ 3 de CS1 foi purificado em uma grande escala e confirmado por seqüenciamento de DNA.

Transfecção Estável de ECD-Fc γ 3 de CS1:

50 μ g de plasmídeo de ECD-Fc γ 3 de CS1 foram linearizados com enzima de Fsp1, e o DNA foi precipitado em etanol, lavado, e ressuspenso em 500 μ l de PBS estéril. As células de NSO foram lavadas duas vezes em PBS frio, e ressuspensas em 2×10^7 por um ml de PBS. Uma quantidade de 1×10^7 de células foi empregada para transfecção.

500 μ l de células de NSO foram combinados com 500 μ l de DNA em PBS. As células foram eletroforadas em 1,5V e 3 μ F por um pulsador BioRad Gene. As células foram adicionadas a 100 ml de meios completos de DMEM e semeadas em dez placas de 96 cavidades. Os meios de seleção micofenólicos em 1 μ g/ml foram adicionados 24 horas após a transfecção. Os transfectantes positivos foram avaliados após 10 dias e se expandiram em placas de 48 e 24 cavidades. Os transfectantes positivos foram reavaliados e produtores elevados foram expandidos para purificação da proteína.

Purificação de Proteína de ECD-Fcγ3 de CS1:

Os transfectantes estáveis expressando proteína de fusão CS1-ECD Fcγ3 foram expandidas em 600 ml de meios completos de DMEM com aditivos de glicose durante cinco dias. A proteína de fusão foi purificada em uma coluna de proteína G Sepharose e dialisada contra 1x de PBS. As formas reduzidas e não reduzidas de CS1 ECD-Fcγ3 foram analisados por Coomassie. O ECD Fcγ3 de CS1 foi analisado da mesma forma por Western blot empregando anti-HulG, e confirmado por seqüenciamento N-terminal. A proteína de fusão CS1-Fc-γ3 purificada foi empregada para imunizar camundongos.

Produção de proteína de fusão de ECD-myc-GPI de CS1:

O domínio extracelular (ECD) de CS1 foi isolado de células Raji empregando iniciadores flanqueando o domínio extracelular de CS1. O produto de PCR foi purificado por gel e litigou em um vetor expressando um rótulo myc e ligação de fosfatidilinositol de glicosila para expressão de superfície de célula (vetor myc-GPI). O plasmídeo contendo ECD-myc-GPI de CS1 foi purificado em uma grande escala e confirmado por seqüenciamento de DNA.

Transfecção Estável de ECD-myc-GPI de CS1:

50 µg de plasmídeo de ECD-myc-GPI de CS1 foram linearizados com enzima Fsp1, e o DNA foi precipitado em etanol, lavado, e ressuspensão em 500 µl de PBS estéril. As células NSO foram lavadas duas vezes em PBS frio e ressuspensas em 2×10^8 por um ml de PBS. Uma quantidade de 1×10^8 de células foi empregada para transfecção.

500 µl de células NSO foram combinados com 500 µl de DNA em PBS. As células foram eletroforadas em 1,5 V e 3 µF por um pulsador Biorad Gene. As células foram desenvolvidas a 37°C em 5% de CO₂ com 1 µg/ml de seleção micofenólica, e foram mais tarde subclonadas em placas de 96 cavidades. Os transfectantes positivos foram avaliados com anticorpo anti-myc. Os produtores poderosos de transfectantes de ECD-myc-GPI de CS1 foram selecionados e se expandiram para ensaios *in vitro*.

Exemplo 3: Produção de Anticorpos Monoclonais Anti-CS1.

Imunógenos para CS1 Humano:

A proteína de fusão ECD- γ 3 de CS1 humana recombinante purificada foi empregada para imunizar os camundongos Balb/c através das almofadas do pé (ECD de CS1 se refere ao domínio extracelular de CS1 descrito acima). Resumidamente, os camundongos foram imunizados nas almofadas do pé traseiro com 10 μ g de proteína com um volume igual de adjuvante Ribi em um volume total de 25 μ l. As imunizações das almofadas do pé foram realizadas 4 vezes em intervalos de 4 - ou 5 - dias.

a. Fusão de Célula:

Dois camundongos imunizados com ECD- γ 3 de CS1 foram sacrificados. Os linfonodos sacrais e femorais poplíteos foram removidos dos camundongos. Os linfócitos foram isolados dos tecidos, e os hibridomas foram gerados através de procedimentos padrão. Resumidamente, os hibridomas foram gerados por fusão mediada por polietileno glicol (PEG) 1500 entre os linfócitos e uma linhagem celular de mieloma de camundongo (células NSO). As células fundidas foram semeadas em placas de 96 cavidades em uma densidade de 10^7 células por placa. A seleção de células fundidas foi concluída empregando meios HAT (hipoxantina, aminopterin, timidina).

b. Avaliação dos Hibridomas

A especificidade de anticorpos segregados por hibridomas foi determinada por uma citometria de fluxo (FACS) com base no ensaio de ligação para células expressando CS1. O ensaio de FACS foi realizado empregando protocolos padrão. Os transfectantes estáveis de NSO que expressando o domínio extracelular CS1 de superfície (2×10^5) foram ressuspensos em 50 μ l de PBS resfriado com gelo com 50 μ l de sobrenadante de cultura em gelo durante 1 hora. Após lavagem extensiva, as células foram incubadas com anticorpos específicos de IgG anticamundongo de cabra conjugado por ficoeritrina durante 1 hora no gelo. As células foram lavadas novamente e os anticorpos de ligados à superfície da célula foram detectados por FACS empregando um Becton Dickinson FACScan. Como mostrado na Tabela 1, os anticorpos: Luc2, Luc3, Luc15, Luc20, Luc22, Luc23, Luc29, Luc32, Luc34, Luc35, Luc37, Luc38, Luc39, Luc56, Luc60, Luc63, ou Luc90,

ligados fortemente às células NSO-CS1 transfectadas com CS1, porém não ao NSO-FcRn. Os anticorpos de CS1 anti-humano se ligaram às células K562 e Daudi (que são conhecidas por expressar CS1 nativo), porém não às células Jurkat de controle negativo. O dados mostram que os anticorpos anti-CS1 produzidos são capazes de ligação especificamente a CS1. Também mostrados na tabela foram os resultados da ligação de ensaio (por E-LISA) de anticorpos Luc à proteína de fusão de CS1- γ 3 versus AR-G3 de controle negativo (proteína de fusão γ 3). Os anticorpos Luc ligaram-se especificamente à CS1- γ 3 e não à proteína de fusão AR- γ 3 de controle negativo.

Tabela 1: MABs Anti-Humano de CS1 gerado da fusão 342										
	Resultados De MAB	NSO- CS1	NSO- FcRb	FAC (MFI)	Daudi	Jurkat	ELISA		Sublones	Ig ISO de camundongo
							CS1-G3 (Captura)	AR-G3		
1	Luc2	162	< 5	13,4	10,5	< 5	1,0	0,2	Luc2-1	IgG1
2	Luc3	377	< 5	25,7	7,8	< 5	0,9	0,5	Luc3-F	IgG1, G2b
3	Luc15	110	< 5	14,0	12,4	< 5	1,1	0,3	Luc15-1	ND
4	Luc20	89	< 5	8,0	12,6	< 5	1,2	0,2	Luc20-1	ND
5	Luc22	228	< 5	14,7	6,1	< 5	0,6	0,2	Luc22-1	IgG2b
6	Luc23	164	< 5	19,6	10,2	< 5	0,6	0,2	Luc23-1	IgG1
7	Luc29	86	< 5	24,1	11,9	< 5	0,9	0,2	Luc29-D6, C8	IgG1
8	Luc32	201	< 5	9,8	10,7	< 5	0,8	0,2	Luc32-1	IgG2b
9	Luc34	127	< 5	26,2	10,3	< 5	1,2	0,3	Luc34-1, 34-3	IgG1
10	Luc35	184	< 5	10,6	29,7	< 5	0,7	0,2	Luc35-1	IgG2a
11	Luc37	366	< 5	12,8	7,2	< 5	0,6	0,2	Luc37-C12, F11	IgG2b
12	Luc38	112	< 5	31,4	11,6	< 5	0,8	0,2	Luc38-1	IgG2b
13	Luc39	117	< 5	12,0	17,5	< 5	0,4	0,2	Luc39-E10	IgG2a
14	Luc56	132	< 5	12,6	9,7	< 5	1,0	0,2	Luc56-1	IgG2a
15	Luc60	230	< 5	14,6	10,4	< 5	0,9	0,3	Luc60-2	IgG2b
16	Luc63	214	< 5	15,8	12,7	< 5	0,6	0,2	Luc63-1	IgG2a
17	Luc90	237	< 5	9,7	10,1	< 5	0,8	0,1	Luc90-H1, D9	IgG2b
	Controle ISO	14	3	5,41	6,02		0,16	0,14		
	Anti Myc	193	335	6,62	6,85		0,19	0,15		

As Seqüências de Aminoácido dos Anticorpos Monoclonais Anti-CS1 Produzidos

As regiões variáveis de cadeia pesada e leve do anticorpo foram clonadas empregando técnicas padrão. Resumidamente, RNA total de $1-5 \times 10^6$ de células foi empregado para preparar cDNA empregando Kit de Amplificação de cDNA SMART RACE (BD Biosciences Clontech) e as regiões variáveis foram amplificadas por PCR empregando iniciadores específicos de gene complementares às regiões constantes cadeia leve e pesada de camundongo.

10 As seqüências de aminoácido da cadeia pesada madura e da cadeia leve madura dos anticorpos Luc90; Luc63, e Luc34 são mostradas na Tabela 4.

Exemplo 4: Caracterização de Anticorpos de CS1

Um ensaio de competição de citometria de fluxo foi empregado para determinar a especificidade de epítipo de 15 anticorpos monoclonais anti-CS1 diferentes. Os transfectantes estáveis de NSO expressando CS1 de superfície (2×10^5) foram incubados no gelo durante 1 hora com 50 μ l de anticorpos anti-CS1, incluindo combinações em pares de Luc23, Luc29, Luc34, Luc35, Luc37, Luc38, Luc 63, e Luc 90. Em paralelo, anticorpo de controle de isótipo (AIP-13) foi empregado como um controle negativo. Os anticorpos monoclonais anti-CS1 biotinilados (Luc23, Luc34, Luc37, Luc38, Luc63, e Luc90) foram incubados em 1 μ g/ml com a mistura de célula/ anticorpo durante 30 minutos adicionais no gelo. Após lavagem extensiva, as células foram incubadas com estreptavidina conjugada por ficoeritrina durante 1 hora no gelo. As células foram lavadas e os anticorpos biotinilados ligados à superfície da célula foram detectados por FACS empregando um Becton Dickinson FACScan.

Os anticorpos não-rotulados: Luc23, Luc34, Luc37, Luc38, Luc63, e Luc90 foram testados quanto à capacidade de competir entre si em uma concentração de 15 μ g/ml, 3 μ g/ml, e 0,6 μ g/ml, e os anticorpos de bloqueio ou competição foram adicionados em 1 μ g/ml. AIP-13 foi empregado como um controle negativo, uma vez que este anticorpo não liga CS1 ou

compete com quaisquer dos anticorpos Luc. O nível de fluorescência (intensidade de fluorescência média) (MFI) dos anticorpos biotinilados é mostrado na figura. Uma diminuição significativa no MFI indicou a competição de CS1 de superfície de célula por anti-CS1 biotinilado por Mab versus Mab anti-
5 CS1 não-rotulado, em pelo menos 50% comparado com o MFI do anticorpo de controle.

A Figura 3 descreve um resultado exemplar dos ensaios de competição entre os anticorpos Luc quando os anticorpos monoclonais Luc de bloqueio foram empregados em uma concentração de 15 µg/ml e 3
10 mg/ml. Os ensaios de competição indicaram que vários dos anticorpos Luc contatam epítomos distintos. Luc38 contata um epítomo distinto dos epítomos de Luc37, 23, 90, e 63. Luc63 contata um epítomo não sobreposto separado que é distinto dos epítomos de Luc37, 23, 90, e 38. Luc90 contata um epítomo não sobreposto diferente, distinto dos epítomos de Luc 37, 23, 63, e 38.
15 Luc 23 contata outro epítomo não sobreposto, distinto dos epítomos de Luc90, 63, e 38. Luc37 contata um epítomo não sobreposto adicional, distinto dos epítomos contatados por Luc90, 63, e 38. Luc63 contata um epítomo sobreposto com Luc34, ao mesmo tempo em que Luc90 contata um epítomo sobreposto com Luc34. Luc37 contata um epítomo que se sobrepõe com o
20 epítomo de Luc23. Luc34 bloqueia ou significativamente diminui a ligação de todos os anticorpos de Luc, e pode ou contatar um epítomo exposto e amplo, ou pode ter afinidade mais elevada com CS1. Luc37, Luc23, e Luc38 não bloqueiam a ligação a CS1 pelo anticorpo de Luc34. Os epítomos para Luc37, Luc23, e Luc38 podem ser "incluído" dentro da estrutura secundária de CS1, ou a afinidade com CS1 pode ser menor do que a afinidade do an-
25 ticorpo de Luc34.

As afinidades relativas de três anticorpos monoclonais foram também testadas por análise Biacore. A análise cinética de CS1 MAbs por medições de SPRKinetics entre proteína de fusão de CS1-Fc humana e an-
30 ticorpos de camundongo monoclonais de CS1 anti-humano Luc34.1, 63,2, e 90H1 foram realizados empregando BIAcore 2000 (BIAcore, Suécia). A condição de regeneração foi estabelecida imobilizando-se mais de 10 000 RUs

de cada anticorpo sobre células de fluxo diferentes e injetando-se CS1-Fc sobre a superfície, seguido pelo teste de uma série de tampões diferentes até que o melhor foi encontrado para otimizar a liberação de CS1-Fc de cada anticorpo. Um tampão de 10mM de Glicina, pH 2,0 foi constatado ser o
5 tampão de regeneração ideal e foi imediatamente testado quanto a sua reprodutividade em 10 ciclos de injeção de CS1-Fc e regeneração de tampão. O tampão foi constatado ser adequado para regeneração da reprodutividade da superfície de anticorpo. Conseqüentemente 10mM de Glicina, pH 2,0 foi o tampão de regeneração designado para os experimentos BIAcore de anti-
10 corpo e CS1-Fc.

O anticorpo de CS1 produzido internamente foi imobilizado com unidades de resposta baixas (RUs) variando de 99,4 RUs a 133,7 RUs no *chip* sensor de grau de pesquisa-grau CM5 pelos reagentes de acoplamento de amina BIAcore (N-etil-N'-dimetilaminopropilcarbodiimida, EDC; N-
15 hidroxissuccinimida, NHS; e HCl de etanolamina, pH 8,5). Os ensaios foram executados em uma taxa de fluxo de 30ul/minuto em temperatura ambiente. Uma fase de associação de três minutos de CS1-Fc foi seguida por injeção de dez minutos de tampão fluente (10mM de Hepes, 300mM de cloreto de sódio, 3mM de EDTA, 0,05% de P-20, pH 7,4) para monitorar a dissociação
20 durante cada ciclo de ligação, com concentrações de CS1-Fc diferentes por ciclo. A superfície de regeneração foi regenerada com 10mM de Glicina, pH 2,0. Os cinéticos de ligação de cada CS1-Fc e par de anticorpo foram calculados de uma análise global de dados de sensorgrama coletados de doze concentrações diferentes de CS1-Fc (1024 nM, 512 nM, 256 nM, 128 nM, 64
25 nM, 32 nM, 16 nM, 8 nM, 4 nM, 2 nM, 1 nM, 0,5 nM) em duplicata, empregando o programa BIAevaluate. Referência dupla foi aplicada em cada análise para eliminar as respostas anteriores do controle somente de tampão e superfície de referência. A afinidade (K_D) da ligação foi obtida simultaneamente ajustando-se a associação e fases de dissociação do sensorgrama
30 das séries de concentração analisada empregando o modelo analisado bivalente do programa BIAevaluate. A experiência foi realizada três vezes para estudar o desvio padrão dos dados.

As afinidades de ligação de Luc 90.H1, Luc63.2, e Luc43.1 são resumidas na Figura 4. Luc90.H1 tem afinidade de ligação mais elevada entre esses três anticorpos. A afinidade de ligação de Luc90.H1 é 5,5 vezes mais elevada do que aquela de Luc 63.2 e 28 vezes mais elevada do que aquela de Luc34.1.

Manchamento Imuno-histológico com Anticorpos Anti-CS1:

As células transfectadas com CS1 foram também examinadas quanto ao manchamento imuno-histológico com anticorpos anti-CS1. Uma quantidade de 10 µg/ml de anticorpo anti-CS1 monoclonal primário foi adicionado às células transfectadas com CS1. As células foram em seguida bloqueadas com soro e incubadas com o Ig anti-camundongo de biotina. A avidina-peroxidase foi então misturada com as células e desenvolvidas com AEC (um reagente peroxidase padrão). A cor vermelha de AEC indicou o manchando positivo ao mesmo tempo em que os núcleos das células testadas foram contra-manchados com hematoxilina (azul). Os dados indicaram que as células transfectadas com CS1 foram positivamente manchadas com os anticorpos anti-CS1, mostrando que os anticorpos anti-CS1 produzidos são capazes de se ligarem a CS1 expressado na superfície de célula (Figura 5A). Desse modo, os anticorpos anti-CS1 são adequados para uso não somente na detecção de expressão na superfície de células sanguíneas periféricas na solução, porém também na detecção por imunohistoquímica (IHC) que é tipicamente empregada para analisar as seções de tecido (por exemplo, biópsias de tecido ou linfonodos do paciente).

A Figura 5B mostra o manchamento imunoistológico de tonsila inflamada com dois anticorpos anti-CS1, Luc90 e Luc63. Os painéis C e D na Figura 5B mostram o manchamento com CD138 que mancha as células plasmáticas e células de epiteliais. Os painéis superiores (Figura 5B, painéis A e B) mostram o manchamento de seção serial com anticorpos anti-CS1. Do padrão de sobreposição do manchamento, é evidente que os anticorpos de CS1 mancham as células plasmáticas na tonsila inflamada.

Figura 5C mostra o manchamento imunoistológico do tecido sinovial da junta de um paciente com artrite reumatóide com anti-CS1 Luc63.

As células plasmáticas infiltraram na sinóvia como observado pelo manchamento com CD138 (mão direita, painel de topo). Do padrão de sobreposição do manchamento (compare o painel de topo da mão direita com painel de topo da mão esquerda), é evidente que anticorpos anti-CS1 mancham as células plasmáticas nas juntas de pacientes com artrite reumatóide.

Padrão de Expressão de Proteína CS1:

A expressão de proteína de CS1 foi também examinada com os anticorpos Luc produzidos através da análise de FACS (Figura 6). Os PBMCs foram isolados de indivíduos saudáveis e de pacientes de lúpus por um procedimento de centrifugação gradiente Ficoll Hypaque. Os PBMCs foram manchados com os anticorpos como indicado seguindo os procedimentos padrão. Para ativação do mitógeno de erva-dos-cânceres (PWM) de PBMCs, PWM foi adicionado em diluição de 1:100 aos PBMCs, que foram subsequentemente colocados em 37°C em 7% de CO₂ durante 8 dias. As células estimuladas por PWM foram colhidas e lavadas antes do manchamento pelo anticorpo. Os anticorpos anti-CS1 de camundongo empregados aqui são Luc90 (IgG2b), Luc63, Luc38 e outros anticorpos Luc anti-CS1 produzidos. Os anticorpos de controle de isótipo foram anticorpos IgG de camundongo pareados de isótipo.

Os resultados indicaram que CS1 foi positivamente expressada em células B ativadas, células T CD8⁺ (ambas ativadas e *naïve*), células de NK (CD3-CD56⁺), células NKT (CD56⁺CD3⁺), leucócitos CD14^{+/lo} (macrófagos e/ou monócitos), e células T CD4⁺ (nível baixo em células ativadas *in vitro*). CS1 foi expressada nestas populações de célula de ambos adultos saudáveis e pacientes de lúpus. Nenhuma expressão de proteína de CS1 significativa foi detectada nas células T CD4⁺ desativadas de adultos saudáveis, plaquetas, HuVECs, células de rim, células de via aérea bronquiais, células de via aérea pequenas, células prostáticas, células do fígado, e células da mama.

O manchamento da amostra de células B ativadas é mostrado na Figura 6, onde o manchamento de PBMCs ativado por PWM é mostrado como a linha grossa, ao mesmo tempo em que o manchamento de controle

de isótipo e PBMCs desativados foi mostrado como linha pontilhada sublinhada. O padrão de expressão de CS1 é significativo, porque um anticorpo terapêutico idealmente se liga principalmente às células alvo e não se liga a outras células e tecidos, especialmente plaquetas. Os dados sugerem que os anticorpos anti-CS1 sejam anticorpos terapêuticos candidato adequados.

Exemplo 5: Humanização dos Anticorpos de CS1

Este exemplo descreve a humanização do anticorpo monoclonal anti-CS1 de camundongo Luc63 (MuLuc63). A humanização de MuLuc63 foi realizada essencialmente de acordo com o procedimento de Queen, C. e outros (Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 86: 10029-10033 (1989)). Primeiro, os segmentos VH e VL humano com homologia elevada às seqüências de aminoácido VH e VL MuLuc63, respectivamente, foram identificados. Em seguida, as seqüências de CDR junto com os aminoácidos da estrutura importantes para manter as estruturas dos CDRs foram enxertadas nas seqüências da estrutura humana selecionada. O anticorpo monoclonal humanizado resultante (HuLuc63) foi expressado na linhagem celular de mieloma de camundongo NS0. O anticorpo HuLuc63 humanizado ligou-se ao CS1 humano recombinante em um ensaio de ELISA com um valor de EC50 de 70,1 ng/ml, similar ao valor de EC50 de 66,1 ng/ml determinado para MuLuc63 no mesmo ensaio, indicando que HuLuc63 manteve afinidade de ligação elevada com CS1 humano.

Clonagem e Seqüenciamento de cDNAs de Região Variável de MuLuc63

O RNA total foi extraído de aproximadamente 5×10^7 células de hibridoma produzindo MuLuc63 empregando o reagente TRIzol (Life Technologies, Inc., Rockville, MD). O cDNA de filamento duplo foi sintetizado empregando o Kit de Amplificação de cDNA SMART RACE (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) seguindo o protocolo do fornecedor. Os cDNAs de região variável para as cadeias pesadas e leves foram amplificados por reação em cadeia de polimerase (PCR) empregando os iniciadores 3' que recozem respectivamente para as regiões C de cadeia gama ou capa de camundongo, e um iniciador universal 5' fornecido no Kit de Amplificação de cDNA SMART RACE. Para PCR VH, o iniciador 3' tem a seqüência 5' –

AGCTGGGAAGGTGTGCACAC-3' (SEQ ID NO: 51). Para PCR VL, o iniciador 3' tem a sequência 5' - TTCCTGCCATCAATCTTCC -3' (SEQ ID NO: 52). Os cDNAs VH e de VL foram subclonados no vetor pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) para determinação de sequência. O

5 seqüenciamento de DNA foi realizado por reações de seqüenciamento de ciclo de PCR com terminadores de cadeia de dideoxi fluorescente (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acordo com as instruções do fabricante.

Quatro clones de plasmídeo foram seqüenciados para cada das cadeias pesadas e leves. As seqüências únicas homólogas às regiões variáveis típicas de cadeia pesada e leve de camundongo foram identificadas.

10 As seqüências de cDNA junto com as seqüências de aminoácido deduzidas das regiões V de cadeia pesada e leve de MuLuc63 são mostradas nas Tabelas 5 e 6.

Projeto das regiões V HuLuc63

15 A humanização das regiões V de anticorpo foi realizada como descrito por Queen, C. e outros (Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. 86: 10029-10033 (1989)). Primeiro, um modelo molecular das regiões variáveis MuLuc63 foi construído com o auxílio dos programas de computador ABMOD e ENCAD (Levitt, M., J. Mol. Biol. 168: 595-620 (1983)). Em seguida, com base em uma pesquisa de homologia contra seqüências de cDNA de anticorpo humano, a seqüência VH humana E55 3-14 (Cuisinier e outros, Eur. J. Imm. 23:110-118 (1993)) e o segmento J JH1 (Ravetch, J.V. e outros, Cell 27: 583-591 (1981)) foram selecionados para fornecer as estruturas para a região variável de cadeia pesada HuLuc63. Para a região variável de cadeia

20 leve HuLuc63, a seqüência VL de cDNA III-2R (Manheimer-Lory e outros, J. Exp. Med. 174:1639-1652 (1991)) foi empregada. A identidade dos aminoácidos da estrutura entre MuLuc63 VH e as estruturas humanas aceptores foi 81,6% (71/87), ao mesmo tempo em que a identidade entre MuLuc63 VL e as estruturas humanas aceptores foi 76,3% (61/80).

30 Nas posições da estrutura nas quais o modelo de computador sugeriu contato significativo com os CDRs, os aminoácidos das regiões V MuLuc63 foram substituídos pelos aminoácidos da estrutura humana origi-

nal. Isto foi feito nos resíduos 28, 48, 49, 66 e 68 da cadeia pesada (Tabela 7). Para a cadeia leve, a substituição foi feita no resíduo 60 (Tabela 8). Observe que o sistema de numeração empregado aqui é aquele de Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)).

Além disso, a inspeção da sequência de aminoácido MuLuc63 revelou um sítio para glicosilação ligada por N potencial em CDR2 da região VH. Tais sítios de glicosilação ligados por N têm a sequência geral N-X-T/S (onde N = asparagina, X = qualquer aminoácido, e S/T = serina ou treonina). Uma vez que a presença de glicosilação ligada por N no domínio variável poderia ter efeitos indesejáveis durante o desenvolvimento de HuLuc63 como um anticorpo terapêutico, o sítio de glicosilação potencial em CDR2 (N-Y-T) foi eliminado por substituição da treonina com mutação de alanina (N-Y-UM) no projeto humanizado.

Os alinhamentos de MuLuc63, HuLuc63, e das sequências de aminoácido aceitantes humanas para VH e VL são mostrados nas Tabelas 7 e 8, respectivamente.

Construção dos genes de VL e VH de HuLuc63

Um gene codificando cada dos VL e VH de HuLuc63 foi projetado como um minixon incluindo um peptídeo de sinal, um sinal de doador de união, e sítios de enzima de restrição apropriados para clonagem subsequente em um vetor de expressão de mamífero. Os sinais de doador de união nos minixons de VH e VL foram derivados das sequências JH6 e JK4 de linha germinativa humana correspondente, respectivamente. As sequências de peptídeo de sinal nos minixons de VH e VL de HuLuc63 foram derivadas das sequências de VH e VL de MuLuc63 correspondentes, respectivamente. As sequências de nucleotídeo de genes VH e VL de Luc63 junto com as sequências de aminoácido deduzidas são mostradas nas Tabelas 5 e 6.

Os genes VH e VL de HuLuc63 foram construídos por extensão dos oligonucleotídeos sintéticos sobrepostos variando no comprimento de 33 a 43 bases e amplificação por PCR. (Stemmer e outros, Gene 164:49-53

(1995)). Os oligonucleotídeos para a síntese dos genes de VH e VL de HuLuc63 são listados na Tabela 9.

Os fragmentos amplificados PCR foram purificados pelo *kit* de purificação por PCR Qiaquick (Qiagen) e digeridos com MluI e XbaI. O gene de VH de HuLuc63 foi subclonado em pHuHCg1.D para criar o plasmídeo pHuHCg1.D-HuLuc63. O gene de VL de HuLuc63 foi subclonado em pHuC-kappa.rgpt.dE, um derivado de vetor de expressão de cadeia leve pOKT3.Vk.rg (Couve, M.S. e outros, J. Immunol. 159: 3613-3621 (1997)), para criar o plasmídeo pHuCkappa.rgpt.dE-HuLuc63.

10 Expressão de HuLuc63

O anticorpo HuLuc63 IgG1 / κ foi produzido por transfecção transitória de células de cultura de tecido. A linhagem celular embrionária humana do rim 293-H (Invitrogen, Carlsbad, a CA) foi mantida em DMEM (Bio-Whittaker, Walkersville, MD) contendo 10% de FBS (HyClone, Logan, UT) e aminoácidos não essenciais (Invitrogen). As células 293-H foram semeadas em 1×10^6 células por cavidade em um volume de 2,5 ml em uma placa de 6 cavidades no dia antes da transfecção empregando meios regulares (DMEM + 10% de FBS + aminoácidos não essenciais). No dia da transfecção, 4 μ g de DNA de plasmídeo por cavidade foram diluídos em 250 μ l de Hibridoma-SFM (H-SFM, Invitrogen). 10 μ l de Reagente de lipofectamina 2000 (LF2000, Invitrogen) por cavidade foram diluídos em 250 μ l de H-SFM. O DNA diluído foi combinado com LF2000 diluído e incubado durante 20 minutos para permitir que os complexos de DNA-LF2000 se formem. 500 μ l de complexos de DNA-LF2000 foram adicionados a cada cavidade e misturados inclinando-se a placa de um lado para outro. As células foram incubadas durante 5 dias antes da colheita do sobrenadante para análise.

A expressão de HuLuc63 foi medida por ELISA em sanduíche. As placas Immulon 4 HBX (Thermo Labsystems, Franklin, MA) foram revestidas durante a noite a 4°C com 100 μ l/ cavidade de 1,8 μ g/ml de anticorpos policlonais específicos de cadeia de IgG Fc γ anti-humano de cabra (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, PA) em 0,2 M de tampão de carbonato-bicarbonato de sódio, pH 9,4, lavadas com Tampão de Lava-

gem (PBS contendo 0,1% de Tween 20), e bloqueadas durante 30 minutos em temperatura ambiente com 150 µl/ cavidade de Tampão de Bloqueio SuperBlock em TBS (Pierce Chemical Company, Rockford, IL). Após a lavagem com Tampão de Lavagem, as amostras contendo HuLuc63 foram diluídas apropriadamente em Tampão de ELISA (PBS contendo 1% de BSA e 0,1% de Tween 20) e 100 µl/ cavidade foram aplicados às placas de ELISA. Como um padrão, o anticorpo monoclonal IgG1 /κ anti-CD33 humanizado HuM195 (Co, M.S. e outros, J. Immunol., 148: 1149-1154 (1992)) foi empregado. Após a incubação das placas durante 1 hora em temperatura ambiente e lavagem com Tampão de Lavagem, os anticorpos ligados foram detectados empregando 100 µl/ cavidade de uma diluição de 1:1000 de anticorpos policlonais de cadeia capa anti-humano de cabra conjugado por HRP (Southern Biotech, Birmingham, AL). Após a incubação durante 1 hora em temperatura ambiente e lavagem com Tampão de Lavagem, o desenvolvimento da cor foi realizado adicionando-se 100 µl/ cavidade de substrato ABTS (KPL, Inc., Gaithersburg, MD). Desenvolvimento da cor foi parado adicionando-se 100 µl/ cavidade de ácido de oxálico 2%. A absorvência foi lida em 415 nm empregando uma leitora de microplaca VersaMax (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA).

20 Propriedades de Ligação de MuLuc63 e HuLuc63

As afinidades de MuLuc63 e HuLuc63 com CS-1 humano foram analisadas por ELISA de ligação direta. As placas de ELISA de 96 cavidades (placas Immulon 4 HBX, Thermo Labsystems, Franklin, MA) foram revestidas com 100 µl de 1 µg/ml de proteína de fusão CS1 humano solúvel – Fcγ3 humana em PBS durante a noite em temperatura ambiente. Após a lavagem com Tampão de Lavagem, as cavidades foram bloqueadas com 150 µl de Tampão de Bloqueio Superblock durante 30 minutos em temperatura ambiente. O anticorpo de HuLuc63 transitoriamente expressado ou anticorpo de MuLuc63 purificado foi apropriadamente diluído em Tampão de ELISA e aplicado às placas de ELISA (100 µl por cavidade). As placas de ELISA foram incubadas durante 1 hora em temperatura ambiente e as cavidades foram lavadas com Tampão de Lavagem. Em seguida, 100 µl de anti-

corpo Ck anti-humano de cabra conjugado por HRP ou anticorpo Ck anti-camundongo de cabra conjugado por HRP (ambos de Biotech Southern) diluído em 1:1000 em Tampão ELISA foram adicionados em cada cavidade das placas HuLuc63 e MuLuc63, respectivamente e incubados em temperatura ambiente durante 1 hora. Após a lavagem com Tampão de Lavagem, 100 µl de substrato de ABTS (KPL) foram adicionados a cada cavidade. O desenvolvimento da cor foi parado adicionando-se 100 µl de ácido de oxálico 2% por cavidade. A absorvência foi lida em 415 nm empregando uma leitora de microplaca VERSAmax. Os resultados das experiências de ligação por ELISA são mostrados na Fig. 7. MuLuc63 e HuLuc63 ligam-se a CS-1-Fcγ3 humano de uma maneira dependente da concentração. O valor de EC_{50} de HuLuc63, obtido empregando o programa de computador GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA), foi 70,1 ng/ml. Este é similar ao valor de EC_{50} de 66,1 ng/ml obtido para muLuc63, indicando que a humanização de MuLuc63 de anticorpo monoclonal anti-CS1 de camundongo foi bem sucedida: HuLuc63 manteve afinidade de ligação elevada com CS1 humano. Um modelo da região variável Luc63 humanizada é mostrado na Figura 8.

Exemplo 6: Papel de CS1 em Distúrbios Auto-imunes

CS1 é altamente expressa em células B e T estimuladas, quando comparado com as células não estimuladas:

Para determinar a expressão de CS1, um ensaio *in vitro* foi configurado para estimular os linfócitos B e T do sangue periférico, empregando estimulantes de mitógeno de erva-dos-cânceres (PWM) e fitoemaglutinina (PHA). As células de controle mononucleares do sangue periférico não estimuladas ficaram preparadas em paralelo sem estimulação. O mRNA PolyA⁺ foi isolado e o cDNA foi sintetizado destas amostras empregando técnicas padrão. O gene de CS1 foi amplificado por PCR empregando iniciadores de oligonucleotídeo específicos de CS1 (observe acima) e a expressão foi quantificada empregando Biorad Gel Doc 2000. As intensidades do sinal foram normalizadas para controlar β-actina humana. A análise de PCR em tempo real indicou que CS1 mostrou cerca de 23 duplicações de super-

regulação em células B do sangue periférico ativadas e cerca de 30 vezes de super-regulação em linfócitos T do sangue periférico ativados, quando comparada com células não estimuladas (Figura 9).

CS1 é super-regulado nos linfócitos B do sangue periférico do paciente de lúpus quando comparado com aqueles dos adultos saudáveis de idade semelhante:

Para avaliar a expressão de CS1 em pacientes de lúpus comparados com indivíduos saudáveis, os linfócitos B do sangue periférico foram isolados por classificação de célula, das células CD19⁺ de um paciente de lúpus versus um grupo adultos saudáveis. O mRNA de PolyA⁺ foi isolado e o cDNA foi sintetizado empregando técnicas padrão. A expressão de CS1 foi avaliada por PCR em tempo real empregando iniciadores de oligonucleotídeo específico para CS1. Os dados de PCR em tempo real indicaram que CS1 é super-regulada cerca de 2 vezes em linfócitos B do paciente de lúpus quando comparado com os indivíduos saudáveis. Sob normalização com β -actina, o gene de CS1 foi aumentado 2,3 vezes no cDNA de linfócito B do paciente de lúpus quando comparado com cDNA dos indivíduos saudáveis. Quando normalizado com iniciadores de rRNA 18S, a CS1 foi aumentada 1,8 vezes nas respectivas amostras de cDNA (Figura 10).

Super-regulação de Ly9 novo de camundongo em células T ativadas e B ativadas:

Ly9 novo de camundongo é um ortólogo proposto de CS1 humano (Tovar e outros, Immunogenetics 54: 394-402 (2002)). A expressão de Ly9 novo de camundongo em células T ativadas e B ativadas foi examinada com PCR em tempo real. Os dados mostraram que Ly9 novo de camundongo é super-regulado em células T ativadas e B ativadas.

A expressão de Ly9 novo de camundongo foi analisada com um Sistema de Detecção de Sequência ABI GeneAmp 5700 (observe o Exemplo 2). Sob normalização com os iniciadores de rRNA 8S, o gene Ly9 foi aumentado em 3 vezes no cDNA estimulado por conA, e super-regulou em 6 vezes em cDNA estimulado por LPS quando comparado com cDNA esplênico não estimulado.

Super-regulação de CS1 no Tecido de Doença de Intestino Inflamatório

A expressão da proteína(s) moduladora de IBD no tecido IBD (ambas doença de Crohn e colite ulcerativa) contra o tecido normal foi determinada em disposições de *microchip* como descrito acima. As microdisposições de oligonucleotídeo foram interrogadas com cRNAs derivados de

5 disposições de oligonucleotídeo foram interrogadas com cRNAs derivados de múltiplos tecidos. Mais especificamente, os cRNAs foram gerados por ensaios de transcrição *in vitro* (IVTs) de nove IBD e nove espécimes de intestino normais adjacentes semelhantes, e 24 amostras epiteliais colônicas. A hibridação de cRNA para as microdisposições de oligonucleotídeo foi medi-

10 da pela intensidade de fluorescência média (AI), que é diretamente proporcional ao nível de expressão do gene.

O dados foram analisados comparando-se os níveis de expressão de gene em IBD com os órgãos e tecidos de adultos não patogênicos. Um dos genes identificado com um aumento significativo em expressão de

15 gene em tecido de doença de intestino inflamatório comparado com o tecido normal é CS1. A Figura 11 é uma representação gráfica da análise de microdisposição, mostrando que a expressão de gene de CS1 é aumentada em colite ulcerativa e Crohn quando comparado com células epiteliais colônicas de adulto saudável. Para também avaliar a expressão de CS1 em pa-

20 cientes de doença de intestino inflamatório comparados com indivíduos saudáveis, as amostras de seções doentes de intestino grosso de 2 pacientes de doença de Crohn e 3 pacientes de colite ulcerativa versus amostras de intestino grosso normal de 3 adultos saudáveis foram desagregadas, lavadas, e colocadas em TRIZOL®. O RNA total foi isolado seguindo o proto-

25 colo do fabricante. O RNA total foi tratado com Dnase livre de Rnase (GnHunter). O RNA digerido por Dnase foi extraído com fenol/ clorofórmio, e precipitado durante a noite com etanol. O RNA foi lavado com 75% de etanol e dissolveu em água livre de nuclease. O RNA foi quantificado e a integridade do RNA foi analisada em um gel de agarose. Os dados de PCR em

30 tempo real (Figura 12) indicaram que CS1 é super-regulado 7 vezes e 6 vezes no intestino grosso doente dos pacientes de Crohn (n=2) e 13 vezes, 14 vezes e 46 vezes no intestino grosso doente de pacientes de colite ulcerati-

va (n=3) comparado com o intestino normal agrupado de indivíduos saudáveis (n=3).

Exemplo 7: Expressão de CS1 em Células de Câncer

Padrão de Expressão de Proteína de CS1:

- 5 A expressão de proteína de CS1 foi também examinada com os anticorpos Luc produzidos através da análise de FACS. As linhagens celulares foram incubadas com anticorpos Luc90.H1 anti-CS1 ou anticorpos de controle de isótipo IgG2b de camundongo durante 30 minutos no gelo. As células foram lavadas com PBS e Ig anti-camundongo conjugado por ficoeritrina (PE) foi adicionado às células e incubado durante 30 minutos no gelo. As células foram lavadas e analisadas por citometria de fluxo em um Calibre de FACS (Becton Dickinson). Os gráficos de histograma são mostrados na Figura 13, onde o sinal de anticorpos Luc90.H1 é mostrado como a linha negritada sobreposta. As linhas subjacentes incluem os controles negativos (células não manchadas, anticorpo secundário (Ig-PE anti-camundongo sem anticorpo primário), ou anticorpo de controle de isótipo.). Estes dados mostram que CS1 é expressa em células de linhagem de leucemia ARH-77, linhagem celular de linfoblastóide CESS e IM9 B, e linhagem celular de mieloma L363, LP1, e OPM2.
- 10
- 15
- 20 Amostras de pacientes com mieloma múltiplo (n=21 amostras da medula óssea), alguns pacientes com MGUS (gamopatia monoclonal de significação desconhecida; n=1), um paciente com leucemia de célula plasmática (n=1), células do baço CD34+ mobilizadas da medula óssea (n=5), células de medulas normais (n=3), tecido de linfonodo normal (n=1), pacientes com Leucemia Linfoblástica Crônica (CLL; n=15), pacientes com leucemia de mielogênica aguda (AML; n=11), um paciente com o linfoma não Hodgkin (NHL; n=1), e um paciente com o linfoma de Hodgkin (n=1) foram incubados com anticorpos conjugados por FITC para CS1 (Luc90 ou Luc63), CD45-PerCP, CD38-PE, e/ou CD138-PE e processados como detalhado
- 25
- 30 acima para análise de FACS de células de mieloma (observe Figura 14). Os anticorpos anti-CS1 de camundongo empregados aqui são Luc90 (IgG2b), Luc63 (IgG2a), Luc38 (IgG2b) e outros anticorpos Luc anti-CS1 produzidos.

Os anticorpos de controle de isótipo foram isótipo anticorpos IgG de camundongo pareados.

Os aspirados da medula óssea foram obtidos de pacientes de mieloma múltiplo da Cleveland Clinic. As linhagens celulares de mieloma (LP1, L363, OPM2, NCI-H929, RPMI 8226, e U266 B1), a linhagem celular de leucemia ARH-77, as linhagens de linfoblastóides B (IM9, CESS), e células de medula óssea foram manchadas com anticorpos monoclonais anti-CS1 versus anticorpos de controle de isótipo (Becton Dickinson) seguindo um protocolo de manchamento padrão. As células foram lavadas, colocadas em tampão de manchamento (RPMI, 10% de FBS para células humanas ou DMEM, 10% de FBS), e anticorpos anti-CS1 versus controle de isótipo foram adicionados em 0,5-1 ug de anticorpo por milhões de células em 0,1 ml de volume final. Para amostras de paciente, os glóbulos vermelhos foram lisados, e as células foram pelotadas em uma centrífuga e ressuspensas em tampão de manchamento. Para os anticorpos que não foram diretamente conjugados para FITC, os anticorpos do segundo estágio foram adicionados em 0,5-1 ug de anticorpo por milhões de células em 0,1 ml de volume final. As células foram lavadas e ressuspensas no tampão de manchamento para análise de FACS em um Calibre Becton Dickinson FACS empregando o programa CellQuest. Para distinguir as células plasmáticas, as células de medula óssea de mieloma múltiplas foram manchadas com anticorpos anti-CD45, anti-sindecan-1 (CD138), e monoclonais anti-CD38. O Anti-sindecan-1 (CD138) especificamente mancha as células plasmáticas e não outros leucócitos.

Os resultados mostram que CS1 é altamente expresso em células plasmáticas (por exemplo, células CD138+) de pacientes de mieloma múltiplos (Figuras 14A-14H), células plasmáticas de um paciente de leucemia de célula plasmática (Figura 14I), e em várias linhagens celulares de mieloma (L363, LP1, e OPM2; observe Figura 13). Um total de 21 amostras diferentes de medula óssea de pacientes de mielomas múltiplos foi ensaiado através de fluxo e para todos 21 das 21 amostras, virtualmente todas as células plasmáticas de medula óssea expressam CS1. CS1 é também expres-

sada em células de leucemia ARH-77 e linhagens celulares de linfoblastóide B (IM9 e CESS) (observe Figura 13).

Exemplo 8. Expressão de CS1 em Células Plasmáticas de Paciente de Mieloma

- 5 As amostras de medula óssea de um paciente de mieloma múltiplo foram manchadas com CD138-PE, CD45PerCP, Luc90-FITC, e/ou IgG2b-FITC (anticorpo de controle de isótipo) e analisadas por FACS como detalhado acima (observe Exemplo 5). As células fechadas são como segue: portão R1 contém linfócitos ("R1"), portão R2 contém monócitos ("R2"),
- 10 portão R3 contém granulócitos ("R3"), portão R4 contém células eritróide ("R4"), portão R5 contém células plasmáticas ("R5"), e portão R6 contém blastos ("R6"). A Figura 15 mostra que CS1 é expressada em células plasmáticas (por exemplo, células CD138+) do paciente de mieloma múltiplo.

- Exemplo 9: Anticorpo Monoclonal Anti-CS1 Diminui a Secreção de IgM por
- 15 Células B do Sangue Periférico Ativadas

- As células mononucleares do sangue periférico de um adulto normal foram isoladas por um gradiente Ficoll padrão, incubadas com mitógeno de erva-dos-cânceres em 10 µg / ml (GIBCO/BRL, Inglaterra, o Reino Unido), e semeadas em uma placa de 24 cavidades em um volume total de
- 20 1 ml. O anticorpo monoclonal (o CS1 anti-humano de camundongo (Luc63) ou controle de isótipo de IgG de camundongo) foi adicionado aos cavidades da amostra em 100 µg/ml ou 10 µg/ml. As células e o anticorpo foram incubados à 37°C em 7% de CO₂ durante 8 dias. Os sobrenadante de culturas foram isolados e IgM foi ensaiado por ELISA como descrito acima. Como
- 25 mostrado na Figura 16, o anticorpo Luc63 em 100 µg/ml ou 10 µg/ml (PwLuc100 e PwLuc10, respectivamente) diminuiu a secreção de IgM das células mononucleares do sangue periférico comparado com a secreção de IgM por células incubadas com o controle de isótipo em 100 µg/ml ou 10 µg/ml (Pwlg100 e Pwlg10, respectivamente) ou nenhum anticorpo (Pw (-)).

- 30 Anticorpo Monoclonal Anti-CS1 Diminui a Secreção de IgM por Células B Ativadas do Sangue Periférico de Paciente de Doença Auto-imune:

Os sobrenadantes das culturas de células mononucleares do sangue periférico foram isolados como detalhado acima e ensaiados por ELISA. As placas Immulon-1 foram revestidas com 100 µl de 1 µg/ml de anticorpo monoclonal IgM anti-humano de camundongo (catálogo Nº 05-4900, Zymed Laboratories, Inc., São Francisco Sul, Califórnia) em PBS. As placas foram bloqueadas durante 1 hora com Tampão de ELISA ('EB' = PBS + 0,1% de BSA + 0,05% de Tween 20). Os sobrenadantes de cultura foram adicionados em várias diluições (em EB) em 100 µl/ cavidade. Os sobrenadantes e IgM humano padrão (catálogo Nº 009-000-012, Jackson Laboratories, Porto de Barra, Maine) foram incubados durante 1-2 horas em temperatura ambiente. O IgM humano capturado foi desenvolvido com anticorpo policlonal IgM-HRP anti-humano de cabra (catálogo Nº 2020-05, Sourthen Biotech Association, Birmingham, Alabama) e substrato de HRP, seguindo-se o protocolo do fabricante. O IgM de ligação foi visualizado por espectrofotometria (405 nm de OD) em uma leitora de placa ELISA padrão. Como mostrado na Figura 17, a quantidade do IgM segregado dos PBMCs de paciente de lúpus foi reduzida pelo tratamento com anticorpos anti-CS1 (Luc90H1) quando comparada com o controle de isótipo. Um anticorpo anti-CD2 de controle positivo (GLO1) mostrou que anti-CS1 é ainda mais forte na redução de produção de IgM do que o anticorpo anti-CD2.

Anticorpo Monoclonal Anti-CS1 Diminui Produção de IgG por Células B do Sangue Periférico de Adultos Saudáveis e de Pacientes de Doença Auto-imune.

A produção de IgG por células B do sangue periférico de adultos saudáveis e pacientes de doença auto-imune (lúpus) foi analisada do mesmo modo como a produção de IgM. Como mostrado na Figura 18, a produção total por células mononucleares do sangue periférico de adulto saudável, 9 dias após o tratamento com o anticorpo anti-CS1 (Luc90H.1) diminuiu em cerca de 23% quando comparado com o controle de isótipo de IgG2b. A produção total de IgG por células mononucleares do sangue periférico paciente de lúpus, 9 dias após o tratamento com anticorpo anti-CS1 (Luc90H.1) diminuiu em cerca de 56% quando comparado com o controle de isótipo de

- IgG2b. As Tabelas 3A e B resumem a inibição da produção de IgG por vários anticorpos anti-CS1 gerados. Como mostrado na Tabela 3A, Luc90.H1 reduziu em cerca de 40% a produção de IgG por PBMCs ativado com lipopolissacarídeo ou mitógeno de erva-dos-cânceres. Luc34.1 reduziu em cerca de 38% a produção de IgG por PBMCs ativado com mitógeno de erva-dos-cânceres. Como mostrado na Tabela 3B, Luc 90.H1 reduziu a produção de IgG de PBMCs de um adulto saudável e de uma linhagem de célula B madura (células IM9) em cerca de 48%. Luc 34.1 reduziu a produção de IgG de PBMCs do adulto saudável em cerca de 53%. Luc 63.2 reduziu a produção de IgG de PBMCs e células IM9 em cerca de 47%. A partir destas experiências, é evidente que Luc 90H.1, Luc34.1, e Luc 63.2 são os melhores anticorpos funcionais. A partir do mapeamento de epítipo, Luc90 e Luc63 têm epítipos não sobrepostos.

Tabela 3A: Anti-CS-1 Diminui a Produção de IG por Células B Ativadas *In Vitro*

Percentual Médio da Diminuição Comparado com o Controle de Isótipo

PBMCs Ativados <i>In Vitro</i>	ANTI-CS-1 MAB	% Médio da Diminuição de HulgG+ SE
Lipopolissacarídeo	Luc 90.H1	41% + 8% (n = 3)
Mitógeno de erva-dos-cânceres	Luc 90.H1	39% + 9% (n = 4)
Mitógeno de erva-dos-cânceres	Luc 34.1	38% + 7% (n = 4)

Tabela 3B: Sumário dos Ensaios de Produção de Ig com Grupo do Anticorpo Anti-CS-1

PERCENTUAL MÉDIO DA ALTERAÇÃO EM IG COMPARADO COM O CONTROLE DE ISÓTIPO

ANTI-CS1 Mab	PMBC Do-ador 55	PMBC Do-ador 705	IM9	% Médio da Alteração em Ig
Luc90H.1	-44%	-56%	-43%	-48%
Luc37	+11%	-43%	-11%	-14%
Luc23	-13%	-4%	+6%	-4%
Luc63.2	-55%	-51%	-36%	-47%
Luc34.1	-64%	-49%	-45%	-53%
Luc38.1	-22%	-44%	-21%	-29%
Luc29D6	-43%	-44%	-25%	-37%

Diminuição relativa na Produção de Ig:
Grupo A (>45% de dec): Luc 90, 63, 34,
GRUPO B (29-37% de DEC): LUC38, 29D6,
GRUPO C (4-14% de DEC): LUC 37, 23,

Os resultados experimentais indicaram que os anticorpos anti-CS1 diminuem a produção de ambos IgG e IgM por células B de sangue periférico *in vitro*.

- 5 Exemplo 10: Redução *In Vivo* de IgG por Anticorpos Monoclonais de CS1 em um modelo de camundongo SCID-HuPBMC.

Modelo de Camundongo SCID-HuPBMC

- As células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) foram isoladas por gradientes de densidade Ficoll-paque padrão (Amersham Biosciences) e ressuspensas em solução tamponada de fosfato (PBS) em 2×10^7 de PBMCs/ ml. Os PBMCs ressuspensos (1 ml) foram intraperitonealmente injetados (i.p.) em camundongos SCID C.B-17. Duas a três semanas após a injeção, as amostras de soro foram tiradas de camundongos e ensaiadas para IgG humano por ELISA. Os camundongos enxertados (produzindo $>1 \mu\text{g/ml}$ de IgG humano no soro) foram aleatorizados nos grupos tratamento e em seguida tratados com anticorpos monoclonais CS-1 anti-humano de camundongo (Luc90.H1 ou Luc63.2.22), anticorpos de controle de isótipo de camundongo (IgG2b ou IgG2a, respectivamente), ou PBS. Os camundongos foram dosados com 200 μg de anticorpo em 500 μl PBS a cada 3-4 dias com 3 ou 4 doses do anticorpo. O soro de camundongo foi analisado quanto a IgG humano por ELISA empregando os protocolos padrão.

- A alteração percentual no IgG humano de soro foi calculada para cada camundongo subtraindo-se a concentração de IgG humano antes da primeira dose de anticorpo (dia 0) da concentração de IgG humano após a dose (dia x), dividindo pela concentração de IgG humano antes da primeira dose (dia 0), e multiplicando por 100, por exemplo, $[(\text{dia } x - \text{dia } 0) / \text{dia } 0] \times 100$. Os dados são mostrados como a alteração percentual média com o erro padrão para cada grupo camundongos. As concentrações de IgG hu-

mano são a concentração média com o erro padrão para cada grupo camundongo. O teste t da amostra Welch 2 foi empregado para comparar o percentual da mudança em IgG humano através dos grupos tratamento.

Anticorpos Anti-CS1 reduziram a produção de IgG humano *in vivo*

- 5 Os dados mostram que os anticorpos anti-CS1 da presente invenção reduzem a produção de imunoglobulina humana substancialmente no modelo de transferência SCID-HuPBMC. Como mostrado na Figura 19A, Luc90.H1 controlou o aumento na produção de IgG em PBS e controle de isótipo tão antes quanto no Dia 4 (4 dias após o tratamento com a primeira
- 10 dose do anticorpo). Esta redução continuou ao longo das 7 semanas (Dia 32) do período de teste. Por exemplo, no Dia 18, a produção de IgG humano aumentou em 225% no controle de isótipo de IgG2b, em 181% no controle de PBS, ao mesmo tempo em que a produção de IgG humano diminuiu em 14% com tratamento de Luc90H.1. Luc90H.1 não só aboliu o aumento de
- 15 181-225% na produção de IgG humano nos grupos controle, porém também resultou em uma diminuição de 14% adicional na produção de IgG. No Dia 25, Luc90H.1 não somente aboliu as 3 vezes de aumento na produção de IgG humano nos grupos controle porém também determinou uma diminuição de 24% adicional na produção de IgG humano.
- 20 Luc 63.2 também efetivamente reduziu a produção de IgG *in vivo*. Como mostrado na Figura 19B, Luc63.2 aboliu os 37 - 46% de aumento na produção de IgG humano nos grupos controle (controle de isótipo de PBS e IgG2a) e deu origem a uma diminuição de 59% adicional na produção de IgG. Neste mesmo estudo, Luc90.H1 foi comparado com Luc63.2 e
- 25 Luc90.H1 aboliu o aumento de 37-114% nos grupos controle (controle de isótipo IgG2b e PBS) e determinou uma diminuição de 14% adicional na produção de IgG por camundongos enxertados com células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs).

- 30 Figura 19C ainda resume a redução na produção de Ig por tratamento com Luc90 e Luc63 no modelo SCIDHuPBMC. Ao mesmo tempo em que abolindo o aumento de produção de IgG em camundongos tratados com controles de PBS e isótipo, Luc90 causou uma diminuição adicional na

- produção de IgG em 14%, 22%, 24%, e 39%, e Luc63 teve uma diminuição adicional em 40% e 59%. Desse modo, nós podemos concluir que o tratamento com anti-Luc de camundongos SCID enxertados com PBMCs humano (SCID-HuPBMC) não só completamente abole o aumento na imunoglobulina humana normalmente observado no soro destes animais, porém também determina uma diminuição adicional comparada com os níveis de pré-tratamento.

Exemplo 11: Atividades de ADCC de Anticorpos Anti-CS1

Preparação de Células Efetoras:

- 10 As células mononucleares humanas do sangue periférico (PBMCs) (células efetoras) foram isoladas do sangue total empregando gradientes de densidade padrão Ficoll-Paque (Amersham Biosciences). As células foram lavadas e ressuspensas em meio de RPMI suplementado com 1% de albumina de soro bovino (BSA).

- 15 Preparação de células alvo:

- As células transfectantes estáveis expressando CS-1 de superfície de célula (células alvo) foram lavadas e ressuspensas em meio RPMI suplementado com 1% de BSA. As células foram semeadas em 100.000 células/ cavidade em 50 µl de volume total. Os anticorpos monoclonais CS-1 anti-humano de camundongo (Luc90.H1 ou Luc63.2.22) ou anticorpos de controle de isótipo (IgG2b ou IgG2a de camundongo, respectivamente) foram adicionados em várias concentrações às células alvo em um volume final de 100 µl, e incubados durante 30 minutos em temperatura ambiente.

- 20 Após a incubação, 100 µl de PBMCs efetores foram adicionados às células alvo em uma relação de 20:1 em 200 µl de volume final. As células alvo e efetoras foram incubadas a 37°C durante 5 horas ou durante a noite. As células foram centrifugadas em 350 X g durante 5 minutos, e 100 µl/ cavidade de sobrenadante foram coletados e transferidos para dentro de uma placa de microtítulo de base plana de 96 cavidades opticamente limpa.

- 30 Ensaio de Lactato Desidrogenase:

Para determinar a atividade de lactato desidrogenase de (LDH) contida nos sobrenadantes, 100 µl de mistura de reação do *Kit* de Detecção

de Citotoxicidade (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) foram adicionados a cada cavidade, e as amostras foram incubadas durante até 30 minutos à 15-25°C. Durante este período de incubação, a placa de microtítulo foi protegida da luz. A absorvência das amostras foi medida em 490 nm empregando uma leitora de ELISA.

Para determinar o percentual de citotoxicidade mediada pela célula, a absorvência média das amostras foi calculada e os controles anteriores foram subtraídos empregando a seguinte equação:

$$\text{Citotoxicidade (\%)} = \frac{\text{liberação de LDH}_{\text{amostra}} - \text{SR}_{\text{efetor}} - \text{SR}_{\text{alvo}}}{\text{MR}_{\text{alvo}} - \text{SR}_{\text{alvo}}} \times 100$$

10 SR: Liberação Espontânea

MR: Liberação Máxima

Os controles experimentais tiveram liberação espontânea das células alvo somente ou das células efetoras somente. As células alvo foram ensaiadas em 2% de solução Triton-X 100 (1:1):

15 Anticorpos Anti-CS1 Induzem a Citotoxicidade Derivada do Anticorpo (ADCC)

A experiência mostrou que os anticorpos anti-CS1 Luc63.2 e Luc90 induziram a citotoxicidade derivada de anticorpo (ADCC) de células expressando CS1 na presença de PBMCs (as células efetoras). Como mostrado na Figura 20, Luc90 induz a citotoxicidade de uma maneira dependente da dosagem. Uma quantidade de 50 µg/ml de Luc90 induziu quase 50% de citotoxicidade das células alvo. Luc63.2 geralmente induz 60-80% de citotoxicidade das células alvo com uma faixa de dose de 10-50 µg/ml. Resultados similares foram obtidos de experiências conduzidas com dois doadores adicionais.

Exemplo 12: Atividade de ADCC com Anticorpos de CS1 de Fucose Baixa Clonagem dos cDNAs de Região Variável de Luc90

As regiões variáveis de camundongo (seqüência ID Nº 3 e Nº 4) foram clonadas da linhagem celular de hibridoma Luc90 pelos métodos padrão. Resumidamente, o RNA total foi extraído e o filamento duplo de cDNA foi sintetizado empregando o *Kit* de Amplificação de cDNA SMART 5'-RACE

(BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) seguindo o protocolo do fornecedor. Os fragmentos de PCR dos cDNAs de região variável foram clonados no vetor pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) para determinação da sequência. Vários clones de plasmídeo foram seqüenciados para cada das cadeias pesadas e leves. As seqüências únicas homólogas às regiões variáveis típicas de cadeia pesada e leve de camundongo foram identificadas.

Construção de Vetores de Expressão de VL e VH de Luc90 Quimérico

Um gene codificando cada de VL e VH de Luc90 foi projetado como um minixon incluindo um peptídeo de sinal, um sinal de doador de união, seqüência de iniciação Kozak e sítios de enzima de restrição apropriados para clonagem subsequente em um vetor de expressão de mamífero. Os iniciadores foram projetados para conter os sítios de restrições apropriados e complementaridade para PCR dos vetores TOPO contendo os genes ou VH ou VL. Os fragmentos amplificados por PCR foram purificados pelo *Kit* de purificação por PCR Qiaquick (Qiagen) e digeridos com MluI e XbaI. O gene VH de Luc90 foi subclonado em pHuHCg1.D (tipo selvagem) ou pHuHCg1.D.AA (mutante BS) para criar os plasmídeos pChiHuHCg1.D-MuLuc90VH e pChiHuHCg1.D.AA-MuLuc90VH, respectivamente. O mutante BS contém duas alterações de aminoácido (L234A/L235A) na região de CH2 de IgG1, tal que a ligação aos receptores de Fc seja abolida (Xu e outros, (2000) Cell Immunol. 200:16-26). O gene VL de Luc90 foi subclonado em pVk para criar o plasmídeo pChiVk-MuLuc90VL. Os vetores de expressão de plasmídeo único foram criados tal que os genes de cadeia pesada e leve possam ser expressos de um único plasmídeo. Os vetores de cadeia pesada foram digeridos com EcoRI para remover a região de cadeia pesada total e subclonados em uma visão de EcoRI única no vetor de cadeia leve. A cadeia pesada de mutante BS foi combinada com fragmento de vetor pChiVk-MuLuc90VL para criar o plasmídeo pChiLuc90-BSK ao mesmo tempo em que a cadeia pesada tipo selvagem foi subclonada no vetor pChiVk-MuLuc90VL para criar o plasmídeo pChiLuc90-g1K.

Expressão de Luc90 Quimérico

Os anticorpos BS e tipo selvagem IgG1 /k de Luc90 quiméricos foram produzidos por transfecção estável de células Sp2/0 com os vetores pChiLuc90-g1K e pChiLuc90-BSK, respectivamente. Um anticorpo de fucose baixa foi produzido por transfecção estável de células YB2/0 com o vetor pChiLuc90-g1K. Os clones positivos foram selecionados com meios de ácido micofenólico e avaliados por ELISA. O clone tipo selvagem AH4, clone de fucose baixa e HG12 mutante de BS 5E4 foram selecionados para expressão elevada, adaptados para meios livres de soro de Hibridoma Gibco com 2% de Soro Bovino Fetal de Ig baixo. Dois litros culturas foram desenvolvidos em garrafas cilíndricas para purificação. Os anticorpos foram purificados por cromatografia de coluna por afinidade de proteína G padrão.

Figuras 21A-C descrevem os dados sobre o efeito de anticorpos de fucose baixa em ensaios de citotoxicidade.

As células expressando CS1 (linhagem celular de mieloma múltiplo humano e transfectante estável) foram tratadas com anticorpos quiméricos de Luc90 anti-CS1 (ambos tipo selvagem e anticorpos modificados com níveis diminuídos de fucose). Os anticorpos quiméricos de Luc90 anti-CS1 estimulam citotoxicidade celular dependente do anticorpo de células expressando CS1. (Figura 21A mostra a citotoxicidade de uma linhagem celular estável expressando CS1 humano; Figura 21B e 21C descrevem a citotoxicidade de duas linhagens celulares de mieloma humano), OPM2 (Figura 21B) e L363 (Figura 21C). Em cada caso, a citotoxicidade é significativamente realçada por anticorpos que têm baixos níveis de fucose (através do desenvolvimento em células YB2/0 como detalhado acima).

Exemplo 13: Tratamento de Mieloma com Anticorpos Anti-CS1

O tratamento com anticorpo anti-CS1 *in vivo* foi realizado em um modelo de tumor de camundongo com mieloma injetando-se o anticorpo intraperitonealmente no indivíduo de teste. Como mostrado na Figura 22, o tratamento com anticorpo anti-CS1 (Luc63 e Luc90) diminui o tamanho do tumor comparado com os animais tratados com controle de isótipo. Neste estudo, 1×10^7 células de mieloma (linhagem celular de mieloma L363) foram injetados intraperitonealmente em camundongos SCID CB.17. Duas se-

- manas depois, quando tamanho de tumor alcançou aproximadamente 80 mm³, os camundongos foram aleatorizados em 4 grupos com 8 camundongos por grupo. Os camundongos foram tratados com anticorpos anti-CS1 (Luc63 ou Luc90) ou anticorpos de controle de isótipo (IgG2a de camundongo ou IgG2b de camundongo). Os camundongos foram dosados com 200 µg de anticorpo/ camundongo para 8 doses em 3 doses por semana. Os resultados mostram que os camundongos tratados com os anticorpos anti-CS1 reduziram significativamente os volumes do tumor comparado com os camundongos tratados com anticorpo de controle de isótipo. Pelo dia 25 do estudo (depois de 5 doses), camundongos tratados com Luc63 mostram tamanho de tumor médio de aproximadamente 100 mm³ comparado com camundongos tratados com anticorpo de controle de isótipo IgG2a (tamanho de tumor médio de aproximadamente 800 mm³). Os camundongos tratados com Luc90 mostram tamanho de tumor médio de aproximadamente 400 mm³ comparados com camundongos tratados com anticorpo de controle de isótipo IgG2b (que têm tamanho de tumor médio de aproximadamente 950 mm³). Os camundongos tratados com Luc63 anti-CS1 não tiveram nenhum tumor mensurável até 2,5 semanas após o tratamento, mostrando a eficácia impressionante do anticorpo na eliminação das células tumorigênicas.
- Os sistemas modelo adicionais para mieloma incluem camundongos SCID implantados intravenosamente (i.v.), intraperitonealmente (i.p.) ou diretamente injetado no osso (ortotopicamente) com mieloma fluorescentemente rotulado ou não-rotulado ou linhagem de célula B madura, por exemplo, ARH77, CESS, IM9, L363, LP1 e OPM2. Estas linhagens serão empregadas para testar os efeitos do tratamento com antagonista em sistemas modelo de animais com mieloma. Estas linhagens celulares expressam o antígeno reconhecido por anticorpos de CS1 anti-humano. Os animais são aleatorizados em grupos e submetidos a um regime de tratamento com anticorpos de CS1 anti-humano ou anticorpos de controle (por exemplo, anticorpos de controle de isótipo). Os anticorpos são administrados em vários níveis de dosagem, por exemplo, uma dose de 1-10 mg/kg para um total de 9-10 doses dada intraperitonealmente a cada 3-4 dias. O tamanho do tumor

é medido duas vezes semanalmente durante 35-40 dias para cada grupo tratamento. As manifestações clínicas de mieloma são observadas. As datas da morte são registradas para cada camundongo.

- Os estudos com animais também serão iniciados para determinar a sinergia potencial entre o tratamento com anticorpo anti-CS1 e quimioterapia. Os tumores de xenoenxerto são permitidos crescer até que eles alcancem um tamanho aproximado dentre 50-100 mm³, e para camundongos injetados intravenosamente, intraperitonealmente ou ortotopicamente, as células de câncer são permitidas enxertar em animais. Neste momento, os
- 5 animais são aleatorizados em grupos e submetidos a um regime de tratamento com anticorpos de CS1 anti-humano ou anticorpos de controle (por exemplo, anticorpos de controle de isótipo). Alternativamente, os animais podem ser submetidos a tratamento com anticorpos de CS1 anti-humano ou anticorpos de controle (por exemplo, anticorpos de controle de isótipo) em
- 10 combinação com agentes de quimioterapia padrão, incluindo combinações de tratamento com prednisona e melfalan ou outros agentes de alquilação (por exemplo, ciclofosfamida ou or clorambucil), ou vincristina, doxorubicina e dexametasona de dose elevada (VAD), ou outros regimes de quimioterapia conhecidos por aqueles de experiência na técnica. Os anticorpos são
- 15 administrados em vários níveis de dosagem, por exemplo uma dose de 1-10 mg/kg para um total de 9-10 doses dada intraperitonealmente a cada 3-4 dias.

- Quimioterapia é administrada intraperitonealmente a cada 3-4 dias em uma concentração eficaz, por exemplo, 1 mg/kg ou outra dose eficaz que é conhecida por aqueles versados na técnica.
- 25

- O tamanho do tumor (para s.c. animais injetados) é medido duas vezes semanalmente por 35 a 40 dias para cada grupo de tratamento. Manifestações clínicas de mieloma são notadas, incluindo de imunoglobulina de soro em camundongos com linhagens de células que secreta imunoglobulina humana (IM9, CESS, ARH-77 e LP-1). Datas de morte são registrados para cada camundongo. A eficácia de tratamento com anticorpo na presença e ausência de quimioterapia é avaliada.
- 30

Entende-se que exemplos descritos acima de alguma forma servem para limitar o verdadeiro escopo desta invenção, mas sim são apresentados para propósitos ilustrativos. Todas as publicações, seqüências de números de acesso e pedidos de patentes citados no relatório descritivo são

5 aqui incorporados por referência como se cada publicação individual, número de acesso, ou pedido de patente foi especificado é individualmente indicado para ser incorporado por referência.

TABELA 2

SEQ ID NO:1

PDL primekey:433671

Sequência de DNA

Acesso ao ácido nucléico Nº: NM_021181

5 GI:19923571|ref|NM_021181.3| Homo sapiens SLAM family member 7 (S-LAMF7), mRNA

1	cttccagaga	gcaatatggc	tggttcccca	acatgcctca	ccctcatcta	tatcctttgg
61	cagctcacag	ggtcagcagc	ctctggaccc	gtgaaagagc	tggtcggttc	cgttggtggg
121	gcogtgactt	tccccctgaa	gtccaaagta	aagcaagttg	actctattgt	ctggaccttc
181	aacacaaccc	ctctgtgcac	catacagcca	gaagggggca	ctatcatagt	gacccaaaat
241	cgtaataggg	agagagtaga	cttcccagat	ggaggctact	ccctgaagct	cagcaaatcg
301	aagaagaatg	actcagggat	ctactatgtg	gggatataca	gctcatcact	ccagcagccc
361	tccaccagg	agtacgtgct	gcatgtctac	gagcacctgt	caaagcctaa	agtcaccatg
421	ggtctgcaga	gcaataagaa	tggcacctgt	gtgaccaatc	tgacatgctg	catggaacat
481	ggggaagagg	atgtgattta	tacctggaag	gccttggggc	aagcagccaa	tgagtcccat
541	aatgggtcca	tccctcccat	ctcctggaga	tggggagaaa	gtgatatgac	cttcatctgc
601	gttgccagga	accctgtcag	cagaaacttc	tcaagcccca	tccttgccag	gaagctctgt
661	gaaggtgctg	ctgatgaccc	agattcctcc	atggctctcc	tggtctcct	gttggtgccc
721	ctcctgctca	gtctctttgt	actggggcta	tttctttggg	ttctgaagag	agagagacaa
781	gaagagtaca	ttgaagagaa	gaagagagtg	gacatttgct	gggaaactcc	taacatatgc
841	ccccattctg	gagagaacac	agagtacgac	acaatccctc	acactaatag	aacaatccta
901	aaggaagatc	cagcaaatat	ggtttactcc	actgtggaaa	taccgaaaaa	gatggaaaat
961	ccccactcac	tgctcacgat	gccagacaca	ccaaggctat	ttgcctatga	gaatgttatc
1021	tagacagcag	tgcaactccc	taagtctctg	ctcaaaaaaa	aaacaattct	cggcccaaa
1081	aaaacaatca	gaagaattca	ctgatttgac	tagaaacatc	aaggaagaat	gaagaacggt
1141	gacttttttc	caggataaat	tatctctgat	gcttctttag	atttaagagt	tcataattcc
1201	atccactgct	gagaaatctc	ctcaaaccca	gaagggttaa	tcacttcata	ccaaaaatgg
1261	gattgtgaat	gtcagcaaac	cataaaaaaa	gtgcttagaa	gtattcctat	agaaatgtaa
1321	atgcaaggct	acacatatata	atgacagcct	gttgattata	tgatggctcc	aggtcagtg
1381	ctggagtttc	attccatccc	agggcttgga	tgtaaggatt	ataccaagag	tcttgctacc
1441	aggagggcaa	gaagacaaaa	acagacagac	aagtcagca	gaagcagatg	cacctgacaa
1501	aatggatgt	attaattggc	tctataaact	atgtgcccag	cactatgctg	agcttacact
1561	aattggctcag	acgtgctgtc	tgccctcatg	aaattggctc	caaatgaatg	aactactttc
1621	atgagcagtt	gtagcaggcc	tgaccacaga	ttcccagagg	gccagggtgtg	gatccacagg
1681	acttgaagg	caaagttcac	aaagatgaag	aatcagggtg	gctgaccatg	tttggcagat
1741	actataatgg	agacacagaa	gtgtgcatgg	cccaaggaca	aggacctcca	gccaggcttc
1801	atttatgcac	ttgtgctgca	aaagaaaagt	ctaggtttta	aggctgtgcc	agaacccatc
1861	ccaataaaga	gaccgagtct	gaagtcacat	tgtaaatcta	gtgtaggaga	cttgaggtca
1921	ggcagtgaga	ctggtggggc	acggggggca	gtgggtactt	gtaaaccttt	aaagatgggt
1981	aattcattca	atagatat	attaagaacc	tatgcggccc	ggcatgggtg	ctcacacctg
2041	taatcccagc	actttgggag	gccaaagggtg	gtgggtcatc	tgaggtcagg	agttcaagac
2101	cagcctggcc	aacatggtga	aaccccatct	ctactaaaga	tacaaaaatt	tgctgagcgt
2161	ggtggtgtgc	acctgtaatc	ccagctactc	gagaggccaa	ggcatgagaa	tcgcttgaac
2221	ctgggaggtg	gaggttgag	tgagctgaga	tggcaccact	gcactccggc	ctaggcaacg
2281	agagcaaaac	tccaatacaa	acaaacaaac	aaacacctgt	gctaggtcag	tctggcacgt
2341	aagatgaaca	tccctaccaa	cacagagctc	accatctctt	atacttaagt	gaaaaacatg
2401	gggaagggga	aagggaatg	gctgcttttg	atatgttccc	tgacacatat	cttgaatgga

```
2461 gacctcccta ccaagtgatg aaagtgttga aaaacttaat aacaaatgct tgttgggcaa
2521 gaatgggatt gaggattatc ttctctcaga aaggcattgt gaaggaattg agccagatct
2581 ctctccctac tgcaaaaccc tattgtagta aaaaagtctt ctttactatc ttaataaaac
2641 agatattgtg agattcaaaa aaaaaaaaaa aa
```

SEQ ID NO:2

Seqüência de Aminoácido – CS1

GI:19923571|ref|NM_021181.3| Homo sapiens SLAM family member 7 (S-LAMF7)

```
5  MAGSPTCLTLIYILWQLTGSAAAGPVKELVGSVGGAVTFPLKSKVKQVDSIVWTFNTTPLVT
   IQPEGGTIIIVTQNRNRERVDFPDGGYSLKLSKLKKNDSGIYYVGIYSSSLQQPSTQEYVLHV
   YEHLSPKPKVTMGLQSNKNGTCVTNLTCCMEHGEEVDVIYTWKALGQAANESHNGSILPISWRW
   GESDMTFICVARNPVSRNFSSPILARKLCEGAADDPDSSMVLLCILLVPLLLSLFVLGLFLW
   FLKRERQEEYIEKKRVDICRETPNICPHSGENTEYDTIPHTNRTILKEDPANTVYSTVEIP
10 KKMENPHSLLTMPDTPRLFAYENVI
```

Tabela 4: Sequência de Aminoácido de antibióticos CS1

Luc-90 VH - SEQ ID NO:3QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYSTTYWMNWVKQRPQGQLEWIGMIHPDSETRLNQ

SEQ ID NO:9

SEQ ID NO:10

5 KFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCARSTMIATRAMDYWGQTSVTVSS

SEQ ID NO:11

Luc-90 VL - SEQ ID NO:4DIVMTQSQKSMSTSVGDRVSITCKASQDVITGVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDRF

SEQ ID NO:12

SEQ ID NO:13

10 TGSGSGTDFTFTISNVQAEGLAVYYCQOHYSTPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO:14

Luc-63 VH - SEQ ID NO:5EVKLLSEGGGLVQPGGSLKLSCAASGDFDSRYWMSWVRQAPGKGLEWIGEINPDSSTINYTP

SEQ ID NO:15

SEQ ID NO:16

15 SLKDKFIISRDNAKNTLYLQMSKVRSEDTALYYCARPDGNYWYFDVWGAGTTVTVSS

SEQ ID NO:17

Luc-63 VL - SEQ ID NO:6DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGIQAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRF

SEQ ID NO:18

SEQ ID NO:19

20 TGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQYSSYPYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:20

Luc-34 VH - SEQ ID NO:7QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTSYWMQWVKQRPQGQLEWIGAIYPGDDTRYTQ

SEQ ID NO:21

SEQ ID NO:22

25 KFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLASEDSAVYYCARGKVYYGSNPFAYWGQGLTVTVSA

SEQ ID NO:23

Luc-34 VL - SEQ ID NO:8DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDEINNWLAQYQQKPGNAPRLISGATSLETGVPSRF

SEQ ID NO:24

SEQ ID NO:25

30 SGSGSGKDYTLSTSLQTEDVATYYCQYWSPTPTFGGGKLEIK

SEQ ID NO:26

Tabela 5: Sítio de glicosilação putativo de Região variável de cadeia pesada anti-CS1 Luc63

Luc-63 VH (SEQ ID NO:27)

MDFGLIFFIVALLKGVQCEVKLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSRYWMSWVRQAPGKG

5 SEQ ID NO:29

SEQ ID NO:30

LEWIGEINPDSSSTINYTPSLKDKFIISRDNAKNTLYLQMSKVRSEDTALYYCARPDGNYWYF

SEQ ID NO:31

SEQ ID NO:32

DVWGAGTTVTVSS

10

NYA (SEQ ID NO:33)

Luc-63 VL (SEQ ID NO:29)

METHSQVFVYMLLWLSGVEGDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGIAV

SEQ ID NO:34

SEQ ID NO:35

AWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYF

15

SEQ ID NO:36

CQQYSSYPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:37

5 (SEQ ID NO: 44). CDR2 de HuLuc63 VH é SEQ ID NO:95

35 HumanVL cDNA FGQGTKVEIK
HuLuc-63 VL QQYSSYPYT FGQGTKVEIK

Tabela 7: Alinhamento das regiões de MuLuc63 (SEQ ID NO: 45), E55 3-14 (SEQ ID NO: 46), HuLuc63 (SEQ ID NO: 47).

		1	2	3	4
		0	0	0	0
5	MuLuc63	EVKLES GGGLVQ PGGSLKLSCAASGFD <u>FSRYWMS</u> WVRQAPG			
	E55 3-14	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS-----WVRQAPG			
	HuLuc63	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFD <u>FSRYWMS</u> WVRQAPG			
		5	6	7	8
		0 a	0	0	0 a
10	MuLuc-63	KGLEWIGEIN <u>PD</u> SSTIN <u>YTP</u> SLKDKFIISRDNAKNTLYLQMS			
	E55 3-14	KGLEWVA-----RFTISRDNAKNSLYLQMN			
	HuLuc-63	KGLEWIGEIN <u>PD</u> SSTIN <u>YAP</u> SLKDK <u>FI</u> ISRDNAKNSLYLQMN			
			1	1	
		9	0	1	
15	bc	0	0ab	0	
	MuLuc-63	KVRSEDTALYYCAR <u>PD</u> GN <u>YF</u> DVWGAGTTVTVSS			
	E55 3-14/JH1	SLRAEDTAVYYCAR-----WGQGTTLTVTVSS			
	HuLuc-63	SLRAEDTAVYYCAR <u>PD</u> GN <u>YF</u> DVWGQGTTLTVTVSS			

Tabela 8: Alinhamento de seqüências de aminoácidos anticorpo da região VL de MuLuc63 (SEQ ID NO:48), III-2R (SEQ ID NO:49) e HuLuc63 (SEQ ID NO: 50).

		1	2	3	4
		0	0	0	0
5	MuLuc63	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGI <u>AWAY</u> QQKPGQ			
	III-2R	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC-----WYQQKPGK			
	HuLuc63	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGI <u>AWAY</u> QQKPGK			
		5	6	7	8
		0	0	0	0
10	MULUC63	SPKLLIWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLA			
	III-2R	VPKLLIY-----GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVA			
	HuLuc63	VPKLLIWASTRHTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVA			
15		1	9	0	
	MULUC63	0	0		
	III-2R	DYFCQQYSSYPYTFGGGKLEIK			
	HuLuc63	TYYC-----FGQGTKVEIK			
		TYYCQQYSSYPYTFGQGTKVEIK			

Tabela 9: Oligonucleotídeos usados para a síntese do HuLuc63 VH e VL gene

HuLuc63 VH Gene

Oligonucleotídeo 1 (SEQ ID NO:53)

5'-TTTACGCGTCCACCATGGATTTTGGGCTGATT-3'

5 Oligonucleotídeo 2 (SEQ ID NO:54)

5'-TTTTTATTGTGCTCTTTTAAAGGGTCCAGTGTGAGGT-3'

Oligonucleotídeo 3 (SEQ ID NO:55)

5'-GCAGCTTGTCGAGTCTGGAGGTGGCCTGGTGCAGCCTGGA-3'

Oligonucleotídeo 4 (SEQ ID NO:56)

10 5'-GGATCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCAGGATTCGATT-3'

Oligonucleotídeo 5

5'-TTAGTAGATATTGGATGAGTTGGGTCCGGCAGGCTCCAGG-3'

Oligonucleotídeo 6

5'-GAAAGGGCTAGAATGGATTGGAGAAATTAATCCAGATAGC-3'

15 Oligonucleotídeo 7

5'-AGTACGATAAACTATGCTCCATCTCTAAAGGATAAATTCA-3'

Oligonucleotídeo 8

5'-TCATCTCCAGAGACAACGCCAAAAATAGCCTGTACCTGCA-3'

Oligonucleotídeo 9

20 5'-AATGAACAGCCTCAGAGCTGAGGACACAGCCGTTTATTAC-3'

Oligonucleotídeo 10

5'-TGTCGAAGACCGGACGGAAGTACTGGTACTTCGATGTCT-3'

Oligonucleotídeo 11

5'-GGGGCCAGGGGACCCTCGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAA-3'

25 Oligonucleotídeo 12

5'-TTTCTAGAGGCCATTCTTACCTGAGGAGACGGT-3'

Oligonucleotídeo 13

5'-GACGAGGGTCCCCTGGCCCCAGACATCGAAGTACCAGTAG -3'

Oligonucleotídeo 14

30 5'-TTCCGTCCGGTCTTGACAGTAATAAACGGCTGTGTCCT-3'

Oligonucleotídeo 15

5'-CAGCTCTGAGGCTGTTTCATTGTCAGGTACAGGCTATTTTT-3'

Oligonucleotideo 16

5'-GGCGTTGTCTCTGGAGATGATGAATTTATCCTTTAGAGAT -3'

Oligonucleotideo 17

5'-GGAGCATAGTTTATCGTACTGCTATCTGGATTAAATTTCTC-3'

5 Oligonucleotideo 18

5'-CAATCCATTCTAGCCCTTCCCTGGAGCCTGCCGGACCCA-3'

Oligonucleotideo 19

5'-ACTCATCCAATATCTACTAAAATCGAATCCTGAGGCTGCA-3'

Oligonucleotideo 20

10 5'-CAGGAGAGTCTCAGGGATCCTCCAGGCTGCACCAGGCCAC-3'

Oligonucleotideo 21

5'-CTCCAGACTCGACAAGCTGCACCTCACACTGGACCCCTTT-3'

Oligonucleotideo 22

5'-TAAAGAGCAACAATAAAAAAATCAGCCCAAAATCCATG-3'

HuLuc63 VL Gene

Oligonucleotide A

5'-TTTACGCGTCCACCATGGAGACACATTCTCAGGTCTTTGTATA-3'

Oligonucleotide B

5 5'-CATGTTGCTGTGGTTGTCTGGTGTGAAGGAGACATTCAG-3'

Oligonucleotide C

5'-ATGACCCAGTCTCCTTCATCACTTCCGCATCAGTAGGAG-3'

Oligonucleotide D

5'-ACAGAGTCACATACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGG-3'

10 Oligonucleotide E

5'-TATTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGAAAGTA-3'

Oligonucleotide F

5'-CCTAAACTATTGATTACTGGGCATCCACCCGGCACACTG-3'

Oligonucleotide G

15 5'-GAGTCCCTGATCGATTCTCAGGCAGTGGATCTGGGACAGA-3'

Oligonucleotide H

5'-TTTCACTCTCACCATTAGCTCACTACAGCCTGAAGACGTG-3'

Oligonucleotide I

5'-GCAACTTATTACTGTCAGCAATATAGCAGCTATCCATACA-3'

20 Oligonucleotide J

5'-CGTTCGGACAGGGGACCAAGGTGGAATCAAACGTAAGTG-3'

Oligonucleotide K

5'-TTTCTAGATTAGGAAAGTGCACCTTACGTTTGATTTCAC-3'

Oligonucleotide L

25 5'-CTTGGTCCCCTGTCCGAACGTGTATGGATAGCTGCTATAT-3'

Oligonucleotide M

5'-TGCTGACAGTAATAAGTTGCCACGTCTTCAGGCTGTAGTG-3'

Oligonucleotide N

5'-AGCTAATGGTGAGAGTGAAATCTGTCCAGATCCACTGCC-3'

30 Oligonucleotide O

5'-TGAGAATCGATCAGGGACTCCAGTGTGCCGGGTGGATGCC-3'

Oligonucleotide P

5'-CAGTAAATCAATAGTTTAGGTACTTCCCTGGTTTCTGTT-3'

Oligonucleotideo Q

5'-GATACCAGGCTACAGCAATACCCACATCCTGACTGGCCTT-3'

Oligonucleotideo R

5 5'-GCAGGTGATAGTGACTCTGTCTCCTACTGATGCGGAAAGT-3'

Oligonucleotideo S

5'-GATGAAGGAGACTGGGTCATCTGAATGTCTCCTTCAACAC-3'

Oligonucleotideo T

5'-CAGACAACCACAGCAACATGTATACAAAGACCTGAGAATG-3'

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo anti-CS1 isolado ou fragmento de ligação de antígeno, caracterizado pelo fato de que se liga a uma proteína codificada pela SEQ ID NO:1 e compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo CDRs de cadeia pesada de SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 95 e SEQ ID NO: 17 e uma região variável de cadeia leve compreendendo CDRs de cadeia leve de SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 e SEQ ID NO: 20.
2. Anticorpo anti-CS1 isolado ou fragmento de ligação de antígeno, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a região variável de cadeia pesada compreende SEQ ID NO:47.
3. Anticorpo anti-CS1 isolado ou fragmento de ligação de antígeno, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a região variável de cadeia leve compreende SEQ ID NO:50.
4. Anticorpo anti-CS1 isolado ou fragmento de ligação de antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que é um anticorpo monoclonal.
5. Anticorpo anti-CS1 isolado ou fragmento de ligação de antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que é um anticorpo humanizado.
6. Anticorpo anti-CS1 isolado ou fragmento de ligação de antígeno, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que é um IgG₁.
7. Composto conjugado, caracterizado pelo fato de que compreende um anticorpo ou um fragmento de ligação de antígeno, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, ligado a uma porção efetora e/ou um rótulo detectável.
8. Composto conjugado, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno está conjugado a um rótulo detectável.
9. Composto conjugado, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o rótulo detectável é um composto radioativo, um composto fluorescente, uma enzima, um substrato, um rótulos de epítopo ou

uma toxina.

10. Composto conjugado, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o rótulo detectável é um agente citotóxico.

5 11. Composto conjugado, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a porção efetora é uma porção de detecção, porção ativável, um agente quimioterapêutico, uma lipase, um antibiótico, uma porção quimioatrativa, um modulador imune ou um radioisótopo.

10 12. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo anti-CS1 isolado ou fragmento de ligação de antígeno, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, e um veículo aceitável.

13. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o composto conjugado, como definido em qualquer uma das reivindicações 7 a 11, e um veículo aceitável.

15 14. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 12 ou 13, caracterizada pelo fato de ser para o tratamento de mieloma múltiplo.

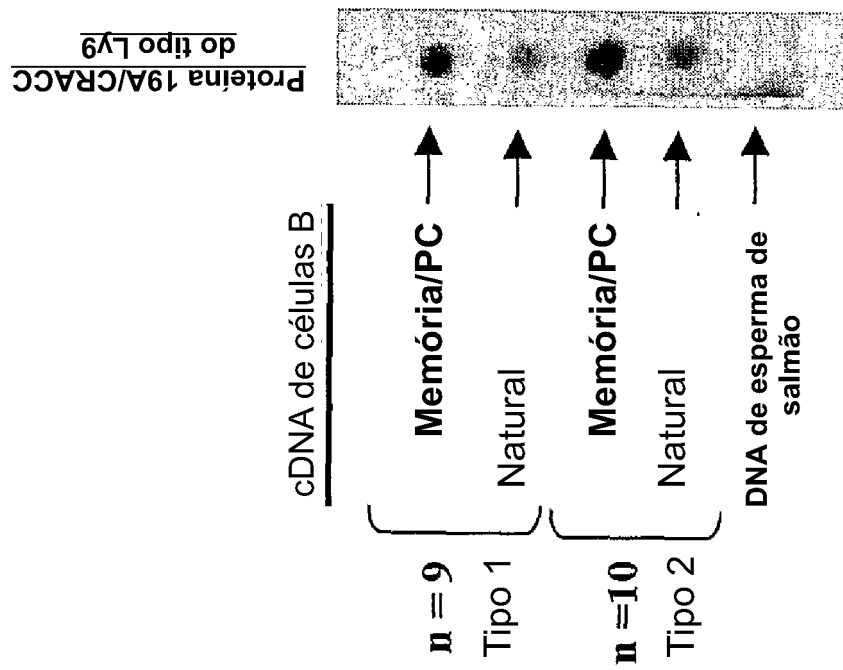


FIG. 1A

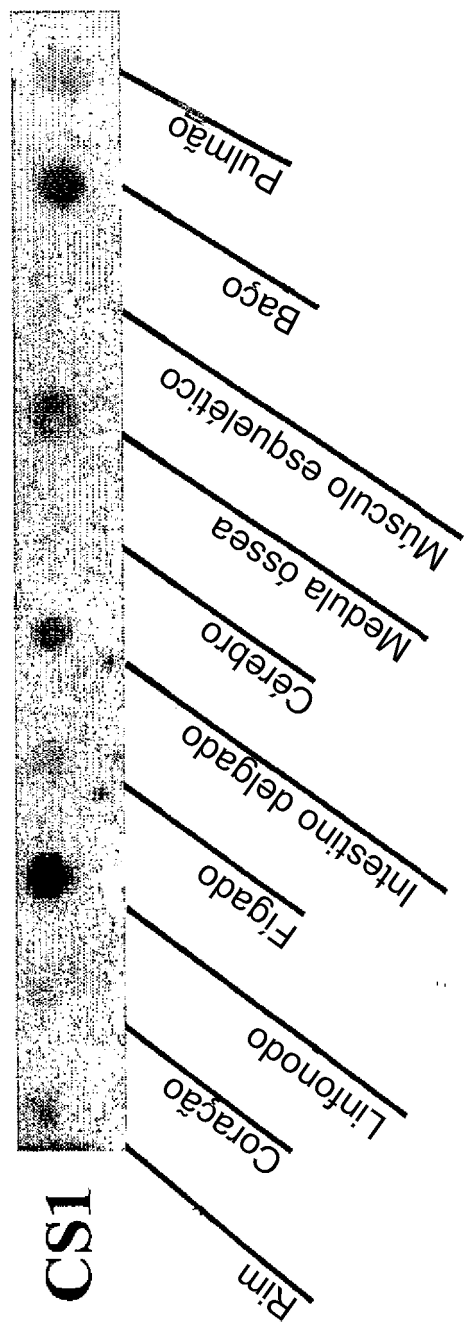


FIG. 1B

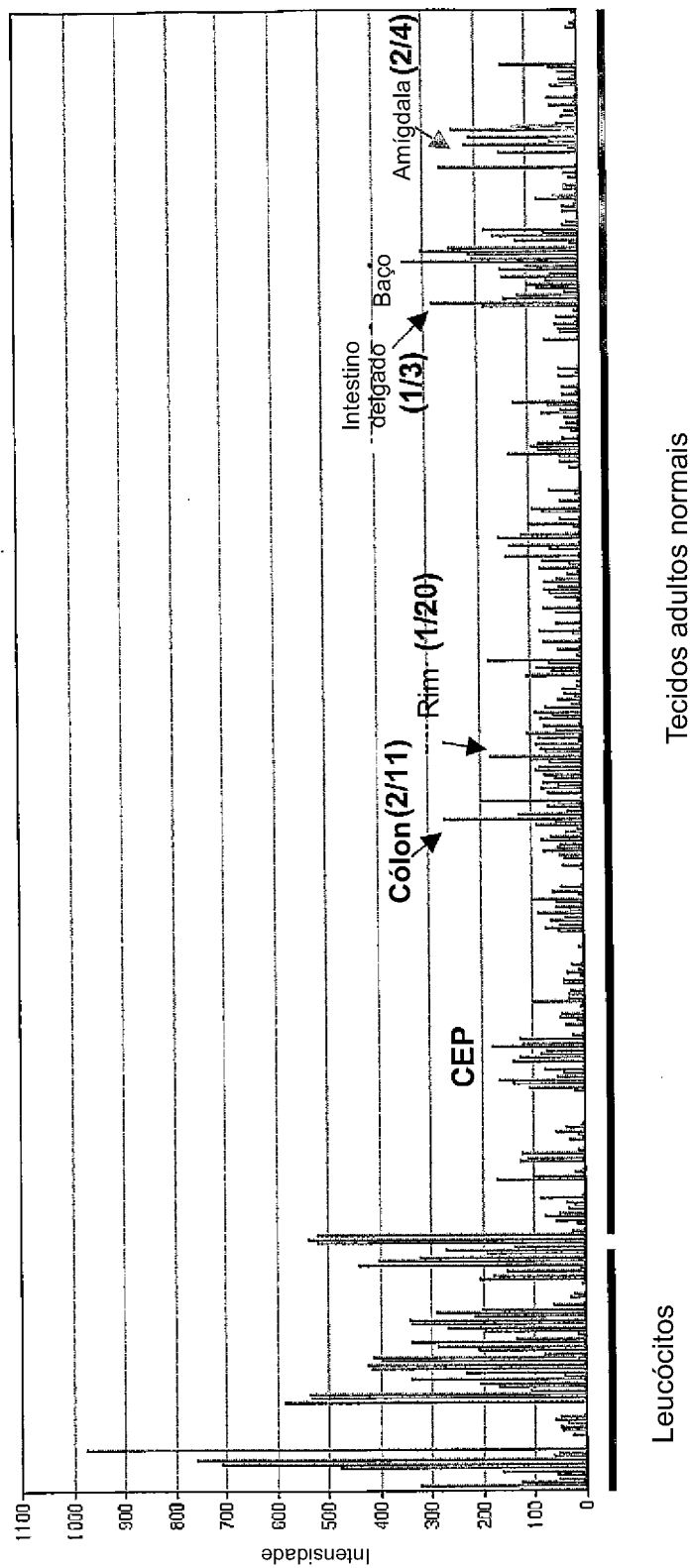
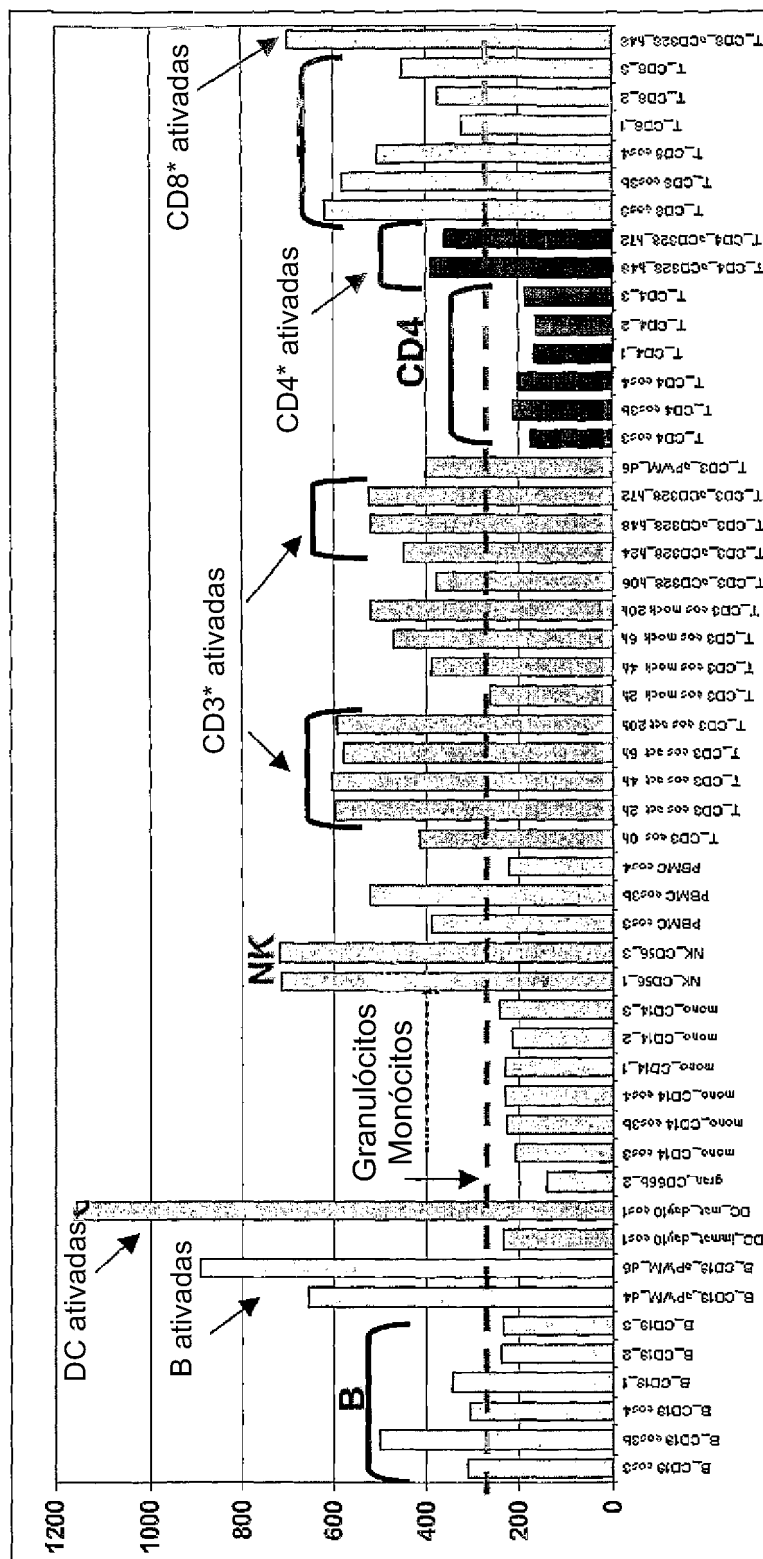
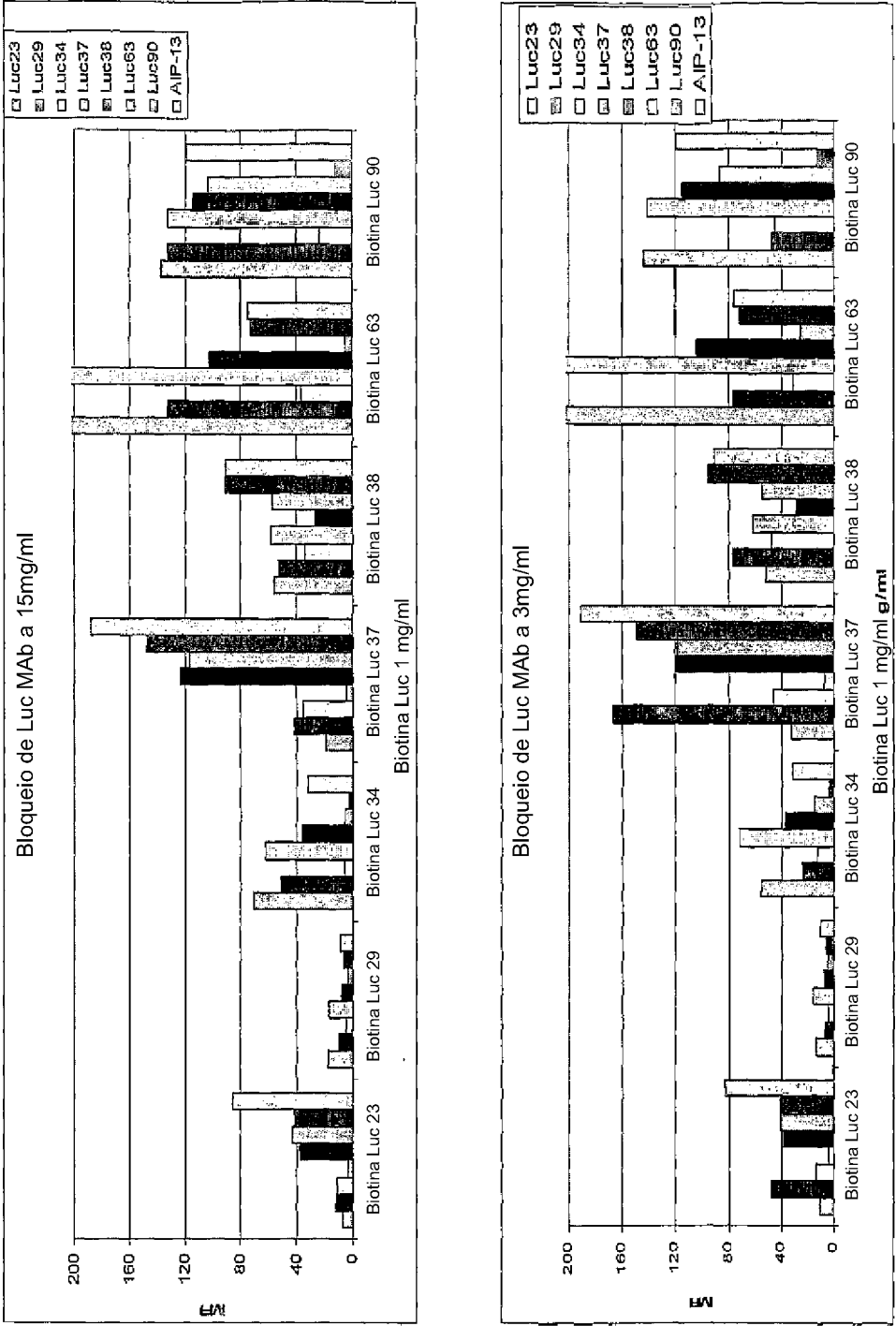


FIG. 2A





	Ka (1/MS)	Kd (1/s)	KD (M)
Luc 90.H1	4,56e4	2,81e-4	6,29e-9 +/- 2,06e-9
Luc 63.2	8,71e3	3,01e-4	3,46e-8 +/- 8,86e-9
Luc 34.1	7,48e3	1,27e-3	1,37e-7 +/- 3,46e-8

FIG. 4

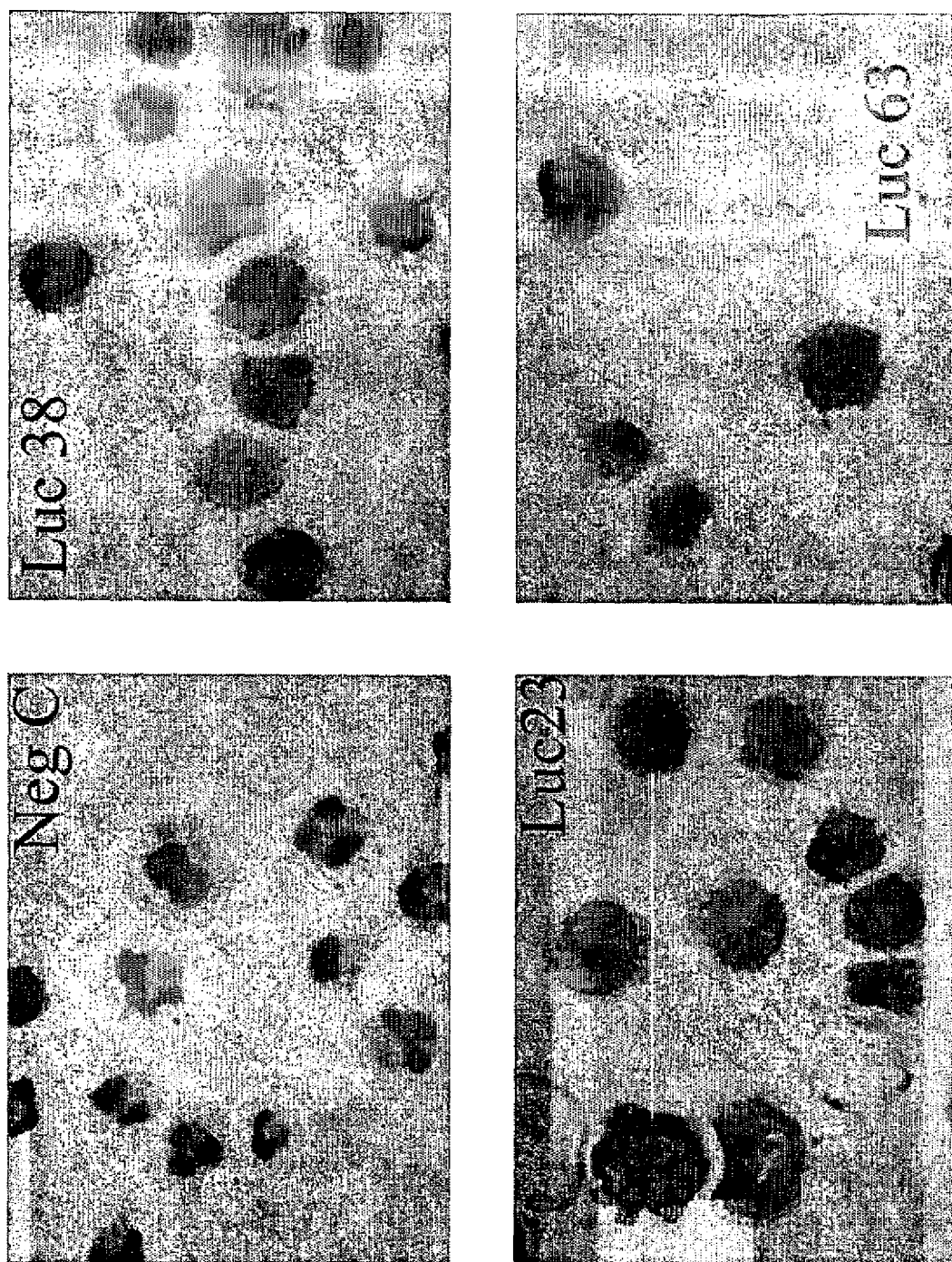


FIG. 5A

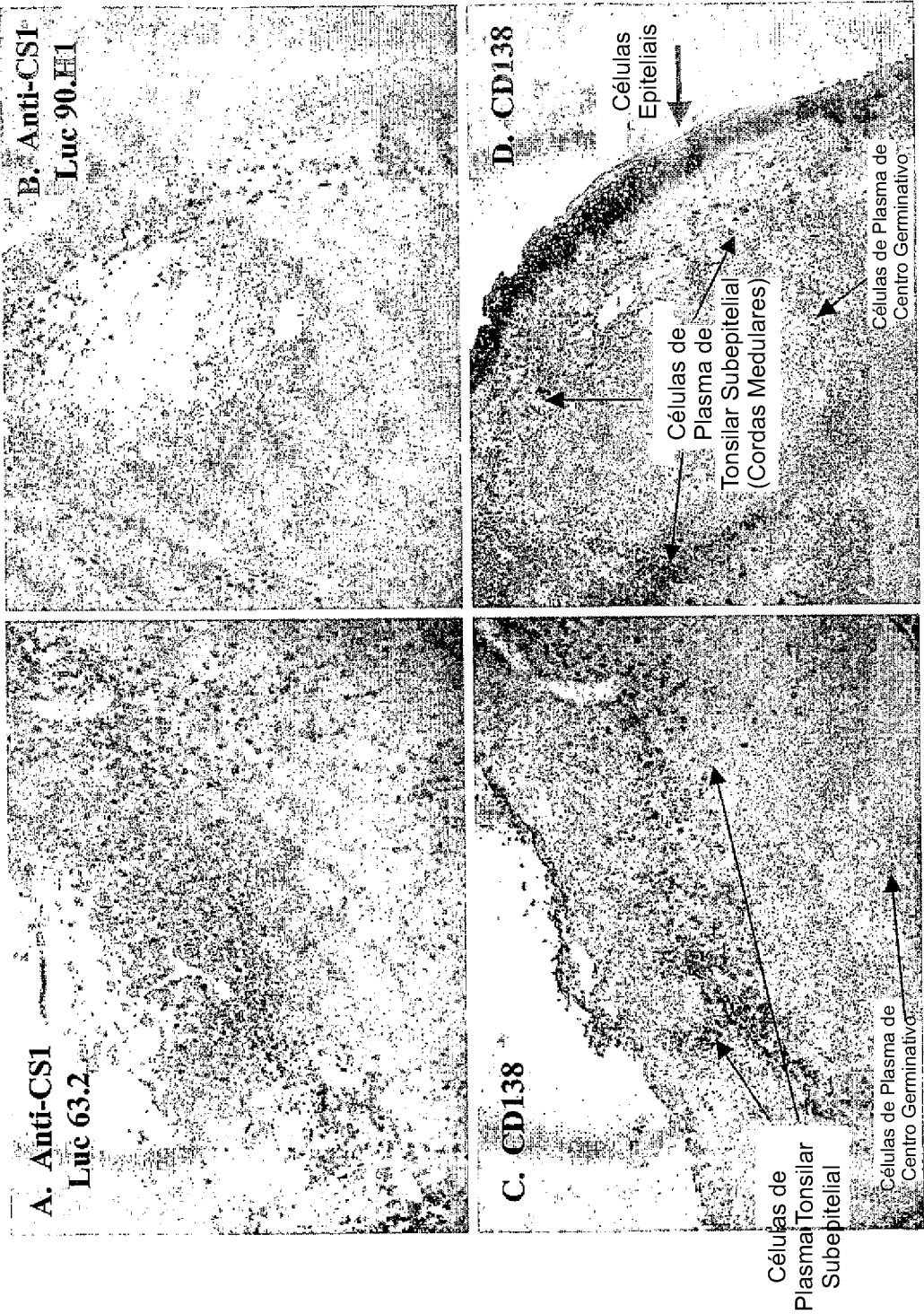


FIG. 5B

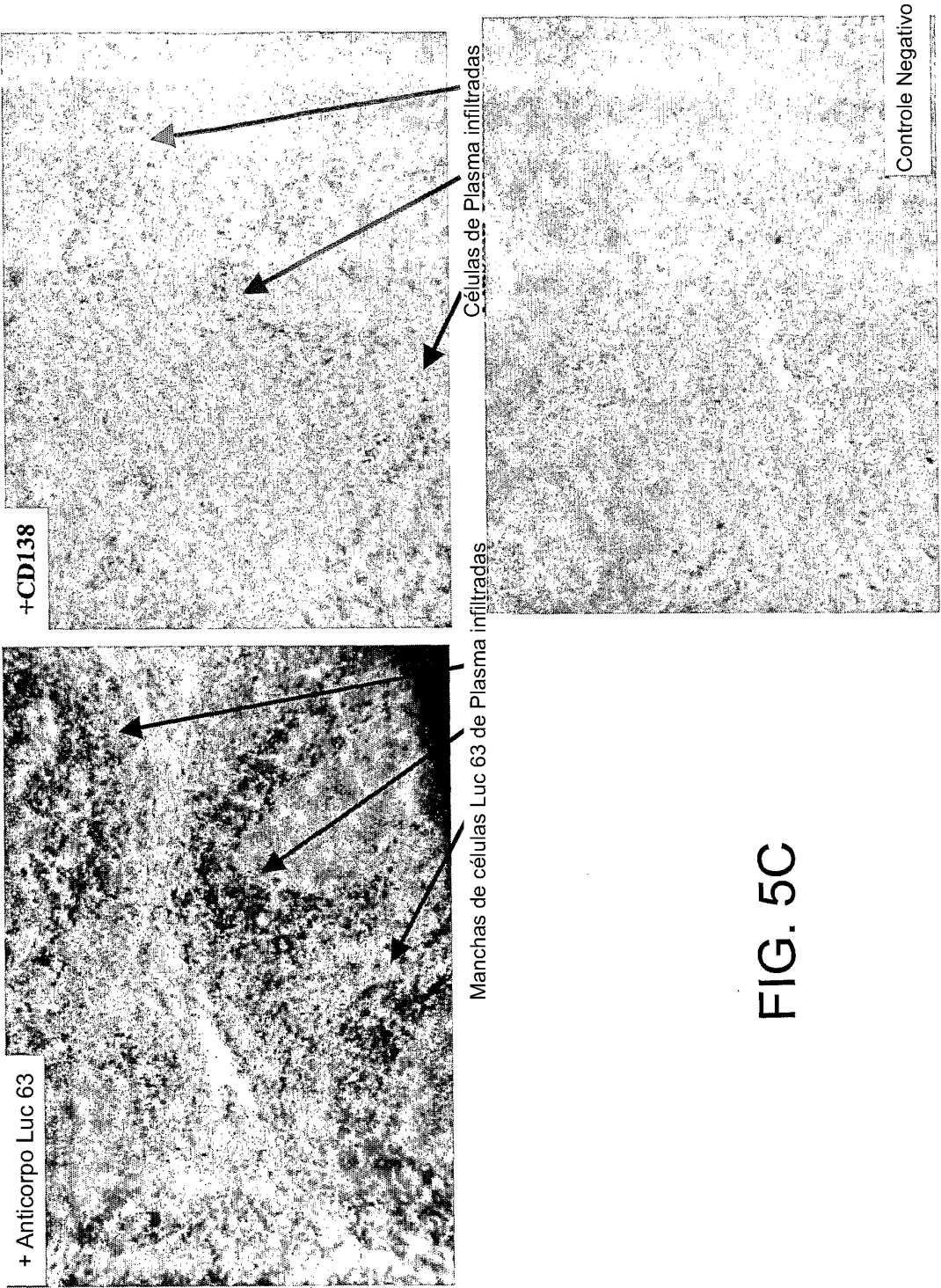


FIG. 5C

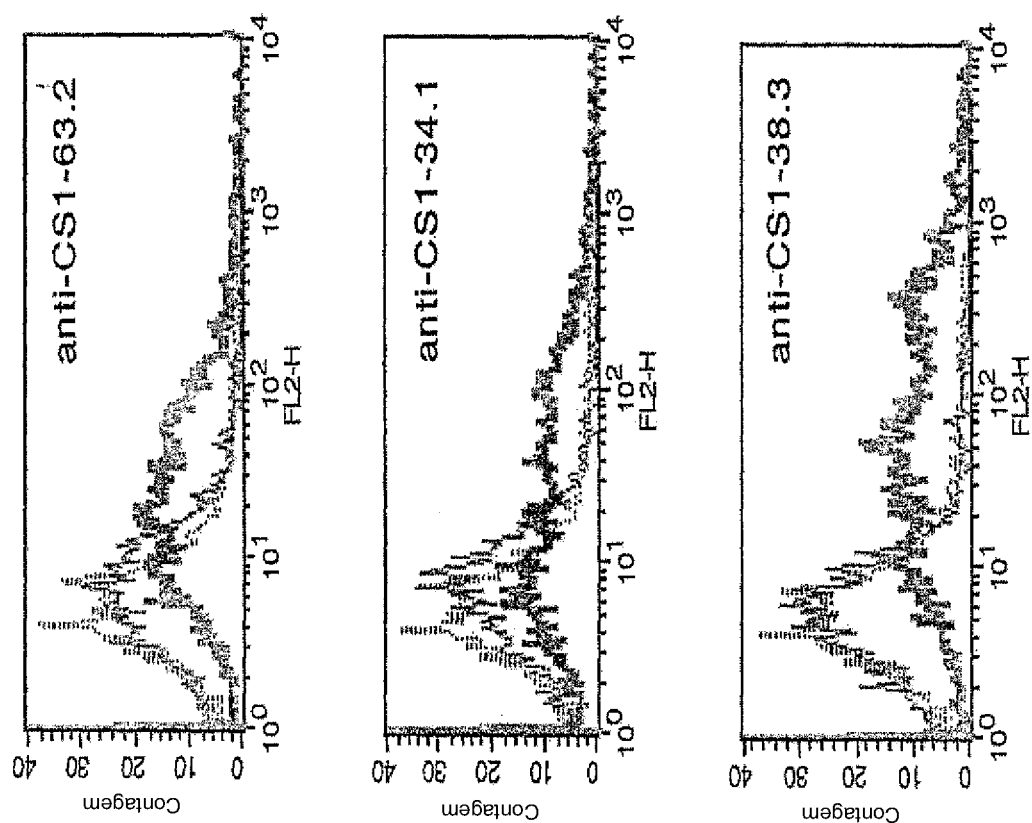


FIG. 6

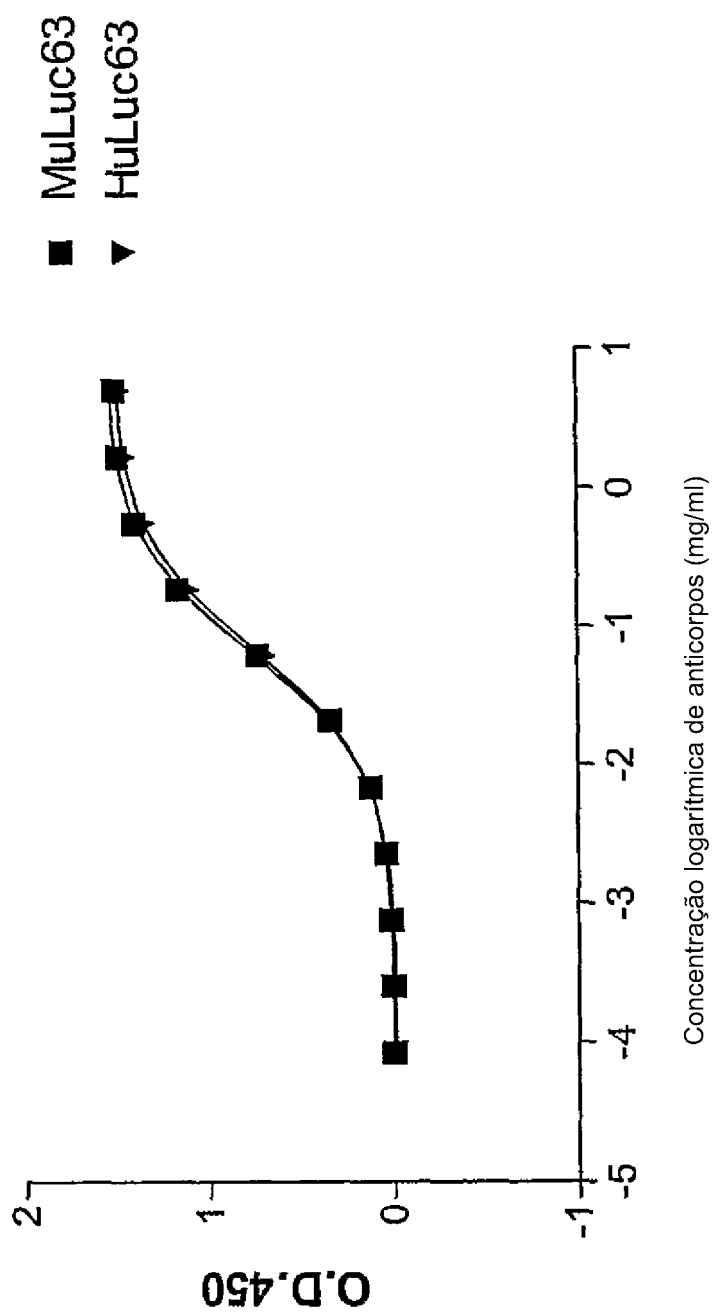


FIG. 7

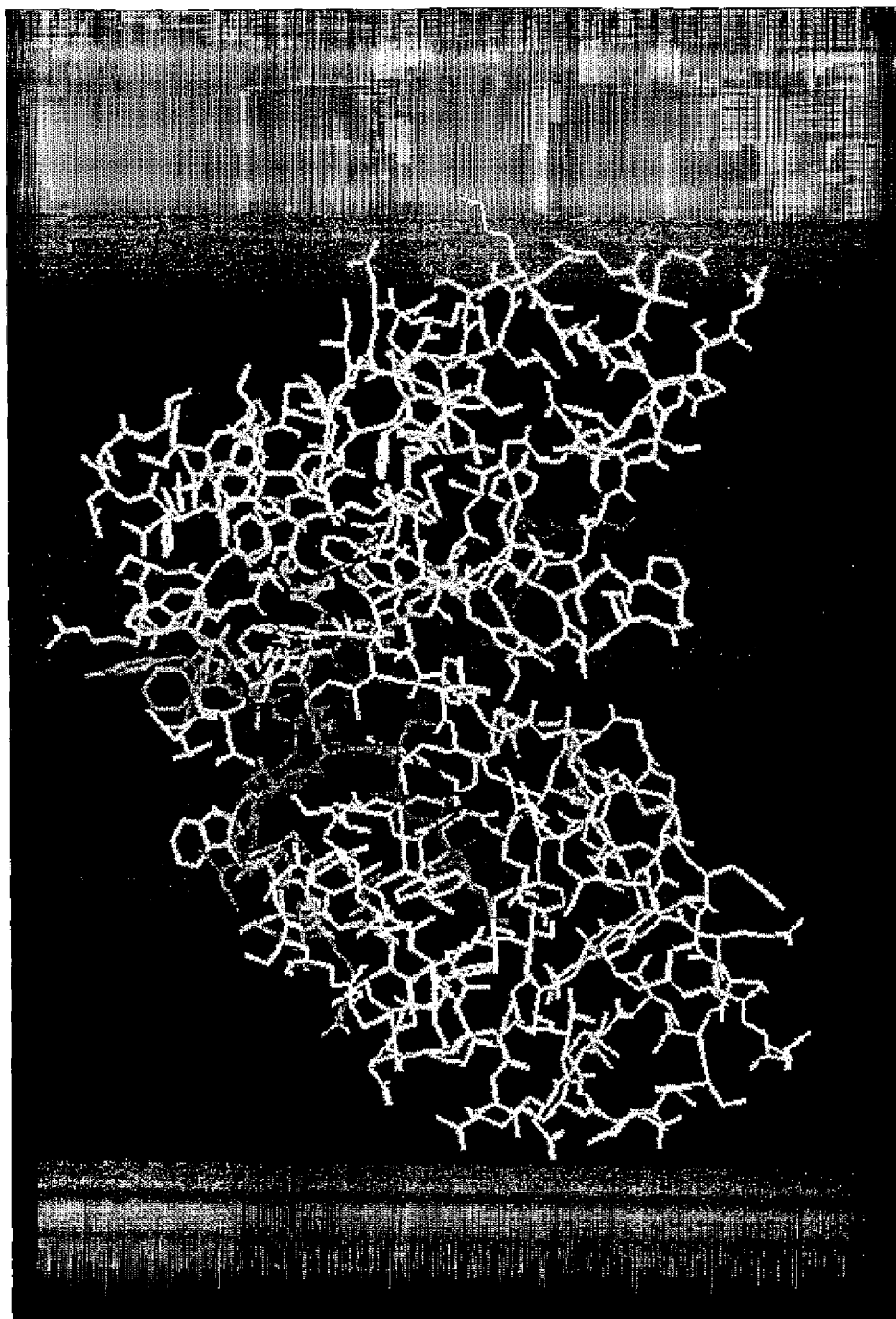
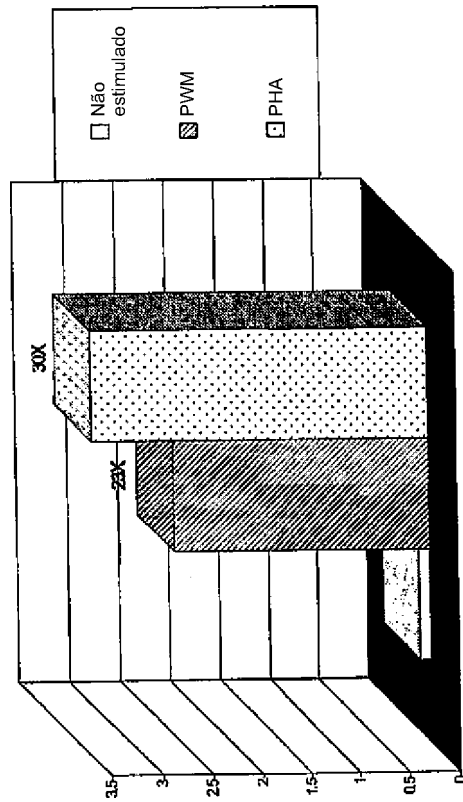


FIG. 8



Análise PCR em tempo real normalizada para rRNA 18S

FIG. 9

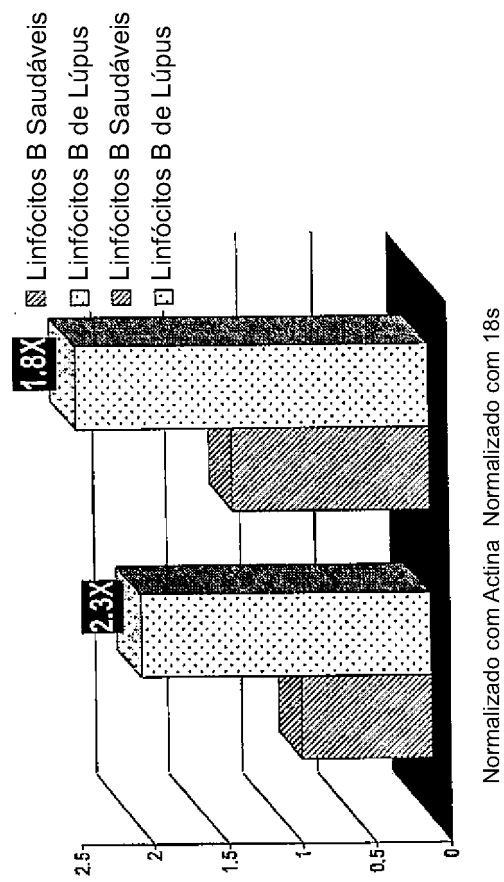


FIG. 10

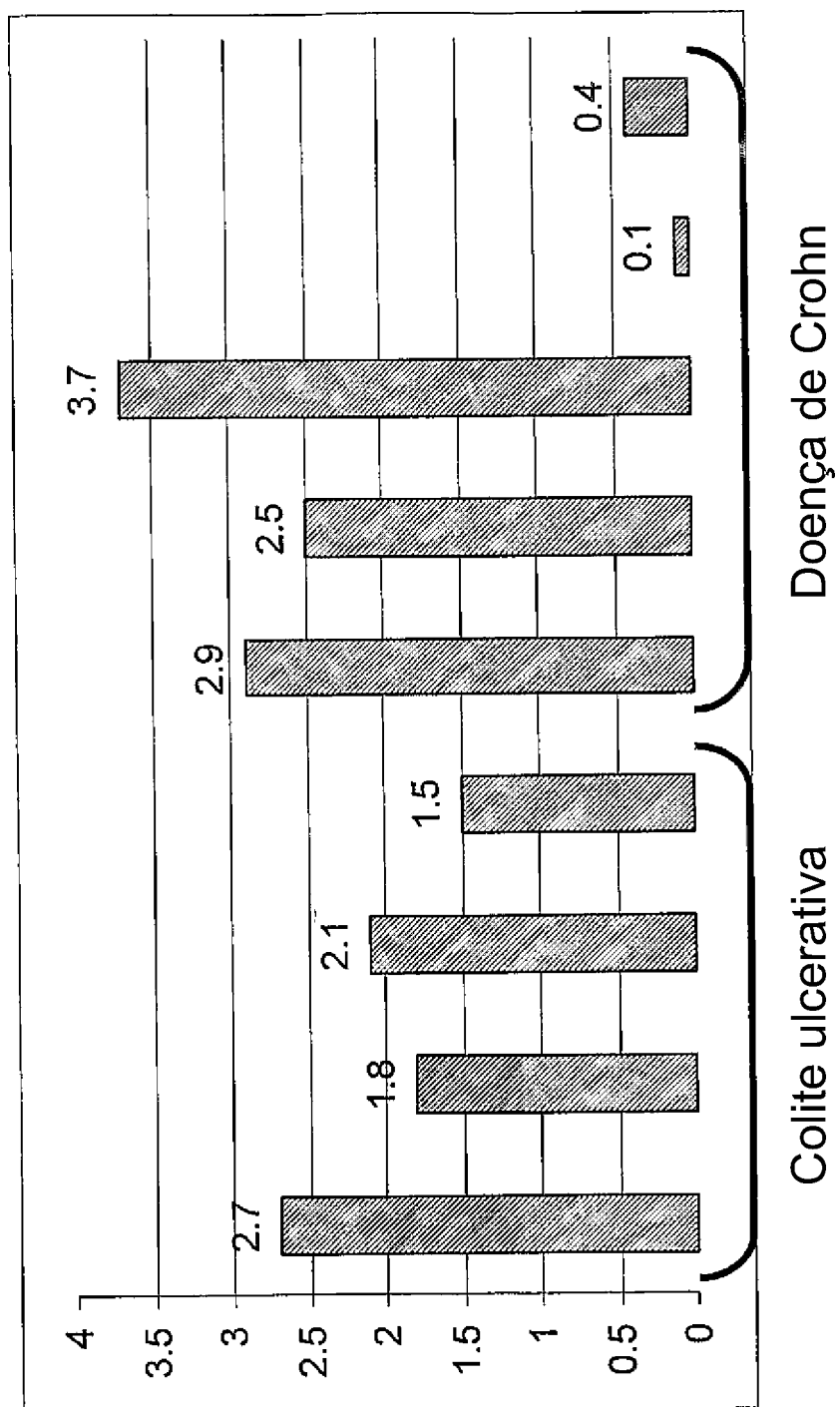


FIG. 11

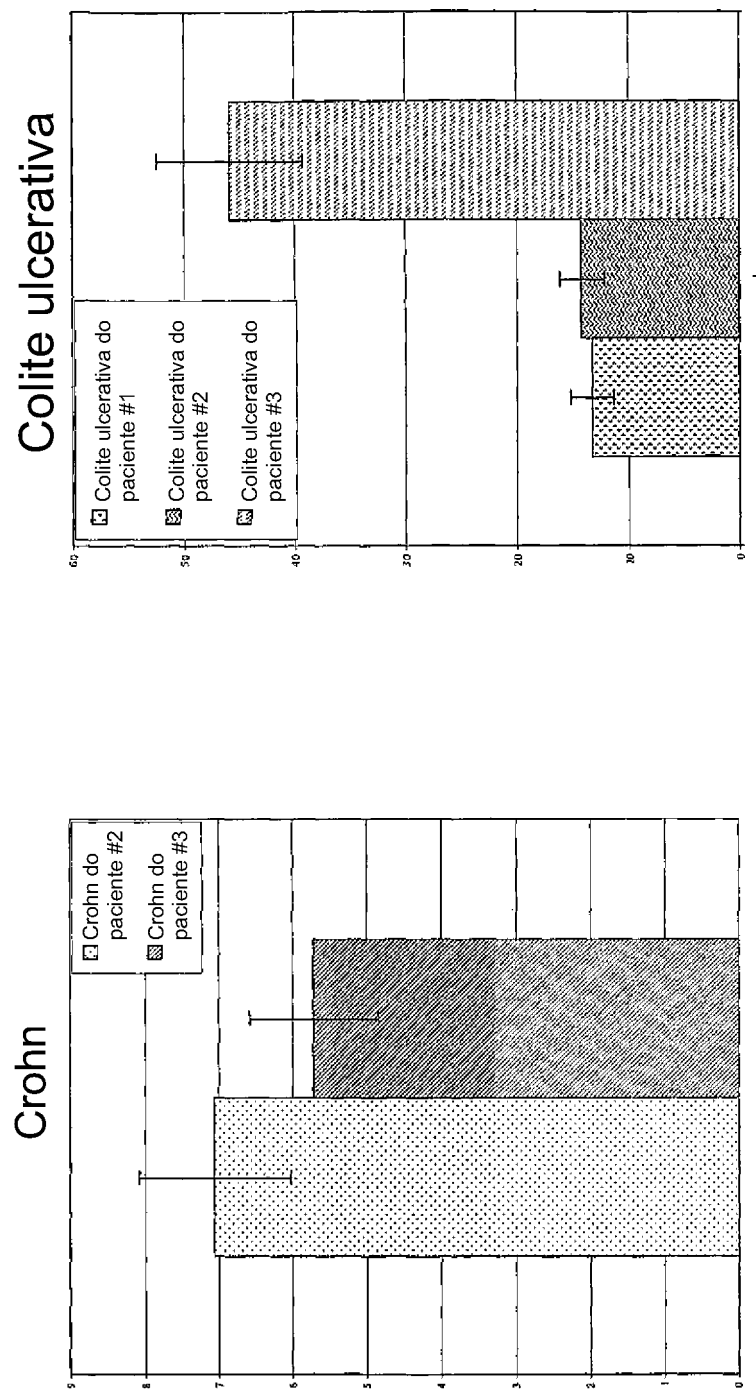


FIG. 12

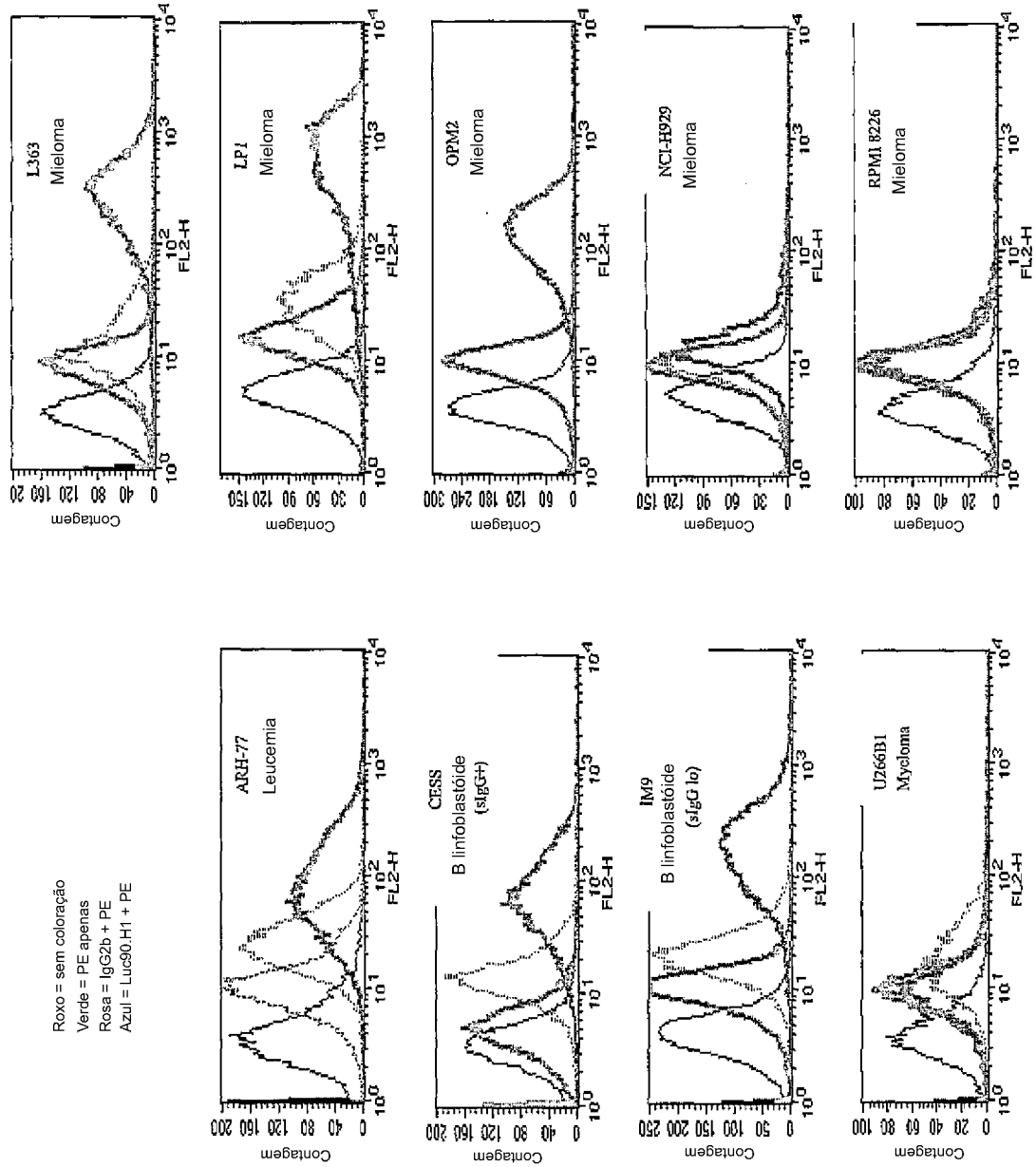


FIG. 13

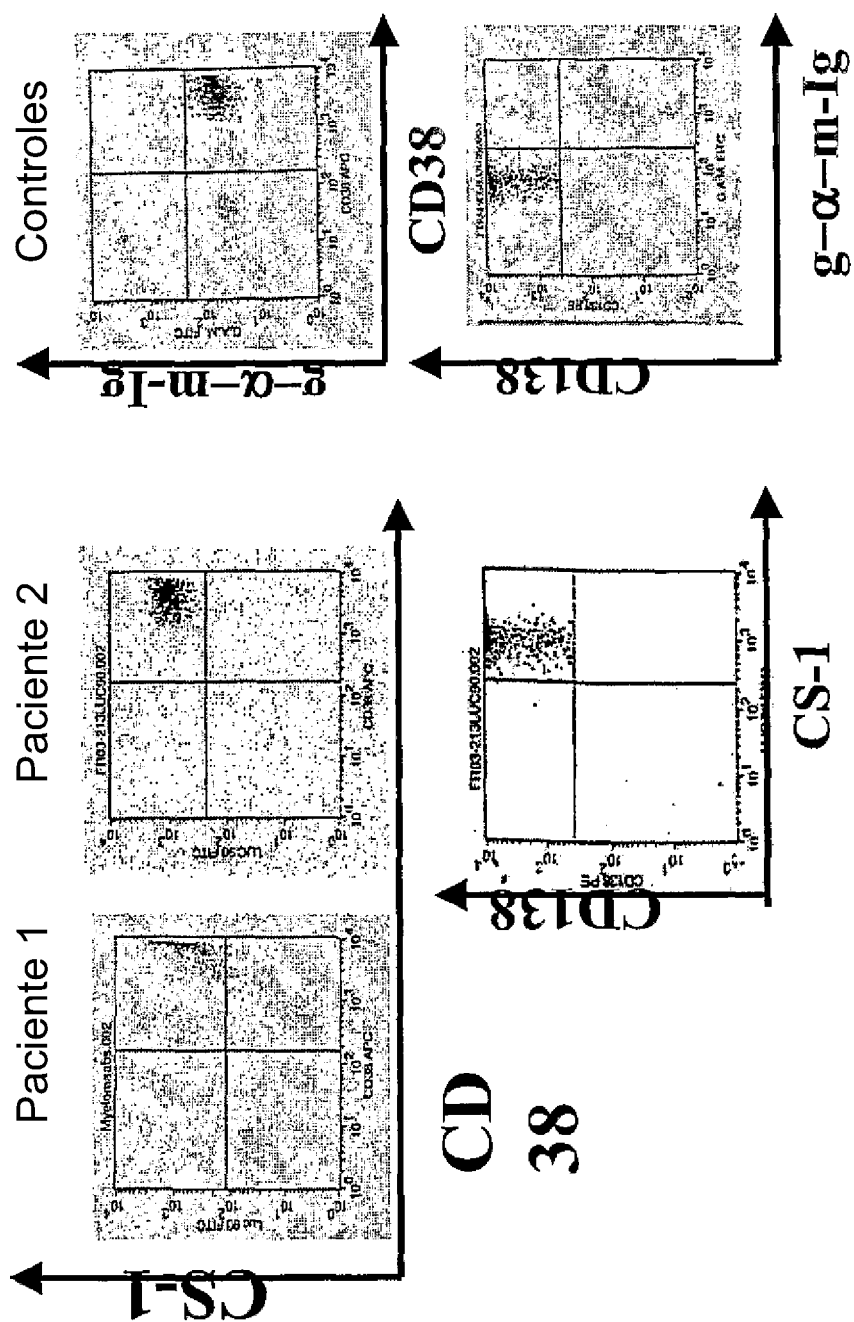


FIG. 14A

Células de plasma na medula óssea bloqueadas

CD45^{dim} CD38^{hi}

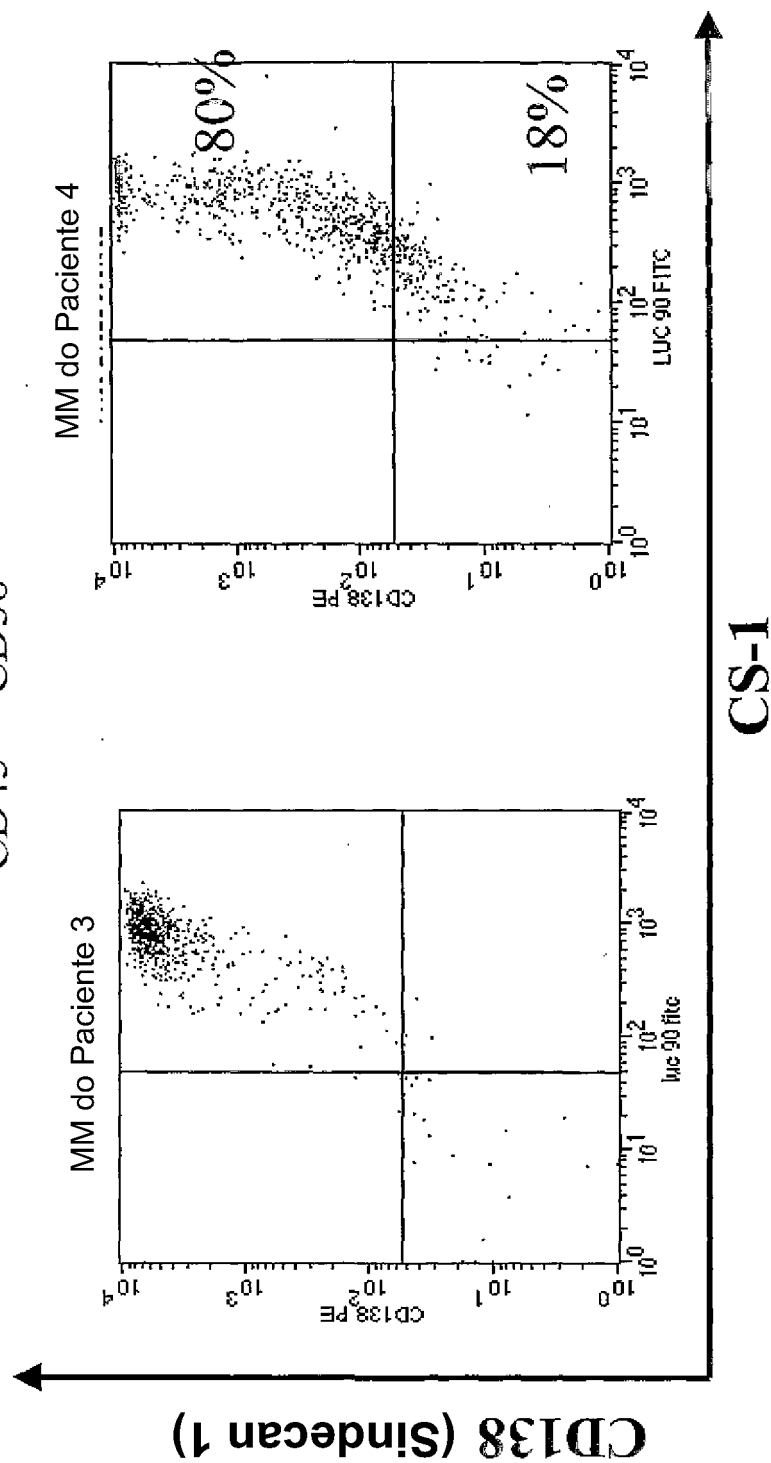


FIG. 14B

MM 5

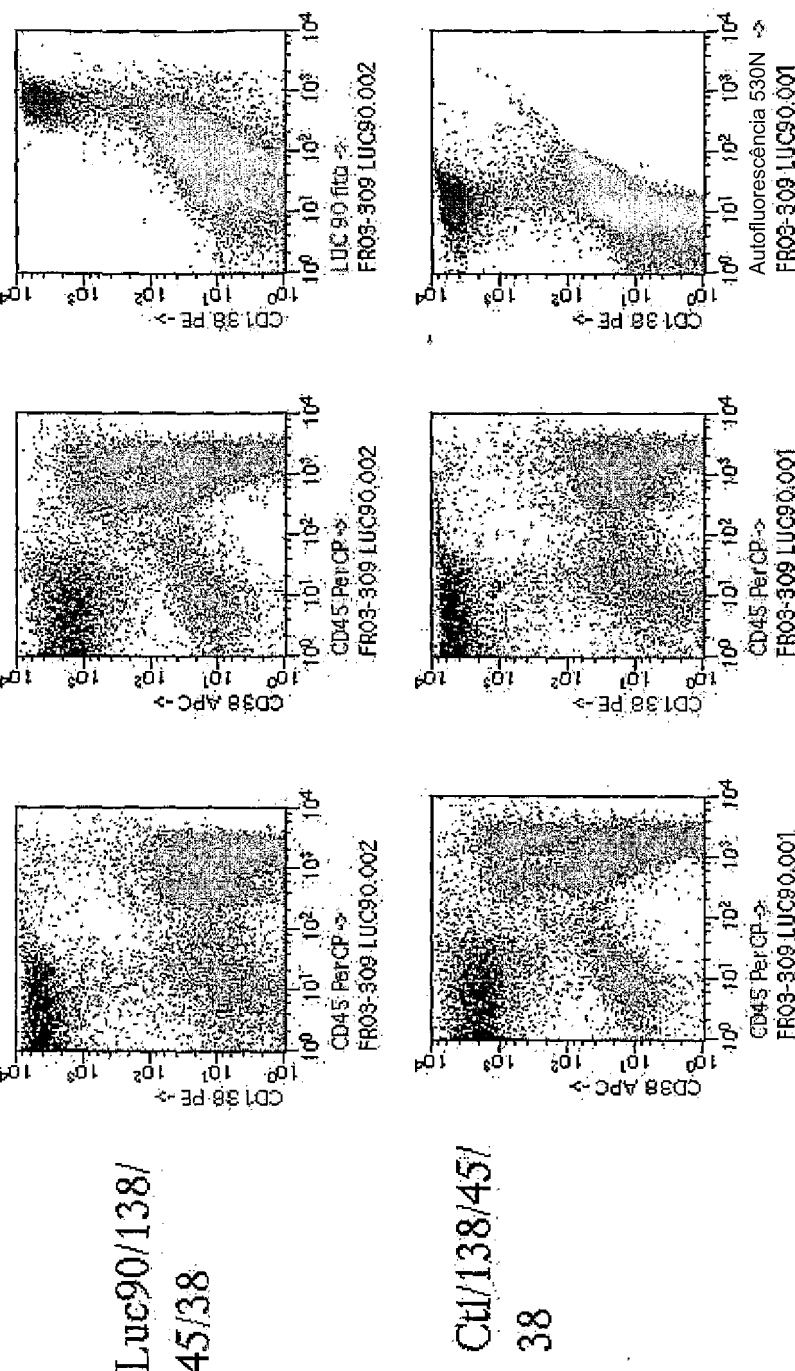


FIG. 14C

MM6

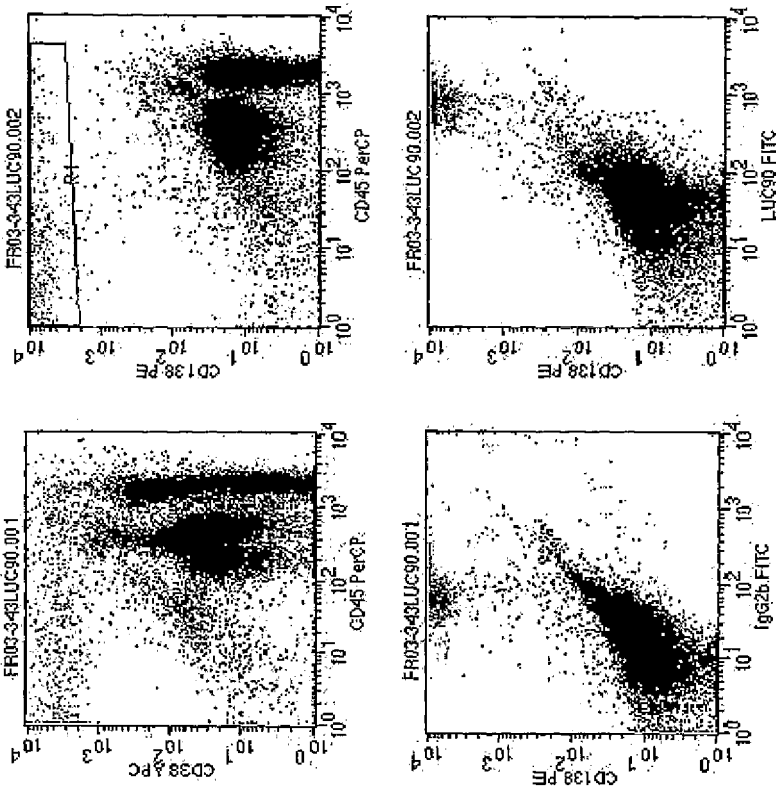


FIG. 14D

MM7

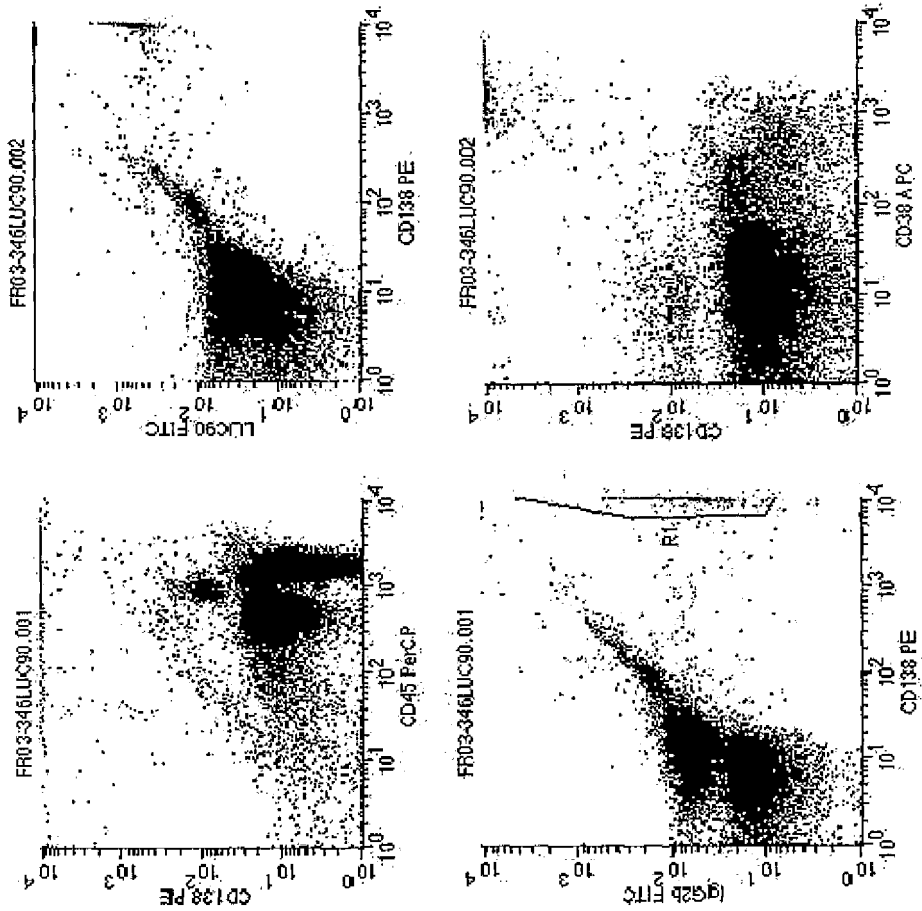


FIG. 14E

MM 8

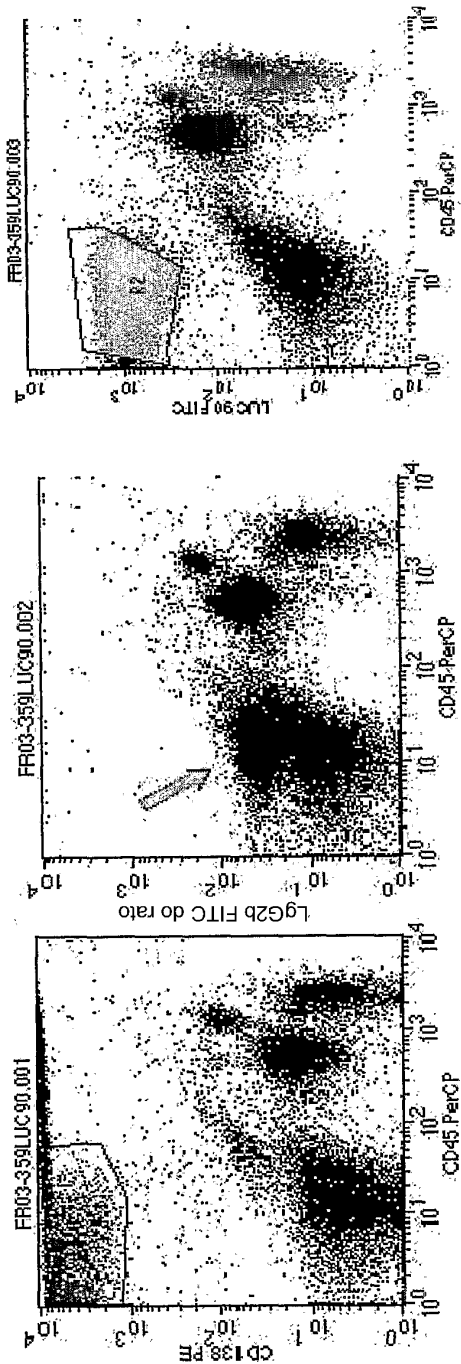


FIG. 14F

MM 9

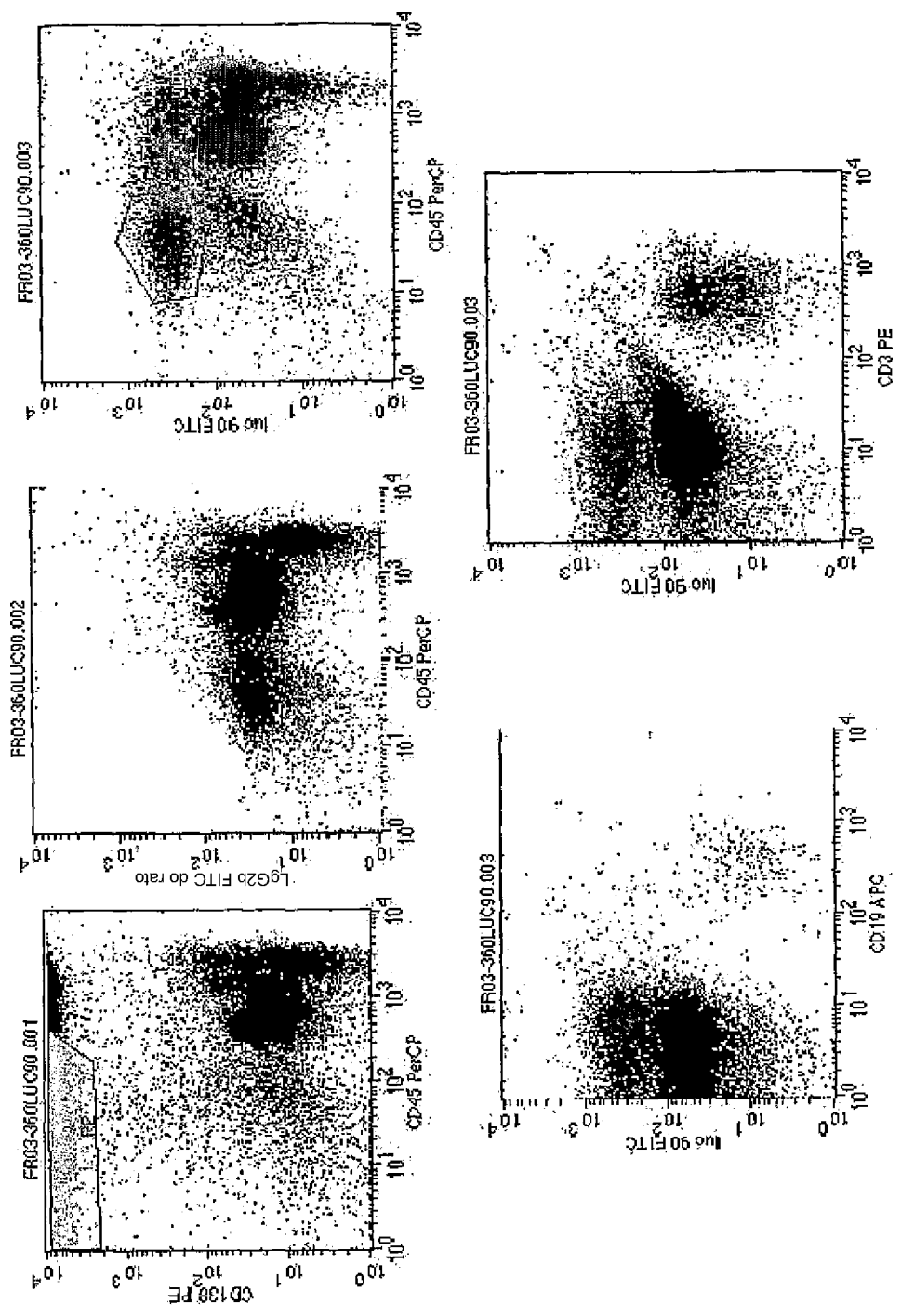


FIG. 14G

MM 10

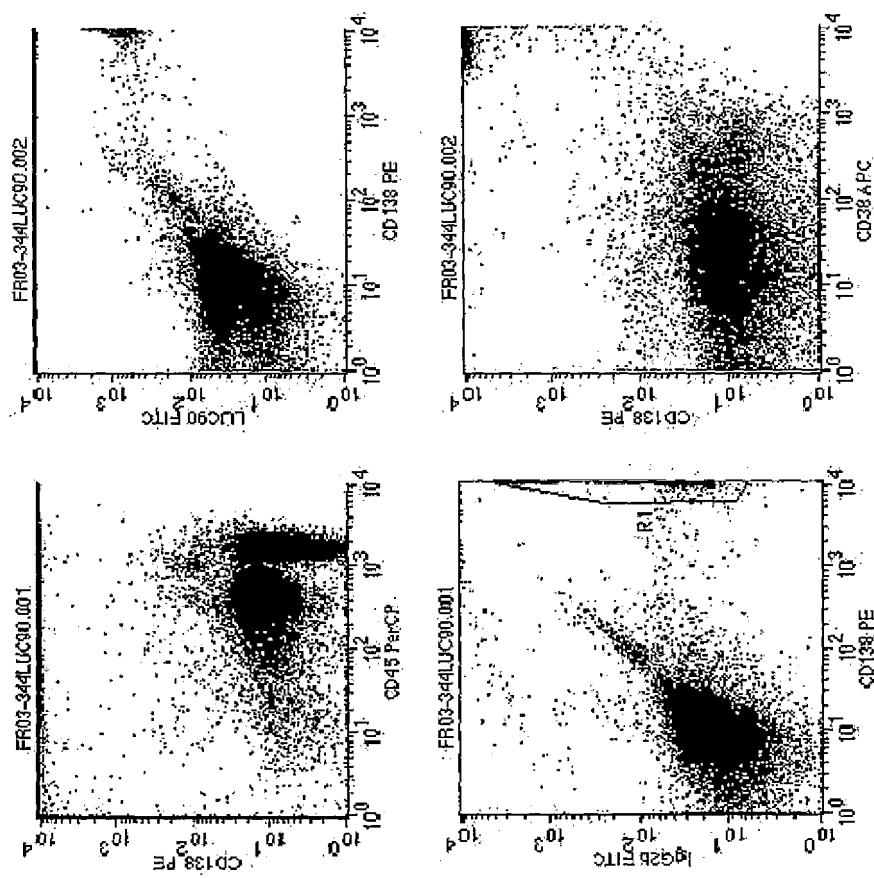


FIG. 14H

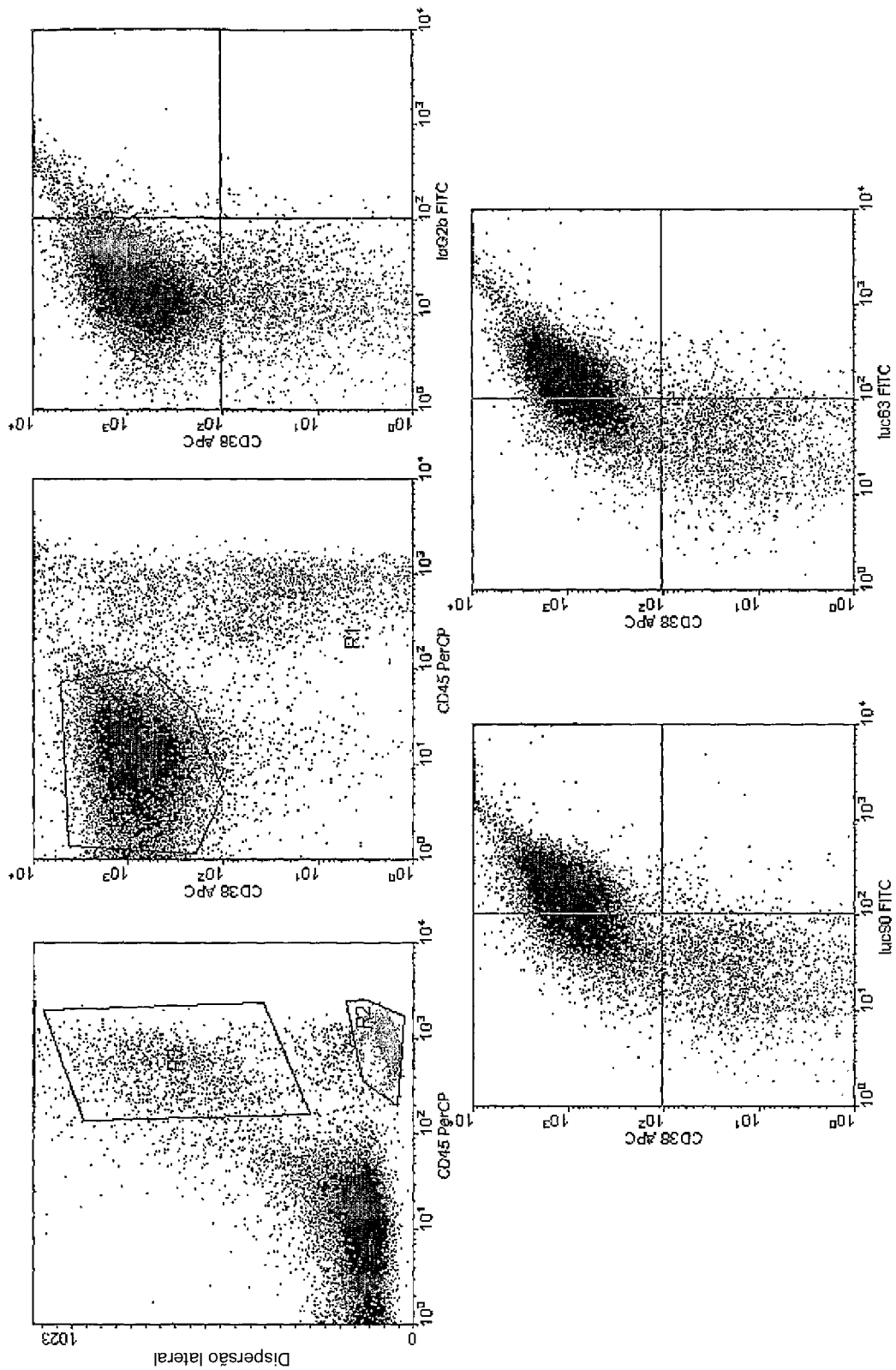


FIG. 14I

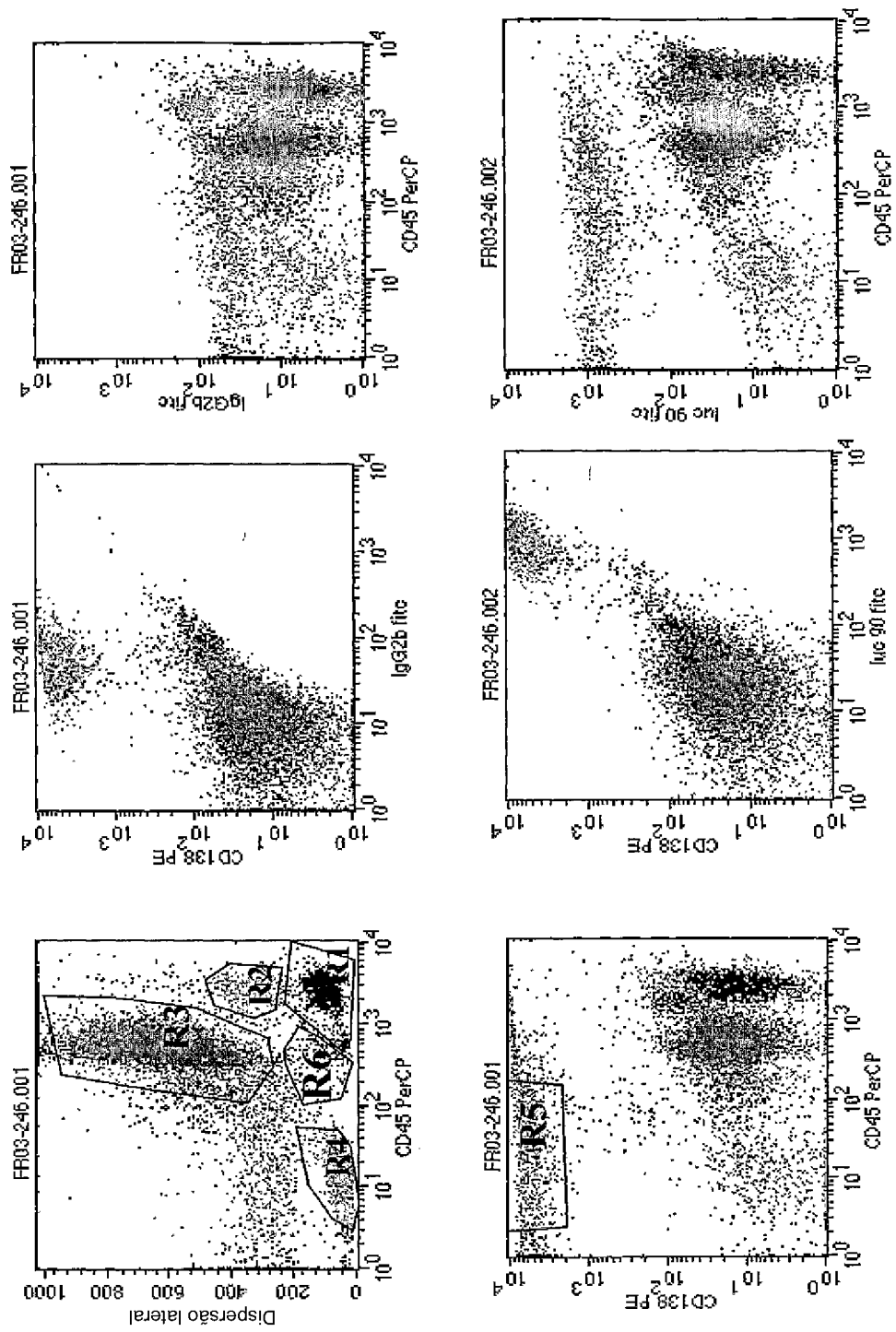


FIG. 15

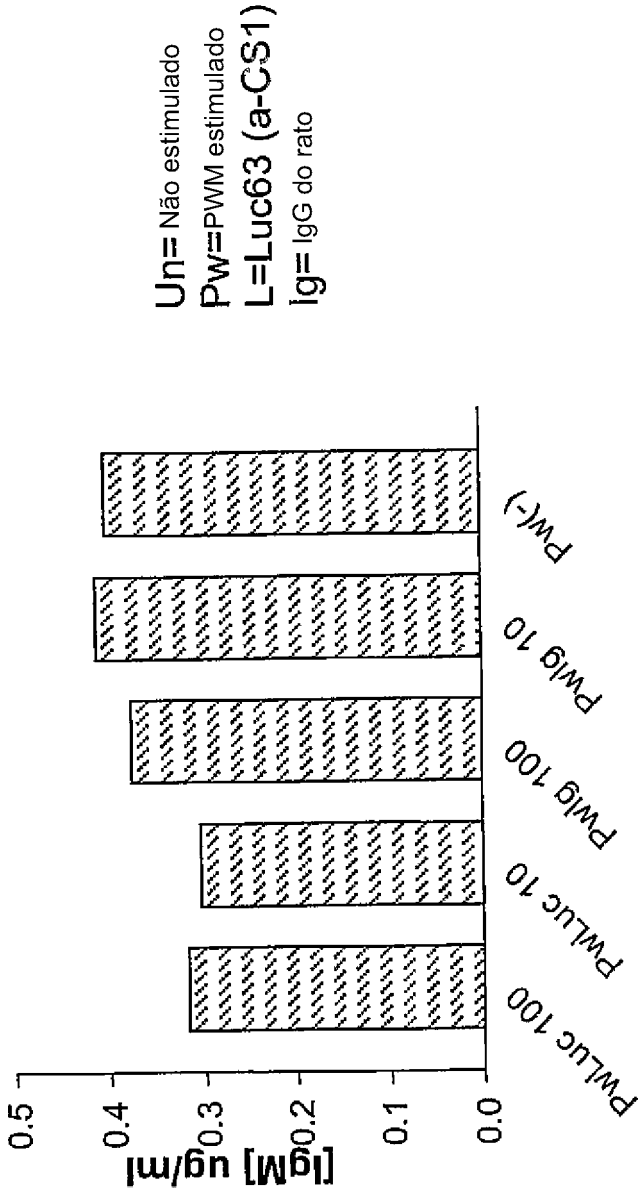


FIG. 16

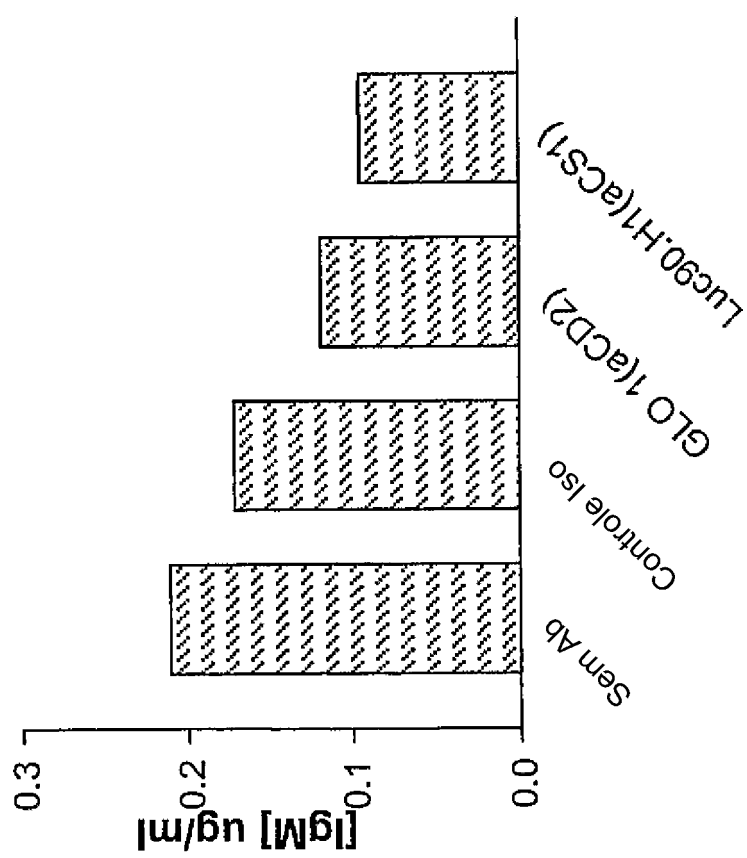


FIG. 17

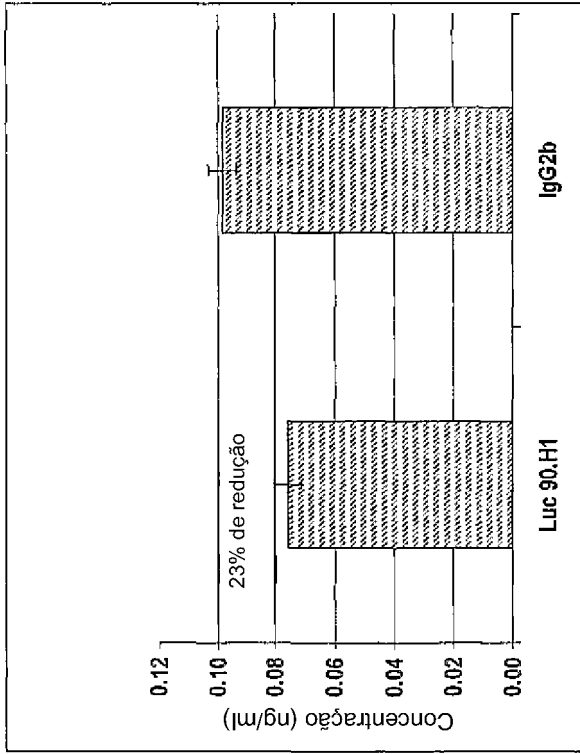
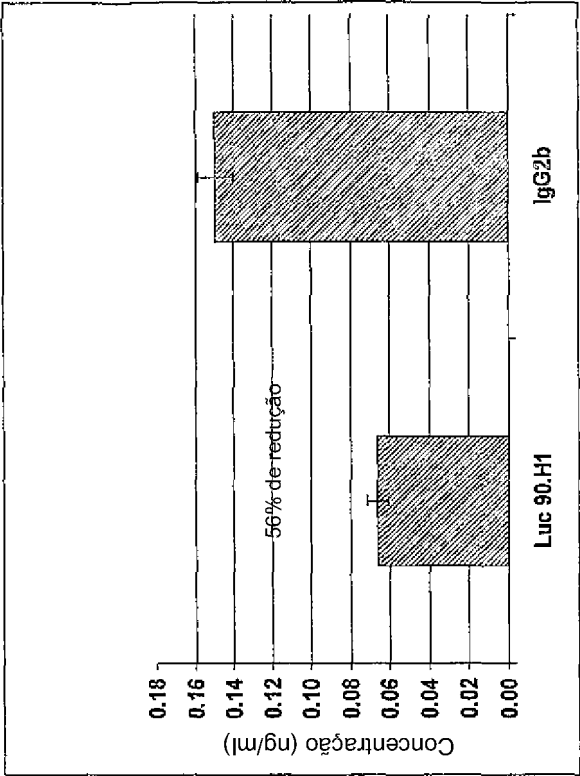


FIG. 18

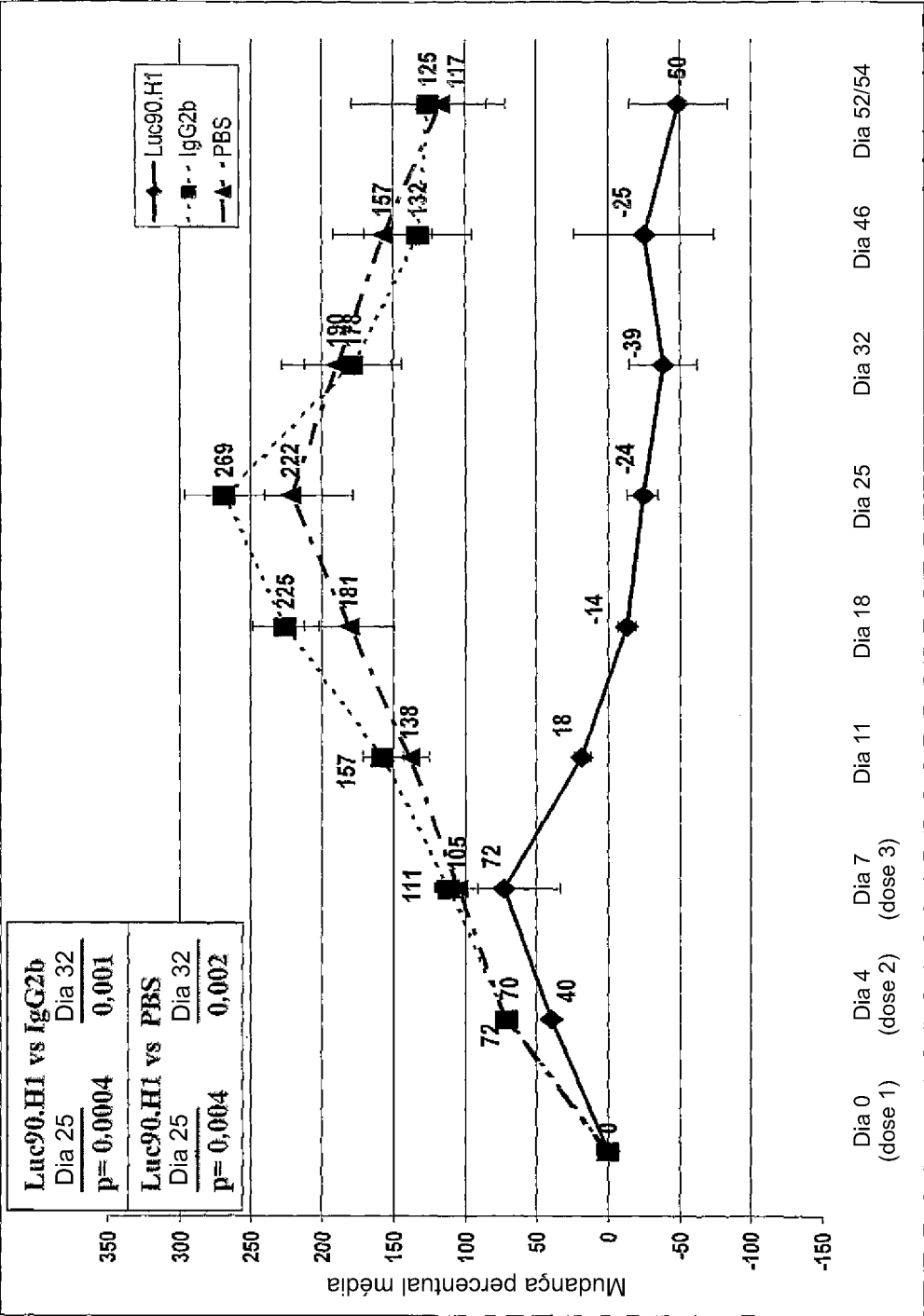


FIG. 19A

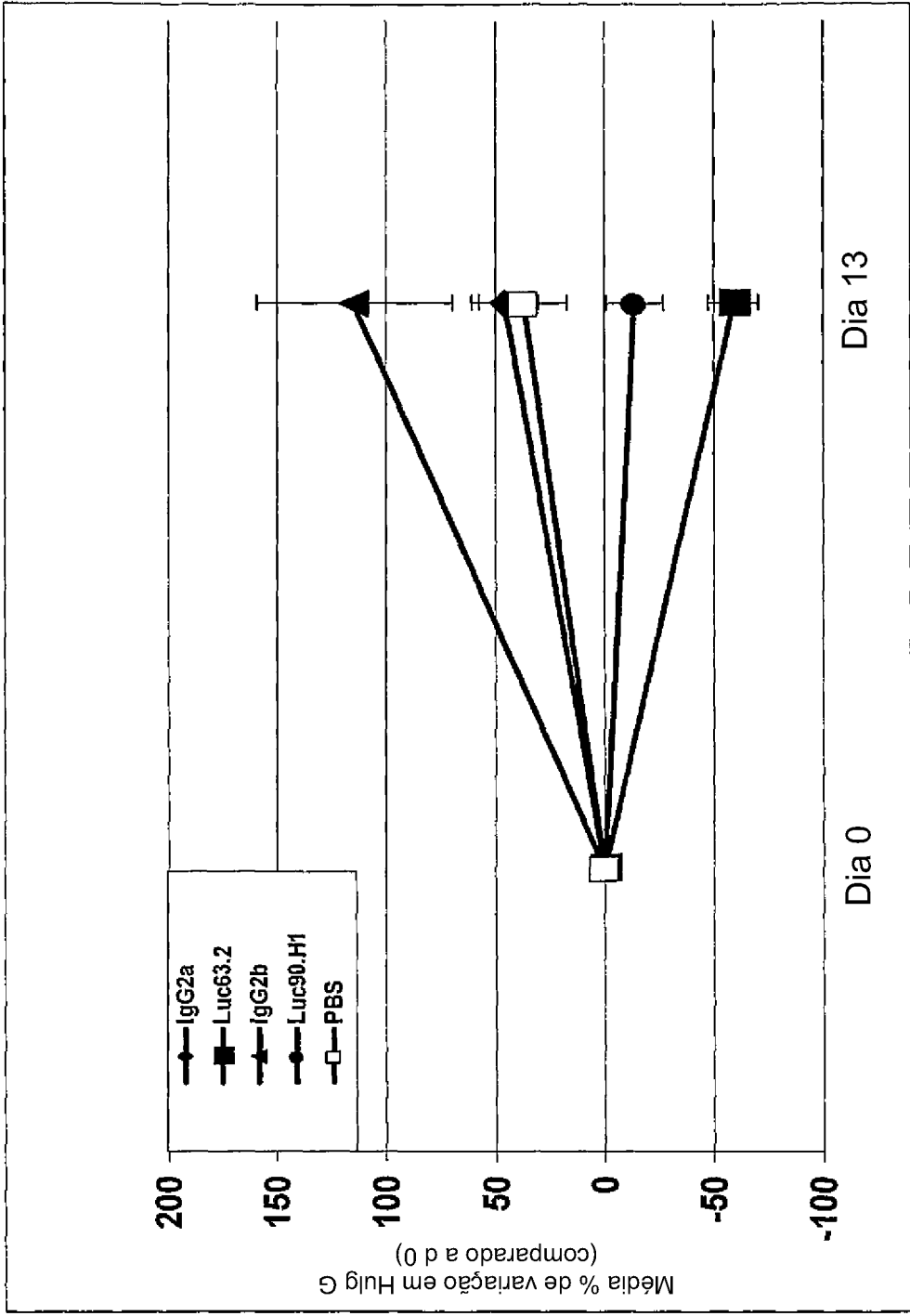


FIG. 19B

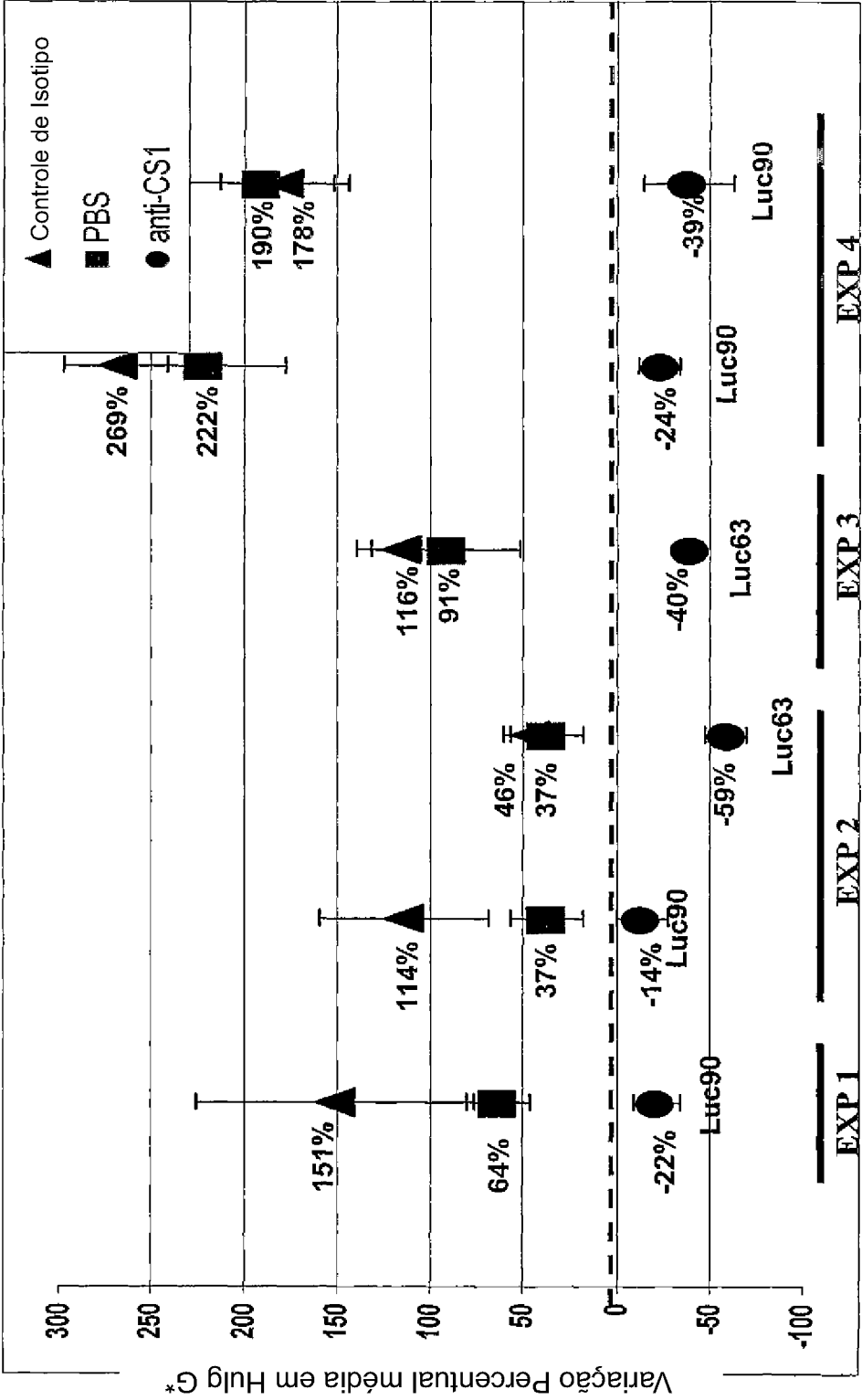


FIG. 19C

α -CS1 vs PBS
 $p = 0.03-0.004$

α -CS1 vs isotipo
 $p = 0.02-0.0008$

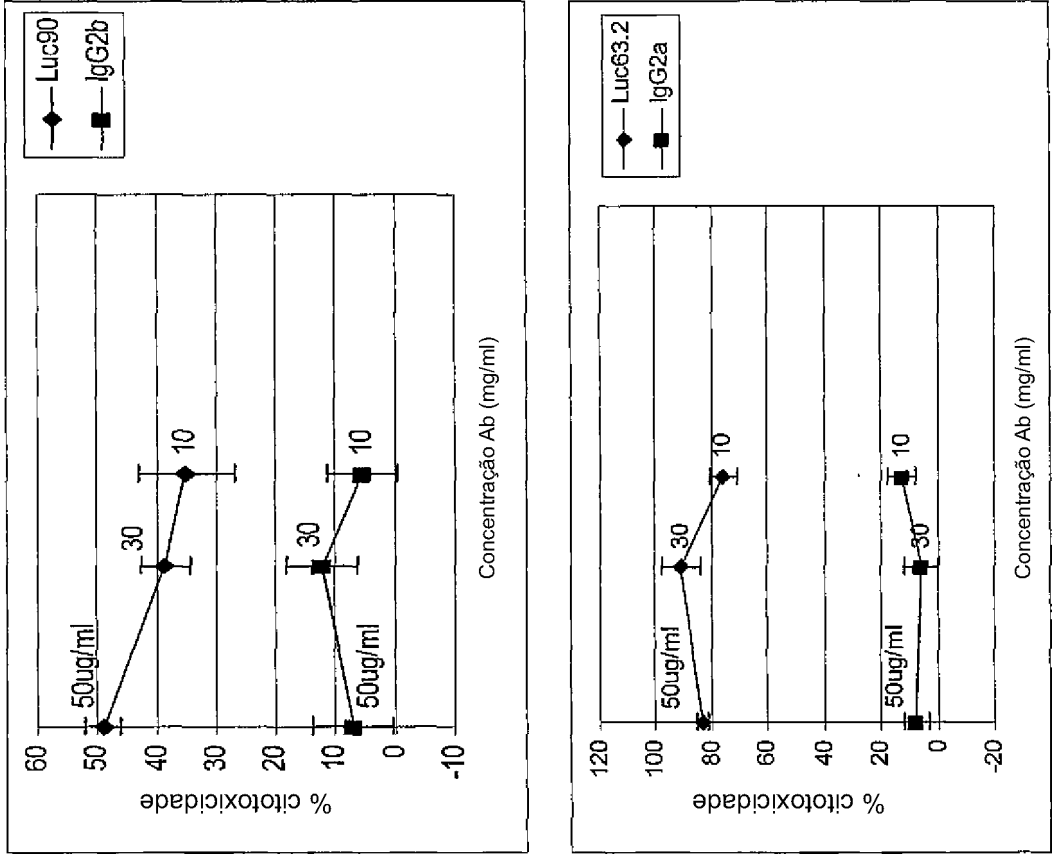


FIG. 20

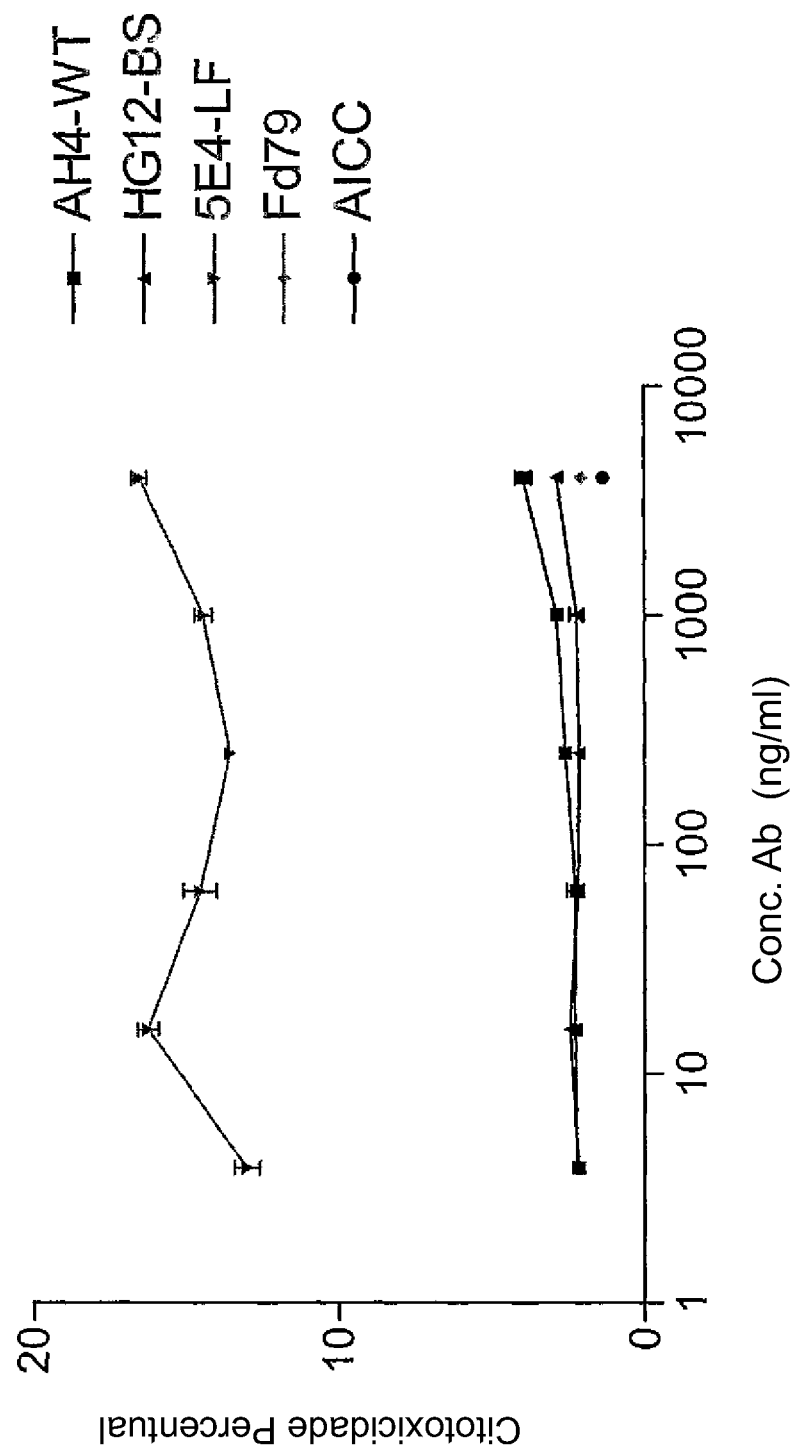


FIG. 21A

ADCC de células OPM2
por Anticorpos Chimeric Luc-90
(desintoxicados)

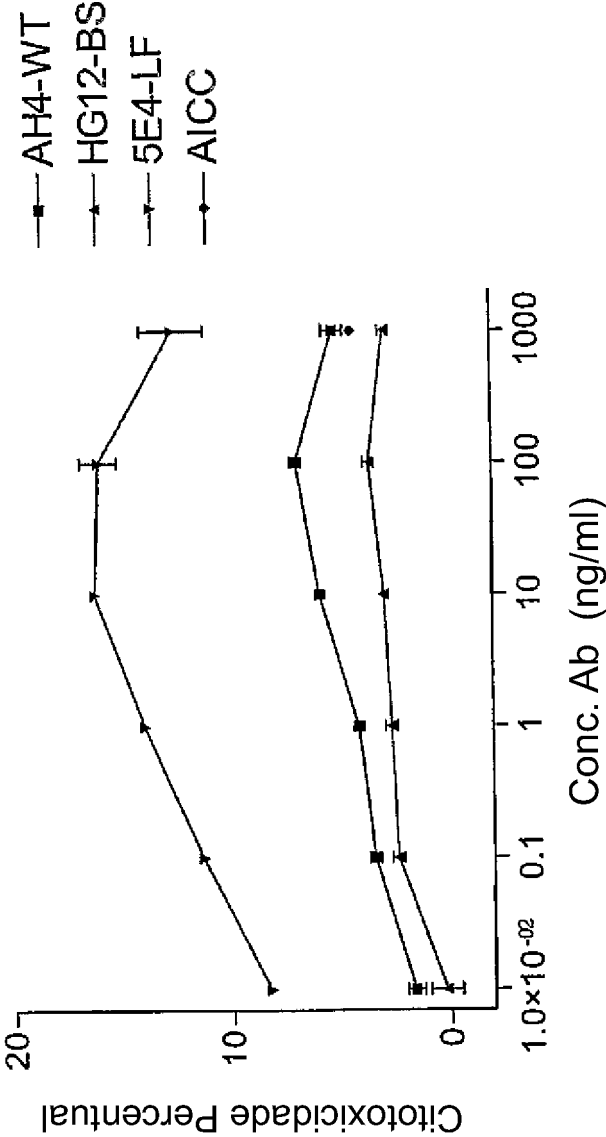


FIG. 21B

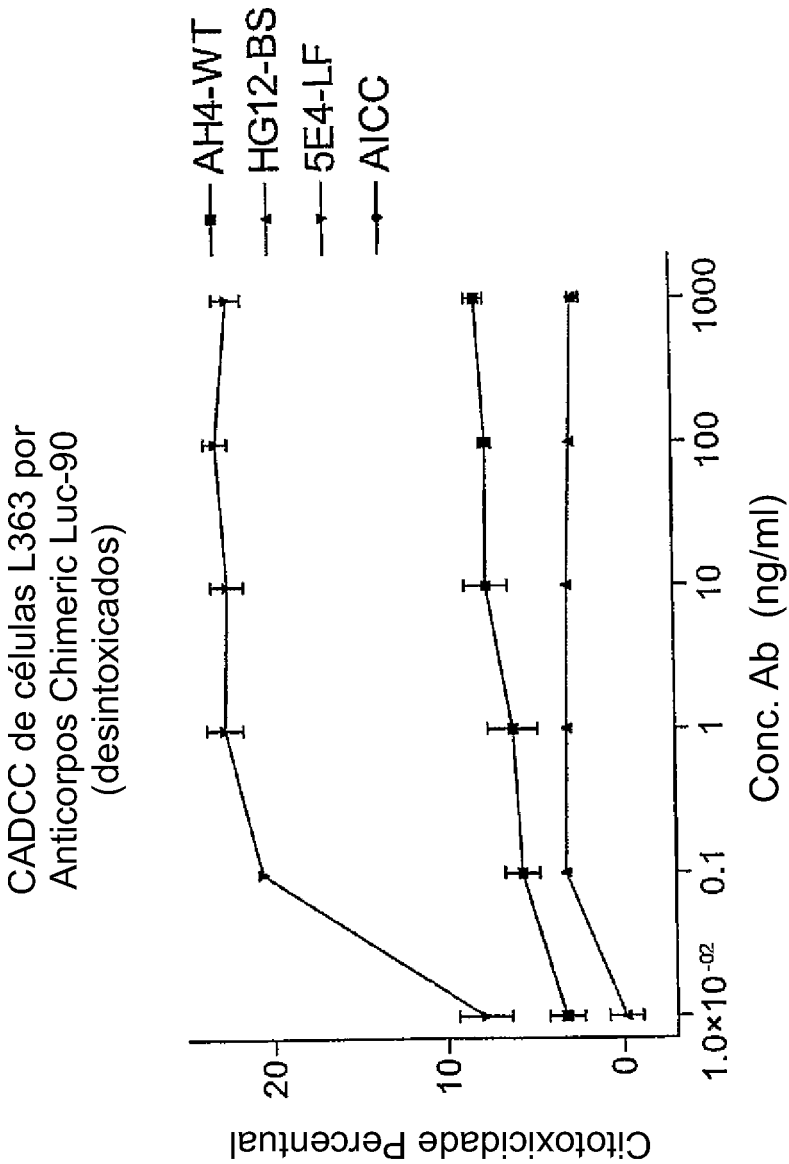


FIG. 21C

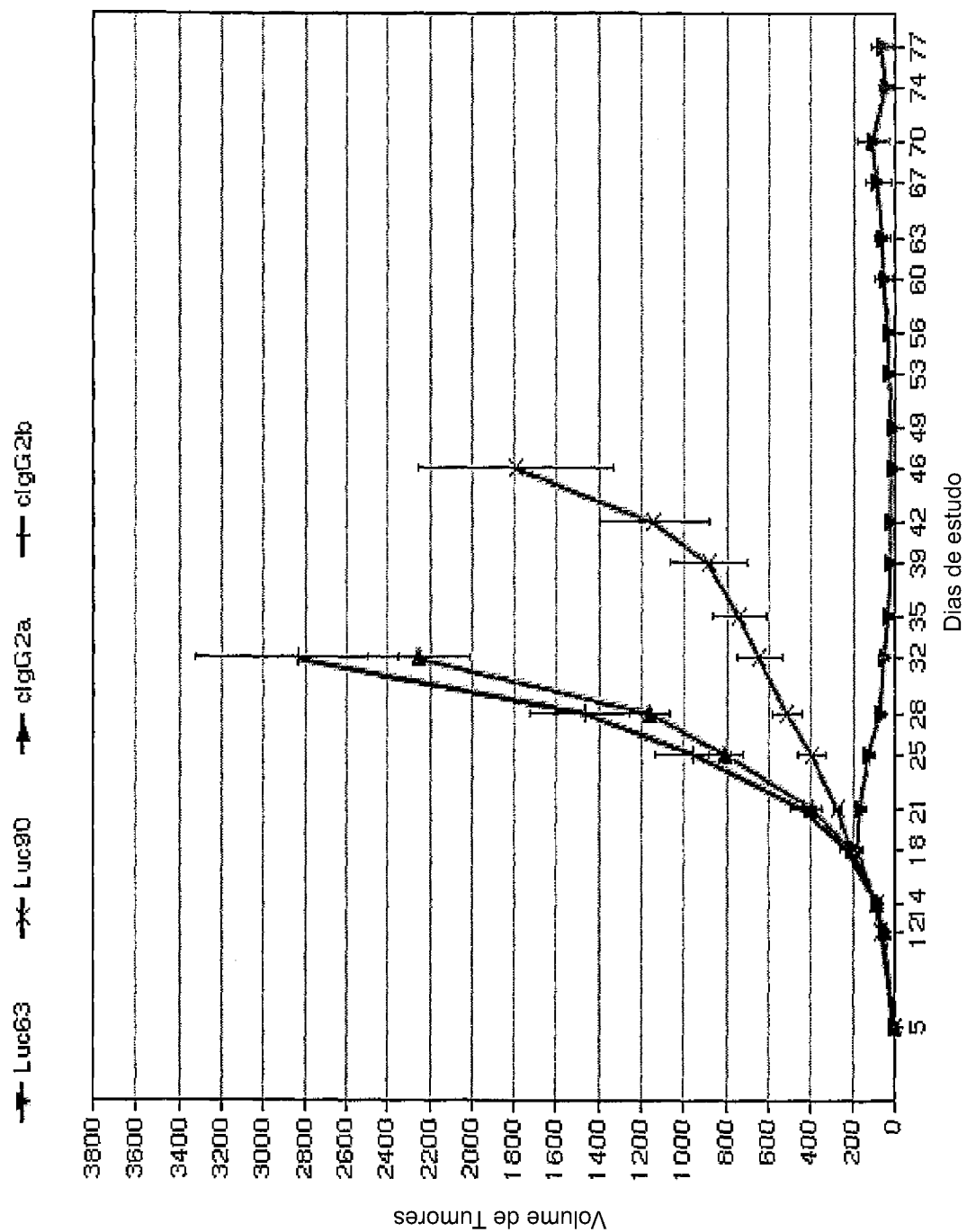


FIG. 22