

(11) Número de Publicação: **PT 975771 E**

(51) Classificação Internacional:
C12N 15/62 (2006.01) **C07K 14/71** (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 1998.04.16	(73) Titular(es): BIOGEN IDEC MA INC.	
(30) Prioridade(s): 1997.04.18 US 44641 P	14 CAMBRIDGE CENTER CAMBRIDGE,	
(43) Data de publicação do pedido: 2000.02.02	MASSACHUSETTS 02142	US
(45) Data e BPI da concessão: 2007.07.11 091/2007	(72) Inventor(es): PHILIP GOTWALS VICTOR KOTELIANSKY RICHARD CATE MICHELLE SANICOLA-NADEL	US US US US
	(74) Mandatário: JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **PROTEÍNAS DE FUSÃO DA REGIÃO CONSTANTE DA
IMUNOGLOBULINA/RECEPTOR DO FTC-BETA DO TIPOII**

(57) Resumo:

RESUMO

PROTEÍNAS DE FUSÃO DA REGIÃO CONSTANTE DA IMUNOGLOBULINA/RECEPTOR DO FTC-BETA DO TIPO II

A presente invenção tem por objecto proteínas de fusão que compreendem o receptor de FTC-beta (factor de transformação do crescimento) do tipo II, ligado a uma porção de uma cadeia constante de imunoglobulina. Também tem por objecto os processos de utilização das proteínas de fusão da presente invenção, para tratar uma variedade de distúrbios fibro-proliferativos.

DESCRIÇÃO

PROTEÍNAS DE FUSÃO DA REGIÃO CONSTANTE DA IMUNOGLOBULINA/RECEPTOR DO FTC-BETA DO TIPO II

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A presente invenção tem por objecto proteínas de fusão solúveis do receptor do FTC-beta e as suas utilizações em processos ou em condições de tratamento, caracterizadas por uma sobre-produção de FTC-beta, incluindo a fibro-proliferação.

ANTECEDENTES

O factor beta de transformação do crescimento (FTC-beta) representa uma família de polipéptidos, dos quais três estão presentes nos mamíferos, FTC-beta 1, FTC-beta 2 e FTC-beta 3. Estes factores têm efeitos globais no crescimento e na diferenciação das células (Roberts e Sporn (1990) Handok. Exp. Pharm. 95: 419-58). Há um crescente corpo de evidências de que o FTC-beta também modula o processo imunitário (Wahl et al. (1989) Immunol. Today 10: 258-61). Para além da estimulação da congregação de células imunitárias no sítio do trauma, o FTC-beta também providencia uma reacção fortemente positiva à sua própria síntese continuada (Kim et al. (1990) Mol. Cell. Biol. 10: 1492-1497).

O FTC-beta pode ser um factor proeminente na etiologia dos distúrbios fibroproliferativos. O FTC-beta é conhecido por estimular as células a produzir mais proteínas, incluindo colagénio, biglicano, decorina e fibronectina; e por inibir enzimas que degradam estas proteínas. Assim, o

FTC-beta pode causar acumulação de tecido fibroso. Por exemplo, na nefropatia diabética e na glomerulonefrite mesangial humana, ambos distúrbios fibroproliferativos, uma característica patológica proeminente e importante é a acumulação da matriz mesangial (Mauer et al. (1984) J. Clin. Invest, 74: 1143-55). Do mesmo modo, a fibrose após radiação é caracterizada por um excesso de FTC-beta, pela proliferação de fibroblastos e pela sobre-produção de tecido conjuntivo (Canney e Dean (1990) Brit. J. Radiol. 63:620-23). Os investigadores que trabalharam neste domínio têm tentado suprimir os efeitos do FTC-beta por meio da administração de um anticorpo anti-FTC-beta. Ver, Border et al. (1990) Nature 346: 371-74; Border et al. ((1992) Kidney Int. 41: 566-570).

Os efeitos biológicos de FTC-beta são mediados por várias proteínas específicas da superfície das células, incluindo os chamados receptores de FTC-beta do tipo I, do tipo II e do tipo III. A maior parte destes receptores foram inicialmente identificados por FTC-beta radio-iodado, reticulados quimicamente com proteínas da superfície das células utilizando o reagente bifuncional DSS. Quase todas as linhas de células que respondem a FTC-beta expressam tanto os receptores do tipo I como os do tipo II, embora os níveis da sua expressão possam variar entre diferentes tipos de células. Nenhum dos receptores do tipo I ou do tipo II, na ausência um do outro, pode mediar uma resposta de FTC-beta, embora o receptor do tipo II sozinho seja capaz de se ligar a FTC-beta.

No desenvolvimento de melhores inibidores de FTC-beta para tratar distúrbios fibroproliferativos, é importante considerar que esses inibidores devem ter um peso molecular mais baixo e uma maior afinidade do que os anticorpos anti-

FTC-beta. Esta combinação de características vai permitir doses muito mais baixas e vai aumentar a facilidade de administração. Além disso, uma proteína natural não vai causar reacções cruzadas com outras espécies.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

De acordo com isto, a presente invenção tem por objecto novas composições e utilizações dessas composições em processos para o tratamento terapêutico de pacientes com distúrbios fibroproliferativos, conforme se descreve aqui a seguir.

A presente invenção tem também por objecto vectores de ADN recombinante que permitem a expressão de proteínas de fusão dos receptores de FTC-beta em células hospedeiras bacterianas e de mamíferos e processos para a sua utilização.

Um dos aspectos da presente invenção é uma proteína de fusão do receptor de FTC-beta isolada, que inibe concorrentialmente a ligação de FTC-beta ao receptor de FTC-beta, em que esta proteína é um receptor de FTC-beta do tipo II, que compreende (a) um polipéptido codificado pelo polipéptido mostrado na SEQ ID N°. 2; (b) um polipéptido que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID N°. 8; ou (c) um polipéptido que compreende a sequência de aminoácidos que é, pelo menos 98 % idêntica à sequência de aminoácidos da SEQ ID N°. 8 ligada a uma segunda proteína que não é um receptor de FTC-beta do tipo II, em que a segunda proteína é uma região constante de uma imunoglobulina. Outras proteínas preferidas contêm a nova sequência de aminoácidos da SEQ ID N°. 11, que engloba a região da fusão em cada um dos lados da junção de receptor de FTC-beta/imunoglobulina.

As composições farmacêuticas da presente invenção são exemplificadas por uma proteína de fusão do receptor de FTC-beta, que compreende (a) um polipéptido codificado pelo polipéptido mostrado na SEQ ID N°. 2; (b) um polipéptido que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID N°. 8; ou (c) um polipéptido que compreende uma sequência de aminoácidos que é, pelo menos, 98 % idêntica à sequência de aminoácidos da SEQ ID N°. 8, num veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico, sendo que a proteína de fusão está numa quantidade suficiente para inibir concorrentialmente a ligação de FTC-beta a um ligando de FTC-beta.

Noutro aspecto, a presente invenção tem por objecto a utilização de uma proteína de fusão de R FTC-beta II, que compreende

- (a) um polipéptido codificado pelo polinucleótido mostrado na SEQ ID N°. 2 ou 4;
- (b) um polipéptido que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID N°. 8 ou 9; ou
- (c) um polipéptido que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 98 % idêntica à sequência de aminoácidos da SEQ ID N°. 8 ou 9,

e uma região constante de uma imunoglobulina, em que a referida proteína de fusão de R FTC-beta II se liga a FTC-beta para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de um indivíduo que sofre de um distúrbio fibroproliferativo.

Os polinucleótidos isolados estão também englobados aqui, codificando, na expressão, para um receptor de FTC-

beta do tipo II ligado a uma segunda proteína, que não é um receptor de FTC-beta do tipo II, conforme descrito aqui. Os polinucleótidos proferidos seleccionam-se no grupo que consiste nas SEQ ID N°s. 1, 2, 3, 4, 10 e 12. Os polinucleótidos que hibridam com estas sequências em condições de hibridação normalizadas e que codificam uma proteína que têm uma actividade inibidora de FTC-beta de uma proteína de fusão do receptor de FTC-beta do tipo II, estão também aqui descritas. Os polinucleótidos que codificam na expressão de uma proteína codificada pelas sequências referidas de polinucleótidos estão também aqui englobados.

Os processos da presente invenção incluem um processo para a produção da proteína de fusão do receptor de FTC-beta conforme aqui descrito, compreendendo a cultura de uma célula hospedeira contendo um vector da presente invenção, permitindo que a referida célula expresse a proteína de fusão, isolando e purificando a proteína de fusão.

Um enquadramento é a utilização de uma composição num processo para o abaixamento dos níveis de FTC-beta num indivíduo, que compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade efectiva de um antagonista de FTC-beta, que é proteína de fusão do receptor de FTC-beta, que compreende a sequência de aminoácidos das SEQ ID N°s 8, 9, 11 e 13.

Outro enquadramento, consiste na utilização de uma composição num processo para abaixamento dos níveis de FTC-beta num indivíduo com artrite, que compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade efectiva de um antagonista do FTC-beta, que é uma proteína de fusão do receptor de FTC-beta, compreendendo a sequência de aminoácidos das SEQ ID N°s. 8, 9, 11 e 13. Num

enquadramento, a presente invenção providencia a utilização de uma composição num processo para o tratamento de um indivíduo, de uma condição médica associada com um distúrbio fibroproliferativo. O processo providencia a utilização, para uma administração parentérica, oral ou local de uma quantidade suficiente da proteína de fusão solúvel do receptor de FGF-beta a um indivíduo, para reduzir ou melhorar o distúrbio e/ou bloquear a actividade de FGF-beta no indivíduo.

Ainda noutro enquadramento, a utilização da composição no processo da presente invenção providencia a administração da proteína de fusão do receptor de FGF-beta por processos intravenosos, intraoculares, intra-articulares, transdérmicos e entéricos. Noutro enquadramento da presente invenção, a composição compreende a administração da proteína de fusão do receptor de FGF-beta a pacientes com distúrbios vasculares do colagénio, tais como, esclerose sistémica, polimiosite, escleroderma, dermatomyosite ou lúpus eritematoso sistémico.

Ainda noutro enquadramento da presente invenção, a composição compreende a administração da proteína de fusão do receptor de FGF-beta a pacientes com fibrose intraocular e pulmonar. Ainda noutro enquadramento, a proteína de fusão do receptor de FGF-beta é administrada a pacientes com nefropatia diabética, glomerulonefrite, vitreoretinopatia proliferativa e artrite reumatóide.

Ainda noutro enquadramento, a utilização da composição no processo da presente invenção providencia o tratamento de uma ferida num indivíduo para evitar a sobre-produção da formação de tecido conjuntivo que está associada com uma sobre-regulação de FGF-beta. A utilização da composição do

processo providencia a administração de uma quantidade suficiente da proteína de fusão do receptor de FTC-beta ao indivíduo, para reduzir a quantidade ou a actividade de FTC-beta nesse indivíduo. Noutros enquadramentos, os tipos de feridas incluem incisões cirúrgicas, lacerações induzidas por traumas e feridas que envolvem o peritoneu para os quais a sobre-produção da formação do tecido conjuntivo constitui adesões abdominais. Ainda noutro enquadramento, a sobre-produção da formação de tecido conjuntivo que serão evitadas incluem escaras, incluindo as escaras que envolvem a restenose de vasos sanguíneos e escaras hipertróficas e quelóides.

Noutro enquadramento, a presente invenção providencia a utilização de uma composição num processo que previne a fibrose após radiação num indivíduo que sofre ou estará próximo de sofrer terapia de radiação. A proteína de fusão do receptor de FTC-beta é administrada numa quantidade suficiente para prevenir a sobre-produção da formação de tecido fibroso.

Deve entender-se que tanto a descrição geral anterior como a descrição detalhada que se segue são exemplificativas e explanatórias e pretendem providenciar uma maior explanação da invenção conforme é reivindicado.

LISTA DAS SEQUÊNCIAS

SEQ ID N°. 1 Sequência de Nucleótidos do Vector de Expressão de R FTC- β II : Fc de Coelho

```
1  GAATTCGAGC TTGCTATGGCT GCAGGTGGTT ACATAACTTA CCGTAAATGG  
51  CCGGCGCTGGC TGACGGCCCA AGGAGGCGCG CCGATTGACG TCAATAATGA  
101 CGTATGTTTC CATAGTAACG CCAATAGGGA CTTCCATG ACCTCAATGG
```

1851 CTCCGACGGC TCCTTCITCC TCTACAGCAA GCTCACCGTS GACAAGAGCA
i901 GGTGGCAGCA GGGGAACGTC TTCTCATGGT CCGTGATGGA TGAGGCTCTG
1951 CACAACCACT ACACGCAGAA GASCCTCTCC CTGTCTCCGG GTAAATGAGT
2001 GCggccgcGT CGACCGTGAC CCCTGCGCCG CGCGGACTCC IGCCCCGAGG
2051 GTCCGGACGC GCCCCAGCTC GCGCCCCTTC CCATATTTAT TCGGACCCCA
2101 AGCATCSCCC ~~CAATAAAGAC~~ CAGCAAGCAA CCGGCTGGGG TSTCCGTGCG
2151 TGTTAGUGGG CCCGTGGGAC CTCCCTTGCC GTCTCTCCTC GCGCACGGCC
2201 CGGGTCCGCC CTGTAGCGCT CGCTGTCTCT CCCCTGCCTG ~~AAGCGCCCCA~~
2251 CCACCGTCTT TCAGGCCCCG GACTTGGTGC CGGGTCCAGG CGTAAAGGAG
2301 CAGGTGACTC TGCGCAGCAC TCGCTTTATT TCSCCAGAGT CGCGGGGCGT
2351 CCAGAAGGGG CCCCTGSACT CCGGCGCGGG GCCGGCTCAG TCCCGCCCCCT
2401 TGCCTGCGCG GAGCTTCTGG CCACTCCCAG GCCGCTGCTC CTCGTGCGGA
2451 CGCCTCGGGG ACACCCAGGC CTGCTTCTTC CTGGGCTCGG CGTCCCTGGA
2501 GTCCCGTGCC CACGGCCGGT GGCCCCCTTC GCGTGACTCC CAGCGCTGGG
2551 GTAGGGCTTC CCGGGGCTCC CTGGCGGCCC GTGGCCTCTC CTCTTTCCGC
2601 GGCTCTCTTT TCTTAGGTCT CTCCTCCTTC CGCGGCTTCT CCTTCCGCGG
2651 CTTCCCCCTCT CTCCGAGGCC TCTCCTTGGG TCCCTGGTCT GCGAGGGTCA
2701 CACGGTCCTC CCGGACGGCC TCTCCGGTGG CCTCGCCGGG CTCCTCCTCG
2751 TCGTTCTCTG CAGCCTCCCG ACTCCCGGGA ATCTTGGGTC TGACCTCTGC
2301 CTCGGCCCCG GCGCGAGGCG GCGCTGATGG AGGCGCCTGG GCCTCGAACT
2851 TAGGCTGCAA GACAGAGTGG GGTCTTGGG TAAGCGCCCA CCTTCCCCCC
2901 GGCCCGGGCT CCTTCTTTCC TTGGGGATGA AGGTCCCAAT GCCCGCGGTC
2951 AGTGGAAGGA AGCTCTTACC AGGGGCGACG ATGGCTCCCT CGGGGCTGAG
3001 CTTGGCGGGA CCCAGGGCTC GGGCACACGT GCTTGGAGTG CTGCCTCCGC
3051 AGCGACGGCG TCTGCAGCGA CAGGGTCGGG ACCCGAGTCA GCTGGGCCGA
3101 GGCACGGTCC AACTGTCCA TCCCTCCCTC ACCCCTAGAG CCCCCCTCCC
3151 TGGACAGTTB GAGTGGGGCT CCCCCGGLAG GGCTGAGACT AAGGATGCCC
3201 CCGAGCCGTG GGAAGGGACT CCGGGACICC GCTGCCGCGG CGCCCCSTCT
3251 CCGAACCTCG ~~CTCTTCAAT~~ TGGTEATTCT SCCCCCGAC CACGGGCTGS
3201 AGGAGGCCCC ~~TAGCAAGGCA~~ GGGGTGCGAG GAGTGCCCCC GGGGGGCGCT
335i CACGAGCTGA GCGGTCCCCA GAGAGGGCGC ~~ACGCGAAAGC~~ ~~CGGCAGAGCG~~
3401 CTACGAGGCA GGAGGGGTTG ~~CACAAAGTTC~~ ~~ATKCGAAGC~~ CAGAACCTAC
3451 TCGCGGCGAG ~~GCGAATGCGC~~ ~~CCCGCAAAAG~~ GTCCACACCG GGTGAGAGGG
3501 ~~GCGCGCAAGC~~ CCCGTCActt aaGGGACATA TGACGTGAGC TCAGATCTTT

3551 GTCAAGGAAC CTTACSTCTG TGGTGTGACA TAATTGGACA AACTACCTAC
3601 AGASATTTAA AGCTCTAAGG TAAATATAAA ATTTTAAAGT GTATAATGTG
3651 TTAAACTACT GATTCTAATT GTTTGTGTAT TTTAGATTCC AACCTATGGA
3701 ACTGATGAAT GGGAGCAGTG GTGAAATGCC TTTAATGAGG AAAACCTGTT
=;=,~ TTGCTCAGAA GAAATGCCAT CTAGTGATGA TGAGGCTACT GCTGACTCTC
3801 AACATTCTAC TCCTCCAAAA AAGAAGAGAA AGGTAGAAGA CCCCAGGCAC
3851 TTTCCTTCAG AATTGCTAAG TTTTTTGAGT CATGCTGTGT TTAGTAATAG
3901 AACTCTTGCT TGCTTTGCTA TTTACACCAC AAAGGAAAAA GCTSCACTGC
3957 TATACAAAGAA AATTATGGAA AAATATTCTG TAACCTTTAI AAGTAGGCAT
4001 AACAGTTATA ATCAATAACT ACTGTTTTTT CTTACTCCAC ACAGGCATAU
4051 AGTGTCTGCT ATTAATAACT ATGCTCAAAA ATTGTGTACC TTTAGCTTTT
4101 TAATTTGTAA AGGGGTAAAT AAGGAATATT TGATGTATAG SGCCTTGACT
4151 AGAGATCATA ATCAGCCATA CCACATTTGT AGAGGTTTTA CTGCTTTAA
4201 AAAACCCCCC ACACCTCCCC CTGAACCTGA AACATAAAAT GAATGCAATT
4251 GTTGTTGTGA ACTTGTTTAT TGCAGCTTAT AATGGTTACA AATAAAGCAA
4301 TAGCATCACA AATTTACAAA ATAAAGCATT TTTTCACTG CATTCTAGTT
4351 GTGGTTTGTC CAAACTCATC AATGTATCTT ATCATGTCTG GATCCTCTAC
4401 GCCGGACGCA TCGTGGCCGG CATCACCGGC GCCACAGGTG CGGTTGCTGG
4451 CGCCTATATC GCCGACATCA CCGATGGGGA AGATCGGGCT CGCCACTTCG
4501 GGCTCATGAG CGCTTGTTTC GCGTGGGTA TGGTGGCAGG CCCCCTGGCC
4551 GGGGGACTGT TGGGCGCCAT CTCCTTGCA TGCACATTCC TTGCGGCGGC
4601 GGTGCTCAAC GGCCTCAACC TACTACTGGG CTGCTTCCTA ATGCAGGAGT
4651 CGCATAAGGG AGAGCGTCGA GACTCCATCT CAAAAATAAA ATAAAAATAAA
4701 AATAAAAAAA AAAGGGCCCT TGTGCAFSIGC TGACAGCTTG TATGTTTCTG
4751 CTGTTGACAT TTGTGGGCTG TTTACCAACA CTTCTGGAAC ACAGCAGTGG
4801 AAGGGACTTC CCAGATATTT TAAATTTACC CTTAGAAAGC GGTCTGTGAA
4831 AAACCCCTAC CCAATTTCTT TTTTGTTAAG TGACCTAATT AACAGGAGGA
4901 CACAGAGGGT GGATGGGCAG CCTATGATTG GAATGTCCTE TCAAGTAGAG
4951 GAGGTTAGGG TTTATGAGGA CACAGAGGAG CTTCTGGGG ATCCAGACAT
5001 GATAAGATAC ATTGATGAGT TTGACAAAAC CACAAC TAGA ATGCAGTGAA
3351 AAAAATGCTT TATTTGTGAA ATTTGTGATG CTATTGCTTT ATTTGTAACC
5101 ATTATAAGCT GCAATAAACA ACTTAACAAC AACAAATGCA TTCTTTTAT
5151 GATTCAGGTT CAGGGGGAGG TGTGGGAGGT TTTTAAAGC AAGTAAACCC
5201 TCTACAAATG TGGTATGGCT GATTATGATC TCTAGTCAAG GCACTATACA

5251 TCAAATATTC CTTATTAACC CCTTTACAAA ~~TTAAAAAGCT~~ AAAGGTACAC
5301 AATTTTGTAG CATAGTTATT AATAGCAGAC ACTCTATGCC TGTGTGGAGT
5351 ~~AAQAAAAAAC~~ AGTATGTFAT GATTATAACT GTTATGCCTA ~~CYTATAAAGG~~
5461 TTACAGAATA TTTTSCCATA ATTTTCTTGT ATAGCAGTGC AGCTTTTTTCC
5451 TTTGTGGTGT ~~AAATAGCAAA~~ ~~GCAAGCAAGA~~ GTSCTATTAC TAAACACAGC
55C1 ~~ATGACTCAAA~~ AAACCTTAGCA ATTCTGAAGG AAAGTCCTTG GGGTCTTCTA
5551 CCTTTCTCTT CTTTTTTGGA GGAGTAGAAT GTTGAGAGTC AGCAGTAGCL
5601 TCATCASCAC SAGATGGCAT TSCSTCTGAG ~~CAAAACAGCT~~ TTTCTTCATT
5551 AAAGGCATTC CACCACTGCT CCCATTTCATC AGTTCCATAG GTTGGAATCT
5701 AAAATACACA ~~AACATCTAGA~~ ATCAGTAGTT TAACACATTA TACACTTAAA
5751 AATTTTATAT TTACCTTAGA GCTTTAAATC TCTGTAGGTA GTTTGTCCAA
5801 TTATGTCACA CCACAGAAGT AAGGTTCCCTT CACAAAGATC TAAAGCCAGC
5851 ~~AAAAGTCCCA~~ TGGTCTTATA AAAATGCATA GCTTTAGGAG GGGAGCAGAG
5901 AACTTGAAAG CATCTTCCTG TTAGTCTTTC TTCTCGTAGA CTTCAAACCT
5951 ATACTTGATG CTTTTTTCCT CCTGGACCTC AGAGAGGACG CCTGGATATT
5001 CTGGGAGAAG TTTATATTTT CCCAAATCAA TTTCTGGGAA AAACGTGTCA
6051 CTTTCAAATT CCTGCATGAT CCTTGTGACA AAGAGTCTGA GGTGGCCTGG
6101 TTGATTCATG GCTTCCTGGT AAACAGAACT GCCTCCGACT ATCCAAACCA
6151 TGTCTACTTT ACTTGCCAAT TCCGTTTGTT CAATAAGTCT TAAGGCATCA
6201 TCCAAACTTT TGGCAAGAAA ATGAGCTCCS CGTGGTGGTT CTTTGAGTTC
6251 TCTACTGAGA ACTATATTAA TTCTGTCCTS TAAAGGTCGA TTCTTCTCAG
5301 GAATGGAGAA CCAGGTTTTT CTACCCATAA TCACCAGATT CTGTTTACCT
6351 TCCACTGAAG AGGTTGTGGT CATTCTTTGG AAGTACTTGA ACTCGTTTCT
6401 GAGCGGAGGC CAGGGTAGGT CTCCGTTCTT GCCAATCCCC ATATTTTGGG
6451 ACACGGCGAC GATGCAGTTC ~~AATGCTCGAA~~ CCATGATGGC AGCGGGGATA
6501 AAATCCTACC AGSCTICACG CTAGGATTGC CGTCAAGTTT GCGCGGAAAT
5351 CGCAGGCCTG ~~AGCTGTCCTC~~ CCCCCAAGC TTTTGTGAAA AGCCTAGGCC
6501 ~~TCCAAAAAAG~~ CCTCCTCACT ACTTCTGGAA TAGCTCAGAG GCCGAGGCGG
6651 CCTCGGCCCTC TGCATAAATA ~~AAAAAATTA~~ GSSAGCCASG ~~CGGCGGAGAA~~
6701 TGGGCGGAAC TGGGCGGAGT TAGGGGGGGG ATGGGCGGAG TTAGGGGCGG
6751 GACTATGGTT ~~GCTGACTAAT~~ TGAGATGCTG CCTCGCGCGT TTCGGTGATG
6801 ACGGTGAAAT CCTCTGACAC ATGCAGCTCC CGGAGACGGT CACAGCTTGT
6R51 CTGTAAGCGG ~~ATGCGCGGAG~~ ~~CAATCAAGCC~~ CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG
6901 ~~TGTTGGCGGG~~ TGTCGGGGCG CAGCCATGAC CCAGTCACGT ~~AGCCATAGCC~~

6951 GAGTGTATAC TGGCTTAACT ATGCGGCATC AGAGIAGATT GTACSGAGAG
7001 TGCACCATAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC
7051 CGCATCAGGC GCTCTTCCGC TTCCTCGCTC ~~ACTGACTGSC~~ TJCGCSCGGT
7101 CGTTCGGZTG SGGZGAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAZGCG GTAATACGGT
7151 TATCCACAGA ATCAGGGGAT AACCCAGGAA AGAACATGTG ~~AGCAAAAGSC~~
7201 CAGCAAAAGG CCAGGAACCG ~~TAAAAAGSCC~~ GCGTTGCTUG CGTTTTTCCA
7251 TAGGYSCCGC CCCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACGC ~~TCAAGTCAGA~~
7331 GGTGGCGAAA CCCGACAGGA ~~CTATAAGAT~~ ACCAGGCGTT TCCCCCSGGA
7351 AGCTCCCTCG TCGCTCTCC IGTTCCGACC CTGCCGCTTA CCGGATACCS
7401 GSCCGCCTTT CSCCCTSCGG GAAGCGTGGC GCTTTCTCAT AGCTCACGCT
7451 GTASGTATCT CAGTTCGGTG TAGGTCGTTC GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG
7501 CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACIGCTGC GCCTTATCCG GTAACTATCG
7551 TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG GCAGCAGCCA
7501 CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGSATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC
7651 TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT
7701 CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTTCGG ~~AAAAAGATTT~~ GGTAGCTCTT
7751 GATCCGCGAA ~~ACAAACCCAC~~ GCTGGTAGCG GTGGTTTTTT TGTITGCAAG
7801 CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT CAAGAAGATC CTTTGATCTT
7851 TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGMCGA AAATCACGT TMGGGATTT
7301 TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTAAATTA
7351 ~~AAATGAAATTT~~ TTAAATCAAT CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA
8001 CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT
8051 TSCGTTTCATC CATAGTTGCC TGAATCCCCG TCGTGTAGAT ~~AACTACGATA~~
8101 CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCAGTGGT GCAATGATAC CGCGAGACCC
8151 ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA GCCGAAGGG
8201 CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT
8251 ~~AATTGTTGDC~~ ~~GGGAAGCTAG~~ AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTGCG
8301 CAACGTTGTT GYCATTGCTG CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCGTTTG
8351 GTATGGCTTC ATTCAGCTCC ~~GGTTCGCAAC~~ GATCAAGGCG AGTTACATGA
8401 TCCCCCATGT TGTGCAAAAA AGCGGTTAGC TCCTTCGGTC CTCCGATCGT
8451 ~~TGTCAGAACT~~ AAGTTGGCCG CAGTGTTATC ACTCATGGTT ATGGCAGCAC
8501 ~~TGCATAATTC~~ TCTTACTGTC ~~ATGCCATCCG~~ ~~TAAGATGCTT~~ TTCTGTGACT
8551 GGTGAGTACT ~~CAAGCAAGTC~~ ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GCCGACCGAG
8601 TTGCTCTTGC CCGGCGTCAA CACGGGATAA ~~TACCGCGCCA~~ CATAGCAGAA

8651	CTTTAAAAGT	GCTCATCATT	GGAAAACGTT	CTTCGGGGCG	AAAACCTCTCA
8701	AGGATCTTAC	CGCTGTTGAG	ATCCAGTTCG	ATGTAAACCA	CTCGTUCACC
8751	CAACTGATCC	TCAGCATCTT	TTATTTTCAC	CAGCGTTTCT	GGGTGAGCAA
8801	AAACAGGAAG	GCAAAATGCC	GCAAAAAAGG	GAATAAGGGC	GACACGGAAA
8851	TGTTGAATAC	TCATACTCTT	CCCTTTTCAA	TATTATTCAA	GCATTTATCA
8901	GGGTTATTGT	CSCATGAGCG	GATACATATT	TGAATGCTATT	TAGAAAAATA
8951	AACAAATACG	GGTTCGCGUC	ACATTTCCCC	GAAAAGTGCC	ACCTGACGTC
9001	TAAGAAACCA	TSATTATCAT	GACATTAACC	TAGAAAAATA	GGCGSATCAC
9051	GAGGCCCTTT	CGTCTTCAAG	AATTCGG		

ATGGGTCGGGGGCTGTCTCCGGGGCCTGTGGCCGCTGCACCTCGTCTGTGGACGCGCATC
832
GCCAGCACGATCCC GCCGCACGTT CAGAAGT CGGT TAATAACGACATGATGGTCACGGAC
892
AACAA TGGCGCCGTC AATTGCCACA ACTTTGCAACTTTTGGAATGTCGGATCTTCACG
952
TGTGACAACCAGAAGTCTGCATGAGCAACTGCAGCATCACGTCCATCTGTGAGAAGGCA
1012
CACGAAGTCTGCGTGGCCGTCTGGAGGAAGAACGATGAAAACATAACCCCTGGGAGACTGTG
1072
TGTCACGACCCCCAAGCTCGCCTACCATGGATTCCCTTCTGGAAGATTCTGCCTCTCCAAG
1132
TGTATCATGAAAGAAAAGAAGGTGTTTGGGGAGACTTTCTTCATGTGTTCTTGCAGCACT
1192
GACGAGTGCAATGACCACATCATCTTCTCTGAGGAATACACCACCAGCAGTCCGGATCTG
1252
GTGCACCAAACCTGCACATGCGCCACCTGCGCAGGACTTCAACTCCTGGGGGGACCGTCA
1312
GTCTTCTGTTTCTGCTTCAAAAGCTCAGGACGCTTATGATCTCCCGGACCGCTGAGTTC
1372
ACATGCTGTGGTGTGTGAGCTGTACCTCAGACCGCTGAGCTCAAGTTCAACTGTGTACGTG
1432
GGCGCTGTGTAATTTGCTAAAGGCGAGACCGGCGGAGGAGGCTGCTGCTGCTG

1492
TACCTGTGTGCTCAGGCTGCTCACCTGTCTGCACCAAGTACTGCTGTAATGGCAAGGATAC
1552
AATTCGAGGTTCTCCACCAAGGCTTCCAGGCTCCCTTCGAGAAACGTTCTCCAAAGCC
1612
AAATGGCAGCTCCGAGAACCAAGGTGTACAGCTTGCTCCATGCCGCGATGAGCTTAAC
1672
AAGAACCACTTCAGCTTGACCTGCTTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGGCTTG
1732
GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGAC
1792
TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG
1852
GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG
1912
AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
1972

SEQ ID N°. 3: Sequência de Nucleótidos do Vector de Expressão do R FTE-β II:Fc Humano

1 GAATTCGAGC TTGCATGCCT GCAGGTCGTT ACATAACTTA CGGTAAATGG
51 CCCGCCTGGC TGACCGCCCA ACGACCCCCG CCCATTGACG TCAFITAAATGA
101 CGTATGTTCC CATAGTAACG CCAATAGGGA CTTTCCATTG ACGTCAATGG
151 GTGGAGTATT TACGGIAAAC TGCCCACTTG GCAGTACATC AAGTGTATCA
201 TATGCCAAGT ACGCCCCCTA TTGACGTCAA TGACGGTAAA TGGCCCGCCT
251 GGCATTATGC CCAGTACATG ACCTTATGGG ACTTTCCTAC TTGGCAGTAC
301 ATCTACGTAT TAGTCATCGC IATTACCATG GTGATGCGGT TTTGGCAGTA
351 CATCAATGGG CGTGGATAGC GGITTGACTC ACGGGGATTT CZAFIGTCTCC
401 ACCCCATTGA CGTCAATGGG AGTTTGLTTT GGCACCAAAA TCAACGGGAC
451 TTTCCAAAAT GTGGTAACAA CTCCGCCCCA TTGACGCAAA TGGGCGGTAG
501 GCGTGACGG TGGGAGGTCT ATATAAGCAG AGCTCGTTTA GTGAACCGTC
551 AGATCGGCTG GAGACGCCAT CCACGCTGTT TTGACCTCCA TAGAAGACAC
631 CGGGACCGAT CCAGCTTCCG GACTCTAGAG GATCCGGTAC TCGAGCAACT
651 GAAAGAACAG AAGCTTAACG GTTAACTTTA GTCTTTTGT CTTTATTTC
701 AGGTCCCGGA TCCGGTGGTG GTGCAAAATCA AAGAACTGCT CTTCTGTGGA

75i TGTTCCTTT ACTTCTAGGC CTGTACGGAA GTGTTACTTC TGGTCTAAAA
801 GCTGCGGAAT TCTXCCCGCG GCCGCTCTGC CATGGGTCGG GGGCTGCTCA
851 GGGGCCTGTG GCCGCTGCAC ATCGTCZTGT GGACGCGTAT CGCCAGCACG
901 ATCCCACCGC ACGTTCAGAA GTCGGTTAAT AACGACATGA TAGTCACTGA
951 ~~CAACAAAGGT~~ GCAGTCAAGT TTCCACAACGT GTGTAAATTT TGTGATGTGA
1001 GATTTTCCAC CTGTGACAAC CAGAAATCCT GCATGAGCAA CTGCAGCALC
1051 ACCTCCATCT GTGAGAAGCC ACAGGAAGTC TGTGTGGCTG TATGGAGAAA
1101 ~~GAATGACGAG~~ ~~AACATACGAC~~ TAGAGACAGT TTGCCATGAC ~~CCCAAGCTTC~~
1151 CCTACCATGA CTTTATTCTG GAAGATGCTG CTTCTCCAAA GTGCATATTS
1201 ~~AACGAAAAAA~~ ~~AAAAGGCTGG~~ TGAGACTTTC TTCATGTGTT CCTGTAGCTC
1251 TGATGAGTGC AATGACAACA TCATCTTCTC ~~AGAAGAAATAT~~ AACACCAGCA
1301 ASCCTGACTT GGTCGACAAA ACTCACACAT GCCCACCCTG CCCAGCACCT
1351 GAACTCCTGG GGGGACCGTC AGTCTTCCTC TTCCCCCAA AACCCAAGGA
1401 CACCCTCATG ATCSCCCGGA CCCCTGAGGT CACATGCGTG GTGGTGGACG
1451 TGAGCCACGA AGACCCTGAG GTCAAGTTCA ACTGGTACGT GGACGGCGTG
1501 GAGGTGCATA ATGCCAAGAC AAAGCCGCGG GAGGAGCAGT ACAACAGCAC
1551 GTACCGTGTG GTCAGCGTCC TCACCGTCCT GCACCAGGAC TGGCTGAATG
1601 GCAAGGAGTA CAAGTGCAAG GTCTCCAACA AAGCCCTCCC AGCCCCCATC
1631 GAGAAAACCA TCTCCAAAGC CAAAGGGCAG CCCCAGAAC CACAGGTGTA
1701 CACCCTGCCC CCATCCCGGG ATGAGCTGAC CAAGAACCAG GTCAGCCTGA
1751 CCTGCCTUGT CAAAGGCTTC TATCCCAGCG ACATCGCCGT GGAGTGGGAG
1801 AGCAATGGGC AGCCGGAGAA CAACTACAAG ACCACGCCTC CCGTGTGGA
1831 CTCCGACGGC TCCTTCTTCC TCTACAGCAA GCTCACCCTG GACAAGAGCA
1901 GGTGGCAGCA GGGGAACGTC TTCTCATGCT CCGTGATGCA TGAGGCTCTG
1931 CACAACCACT ACACGCAGAA GAGCCTCTCC CTGTLTCCGG GTAAATGAGT
2001 GCGGCCGCGT CGACCGTGAC CCCTGCGCCG CGCGGACTCC TGCCCGGAGG
2051 GTCCGGACGC SCCCAGCTC GCGCCCCTTC CCASASTTAT TCGGACCCCA
2101 AGCATCGCIC ~~CAATAAAGAC~~ ~~CAGCAAGCAA~~ CCGGCTGGGG TGTCCGTGCG
2151 TGTTAGGGGG CCCGTGGGAC CTCCCTTGCC GTCTCTCCTC GCGCACGGCC
2201 CGGGTCCGCC CTGTAGCGCT CGCTGTCTGT CCCCTGCCTG AAGCGCCCCA
2251 CCACCGTCTT TCAGGCCCCG GACTTGGTGC CGGGTCCAGG ~~CTTAAAGGAG~~
2301 ~~CAGGTGACTC~~ ~~TGCGCAGCAC~~ TCGCTTTATT TCGCCAGAGT CGCGGGGCGT
2351 ~~CCAGAAAGGG~~ CCCCTGGACT CCGGCGCGGG GCCGGCTCAG TCCCGCCCCCT
2401 ~~TGGCTGCGCG~~ ~~GAGCTTCTCG~~ ~~CAACTCCGAG~~ ~~GCCGCTGCTC~~ ~~CTCTTCGGGA~~

2451 CSCCTCGGGG ACACCCAGGC CTGCTTCTTC CTGSGCTCGG CGTCCCTGGA
2501 GTCCCGTGCC CACGGCCGGT GGCCCCCTTC GCGLGACTCC CAGCGCFGGG
2551 ~~GTAGGGCTTC~~ CCGGGGCTCG CTGGCGGCCC GTGGCCTCTC CTCTTTCCGC
2601 GGCCTCTCTT TCTIAGGTCT CTCCTCCTTC SGCGGCTTCT CCTTCCGCBG
2651 CTTCCCCTCT CTCCGAGGCC TCTCCTTGGG TCCCCGGTCT ~~GCGAGCTCA~~
2-01 CACGGTCCTC CCGGACGGCC TCTCCGGTGG CCTCGCCGGG CTUGTCTTCG
2751 TCGTTCTCTG CAGCCTCCCG ACTCCCAGGA ATCTTGGGTC TGACCTCTGC
2801 CTCGGCCCCG SGCGCAGGCG GCGCTGATGG AGGCGCCTGG GCCTCGAACT
2851 TAGGCTGCAA GACAGAGTGG GGTCTGTTGG TAAGCGCCCA CCTTCCCCC
2901 GGCCCGGGCT CCTTCTTTCC TTGGGGATGA AGGTCCCAAT GCCCGCGGTC
2951 AGTGGAAGGA AGCTCTTACC AGGGGCGACG ATGGCTCCCT CGGGGCTGAG
3001 CTTGGCGGGA CCCAGGGCTC GGGCACACGT GCTTGGAGTG CTGCCTCCGC
3051 AGGGACGGCG TCTGCAGCGA CAGGGTCGGG ACCCGAGTCA GCTGGGCCGA
3101 GGCACGGTCC AACTGTCCA TCCCTCCCTC ACCCCTAGAG CCCCCTCCC
3151 TGGACAGTTG GAGTGGGGCT CCCCCGGTAC GGCTGAGACT AAGGATGCCC
3201 CCGAGCCGTG GGAAGGGACT CCGGGACTCC GCTGCCGCGG CGCCCCTTCT
3251 CCGAACCTCG CTCTTTCAAT TGGTCATTCT TCCCCCGAC CACGGGCTGT
3301 AGGAGGCCCC TAGCAAGGGA GGGGTCGCAG GAGTGCCCCC GGGGGGCGCT
3351 CACGAGCTGA GCGGTCCCCA GAGAGGGCGC AGGGGAAAGG CGGCAGAACG
3401 CTACGAGGCA GGAGGGGTTG CACAAGGTSC ATCCGGAAGC CAGAACCTAC
3451 TCGCGGCGAG GGAATGGGC CCCGCAAAAG GTCCACACCG GGTGAGAGGG
3501 GCGCGCAAGG CCCGTCACCT AAGGGACATA TGACGTGAGC TCAGATCTTT
3551 GTGAAGGAAC CTTACTTCTG TGGTGTGACA TAATTGGACA AACTACCTAC
3501 AGAGATTTAA AGCTCTAAGG TAAATATAAA ATTTTAAAGT GTATAATGTG
3651 TTAAACTACT GATTCTAATT GTTTGTGTAT TTTAGASTCC AACCTATGGA
3701 ACTGATGAAT GGGAGCAGTG GTGGAATGCC TTTAATGAGG AAAACCTGTT
3751 TTGCTCAGAA GAAATGCCAT CTAGTGATGA TGAGGCTACT GCTGACTCTC
3801 AACATTCTAC TCCTCCAAAA ~~AAGACAGAA~~ AGGTAGAAGA CCCCAGGAC
3851 ITTCCTTCAG ~~AATTCTTAAG~~ TTTTTTGAGT CATGCTGSGT TTAGTAATAG
3901 AACTCTTGCT TGCTTTGCTA ILSACACCAC ~~AAAGCAAAAA~~ GCTGCACTGC
393i TATACAAGAA ~~AATTATGAA~~ ~~AAATATCTC~~ TAACCTTTAT AAGTAGGCAT
4301 ~~AACAGTTATA~~ ~~ATCATAACAT~~ ACTGTTTTTT CTTACTCCAC ACAGGCATAG
4051 AGTGTCTGCT ~~ATTAAATACT~~ ATGCTCAAAA ~~ATGCTGTAAC~~ TTTAGCTTTT
4101 ~~TAATTTCTAA~~ ~~AGGGCTTAAT~~ ~~AAGCAATAT~~ TGATGTATAG TGCCTTGACT

4131 AGAGATCATA ATCAGCCATA CCACATTTGT AGAGGTTTTA CTTGCTTTAA
 4201 ~~AAAACCTCCC~~ ACACCTCCCC CTGAACCTGA ~~AACATAAAAT~~ ~~CAATGCATTT~~
 4251 GTTGTTGTTA ACTTGTTTAT ~~TGCAGCTTAT~~ AATGGTTACA ~~AATFAAAGCAA~~
 4301 TAGCATCACA ~~AATTTACAAA~~ ATAAAGCATT TTTTTCAC TG CATTCTAGTT
 4351 GTGGTTTGTC ~~CAAACTCATT~~ ~~AATGTATCTT~~ ATCATGTCTG GATCCTCTAC
 4401 GCCGGACGCA TCGTGGCCCG ~~CATCACCCGC~~ GCCACAGGTG CGGTTGCTGG
 4451 CGCCTATATC GCCGACATCA CCGATGGGGA AGATCGGGCT CGCCACTTCG
 4501 GGCTCATGAG CGCTTGTTTC GGC GTGGGTA TGGTGGCAGG CCCC GTGGCC
 4551 GGGGGACTGT TGGGCGCCAT CTCCTTG CAT GCACCATTCC TTGCGGCGGC
 4601 GGTGCTCAAC GGCCTCAACC TACTACTGGG CTGCTTCCTA ATGCAGGAGT
 4651 CGCATAAGGG AGAGCGTCSA GACTCCATCT ~~CAAAAATAAA~~ ATAAAATAAA
 4701 ~~AATTAATAAA~~ MGGGCCCT TGTGCAAAGC TGACAGCTTG TATGTTTCTG
 4751 CTGTTGACAT TTGTGGGCTG TTTACCAACA CTTCTGGAAC ACAGCAGTGG
 4801 AAGGGACTTC CCAGATATTT TAAAATTACC CTTAGAAAGC GGTCTGTGAA
 4351 AAACCCCTAC CCAATTTCTT TTTTGTTAAG TGACCTAATT AACAGGAGGA
 4901 CACAGAGGGT GGATGGGCAG CCTATGATTG GAATGTCCTC TCAAGTAGAG
 4951 GAGGTTAGGG TTTATGAGGA CACAGAGGAG CTTCTGGGG ATCCAGACAT
 5001 GATAAGATAC ATTGATGAGT ~~T T G G A C M C~~ CACA ACTAGA ATGCAGTGAA
 5051 AAAAATGCTT TATTTGTGAA ATTTGTGATG CTATTGCTTT ATTTGTAACC
 5101 ATTATAAGCT GCAATAAACA AGTTAACAAC AACAAATTGCA TTCATTTTAT
 5151 GTTTCAGGTT CAGGGGGAGG TGTGGGAGGT TTTTAAAGC AAGTAAACC
 5201 TCTACAAATG TGGTATGGCT GATTATGATC TCTAGTCAAG GCACTATACA
 5251 TCAAATATTC CTTATTAACC CCTTTACAAA TTA AAAAGCT AAAGGTACAC
 5301 AATTTTTGAG CATAGTTATT AATAGCAGAC ACTCTATGCC TGTGTGGAGT
 5351 AAGAAAAAAC AGTATGTTAT GATTATAACT GTTATGCCTA CTTATAAAGG
 5401 TTACAGAATA TTTTCCATA ATTTCTTGT ATAGCAGTGC AGCTTTTTC
 5451 TITGTGGTGT AAATAGCAA GCAAGCAAGA GTTCTATTAC TAAACACAGC
 5501 ~~ATGACTCAAA~~ AAACCTAGCA ~~ATTCTGAGG~~ ~~AAAGTCCTTG~~ GGGTCTTCTA
 5551 CCTTCTCTT CTTTTTTGGA GGAGTAGAAT GTTGAGAGTC AGCAGTAGCC
 5601 TCATCATCAC TAGATGGCAT TTCTTCTGAG ~~CAAAACAGCT~~ TTTCTCATT
 5651 ~~AAAGGCATTC~~ CACCACTGCT CCCATT CATC AGTTCCATAG GTTGGAATCT
 5701 ~~AAATACACA~~ ~~AACAAATAGA~~ ATCAGTAGTT ~~TAACACATTA~~ TACACTTAAA
 5751 ~~AATTTATAT~~ TTACCTTAGA ~~GCTTTAAATC~~ TCTGTAGGTA GTTTGTCCAA
 5801 TTATGTCACA CCACAGAAGT AAGGTTCTT ~~CACAAAGATC~~ TAAAGCCAGC

5851 AAAAGTCCCA TGGTCTTATA AAAATGCATA GCTTTAGGAG GGGAGCASAG
5901 AACTTGAAG CATCTTCCTG TTAGTCTTTC TTCTCGTAGA CTTCAAACCT
5951 ATACTTGATG CCTTTTTCTT CCTGGACCTC AGAGASGACG CCTGGGTATT
6001 CTGGGAGAAG TTTASATTTT CCGAAATCAA TTTCTGGGAA AAACGTGTCA
6051 CTTTCAAATT CCTGCAIGAT CCTTGSCACA AACAGTCTCA GGTGGCCTGG
6101 TTGATTCATG GCTTCCCTGGT AACAGAACT GCCTCCGACT ATCCAAACCA
6151 TGTCSACTTT ACTTGCCAAT TCCGGTTGTT CAATAAGTCT TAAGGCATCA
6201 TCCAAACTTT TGGCAAGAAA ATGAGCTCCT CGTGGTGGTT CTTTGAGTTC
6251 TCTACTGAGA ACTATATTAA TTCIGTCCTT TAAAGTCTCA TTCTTCTCAG
6301 GAATGGAGAA CCAGGTTTTT CTACCCATAA TCACCAGAST CTGTTTACCT
6351 TCCACTGAAG AGGTTGTGGT CATTCTTTGG AAGTACTTGA ACTCGTTTCT
6401 GAGCGGAGGC CAGGGTAGGT CTCCGTTCTT GCCAATCCCC ATATTTTGGG
5451 ACACGGCGAC GATGCAGTTC AATGGTCGAA CCATGATGGC AGCGGGGATA
6501 AAATCCTTAC AGCCTTCACG CTAGGATTGC CGTCAAGTTT GGC GCGAAAT
6551 CGCAGCCCTG AGCTGTCCCC CCCCCAAGC TTTTGTCAA AGCCTAGGCC
6601 TCCAAAAAAG CCTCCTCACT ACTTCTGGAA TAGCTCAGAG GCCGAGGCGG
6651 CCTCGGCCTC TGCATAAATA AAAAAAATTA GTCAGCCATG GGGCGGAGAA
6701 TGGGCGGAAC TGGGCGGAGT TAGGGGCGGG ATGGGCGGAG TTAGGGGCGG
6751 GACTATGGTT GCTGACTAAT TGAGATGCTG CCTCGCGCGT TTCGGTGATG
6801 ACGGTGAAAA CCTCTGACAC ATGCAGCTCC CGGAGACGGT CACAGCTTGT
6851 CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG CAGACAAGCC CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG
6901 TGTTGGCGGG TGTCGGGGCG CAGCCATGAC CCAGTCACGT AGCGATAGCG
6951 GAGTGTATAC TGGCTTAACT ATGCGGCATC AGAGCAGATT GTACTGAGAG
7001 TGCACCATAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC
7051 CGCATCAGGC GCTCTTCCGC TTCCTCGCTC ACTGACTCGC TCGCTCGGT
7101 CGTTCGGCTG CGGCGAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAGGCG GTAATACGGT
7151 TATCCACAGA ATIAGGGGAT AACGCAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAGGC
7201 CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAGGCC GCGTTGCTGG CGTTTTTGCA
7251 TAGGGTCCGC CCCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACGC TCAAGTCAGA
7301 GGTGGCGAAA CCGGACAGGA CTATAAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA
7351 AGCTCCCTCG TCGCTCTCC TGTTCGACC CTGCCGCTTA CCGGATACCT
7401 GTCCGCCTTT CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTTCTCAT AGISCACGCT
7451 GTAGGATCTT CAGTTCGGTG TAACTGCTTC GCTCCAGCT GCGCTGTGTG
7501 CAGCAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC GCTTATCCG GTAACATATCG

7551 TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG GCAGCAGCCA
7601 ~~CTGCTACACG~~ GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC
7651 ~~TTGAAAGTGGT~~ GGCCTAACTA CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT
7701 CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTTCGG ~~AAAAAGACTT~~ GGTAGCTCTT
7751 GATCCGGCAA ACAAACCACC GCTGGTAGCG GTGGSTTTTT TGTTTGCAAG
7801 CAGCAGATTA ~~CGCGCAGAAA~~ AAAAGGATCT ~~CAACAAGATC~~ CTTTGATCTT
7851 TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA AAAGTCACGT TAAGGGATTT
7901 TGGICATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTAAATTA
7951 AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA
8001 CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGSCTAT
8051 TTCGTTTCATC CATAGTTGCC TGACTCCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA
8101 CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCAGTGCT GCAATGATAC CGCGAGACCC
8151 ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT ~~AAACCAAGCA~~ GCCGGAAGGG
8201 CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT
8251 AATTGTTGCC GGGAAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTGCG
8301 CAACGTTGTT GCCATTGCTG CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCGTTTG
8351 GTATGGCTTC ATTCAGCTCC GGTTCCCAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA
8401 TCCCCCATGT TGTGCAAAAA AGCGGTTAGC TCCTTCGGTC CTCCGATCGT
8451 TGTGAGAAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTATC ACTCATGGTT ATGGCAGCAC
8501 TGCATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG TPAGATGCTT TTCTGTGACT
8551 GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GGCGACCGAG
8601 TSGCTCTTGC CCGGCGTCAA CACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA
8651 ~~CTTTAAAGT~~ GCTCATCATT GGAAAACGTT CTTGCGGGCG AAAACTCTCA
8701 AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCG ATGTAACCCA CTCGTGCACC
8751 CAACTGATCT TCAGCATCTT TTAATTTTAC CAGCGTTTCT GGGTGAGCAA
8801 AAACAGGAAG GCAAATGCC ~~CCAAAAAGC~~ ~~GATTAAGGCT~~ GACACGGAAA
8851 TGTGGAATAC TCATACTCTS CCTTTTTCAA TATTATSGAA GCATTTATCA
8901 GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT TAG~~AAAA~~TA
8951 AACAAATAGG GGTTCGCGCG ACATTTCCCC ~~GAAGAGTGCC~~ ACCTGACGTC
9001 TAAGAAACCA SSATTASCAT GACATTAACC TATA~~AAAA~~TA GGCGTATCAC
9051 GAGGCCCTTT CGTCTTCAAG ~~AATTCG~~

Humano

ATGCTTGGGGXCTTCCTCAGGGACCTTGTTGCCCGCTGCACATCGTCTCTGTGAACGGGTATC
832

GCCAGAACCATCCCACCTCACCTTCATAAAGTCGGTTAATAACCACACTGATAGTCACTGAC
892

AACAACCGTGCACCTCAAAGTTTTCCACAACCTGTGTAAATTTTTGTGATGTGAGATTITCCACC
952

TGTGACTAACCAGAAAATCCTGCTGTAGSCAACTGCAGCATCACCTCATCTCTGTGAGAAGCCA
1012

CACGAAGTCTTTCTTGGCTGTATGTGAGAAAGAATGACGAGAACRTAACACTAGAGACAGTT
1072

TGCGATGACCCCCAAGCTCCCCCTACCATGACTTTATTCTGTGAAGATGCTGCTTCTCCAAAG
1132

TGCATTATGAAGGAAAAAAAAGCCTGCTGAGACTTTCTTCACTGTGTTTCTGTAGCTCT
1192

GATGAGTGCAATGACAACATCATCTTCTCAGAAGAATATAACACCCAGCAATCTTGACTTG
1252

GTCGACAAAACTCACACATGCCCAACCGTGCCCTAGCACTGTGACTCTCTGGGGGAGCTCTCA
1312

GTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
1372

ACATGCGTGGTGGTGAGCTGAGCCACGAAGACCTTAGGTTCAAGTTCAACTGGTACCTG
1432

GACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG
1492

TACCGTGCTGTTCAAGGCTCTCACCGTCTCTGCAACCAAGACTGGCTGAATGZCANFAGSTAC
1552

AAGTGCAAGGTCTCCACAAANGCCTTCCAGGCCCTTCATCGAGAAACCATCTCCAAAGCC
1612

AAAGGGCAGCTCCGAGAACCAAGGTGTACAGCTTGGCCCCATCCCCCGATGAGCTGACT
1672

AAGAAGCAGGTGAGCTGAGCTGCTGTCTCAAGGCTTCTATCCCAAGCGACATGCTGGTG
1732

GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGTCCGAGAACCACTACANAGACCAACCCCTCCCGTGTGGAC
1792

TCGAGCDECTCCCTCTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCTGTGACXAGAGCAGGTGGCAGCAG
 1852
 GGGAACTCTCTCTCATGCTCCCTCATGCGATGAGGCTCTGCACAACCACTACAGCCAGAG
 1912
 AGCTCTCCCTCTCTCCCGTAAAT
 1972

SEQ ID N°. 5: Iniciador frontal - de Coelho e Humano

5'-AAGGAAAAAAGCGGCGCTCTGCCATGGGTCCGGGGCTG-3'

SEQ ID N°. 6: Iniciador Inverso - Coelho

5'-AGTTTTGTGACCCAGATCCCGACTGCTGGGTGCT-3'

SEQ ID N°. 7: Iniciador Inverso - Humano

5'-AGTTTTGTGACCP SIGTCAGGATTGCTGGTGTTA-3'

SEQ ID N°. 8: Sequência de Aminoácidos do R FIC-β II:Fc de Coelho

M	G	R	G	L	L	R	G	L	W	P	L	H	L	V	L	W	T	R	I
1																			
A	S	T	I	P	P	H	V	Q	K	S	V	N	N	D	M	M	V	T	D
N	N	G	A	V	K	F	P	Q	L	C	K	F	C	D	V	R	S	S	T
C	D	N	Q	K	S	C	M	S	N	C	S	I	T	S	I	C	E	K	A
H	E	V	C	V	A	V	W	R	K	N	D	E	N	I	T	L	E	T	V
C	H	D	P	K	L	A	Y	H	G	F	L	L	E	D	S	A	S	P	K
C	I	N	K	E	K	K	V	F	G	E	T	F	F	M	C	S	C	S	T
D	E	C	N	D	H	I	I	F	S	E	E	Y	T	T	S	S	P	D	L
V	D	K	T	H	T	C	P	E	C	P	A	F	E	L	L	G	G	P	S
161																			
V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	R	N

T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V
 D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T
 Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y
 K C E V S N K A L P A P I E K T I S K A
 K G Q P R E P Q V Y T L P P S E D E L T
 R N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V
 E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D
 S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q
 G N V F S C S V N H E A L H N H Y T Q K
 S L S L S P G K

SEQ ID N°. 9: Sequência de Aminoácidos de R FTC-~~8~~ II:Fc Humano

M G R G L L R G L W P L H I V L W T R I
 1
 A S S I P P H V Q K S V N N D M I V T D
 N N G A V K F P Q L C K F C D V R F S T
 C D N Q K S C M S N C S I T S I C E K P
 Q E V C V A V W R K N D E N I T L E T V
 C H D P K L P Y H D F I L E D A A S P K
 C I M K E K K K P G E T F F M C S C S S
 D E G N D N I I F S E E Y N T S N P D L
 V D K T H T C P P C P A P E L L G G P S

161

V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V
 T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V
 D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T
 Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y
 K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A
 K G Q P R E P Q V Y T L P P S E D E L T
 R N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V
 E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D
 S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q

Q U E R Y C O N T A I N S 1 R E C O R D S

SEQ ID N°. 10: Sequência de Nucleótidos da "Junção" de Fusão de RII:Fc de Coelho

TTCTAAGGATACACCAACCAGCAATCCGGAICTGATCGACAAAACTCAACACATGCCCCAGGTTGCCCA

SEQ ID N°. 11: Sequência de Aminoácidos da "Junção" da Fusão de RII:Fc de Coelho

S E E Y T T S S P D L V D K T H T C P P C P

SEQ ID N°. 12: Sequência de Nucleótidos da "Junção" da Fusão de RII:Fc Humana

TCTCAGAAGAATATAACACCAGCAATCCTGACTTGGTCGACAAAAC TCACACATGCCACCGTGC CCA

SEQ ID N°. 13: Sequência de Aminoácidos da "Junção" da Fusão de RII:Fc Humana

S E E Y N T S N P D L V D K T H T C P P C P

DESCRIÇÃO DETALHADA

Utilizaram-se aqui os seguintes termos e expressões:

Definições

"Recombinante", tal como se utiliza aqui, significa que uma proteína deriva de sistemas de expressão recombinantes (por exemplo, microbianos ou de mamíferos). "Microbiano" refere-se a proteínas recombinantes produzidas em sistemas de expressão de bactérias ou de fungos (por

exemplo, levedura). Define-se um produto "microbiano recombinante" como uma proteína produzida num sistema de expressão microbiana que está praticamente livre de substâncias endógenas naturais. A proteína expressa na maior parte das culturas bacterianas, por exemplo, *E. coli*, estará isenta de glicano. A proteína expressa em levedura pode ter um modelo de glicosilação diferente da expressa em células de mamíferos.

"Activo sob o ponto de vista biológico", tal como se utiliza ao longo da presente memória descritiva como uma característica dos receptores de FTC-beta, significa que uma determinada molécula partilha uma homologia da sequência de aminoácidos suficiente com os enquadramentos da presente invenção aqui descritos, como sendo capaz de se ligar a quantidades detectáveis de FTC-beta e/ou transmitir um estímulo de FTC-beta a uma célula, por exemplo, um componente de uma estrutura de um receptor híbrido ou uma reacção cruzada com anticorpos do receptor anti-FTC-beta em função do receptor de FTC-beta de fontes naturais (isto é, não recombinantes). Preferencialmente, as fusões do receptor de FTC-beta activas sob o ponto de vista biológico dentro do âmbito da presente invenção são capazes de se ligar superior a 0,1 nmoles de FTC-beta por nmole do receptor e, mais preferencialmente, superior a 0,5 nmole de FTC-beta por nmole do receptor em condições de ligação padrão (ver a seguir).

Do mesmo modo, uma "molécula de ligação de FTC-beta", tal como se utiliza aqui, é qualquer molécula que exiba a mesma actividade biológica ou uma actividade que é praticamente igual como uma proteína de fusão do receptor de FTC-beta.

"Indivíduo" significa um organismo vivo, incluindo seres humanos, outros mamíferos e quaisquer outros animais que produzam FTC-beta.

"Sobre-produção de FTC-beta", tal como se utiliza aqui, é uma quantidade de FTC-beta presente no soro ou no tecido, que está anormalmente acima do nível normal. Mais preferencialmente, sobre-produção de FTC-beta é um nível entre cerca de 2 e cerca de 20 vezes o normal. Ainda mais preferencialmente, a sobre-produção de FTC-beta é um nível entre cerca de 2 e cerca de 15 vezes o normal. Por exemplo, Deguchi mediu a produção de FTC-beta durante 24 horas das células brônquio-alveolares e relatou níveis normais de $410 \pm 225 \text{ pg}/10^7$ células, contra o excesso de produção de FTC-beta de $1.283 \pm 453 \text{ pg}/10^7$ células no lúpus eritematoso sistêmico e $1.417 \pm 471 \text{ pg}/10^7$ células no escleroderma ((1992) Ann. Rheum. Dis. 51:36265). A sobre-produção de FTC-beta pode ser determinada em combinação com os níveis normais, medindo a proteína de FTC-beta de ARNm de FTC-beta ou de produtos cuja síntese é estimulada por FTC-beta, tal como, o colagénio.

"Tecido conjuntivo" é tecido fibroso caracterizado pela presença de fibroblastos e proteínas fibrosas, tais como, colagénio e elastina.

Um "distúrbio fibroproliferativo" é caracterizado pela proliferação de fibroblastos mais a correspondente sobre-expressão da matriz extracelular, tal como, fibronectina, laminina e colagénio.

ã "composição terapêutica", tal como se utiliza aqui, é definida como compreendendo as proteínas da presente invenção e outros ingredientes compatíveis sobre o

ponto de vista fisiológico. A composição terapêutica pode conter excipientes, tais como, água, minerais e veículos, tais como, proteína.

Uma "quantidade suficiente" das proteínas da presente invenção, tal como se utiliza aqui, refere-se à quantidade da proteína de fusão do receptor de FTC-beta que neutraliza a actividade biológica do excesso de FTC-Seta. Pode ser determinada por (1) variáveis clínicas apropriadas de melhoramento, (2) avaliação patológica dos efeitos na fibrose e/ou na imunossupressão ou prevenção da fibrose ou (3) uma inibição directa de FTC-beta.

"Aminoácido" - uma unidade monomérica de um péptido, polipéptido ou proteína. Há vinte aminoácidos encontrados nos péptidos, polipéptidos e proteínas de ocorrência natural, sendo que todos eles são isómeros L. O termo também inclui análogos de aminoácidos e isómeros D dos aminoácidos da proteína e dos seus análogos.

"Proteína" - qualquer polímero que consiste praticamente em qualquer um dos vinte aminoácidos. Embora "polipéptido" seja muitas vezes utilizado em referência a polipéptidos relativamente grandes e "péptido" seja muitas vezes utilizado em referência a polipéptidos pequenos, a utilização destes termos na técnica sobrepõe-se e varia. O termo "proteína", tal como se utiliza aqui, refere-se a péptidos, proteínas e polipéptidos, a menos que se indique de outra forma.

"Equivalente funcional" de um resíduo de aminoácido, é um aminoácido que tem propriedades físico-químicas semelhantes às do resíduo de aminoácido que foi substituído pelo equivalente funcional.

"Fusão" - refere-se a uma Ligação covalente, colinear, de duas ou mais proteínas ou dos seus fragmentos por via das suas estruturas peptídicas individuais, mais preferencialmente, através da expressão genética de uma molécula de polinucleótido que codifica essas proteínas.

"Mutante" - qualquer alteração no material genético de um organismo, em particular, qualquer alteração (isto é, eliminação, substituição, adição ou alteração) numa sequência de polinucleótidos de tipo selvagem ou qualquer alteração numa proteína de tipo selvagem.

"De tipo selvagem ou de ocorrência natural", sequência de polinucleótidos de ocorrência natural de um exão de uma proteína ou de uma parte dela ou uma sequência de proteínas ou uma porção delas, respectivamente, tal como existe normalmente *in vivo*.

"Condições de hibridação padrão" - condições de salinidade e temperatura praticamente equivalentes a 0,5 x SSC até cerca de 5 x SSC e 65 °C tanto para a hibridação como para a lavagem. A expressão "condições de hibridação padrão", tal como se utiliza aqui, é assim uma definição operacional e engloba uma gama de condições de hibridação. As condições mais severas podem, por exemplo, incluir a hibridação com um tampão de clivagem de placa (polivinilpirrolidona a 0,2 %, Ficoll 400 a 0,2 %; albumina de soro bovino a 0,2 %, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5); NaCl 1 M; pirofosfato de sódio a 0,1 %; SDS a 1 %); sulfato de dextrano a 13 % e 100 µg/mL de ADN de esperma de salmão, desnaturado, e tratado com ultra-sons, a 65 °C, durante 12-20 horas e lavagem com NaCl 75 mM/citrato de sódio 7,5 mM (0,5 x SSC)/SDS a 1 %, a 65 °C. As condições menos severas podem, por exemplo, incluir a hibridação com um tampão de

clivagem de placa, sulfato de dextrano a 10 % e 110 $\mu\text{g/mL}$ de ADN de esperma de salmão, desnaturado, tratado com ultra-sons, a 55 °C, durante 12-20 horas e lavado com NaCl 300 mM/citrato de sódio 30 mM (2,0 x SSC)/SDS a 1 %, a 55 °C. Ver também, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. New York, Sections 6.3.1-6.3.6, (1989).

"Sequência de expressão de controlo" - uma sequência de polinucleótidos que controla e regula a expressão dos genes quando ligada operacionalmente a esses genes.

"Operacionalmente ligada" - uma sequência de polinucleótidos (ADN, ARN) está operacionalmente ligada a uma sequência de expressão de controlo quando a sequência de expressão de controlo controla e regula a transcrição e a tradução dessa sequência de polinucleótidos. A expressão "ligado operacionalmente" inclui ter um sinal inicial apropriado (por exemplo, ATG) na frente da sequência de polinucleótidos a ser expressa e mantendo a estrutura de leitura correcta para permitir a expressão da sequência de polinucleótidos sobre o controlo da sequência de expressão de controlo e a produção do polipéptido desejado codificado pela sequência de polinucleótidos.

"Vector de expressão" - um polinucleótido, tal como um plasmido de ADN ou fago (entre outros exemplos comuns) que permite a expressão de pelo menos um gene quando o vector de expressão é introduzido numa célula hospedeira. O vector pode ou não ser capaz de replicar numa célula.

"Isolado" (utilizado de forma intermitável com "praticamente puro") - quando aplicado a um ácido nucleico, isto é, sequências de polinucleótidos que codificam polipé-

ptidos, significa um polinucleótido de ARN ou de ADN, uma porção de um polinucleótido genómico, um polinucleótido de ADNc ou sintético que, em virtude da sua origem ou manipulação: (i) não está associado com todo o polinucleótido com o qual está associado na natureza (por exemplo, está presente numa célula hospedeira como um vector de expressão ou uma parte dele); ou (ii) está ligado a um ácido nucleico ou a outra parte química diferente daquela a que está ligado na natureza; ou (iii) não ocorre na natureza. Por "isolado" entende-se ainda uma sequência de polinucleótido que está (i) amplificada *in vitro*, por exemplo, por uma reacção em cadeia de polimerase (RCP); (ii) sintetizado quimicamente; (iii) produzido de forma recombinante por clonagem; ou (iv) purificado, por exemplo, por clivagem e separação em gel.

Assim, "ácido nucleico praticamente puro" é um ácido nucleico que não é imediatamente contíguo a uma ou a ambas as sequências de codificação a que está normalmente contido no genoma de ocorrência natural do organismo do qual esse ácido nucleico derivou. ADN praticamente puro também inclui um ADN recombinante que faz parte de um gene híbrido que codifica sequências adicionais.

"Isolado" (utilizado intermutavelmente como "praticamente puro") - quando aplicado a polipéptidos, significa um polipéptido ou uma porção dele que, em virtude da sua origem ou manipulação: (i) está presente numa célula hospedeira como um produto de expressão de uma porção de um vector de expressão; ou (ii) está ligado a uma proteína ou a outra parte química diferente daquela a que está ligado na natureza; ou (iii) não ocorre na natureza. Por "isolado" entende-se ainda uma proteína que é: (i) sintetizada quimicamente; ou (ii) expressa numa célula hospedeira e

purificada das proteínas associadas. O termo geralmente significa um polipéptido que tenha sido separado de outras proteínas e ácidos nucleicos com os quais ocorre na natureza. Preferencialmente, o polipéptido é também separado de substâncias, tais como, anticorpos ou matrizes de gel (poliacrilamida), que são utilizadas para o purificar.

"Promotor heterólogo" - tal como se utiliza aqui, é um promotor que não está associado na natureza com um gene ou um ácido nucleico purificado.

"Homólogo" - tal como se utiliza aqui, é sinónimo do termo "identidade" e refere-se à semelhança de sequências entre dois polipéptidos, moléculas ou entre dois ácidos nucleicos. Quando uma posição nas duas sequências comparadas está ocupada pela mesma base ou subunidade monomérica de aminoácido (por exemplo, se uma posição em cada uma das duas moléculas de ADN está ocupada por adenina ou uma posição em cada um dos dois péptidos está ocupada por uma lisina), então as respectivas moléculas são homólogas nessa posição. A percentagem de homologia entre duas sequências em função do número de posições emparelhadas ou homólogas partilhadas pelas duas sequências divididas pelo número de posições comparadas x 100. Por exemplo, se 6 de 10 das posições nas duas sequências estão emparelhadas ou são homólogas, então as duas sequências são 60 % homólogas. A título de exemplo, as sequências de ADN CTGACT e CAGGTT partilham 50 % de homologia (3 de um total de 6 posições coincidem). Geralmente, faz-se uma comparação quando duas sequências estão alinhados para dar a homologia máxima. Exemplos de referências para DEFINIR

Os termos "péptidos", "proteínas" e "polipéptidos" são utilizados aqui de forma intermutável. As expressões "sequência de polinucleótidos" e "sequência de nucleótidos" são também utilizadas aqui de forma intermutável.

A prática da presente invenção utilizará, a menos que seja indicado de outra forma, técnicas convencionais da biologia das células, cultura de células, biologia molecular, microbiologia, ADN recombinante, química das proteínas e imunologia, que estão dentro das competências desta técnica. Essas técnicas estão descritas na literatura. Ver, por exemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edição. (Sambrook, Fritsch e Maniatis, eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; DNA Cloning, Volumes I e II (D. N. Glover, ed), 1985; Oligonucleotide Synthesis, (M. J. Gait, ed.), 1984; patente de invenção norte-americana U.S. No. 4.683.195 (Mullis et al.); Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames e S. J. Higgins, eds.), 1984; Transcription and Translation (B.D. Hames e S. J. Higgins, eds.), 1984; Culture of Animal Cells (R. I. Freshney, ed). Alan R. Liss, Inc., 1987; Immobilized Cells and Enzymes, IRL Press, 1986; A Practical Guide to Molecular Cloning (B. Perbal), 1984; Methods in Enzymology, Volumes 154 e 155 (Wu et al., eds), Academic Press, New York; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. H. Miller e M. P. Calos, eds.), 1987, Cold Spring Harbor Laboratory; Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Mayer and Waiker, eds.), Academic Press, London, 1987; Handbook of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D.M. Weir e C. C. Blackwell, eds.), 1986; Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986.

II. Propriedades Gerais de Proteínas e Polinucleótidos Isolados

A. Fusões Solúveis ao Receptor de FTC-beta e dos seus Análogos como Antagonistas de FTC-beta

A presente invenção utiliza polipéptidos antagonistas de FTC-beta isolados e purificados. Os polipéptidos antagonistas de FTC-beta isolados e purificados, utilizados na presente invenção, estão praticamente isentos de outros materiais contaminantes de origem natural ou endógena e contêm menos do que cerca de 1 % em massa de resíduos de contaminantes de proteínas dos processos de produção. Os polipéptidos antagonistas de FTC-beta utilizados na presente invenção estão, eventualmente, sem a glicosilação do modelo natural associado.

Tal como se utiliza aqui, a expressão "receptor de FTC-Seta" refere-se a proteínas que têm sequências de aminoácidos que são praticamente semelhantes ao receptor de FTC-beta de mamífero natural ou às sequências de moléculas de ligação de FTC-beta e que são capazes de se ligarem a FTC-beta e de inibirem que FTC-beta se ligue a membranas das células contendo o receptor de FTC-beta. O receptor de FTC-beta preferido é o receptor de FTC-beta maduro, de comprimento completo, do tipo II. O receptor de FTC-beta do tipo II é uma proteína ligada à membrana, com um domínio intracelular, domínio transmembrana e uma porção extracelular que se liga a FTC-beta. Tem-se determinado o receptor de FTC-beta do tipo II humano como tendo uma sequência de aminoácidos mostrada em Lin et al., Cell: 68, 775-785 (1992) e corrigido como se mostra na patente de invenção norte-americana U.S. 5.693.607.

Os receptores de FTC-beta da presente invenção preferidos, são formas solúveis do receptor de FTC-beta do tipo II, assim como, moléculas de ligação solúveis de FTC-beta do tipo II. Os receptores de FTC-beta solúveis incluem, por exemplo, análogos ou subunidades de proteínas naturais, que têm, pelo menos 20 aminoácidos e que exibem, pelo menos, alguma actividade biológica em comum com o receptor de FTC-beta do tipo II ou com as moléculas de ligação de FTC-beta.

As expressões "proteína de fusão do receptor de FTC-beta do tipo II" ou "R FTC-beta II:Fc", são utilizados intermutavelmente e representam os enquadramentos mais preferidos das composições da presente invenção. Esta proteína de fusão contém, pelo menos, uma parte do receptor de FTC-beta (tipo II) ligado, pelo menos, a uma parte da segunda proteína que não é um receptor de FTC-beta do tipo II. Especificamente, a segunda proteína pode ser a região constante de uma imunoglobulina (preferencialmente, IgG, sendo o mais preferencial, IgG1) ou pode ser uma sua expressão, tal como, a sua articulação C_H2 ou C_H3. As fusões preferidas da presente invenção são homodímeros, ligados uns aos outros por ligações de dissulfureto mas também se considera que as formas heterodiméricas estão dentro âmbito da presente invenção. Ver Secção IV.

Assim, as composições mais preferidas da presente invenção são antagonistas de FTC-beta que são proteínas de fusão solúveis, tais como, moléculas de anticorpos quiméricos recombinantes, comportando sequências do receptor de FTC-beta substituídas pelos domínios variáveis de alguma ou de ambas as cadeias leves e pesadas da molécula de imunoglobulina e que têm domínios de região constante não modificados. Por exemplo, R FTC-beta II

quimérico/IgG1 é produzido a partir de genes quiméricos: uma cadeia pesada, quimérica de R FTC-beta II/immunoglobulina I humana. No seguimento da transcrição e da tradução do gene quimérico, o produto do gene liga-se num homodímero que tenha um receptor de FTC-beta de forma bivalente. Essas formas polivalentes ao receptor de FTC-beta podem ter uma maior afinidade de ligação para o ligando de FSC-beta.

As estruturas do receptor de FTC-beta solúvel da presente invenção, estão desprovidas da região da membrana (e são segregadas a partir da célula) mas retêm a capacidade de se ligar a FTC-beta. As várias proteínas bio-equivalentes e os análogos de aminoácidos têm uma sequência de aminoácidos correspondendo a toda ou parte da região extracelular de um receptor natural de FTC-beta (por exemplo, SEQ ID N°. 8 ou 9 ou sequências de aminoácidos praticamente semelhantes ou, pelo menos, 98 % homólogas das sequências da SEQ ID N°. 8 ou 9) e que são biologicamente activas pelo facto de se ligarem ao ligando de FTC-beta. Os receptores equivalentes de FTC-beta incluem polipéptidos que variam destas sequências por uma ou mais substituições, eliminações ou adições e que retêm a capacidade de se ligar a FTC-beta ou de inibir a actividade de transdução do sinal de FTC-beta por via da superfície da célula ligada às proteínas do receptor de FTC-beta. A inibição da actividade de transdução do sinal de FTC-beta pode ser determinada transfectando as células com ADNs do receptor de FTC-beta recombinante, para se obter uma expressão recombinante do receptor. Faz-se então as células contactarem com FTC-beta e examinam-se os efeitos metabólicos resultantes. Se resultar um efeito que é atribuível à acção do ligando, então o receptor recombinante tem uma actividade de transdução do sinal. Exemplos de

processos para determinar se um polipéptido tem actividade de transdução do sinal, estão descritos por Idzerda et al., J. Exp. Med. 171: 861 (1990); Curtiss et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 3045 (1989); Prywes et al., EMBO J. 5:2179 (1986) e Chou et al., J. Biol. Chem. 262: 1842 (1987). Alternativamente, as células primárias ou as linhas de células que expressam um receptor endógeno de FTC-beta e têm uma resposta biológica detectável a FTC-beta podem também ser utilizadas.

Um "fragmento" das proteínas da presente invenção é uma porção ou toda uma proteína que seja capaz de se ligar a FTC-beta. Preferencialmente, este fragmento tem uma elevada afinidade para FTC-beta. Os fragmentos preferidos das proteínas de fusão são os fragmentos de proteínas que compreendem, pelo menos, parte da porção extracelular do receptor de FTC-beta do tipo II ligado a, pelo menos, uma parte da uma região constante de uma imunoglobulina. Preferencialmente, a afinidade está no intervalo de cerca de 10^{-11} a 10^{-12} M, embora a afinidade possa variar consideravelmente com fragmentos de diferentes dimensões, variando de 10^{-7} a 10^{-13} M. Num enquadramento, o fragmento tem cerca de 10-110 aminoácidos de comprimento e compreende o sítio de ligação de FTC-beta ligado a, pelo menos, parte de uma região constante de uma imunoglobulina.

Se a sequência de aminoácidos naturais do domínio extracelular do receptor de FTC-beta (por exemplo, os aminoácidos 1 a 160 das SEQ ID N°s. 8 ou 9) é utilizada nas proteínas de fusão, a sequência de aminoácidos parece-se com a porção extracelular inteira do receptor do tipo LI. Quando se utilizam porções do receptor de FTC-beta do tipo II menores, elas parecem-se com várias porções das porções extracelulares do receptor de FTC-beta do tipo II, desde

que se liguem a FTC-beta com elevada afinidade. Embora a sequência de um dado "fragmento" se baseie mais preferencialmente no receptor natural de FTC-beta da região extracelular, a definição também engloba análogos de proteínas da presente invenção que têm uma elevada afinidade para FTC-beta. Esses análogos incluem os que são produzidos por substituições conservadoras de aminoácidos, assim como, os que são produzidos por síntetização do fragmenta pelas células mutadas.

Os membros da família dos receptores de FTC-beta úteis nas utilizações das composições nos processos da presente invenção, incluem qualquer uma das proteínas naturais de ocorrência natural incluindo as suas contrapartes filogenéticas, alélicas ou outras das suas variantes, quer produzidas a partir de fontes naturais ou quimicamente, incluindo mutainas ou proteínas mutantes, assim como, formas recombinantes e novas, membros activos da família. Os polipéptidos incluem uma sequência de aminoácidos de, pelo menos, 98 % ou 99 % homólogas à sequência de aminoácidos das SEQ ID N°s. 8 ou 9. O polipéptido pode também incluir uma sequência de aminoácidos praticamente igual à sequência de aminoácidos nas SEQ ID N°s. 8 ou 9. O polipéptido tem, pelo menos, 5, 10, 20, 50, 100 ou 150 aminoácidos de comprimento e inclui, pelo menos 5, preferencialmente, pelo menos 10, mais preferencialmente, pelo menos 20 e, ainda mais preferencialmente, pelo menos 50, 100 ou 150 aminoácidos contíguos das SEQ ID N°s. 8 ou 9.

Os polipéptidos da presente invenção incluem aqueles que têm origem como resultado da existência de genes múltiplos, eventos alternativos de transcrição, eventos de combinação alternativa de ARN e eventos alternativos de

tradução e de pós-tradução. O polipéptido pode ser feito inteiramente por meios sintéticos ou pode ser expresso em sistemas, por exemplo, células de cultura que resultam nas modificações pós-tradução praticamente iguais presentes quando a proteína é expressa numa célula natural ou em sistemas que resultam na omissão de modificações pós-tradução presentes quando expressas numa célula natural.

B. Sequências Isoladas do Lolinucleótidos

A presente invenção também tem por objecto polinucleótidos que derivam de polinucleótidos que codificam, sob expressão, o receptor de FTC-beta de tipo natural (por exemplo, SEQ ID N°s. 1-4, 10 e 12), ver também a patente de invenção norte-americana U.S. 5.693.607. Um ADNc que codifica uma molécula de um receptor de FTC-beta do tipo II (isto é, os nucleótidos numerados como 832-1.311 das SEQ ID N°. 2 ou da SEQ ID N°. 4), é uma sequência de ADN complementar (ADNc) que codifica para o receptor de FTC-beta. Outros membros da família dos receptores de FTC-beta apresentam-se como polinucleótidos de FTC-beta do tipo I, de tipo natural (REF) e polinucleótidos do tipo III, de tipo natural (REF).

Também tem por objecto polinucleótidos isolados, exibidos nas SEQ ID N°s. 1-4, 10 e 12, que podem ser alterados para originar polinucleótidos equivalentes sob o ponto de vista funcional. Um polinucleótido é "equivalente sob o ponto de vista funcional" comparado com os das SEQ ID N°s. 1-4, 10 e 12 se satisfaz pelo menos uma das seguintes condições: (a) o "equivalente funcional" é um polinucleótido que hibrida com uma qualquer das sequências anteriores (SEQ ID N°s. 1-4, 10, 12) em condições de hibridação padrão. Mais preferencialmente, codifica uma proteína do

receptor de FTC-beta com a mesma actividade biológica que o receptor de FTC-beta de tipo natural e (b) o "equivalente funcional" é um polinucleótido que codifica na expressão para uma sequência de aminoácidos codificada por um qualquer dos polinucleótidos das SEQ ID N°s. 1-4, 10 e 12.

Devido à degenerescência das sequências de codificação dos nucleótidos, podem utilizar-se outros polinucleótidos para codificar os receptores de FTC-beta ou as suas fusões. Para o receptor de FTC-beta do tipo II, estes polinucleótidos incluem toda ou porções de ADN que codificam as SEQ ID N°s. 8 ou 9, que estão alterados pela substituição de diferentes codões, que codificam o mesmo resíduo de aminoácidos dentro da sequência, produzindo assim uma alteração silenciosa. Essas sequências alteradas são encaradas como equivalentes das SEQ ID N°s. 8 ou 9. Por exemplo, Fen (f) é codificada por dois codões, TTC ou TTT, Tri (Y) é codificada pelo TAC ou TAT e His (E) é codificada por CAC ou CAT. Por outro lado, Trp (W) é codificado por um único codão, TGG. De acordo com isto, deve entender-se que para uma dada sequência de ADN que codifica uma proteína particular, haverá muitas sequências degeneradas de ADN que serão codificadas por ela. Estas sequências de ADN degeneradas estão consideradas dentro do âmbito da presente invenção.

As proteínas de fusão da presente invenção que incorporam os receptores de FTC-Seta do tipo II de coelho, estão indicadas nas SEQ ID N°s. 2 e 8 para o ADNc e as sequências de aminoácidos deduzidas, respectivamente. Também tem por objecto as proteínas de fusão que incorporam o receptor humano de FTC-beta do tipo II mostrado nas SEQ ID N°s. 4 e 9 para o ADNc e as sequências de aminoácidos deduzidas, respectivamente.

As proteínas preferidas de R FTC-beta II:Fc da presente invenção incluem a nova sequência de "junção" de XDN SEQ ID N°. 6 e SEQ ID N°. 11 de aminoácidos. A SEQ ID N°. 10 representa os 11 codões de triplete em cada um dos lados da junção de CTG/GTC entre o ADN de R FTC-beta II de coelho e o ADN da imunoglobulina. NA SEQ ID N°. 10, as extremidades da sequência de FTC-beta depois do triplete CTG e a sequência da imunoglobulina começa no triplete GTC. A sequência da "junção" de aminoácidos de coelho deduzida, correspondente, está representada na SEQ ID N°. 11 em que a extremidade da sequência do receptor de FTC-beta é a leucina e o início da sequência de imunoglobulina é a valina imediatamente depois. Também se descreve aqui as sequências de ADNc humano da "junção" correspondente e as sequências de aminoácidos das SEQ ID N°s. 12 e 13, respectivamente. Na SEQ ID N°. 2, a junção correspondente começa no triplete do início do nucleótido 1.309 e termina no triplete do início do nucleótido 1.312.

Pode acontecer que as SEQ ID N°s. 10 e 12 sejam o ADN mínimo necessário para a hibridação em condições padrão com qualquer sequência de ADN que codifique qualquer um de receptor de FTC-beta:proteína de fusão de Fc. Apesar disso, dado que toda a sonda hibrida em ambos os lados da junção e ambos os lados da junção de receptor FTC-beta/região constante participam na hibridação, podem existir sequências mais pequenas. Além disso, os especialistas na matéria compreenderam que sequências de ADN maiores do que as SEQ ID N°s. 10 e 12, serão apropriadas também para a hibridação. Um especialista na matéria pode ensaiar se uma sonda particular, tal como, as SEQ ID N°s. 10 e 12 são capazes de hibridar em ambos os lados da junção, por meio da marcação da extremidade 5' quer de um oligonucleótido de estrutura helicoidal simples num sentido ou de um

oligonucleótido de estrutura helicoidal simples de sentido inverso, com um fosfato de ATP apropriadamente marcado utilizando um polinucleótido-cinase. Uma sequência da presente invenção deve hibridar e por isso ser marcada por ambas as sondas de oligonucleótido. Deve entender-se ainda que a presente invenção engloba as sequências completamente degeneradas que codificam a junção das SEQ ID N°s. 10 e 12.

Tal como a maior parte dos genes de mamíferos, os receptores de ETC-beta de mamíferos estão presumivelmente codificados por genes com múltiplos exões. As estruturas alternativas de ARNm que podem ser atribuídas a diferentes eventos de junção de ARNm no seguimento da transcrição e que partilham grandes regiões de identidade ou semelhança com os ADNcs reivindicados aqui, também podem ser utilizados. O vector que contém o clone de ADNc de R FTC-beta II:Fc foi utilizado para expressar e purificar R FTC-beta II:Fc solúvel.

Podem isolar-se outros ADNcs de receptores de FTC-beta de mamíferos utilizando uma sequência de ADN do receptor de FTC-beta humano apropriada como sonda para pesquisar uma biblioteca de ADNc particular de mamíferos, por meio da hibridação de espécies cruzadas. Os receptores de FTC-beta de mamíferos utilizados na presente invenção incluem, a título de exemplo, receptores de FTC-beta de primatas, seres humanos, murinos, caninos, felinos, bovinos, equinos e porcinos. Os receptores de FTC-beta de mamíferos podem obter-se por hibridação de espécies cruzadas utilizando um ADNc de estrutura helicoidal simples derivado da sequência de ADN de receptor humano de FTC-beta como uma sonda de hibridação, para isolar os ADNcs dos receptores de FTC-beta da biblioteca de ADNc de mamíferos.

III. Produção de Polipéptidos Recombinantes

Os polipéptidos isolados aqui descritos podem ser produzidos por qualquer processo conhecido na técnica. Esses processos vão desde processos directos de síntese de proteínas até à construção de uma sequência de ADN que codifique as sequências de polipéptidos isolados e à expressão dessas sequências num hospedeiro transformado, apropriado. Por exemplo, o ADNc pode obter-se por pesquisa numa biblioteca de ADNc humano com um fragmento de ADNc marcado, que codifica os polipéptidos das SEQ ID N°s. 8, 9, 11 ou 13 e por identificação dos clones positivos por meio de autoradiografia. Vários ciclos de purificação de placas e hibridação são realizados utilizando processos convencionais.

Num enquadramento de um processo recombinante, constrói-se uma sequência de ADN isolando ou sintetizando uma sequência de ADN que codifique uma proteína de interesse, de origem natural. Eventualmente, a sequência pode sofrer mutagenese por mutagenese específica do sítio para originar os análogos funcionais. Ver, por exemplo, Zoeller et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 81: 5662-5066 (1984) e a patente de invenção norte-americana U.S. 4.588.585. Outro processo de construção de uma sequência de ADN que codifica um polipéptido de interesse, será por síntese química utilizando um sintetizador de oligonucleótidos. Esses oligonucleótidos podem ser concebidos, preferencialmente, com base na sequência de aminoácidos do polipéptido desejado e, preferencialmente, seleccionando os codões que estão favorecidos na célula do hospedeiro, em que o polipéptido recombinante de interesse será produzido.

Podem aplicar-se processos normalizados para sintetizar uma sequência de um polipéptido isolado codificando um polipéptido isolado de interesse. Por exemplo, pode-se utilizar uma sequência completa de aminoácidos para construir um gene traduzido ao contrário. Ver Maniatis et al., supra. Além disso, pode-se sintetizar um oligómero de ADN contendo uma sequência de nucleótidos que codifica para o polipéptido particular isolado. Por exemplo, pode-se sintetizar vários oligonucleótidos pequenos que codificam para porções do polipéptido desejado e depois faz-se a respectiva ligação. Os oligonucleótidos individuais normalmente contêm prolongamentos de 5' ou 3' para uma junção complementar. Uma vez combinados (por síntese, mutagénese dirigida ao sítio ou outro processo), as sequências de ADN mutantes que codificam um polipéptido particular de interesse isolado, serão inseridas num vector de expressão e ligadas operacionalmente a uma sequência de controlo de expressão apropriada para a expressão da proteína de um hospedeiro desejado. A ligação apropriada pode ser confirmada por sequenciação de nucleótidos, mapeamento de restrição e expressão de um polipéptido activo sob o ponto de vista biológico num hospedeiro apropriado. Como é sabido na técnica, para se obter elevados níveis de expressão de um gene transfectado num hospedeiro, o gene deve estar operacionalmente ligado às sequências de controlo de expressão transcricionais e de tradução, que são funcionais no hospedeiro de expressão escolhido.

A. Expressão do Receptor de FTC-beta Recombinante

Os vectores de expressão recombinantes são utilizados preferencialmente para amplificar ou expressar o ADN que codifica as fusões do receptor de FTC-beta. Os vectores de

expressão recombinantes são estruturas de ADN replicáveis que ~~tão~~ fragmentos de ADN sintéticos ou derivados de ADNc, que codificam as fusões do receptor de FTC-beta ou análogos bioequivalentes ligados operacionalmente a elementos reguladores transcricionais ou translacionais apropriados derivados de genes de mamíferos, microbianos, virais ou de insectos. Uma unidade transcricional geralmente compreende um conjunto de (1) um elemento ou vários elementos genéticos com um papel regulador na expressão dos genes, por exemplo, promotores ou elementos de aumento transcricional, (2) uma sequência estrutural ou de codificação que está transcrita no ARN e traduzida na proteína e (3) sequências de transcrição e de início de tradução e de terminação apropriadas, conforme descrito em detalhe a seguir. Esses elementos reguladores podem incluir uma sequência de operador para controlar a transcrição. A capacidade para replicar num hospedeiro, normalmente conferida por uma origem de replicação e a selecção de genes para facilitar o reconhecimento de transformantes, pode ser adicionalmente incorporada. As regiões de ADN estão ligadas operacionalmente quando estão funcionalmente relacionadas umas com as outras. Por exemplo, um ADN para um péptido de sinal (líder secretor) está operacionalmente ligado ao ADN para um polipéptido se estiver expresso como um precursor que participa na secreção do polipéptido: um promotor está operacionalmente ligado a uma sequência de codificação se controla a transcrição da sequência; ou um sítio de ligação do ribossoma está operacionalmente ligado a uma sequência de codificação se estiver posicionado de tal maneira que permita a tradução. Geralmente, operacionalmente ligado significa contíguo e, no caso de líderes de secreção, contíguo e no mesmo fragmento de leitura. Os elementos estruturais apropriados para serem utilizados nos sistemas de expressão de leveduras incluem,

preferencialmente, uma sequência líder que permite a secreção extracelular da proteína traduzida por uma célula hospedeira. Alternativamente, quando uma proteína recombinante está expressa sem uma sequência líder ou de transporte, pode incluir um resíduo de metionina no terminal N. Este resíduo pode, eventualmente, ser em seguida clivado a partir da proteína recombinante expressa, para originar um produto final.

As sequências de ADN que codificam os receptores de FTC-beta de mamíferos que se pretendem expressar como uma fusão num microrganismo, podem conter preferencialmente intrões que podem terminar prematuramente a transcrição do ADN no ARNm dado que essa terminação prematura da transcrição pode ser desejável, por exemplo, quando dela vão resultar mutantes com truncagens vantajosas no terminal C, por exemplo, eliminação de uma região da transmembrana para originar um receptor solúvel não ligado à membrana das células. Devido ao código de degenerescência, podem considerar-se variações nas sequências de nucleótidos que codificam as mesmas sequências de aminoácidos. Tal como já foi discutido antes, outros enquadramentos incluem sequências capazes de hibridar com as sequências do ADNc fornecido em condições padrão (50 °C, 2 x SSC) e outras sequências que hibridam ou degeneram com as que codificam as proteínas da presente invenção, activas sob o ponto de vista biológico.

A escolha da sequência de controlo de expressão e do vector de expressão dependerá da escolha do hospedeiro. Pode utilizar-se uma grande variedade de combinações de hospedeiro/vector de expressão. Os vectores de expressão úteis para hospedeiros eucarióticos incluem, por exemplo, vectores que compreendem as sequências de controlo da

expressão de SV40, vírus do papiloma bovino, adenovírus e citomegalovírus. Os vectores de expressão úteis para hospedeiros bacterianos incluem plasmídeos bacterianos conhecidos, tais como, plasmídeos de *Escherichia coli*, incluindo pCR1, pBR322, pMB9 e os seus derivados, uma gama mais vasta de plasmídeos de hospedeiros, tais como, M13 e fagos de ADN de estrutura helicoidal simples, filamentosos. Os vectores de *E. coli* preferidos incluem os vectores pL contendo o promotor do fago lambda pL (patente de invenção norte-americana U.S. 4.874.702), vectores de pET contendo o promotor de T7 polimerase (Studier et al., Methods in Enzymology 185: 60-89, 1990 1) e o vector pSP72 (Kaelin et al., supra). Os vectores de expressão úteis para as células de leveduras incluem, por exemplo, o 2 μ e os plasmídeos centrómeros.

Além disso, pode-se utilizar nestes vectores qualquer uma de uma ampla variedade de sequências de controlo de expressão. Essas sequências de controlo de expressão úteis incluem as sequências de controlo de expressão associadas com genes estruturais dos vectores de expressão anteriores. Exemplos de sequências de controlo de expressão úteis incluem, por exemplo, os promotores precoces e tardios de SV40 ou de adenovirus, o sistema *lac*, o sistema *trp*, o sistema TAC ou *TRC*, o principal operador e as regiões promotoras do fago lambda, por exemplo, pL, as regiões de controlo da proteína de revestimento fd, o promotor para 3-fosfoglicerato-cinase ou outros enzimas glicolíticos, os promotores de fosfatase ácida, por exemplo, o , os promotores do sistema de emparelhamento alfa de leveduras e outras sequências conhecidas por controlarem a expressão de genes de células procarióticas ou eucarióticas e de seus vírus e as suas várias combinações.

O ADN do receptor recombinante de FTC-beta ou o ADN de FTC-beta recombinante R:Fc é expresso ou amplificado num sistema de expressão recombinante, que compreende uma monocultura praticamente homogênea de um hospedeiro apropriado, que tem integrado estavelmente (por transformação ou transfecção) uma unidade transcricional recombinante no ADN cromossômico ou comporta a unidade transcricional recombinante como um composto de um plasmido residente. Geralmente, as células que constituem o sistema são a progenia de um único transformante antigo. Os sistemas de expressão recombinante, tal como se definem aqui, irão expressar proteínas heterólogas após indução de elementos reguladores ligados à sequência de ADN ou genes sintéticos a ser expressos.

As células hospedeiras apropriadas para a expressão de receptores de FTC-beta de mamíferos e as suas proteínas de fusão incluem células procarióticas, de leveduras ou células eucarióticas superiores, sob o controlo dos promotores apropriados. As células procarióticas incluem organismos gram negativos ou gram positivos, por exemplo, *E. coli* ou bacilos. As células eucarióticas superiores incluem linhas de células estabelecidas com origem em mamíferos, conforme se descreve a seguir. Os sistemas de tradução isentos de células podem também ser utilizados para produzir receptores de FTC-beta de mamíferos e R FTC-beta:Fc utilizando ARNs derivado das estruturas de ADN da presente invenção. Os vectores de clonagem e de expressão apropriados para serem utilizados com bactérias, fungos, leveduras e hospedeiros celulares de mamíferos, estão descritos por Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.º 1, 1983).

As proteínas recombinantes da presente invenção podem também ser expressas em hospedeiros de leveduras, preferencialmente, da espécie *Saccharomyces*, tais como, *S. cerevisiae*. As leveduras de outros géneros, tais como, *Pichia* ou *Kluyveromyces* podem também ser utilizadas. Os vectores de levedura conterão geralmente uma origem de replicação do plasmido de levedura de 2 μ ou uma sequência de replicação autónoma, um promotor. O ADR que codifica as proteínas da presente invenção e as sequências de ADN para poliadenilação e terminação da transcrição e um gene de selecção. Preferencialmente, os vectores de levedura irão incluir uma origem de replicação e um marcador seleccionável que permite a transformação tanto da levedura como de *E. coli*, por exemplo, o gene resistente à ampicilina de *E. coli* e o gene TRP1 ou URA3 de *S. cerevisiae*, que dão um marcador de selecção para uma estirpe mutante de levedura, a que falta a capacidade para crescer em triptofano e um promotor derivado de um gene de levedura altamente expresso, para induzir a transcrição de uma sequência estrutural a jusante. A presença da lesão de TRP1 ou de URA3 no genoma da célula hospedeira de levedura vai providenciar então um ambiente efectivo para detectar a transformação por meio do crescimento na ausência de triptofano ou uracilo.

As sequências de promotor apropriadas em vectores de leveduras incluem os promotores para metalotioneína, 3-fosfoglicerato-cinase (Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255:2073, 1990) ou outras enzimas glicolíticas (Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg. 7: 149, 1968; e Holland et al., Biochem. 7: 4900, 1978), tais como, enolase, gliceraldeído-3-fosfato-des-hidrogenase, hexocinase, piruvato-descarboxilase, fosfofructocinase, glicose-6-fosfato-isomerase, 3-fosfoglicerato-mutase, piruvato-cinase, triosefosfato-isomerase.

ruvB, fosfoglicose-isomerase e glicocinase. Os vectores apropriados e os promotores apropriados para serem utilizados na expressão da levedura, estão ainda descritos em R. Hitzeman et al., patente de invenção europeia EP A 73.657. Os vectores de levedura específicos podem ser combinados utilizando sequências de ADN de pUC18 para selecção e replicação em *E. coli*. (O gene Amp^r e origem de replicação) e sequências de ADN de leveduras incluindo um promotor de ADH2 que reprime a glicose e um líder da secreção do factor alfa. O promotor de ADH2 já foi descrito por Russell et al. (*J. Biol. Chem.* 258: 2674, 1982) e Beier et al. (*Nature* 300:724, 1982). O líder do factor alfa de levedura, que dirige a secreção de proteínas heterólogas, pode ser inserido entre o promotor e o gene estrutural para ser expresso. Ver, por exemplo, Kurjan et al., *Cell* 30: 933, 1982; e Bitter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:5330, 1984. A sequência líder pode ser modificada para conter, próximo da sua extremidade 3', um ou mais sítios de restrição úteis para facilitar a fusão da sequência líder com os genes estranhos.

Os protocolos de transformação de levedura apropriados são conhecidos pelos especialistas na matéria: uma técnica exemplar está descrita por Hinnen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75: 1929, 1978, conforme descrito por Sherman et al., *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986.

Pode utilizar-se também com vantagem os sistemas de culturas de células de mamíferos ou de insectos para expressar a proteína recombinante. A expressão das proteínas recombinantes em células de mamíferos é particularmente preferida, porque essas proteínas estão geralmente dobradas

de forma correcta, modificadas de forma apropriada e são completamente funcionais. Exemplos de linhas de células hospedeiras de mamíferos apropriadas incluem linhas de CQS-7 de células de rim de macaco, descritas por Gluzman (Cell 23: 175, 1981) e outras linhas de células capazes de expressar um vector apropriado incluindo, por exemplo, as células L, C127, 3T3, ovário de hamster chinês (OHC) e linhas de células HeLa e BHK. Os vectores de expressão de mamíferos podem compreender elementos não transcritos, tais como, uma origem de replicação, um promotor apropriado e um melhorador ligado ao gene a ser expresso e outras sequências não transcritas que flanqueiam 5' ou 3' e sequências não traduzidas de 5' ou 3', tal como é necessário sítios de ligação do ribossoma, um sítio de poliadenilação, sítios de dadores conjugados, sítios receptores e sequências de terminação transcricional. Os sistemas de baculovírus para a produção de proteínas heterólogas em células de insectos foram revistos por Luckow and Summers, Bio/Technology 6:47 (1988).

Os vectores de expressão recombinantes compreendem ADNcs que estão estavelmente integrados em ADN de células hospedeiras. Consegue-se um elevado nível do produto de expressão seleccionando linhas de células que tenham números amplificados de ADN do vector. As linhas de células que têm números amplificados de ADN do vector seleccionam-se, por exemplo, por transformação de uma célula hospedeira com um vector que compreende uma sequência de ADN que codifica uma enzima que é inibida por um fármaco conhecido. O vector pode também compreender uma sequência de ADN que codifica uma proteína desejada. Alternativamente, a célula hospedeira pode ser co-transformada com um segundo vector que compreende a sequência de ADN que codifica a proteína desejada. Faz-se então a cultura das células hospedeiras

transformadas ou co-transformadas em concentrações crescentes do fármaco conhecido, seleccionando assim para as células resistentes ao fármaco. Essas células resistentes ao fármaco sobrevivem em concentrações crescentes do fármaco tóxico por meio da sobre-produção da enzima que é inibida pelo fármaco, frequentemente em resultado da amplificação do gene que codifica a enzima. Quando a resistência ao fármaco é causada pelo aumento do número de cópias do ADN do vector que codifica a enzima que pode ser inibida, há uma concomitante co-amplificação do ADN do vector que codifica a proteína desejada no ADN das células hospedeiras.

Um sistema preferido para essa co-amplificação utiliza o gene para a di-hidrofolato-redutase (DHFR), que pode ser inibida pelo fármaco metotrexato (MTX). Para se conseguir uma co-amplificação, transforma-se uma célula hospedeira a que falta um gene activo que codifica DHFR com um vector, que compreende a sequência de ADN que codifica DHFR ou uma proteína desejada ou é transformada com um vector que compreende uma sequência de ADN que codifica DHFR e um vector que compreende uma sequência de ADN que codifica a proteína desejada. As células hospedeiras transformadas ou co-transformadas são postas em cultura num meio que contém níveis crescentes de MTX e seleccionam-se essas linhas de células que sobrevivem.

Um sistema de co-amplificação particularmente preferido utiliza o gene para a glutamina sintetase (GS), que é responsável pela síntese de glutamato e amónia, utilizando a hidrólise de ATP em ADP e fosfato para provocar a reacção. A GS é submetida a inibição por meio de uma variedade de inibidores, por exemplo, metionina-sulfoximina (MSX). Assim, as proteínas da presente invenção podem ser

expressas em concentrações elevadas por co-amplificação das células transformadas com um vector que compreende a sequência de ADN para GS e uma proteína desejada ou co-transformadas com um vector que compreende uma sequência de ADN que codifica GS e um vector que compreende uma sequência de ADN que codifica a proteína desejada, fazendo-se as culturas das células hospedeiras em meios que contêm níveis crescentes de MSX e seleccionando as células que sobreviveram. O sistema de co-amplificação de GS, os vectores de expressão recombinantes apropriados e as linhas de células, estão descritos nos seguintes pedidos de patente de invenção PCT: WO 87/04462, WO 89/01036, WO 89/10404 e WO 86/05807.

As proteínas recombinantes são expressas, preferencialmente, por co-amplificação de DHFR ou de GS em células hospedeiras de mamíferos, tais como, células de ovário de hamster chinês (OHC) ou, alternativamente, em células de mieloma de murino, tal como, SP2/0-Ag14 ou NSO ou numa linha de células de mieloma de rato, tal como, YB2/3.0-Ag20, descritas nos pedidos de patente de invenção PCT WO 89/10404 e WO 86/05807.

Deve entender-se que nem todos os vectores e as sequências de controlo de expressão vão funcionar igualmente bem para expressar um dado polipéptido isolado. Também nem todos os hospedeiros funcionam igualmente bem com o mesmo sistema de expressão. Contudo, um especialista na matéria pode fazer uma selecção destes vectores, sistemas de controlo de expressão e hospedeiros sem necessitar de fazer experimentação.

B. Purificação de R FTC-beta II:Fc Recombinante

As proteínas produzidas por um hospedeiro transformado podem ser purificadas de acordo com qualquer processo apropriado. Esses processos padronizados incluem cromatografia (por exemplo, cromatografia de permuta iônica, de afinidade e de dimensionamento da coluna), centrifugação, solubilidade diferencial ou por qualquer outra técnica normalizada para purificação de proteínas. Os marcadores de afinidade, tais como, hexa-histidina, domínio da ligação da maltose, sequência de revestimento da gripe e glutathione-S-transferase podem ligar-se à proteína para permitir uma purificação fácil por passagem sobre uma coluna de afinidade apropriada. As proteínas isoladas podem também ser caracterizadas fisicamente utilizando técnicas como proteólise, ressonância magnética nuclear e cristalografia por raios X.

Por exemplo, pode-se primeiro concentrar os sobrenadantes de sistemas que segregam proteínas recombinantes em meios de cultura utilizando um filtro de concentração de proteína disponível comercialmente, por exemplo, uma unidade de ultra-filtração da Amicon ou da Millipore Pellicon. No seguimento da etapa de concentração, o concentrado pode ser aplicado a uma matriz de purificação apropriada. Por exemplo, uma matriz de afinidade apropriada pode conter um FTC-beta ou lectina ou uma molécula de anticorpo ou uma proteína A ligada a um suporte apropriado. Alternativamente, pode-se utilizar uma resina permutadora de aniões, por exemplo, uma matriz ou um substrato com grupos dietilaminoetilo (DEAE) pendentos. As matrizes podem ser acrilamida, agarose, ~~dextrano~~, celulose ou outros tipos vulgarmente utilizados na purificação das proteínas. Alternativamente, pode-se utilizar uma ~~etapa~~ de permuta

catiônica. Os permutadores de catiões apropriados incluem virias matrizes insolúveis que compreendem grupos sulfopropilo ou carboximetilo. Os grupos sulfopropilo são os preferidos. Finalmente, pode-se utilizar uma ou mais etapas de cromatografia líquida de elevada resolução de fase inversa (CLER-FI) utilizando meio hidrofóbico de CLER-FI, por exemplo, gel de sílica com grupos metilo pendentes ou outros grupos alifáticos para aumentar a purificação de uma composição de R FTC-beta II:Fc. Algumas ou todas as etapas de purificação anteriores, em várias combinações, podem também ser utilizadas para providenciar uma proteína recombinante, homogênea.

A proteína recombinante produzida em culturas bacterianas é normalmente isolada pela extração inicial de aglomerados de células, seguida de uma ou mais concentrações, salinização e etapas de permuta iônica aquosa ou cromatografia de exclusão. Finalmente, pode-se utilizar para as etapas de purificação finais a cromatografia líquida de elevada resolução (CLER). As células microbianas utilizadas na expressão de receptores de FTC-beta, recombinantes de mamíferos, podem romper-se por qualquer processo conveniente, incluindo os ciclos de congelamento-descongelamento, ultra-sons, rompimento mecânico ou utilização de agentes de lise de células.

A fermentação de leveduras que expressam a fusão do receptor de FTC-beta de mamíferos, sob a forma de uma proteína segregada, simplifica enormemente a purificação. A proteína recombinante segregada que resulta de uma fermentação em grande escala pode ser purificada por processos análogos aos descritos por Urdal et al. (J. Chromatog. 296: 171, 1984). Esta referência descreve duas

etapas sequenciais de CLER de fase Inversa para purificação de FEC-GM recombinante numa coluna preparativa de CLER.

C. Produção de Fragmentos e Análogos

Os fragmentos de uma proteína isolada (por exemplo; fragmentos da SEQ ID Nº. 8) podem também ser produzidos de forma eficiente por processos recombinantes, por digestão proteolítica ou por síntese química, utilizando processos conhecidos dos especialistas na matéria. Nos processos recombinantes, os fragmentos internos ou terminais de um polipéptido podem ser gerados removendo um ou mais nucleótidos de uma das extremidades (para um fragmento terminal) ou de ambas as extremidades (para um fragmento interno) de uma sequência de ADN que codifica para o polipéptido isolado. A expressão do ADN mutagenizado produz fragmentos de polipéptido. A digestão com endonucleases que "mordiscam a extremidade" também gera ADNs que codificam uma estrutura dos fragmentos. Os ADNs que codificam os fragmentos de uma proteína podem também ser gerados por corte aleatório, digestão por restrição ou uma combinação de ambas.

Os fragmentos do receptor de FTC-beta podem ser gerados directamente a partir de proteínas intactas de receptor de FTC-beta. Os péptidos podem ser clivados especificamente por enzimas proteolíticas incluindo, mas não se limitando, a plasmina, trombina, tripsina, quimio-tripsina ou pepsina. Cada uma destas enzimas é específica para o tipo de ligação peptídica que ela própria ataca. A tripsina catalisa a hidrólise das ligações peptídicas em que o grupo carbonilo pertence a um aminoácido básico, normalmente arginina ou lisina. A pepsina e a quimio-tripsina catalisam a hidrólise das ligações peptídicas de

aminoácidos aromáticos, tais como, triptofano, tirosina e fenilalanina. Geram-se conjuntos alternados de fragmentos de proteína clivados evitando a clivagem no sítio que é susceptível a uma enzima proteolítica. Por exemplo, a reacção dos grupos ϵ -aminoácido de lisina com tioacetato de etiltriflúor em condições mediamente básicas, origina resíduos de aminoácidos bloqueados cuja ligação peptídica adjacente já não é susceptível à hidrólise por meio de tripsina. As proteínas podem ser modificadas para criar ligações peptídicas que são susceptíveis a enzimas proteolíticas. Por exemplo, a alquilação de resíduos de cisteína com β -halogeno-etilaminas origina ligações peptídicas que são hidrolisáveis pela tripsina (Lindley, Nature 178: 047 (1956)). Além disso, os reagentes químicos que clivam as cadeias de péptidos em resíduos específicos também podem ser utilizados. Por exemplo, o brometo de cianogénio cliva péptidos nos resíduos de metionina (Gross and Witkip, J. Am. Chem. Soc., 83: 1510 1 6 1 Assim, tratando as proteínas com várias combinações de modificadores, enzimas proteolíticas e/ou reagentes químicos, as proteínas podem ser divididas em fragmentos com um comprimento desejado sem sobreposição dos fragmentos ou divididas em fragmentos sobrepostos de um determinado comprimento.

Os fragmentos podem também ser sintetizados quimicamente utilizando técnicas conhecidas na técnica, tais como, a química de F-moc ou t-Boc de fase sólida de Merrifield. Merrifield, Recent Progress in Hormone Research 23: 451 (1967).

D. Produção de Sequências de ADN e de Péptidos Alteradas: Processos Aleatórios

Podem preparar-se variantes de sequências de aminoácidos de uma proteína (tal como, as variantes da SEQ ID N°. 8) por mutagénese aleatória de ADN que codifica a proteína ou uma sua porção particular. Os processos úteis incluem mutagénese por RCP e mutagénese de saturação. Pode-se também gerar uma biblioteca de variantes aleatórias de sequências de aminoácidos por meio da síntese de um conjunto de sequências de oligonucleótidos degeneradas. Os processos de geração de variantes de sequências de aminoácidos de uma dada proteína utilizando ADN e péptidos alterados, são bem conhecidos na técnica. Os exemplos que se seguem desses processos não pretendem limitar o âmbito da presente invenção, mas servem meramente para ilustrar técnicas representativas. Os especialistas nesta técnica irão reconhecer que outros processos são úteis sobre este ponto de vista.

Mutagénese por RCP: Em resumo, utiliza-se Taq polimerase (ou outra polimerase) para introduzir mutações aleatórias num fragmento clonado de ADN (ver, Leung et al., Technique 1: 11-15 (1989)). As condições da RCP são escolhidas de tal modo que a fidelidade da síntese de ADN é reduzida pelos polímeros de Taq ADN utilizando, por exemplo, uma relação de dGTP/dATP de cinco e adicionando Mn^{+2} à reacção de RCP. O conjunto dos fragmentos de ADN amplificados é inserido em vectores de clonagem apropriados para originar bibliotecas de mutantes aleatórios.

Mutagénese de Saturação: Há um processo de forma geral em Mayers et al., Science, 229: 242 (1989). Em resumo, a técnica inclui a geração de mutações por tratamento químico

ou irradiação de um ADN de estrutura helicoidal simples *in vitro* e a síntese de uma estrutura helicoidal de ADNc. A frequência da mutação é modulada pela severidade do tratamento e basicamente podem obter-se todas as substituições de bases possíveis.

Mutagénese de Oligonucleótidos Degenerados: Fode gerar-se uma biblioteca de péptidos homólogos a partir de um conjunto de sequências degeneradas de oligonucleótidos. A síntese química das sequências degeneradas pode ser realizada num sintetizador automático de ADN e os genes sintéticos são então ligados num vector de expressão apropriado. Ver, Itakura et al., Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Symposium on Macromolecules, pp. 273-289 (A. G. Walton ed.), Elsevier Amsterdam, 1981.

E. Produção de Sequências de ADN Alterado e Péptidos: Processos Directos

A mutagénese não aleatória ou dirigida origina sequências específicas ou mutações em porções específicas de uma sequência de polinucleótidos que codifica um polipéptido isolado, para originar variantes que incluem eliminações, inserções ou substituições de resíduos da sequência de aminoácidos conhecida do polipéptido isolado. Os sítios de mutação podem ser modificados individualmente ou em série, por exemplo, por: (1) substituindo primeiro com aminoácidos conservados e depois com mais escolhas de radicais consoante os resultados alcançados; (2) eliminando o resíduo alvo; ou (3) inserindo resíduos da mesma classe ou de uma classe adjacente diferente ao sítio localizado ou ainda combinações das opções 1-3.

Mutagénese por Rastreamento de Alanina: Este processo localiza os resíduos ou as regiões de uma dada proteína que são localizações preferidas para a mutagénese. Ver, Cunningham and Wells, Science 244: 1081-1085 (1989). Ao rastrear a alanina, selecciona-se um resíduo ou um grupo de resíduos alvo e substitui-se por alanina ou polialanina. Esta substituição pode afectar a interacção do aminoácido com os aminoácidos vizinhos e/ou com o ambiente aquoso ou da membrana circundante. Os que têm sensibilidade funcional às substituições são então refinados por meio da introdução de mais variantes ou de outras variantes no sítio ou para os sítios da substituição.

Mutagénese Mediada por Oligonucleótidos: Pode-se utilizar uma versão deste processo para preparar a substituição, eliminação e inserção de variantes de ADN. Ver, Adelman et al., DNA 2: 183 (1983). Em resumo, o ADN desejado é alterado por hibridação de um iniciador de oligonucleótido que codifica uma mutação de ADN com uma matriz de ADN que normalmente tem uma forma helicoidal simples de um plasmido ou de um fago contendo uma sequência de ADN não alterada ou de tipo natural da proteína desejada (por exemplo, a proteína). Depois da hibridação, utiliza-se uma ADN-polimerase para fazer a segunda e complementar estrutura helicoidal de ADN da matriz, que irá incorporar o iniciador de oligonucleótido e que irá codificar para a alteração seleccionada na sequência de ADN desejada. Geralmente, os oligonucleótidos que se utilizam têm pelo menos 25 nucleótidos de comprimento. Um oligonucleótido óptimo terá 12 a 15 nucleótidos que são completamente complementares da matriz em cada um dos lados da mutação. Isto assegura que o oligonucleótido irá hibridar apropriadamente com a molécula da matriz de ADN de estrutura helicoidal simples.

Mutagénesse de Cassete: Este processo (Wells et al., Gene 34: 315 (1985)) requer um plasmido ou outro vector que contém o ADN da subunidade da proteína a ser mutada. Os codões no ADN da subunidade de proteína são identificados e insere-se um único sítio de endonuclease de restrição em cada lado dos sítios de mutação identificados, utilizando-se o processo de mutagénesse dirigido ao oligonucleótido descrito antes. O plasmido é então cortado nestes sítios para ser linearizado. Sintetiza-se um oligonucleótido de estrutura helicoidal dupla codificando a sequência do ADN entre os sítios de restrição mas contendo as mutações desejadas, utilizando processos padrão. As duas estruturas helicoidais são sintetizadas separadamente e depois são hibridadas em conjunto utilizando processos padrão. Este oligonucleótido de estrutura helicoidal dupla é a "cassete" e tem extremidades 3' e 5' que são compatíveis com as extremidades do plasmido linearizado, de tal modo que podem ser directamente ligados. O plasmido contém então assim a sequência de ADN da subunidade de proteína desejada já mutada.

Mutagénesse Combinatória: Numa versão deste processo (Ladner et al., patente de invenção WO 88/06630), as sequências de aminoácidos para um grupo de proteínas homólogas ou outras proteínas relacionadas, estão alinhadas, preferencialmente, para promover a maior homologia possível. Todos os aminoácidos que aparecem numa dada posição das sequências alinhadas podem ser seleccionados para criar um conjunto degenerado de sequências combinatórias. A biblioteca diversificada é gerada por mutagénesse combinatória ao nível do ácido nucleico e é codificada por uma biblioteca de genes variada. Por exemplo, uma mistura de oligonucleótidos sintéticos pode ser ligada por via enzimática a uma

sequência de genes de tal modo que o conjunto degenerado de sequências potenciais se possa expressar com péptidos individuais ou, alternativamente, como um conjunto de proteínas contendo todo o conjunto das sequências degeneradas.

IV. Outras Variantes de Polipéptidos Isolados

Os derivados de proteínas da presente invenção também incluem várias formas estruturais da proteína primária que retém actividade biológica. Devido à presença dos grupos amino e carboxilo ionizáveis, por exemplo, uma proteína de fusão do receptor de FTC-beta, pode estar sob a forma de sais ácidos ou básicos ou pode estar sob uma forma neutra. Os resíduos de aminoácidos individuais podem também ser modificados por oxidação ou redução. A estrutura primária do aminoácido (por exemplo, da parte de R FTC-beta II) pode ser modificada por meio da formação de conjugados covalentes ou agregadores com outras partes químicas, tais como, grupos glicosilo, lípidos, fosfatos, grupos acetilo e similares ou pela criação de mutantes das sequências de aminoácidos.

Os derivados covalentes do receptor de FTC-beta podem ser preparados ligando grupos funcionais particulares às cadeias laterais dos aminoácidos do receptor de FTC-beta ou nos terminais N ou C. Outros derivados de R FTC-beta II:Fc incluem conjugados covalentes ou agregadores de R FTC-beta II ou os seus fragmentos com outras proteínas ou polipéptidos, por meio da síntese em cultura recombinante sob a forma de fusões adicionais do terminal N ou do terminal C. Por exemplo, o péptido conjugado pode ser uma sequência de polipéptido de sinal (ou líder) na região terminal N da proteína a qual de forma co-translacional ou

pós-translacional dirige a transferência da proteína do seu sítio de síntese para o seu sitio de função dentro ou fora da membrana da célula ou da parede (por exemplo, a sequência líder do factor alfa de levedura). As proteínas do receptor de FTC-beta podem compreender péptidos adicionais para facilitar a purificação ou a identificação do receptor de FTC-beta (por exemplo, poli-Eis). A sequência de aminoácidos do receptor de FSC-beta pode também estar ligada ao péptido Asp-Tir-Lis-Asp-Asp-Asp-Asp-Lis (DYKDDDDK) (Hopp et al., Bio/Technology 6: 1204,1988). A última sequência é altamente antigénica e providencia um epitopo ligado inversamente por um anticorpo monoclonal específico, permitindo um ensaio rápido e uma purificação fácil da proteína recombinante expressa. Esta sequência é também especificamente clivada por enterocinase da mucosa de bovinos no resíduo que se segue imediatamente ao par de Asp-Lis. As proteínas de fusão recobertas com este péptido podem também ser resistentes à degradação intracelular em *E. coli*.

As formas polivalentes do receptor de FTC-beta são úteis dado que possuem múltiplos sítios de ligação do receptor de FTC-beta para o ligando de FTC-beta. Por exemplo, um receptor blvalente de FTC-beta, solúvel, pode consistir em duas repetições em tandem dos aminoácidos numerados de 1-160 das SEQ. ID. N°s. 8 ou 9 separadas por uma região ligante, sendo as repetições ligadas ao domínio constante de imunoglobulina. Podem construir-se formas polivalentes alternativas, por exemplo, acoplando químicamente as fusões do receptor de FTC-beta e Fc a qualquer molécula veicular aceitável sob o ponto de vista clínico, um polímero seleccionado do grupo que consiste em Ficoll, polietileno-glicol ou dextrano, utilizando técnicas de acoplamento convencionais. Alternativamente, a fusão do

receptor de FTC-beta pode ser acoplada quimicamente a biotina e o conjugado de receptor de biotina-FTC-beta a Fc podem então ligar-se a avidina, resultando em moléculas receptoras tetravalentes de avidina/biotina/receptor de FTC-beta. As fusões de receptor de FTC-beta e Fc podem ser acopiadas covalentemente a dinitrofenol (DNP) ou trinitrofenol (TNP) e o conjugado resultante precipita com anti-DNP ou anti-TNP-IgM, para formar conjugados decaméricos com uma valência de 10 para os sítios de ligação do receptor de FTC-beta.

Os análogos funcionais dos mutantes da fusão de R FTC-beta II:Fc que têm sítios de N-glicosilação inactivados podem ser produzidos por síntese dos oligonucleótidos e ligação ou por técnicas de mutagénese específicas dos sítios. Estas proteínas análogas podem ser produzidas numa forma homogénea, de hidratos de carbono reduzidos com um bom rendimento, utilizando sistemas de expressão de leveduras. Os sítios de N-glicosilação em proteínas eucarióticas são caracterizados pelo tripleto de aminoácidos Asn-Al-Z, em que Al representa qualquer aminoácido excepto Pro e Z representa Ser ou Tre. Nesta sequência, Asn providencia um grupo amino de cadeia lateral para a ligação covalente de hidratos de carbono. Esse sítio pode ser eliminado substituindo outro aminoácido por Asn ou pelo resíduo Z, eliminando Asn ou Z ou inserindo um aminoácido diferente de Z entre Al e Z ou qualquer outro aminoácido diferente de Asn entre Asn e Al. Os derivados do receptor de FTC-beta podem também ser obtidos por mutações do receptor de FTC-beta ou das suas subunidades. Os análogos bioequivalentes das proteínas do receptor de FTC-beta podem ser ~~construídos~~, por exemplo, fazendo várias substituições dos resíduos ou das sequências ou eliminando resíduos

terminais ou internos ou sequências não necessárias para a actividade biológica.

Outros análogos incluem a proteína de R FTC-beta II:Fc ou os seus fragmentos activos sob o ponto de vista biológico, cujas sequências diferem das SEQ ID N.ºs. 2 ou 4 por uma ou mais substituições conservadoras de aminoácidos ou por uma ou mais substituições não conservadoras de aminoácidos ou por eliminações ou inserções que não vão abolir a actividade biológica da proteína isolada. As substituições conservadoras incluem normalmente a substituição de um aminoácido por outro com características semelhantes, tais como, substituições dentro dos seguintes grupos: valina, alanina e glicina; leucina e isoleucina; ácido aspártico e ácido glutâmico; asparagina e glutamina; serina e trionina; lisina e arginina; e fenilalanina e tirosina. Os aminoácidos hidrofóbicos não polares incluem alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptofano e metionina. Os aminoácidos neutros polares incluem glicina, serina, trionina, cisteína, tirosina, asparagina e glutamina. Os aminoácidos carregados positivamente (básicos) incluem arginina, lisina e histidina. Os aminoácidos carregados negativamente (ácidos) incluem ácido aspártico e ácido glutâmico. Outras substituições conservadoras são fáceis de se fazer pelos especialistas na matéria. Por exemplo, para o aminoácido alanina, uma substituição conservadora pode ser feita em qualquer de D-alanina, glicina, beta-alanina, L-cisteína e D-cisteína. Para a lisina, uma substituição pode ser qualquer uma de O-lisina, arginina, D-arginina, homoc-arginina, metionina, D-metionina, ornitina ou D-crnitina.

Geralmente, as substituições que se pode esperar que induzam alterações nas propriedades funcionais dos

polipéptidos isolados são aquelas em que: (i) um resíduo polar, por exemplo, serina ou trionina, está substituído por um resíduo hidrofóbico, por exemplo, leucina, isoleucina, fenilalanina ou alanina; (ii) um resíduo de cisteína está substituído por qualquer outro resíduo; (iii) um resíduo com uma cadeia lateral electropositiva, por exemplo, lisina, arginina ou histidina, está substituído por um resíduo com uma cadeia lateral electronegativa, por exemplo, ácido glutâmico ou ácido aspártico; ou (iv) um resíduo com uma cadeia lateral volumosa, por exemplo, fenilalanina, está substituído por outro que não tenha cadeia lateral, por exemplo, glicina.

Também se descrevem moléculas isoladas que são: variantes alélicas, mutantes naturais, mutantes induzidos, proteínas codificadas pelo ADN que hibrida em condições de alta ou baixa severidade com um ácido nucleico que codifica um polipéptido, tal como, as SEQ ID N°s. 8 ou 9 e polipéptidos que se ligam especificamente aos péptidos por meio de anti-soros, especialmente por anti-soros a um sítio activo ou a um sítio de ligação. Todas as variantes aqui descritas é espectável que: (i) retenham a função biológica da proteína original.

V. Utilizações

A presente invenção tem por objecto composições e utilizações de composições para serem administradas a um indivíduo com uma condição médica particular, numa quantidade suficiente de proteína de fusão do receptor de FTC-beta, tal como, R FSC-beta II:Fc, para reduzir a actividade de FTC-beta no indivíduo. A presente invenção ainda tem por objecto composições e utilizações das composições para libertarem R FTC-beta II:Fc num sítio, em

que FTC-beta não está em excesssc, tal como, em estados de doença caracterizados por fibroproliferação e imunossupressão, tal como, os estados associados a doenças infecciosas.

Embora não pretendendo estar ligado a qualquer teoria em particular, parece que R FTC-beta II:Fc regula a actividade de FTC-beta competindo com FTC-beta por meio de receptores da superfície das células. Crê-se ainda que inactiva FTC-beta por meio da sua eliminação de um conjunto livre de FTC-beta disponível para interagir com os receptores da superfície das células. Consoante as propriedades farmacológicas de clearance, o complexo de R FTC-beta II:Fc/FTC-beta é retirado do sítio de FTC-beta. Esta acção de complexação com um excesso de FTC-beta reduz a quantidade de FTC-beta livre. Com menos FTC-beta disponível para complexar com os receptores das células, a fibroproliferação induzida por FTC-beta diminui, resultando na estase do estado de doença.

A administração das proteínas da presente invenção ou dos fragmentos da presente invenção pode ser feita em distúrbios fibroproliferativos. Tal como se mencionou antes, os modelos de glomerulonefrite em animais mostraram bons resultados com anticorpos anti-FTC-beta a bloquear o excesso de FTC-beta. Estes anticorpos são difíceis de libertar porque têm um elevado peso molecular e podem implicar severas reacções alérgicas quando derivam de outras espécies. Assim, seria preferível administrar uma proteína natural ou um seu análogo próximo com um peso molecular mais baixo, tal como, R FTC-beta II:Fc, no caso da glomerulonefrite. Os distúrbios dos rins associados com um excesso de FTC-beta incluem, mas não se limitam, a glomerulonefrite mesangial proliferativa, glomerulonefrite crescêntrica, nefropatia diabética, fibrose renal intersti-

cial, fibrose renal em pacientes que foram transplantados e receberam ciclosporina e nefropatia associada com VIH. Estas condições estão associadas com a sobre-produção da formação de tecido fibroso, que a administração de R FTC-beta II:Fc deverá suprimir.

Dado que não é conhecido que o R FTC-beta II por si só tenha um efeito colateral de captura de R FTC-beta II:Fc, pode ser administrado com segurança durante ou no fim da cirurgia . de colocação da retina, que é a causa mais comum de vitreoretinopatia proliferativa (VRP) (Connor et al. (1989) J. Clin. Invest. 83: 1661-1666). Outra condição importante fibroproliferativa é a artrite reumatóide (AR), que está também associada com um excesso de produção de FTC-beta. Os dados indicam que o bloqueio de FTC-beta em qualquer momento no desenvolvimento de estados crónicos de AR, pode ajudar a parar a deterioração progressiva das articulações e dos ossos. Por esta razão, as fusões da presente invenção podem ser administradas a pacientes com dores precoces das articulações e a pacientes com dores prolongadas de articulações e articulações deterioradas. A teoria actual é que a deterioração das articulações na AR é devida a uma sobre-produção de FTC-beta. O excesso de FTC-beta tem sido medido nas articulações após ensaios em animais que foram injectados com paredes de células estreptocócicas cuja presença se acredita que cause a artrite reumatóide (AR). Dado que o anticorpo anti-FTC-beta bloqueia as alterações artríticas neste modelo, crê-se que as fusões da presente invenção podem também ter um efeito positivo. Outras condições associadas com um excesso do nível de FTC-beta incluem a fibrose pulmonar idiopática e a mielofibrose. Para complexar com o excesso de FTC-beta e para diminuir o desenvolvimento do excesso de tecido

fibroso, as proteínas da presente invenção podem ser administradas nestas condições.

As proteínas da presente invenção podem ser utilizadas para tratar distúrbios vasculares do colagénio que estão associados com a sobre-produção de FTC-beta. Acredita-se hoje em dia que há uma sobre-produção de FTC-beta nos distúrbios vasculares do colagénio, tal como, na esclerose sistémica progressiva (ESP), polimiosite, escleroderma, dermatomiosite, fascite eosinofílica e morfea. Os distúrbios vasculares do colagénio podem também estar associados com a ocorrência do síndrome de Raynaud. Entre outros efeitos, a sobre-produção de FTC-beta pode estar também envolvida na fibrose pulmonar intersticial e no distúrbio dos pulmões no último estado, que está associado com distúrbios auto-imunes, tais como, o lúpus eritematoso sistémico (LES) e escleroderma (Deguchi, (1992) Ann. Rheum. Dis. 51: 362-65); ou podem ser causados por contactos com químicos, alergias ao pó e febre dos fenos. Uma quantidade efectiva sob o ponto de vista terapêutico das proteínas da presente invenção pode ser administrada para neutralizar a actividade biológica de FTC-beta que, por sua vez, irá prevenir fibrose não desejada.

As proteínas da presente invenção podem também ser utilizadas na prevenção da sobre-produção de escaras em pacientes que são conhecidos por formarem colóides ou escaras hipertróficas. Por exemplo, pode-se administrar R FTC-beta II:Fc para prevenir escaras ou a produção de escaras durante a cura de feridas em vários tipos de feridas, incluindo incisões cirúrgicas e lacerações traumáticas. A fusão de R FTC-beta III:Fc pode ser aplicada a feridas da pele antes que elas fechem para ajudar a que saiam antes de formar escaras. As proteínas da presente

invenção podem ser colocadas em feridas cirúrgicas abdominais para prevenir a formação de adesões que ocorrem também muito vulgarmente depois desse tipo de cirurgia. A presente invenção permite uma administração local de fusão suficiente para complexar com a sobre-produção de FTC-beta e prevenir a sobre-produção de processos de cura.

O excesso de FTC-beta também tem sido referido em polipose nasal, uma condição caracterizada por pólipos múltiplos (Ohno et al. (1992) J. Clin. Invest. 89: 1662-68). As proteínas de fusão podem ajudar a baixar os níveis de FTC-beta e diminuir a hiperproliferação que resulta em pólipos. Por exemplo, pode-se administrar R FTC-beta II:Fc após uma cirurgia aos pólipos para prevenir a sobre-produção de escaras e a recorrência de pólipos e pode ser administrada para inibir a formação de pólipos no intestino.

As proteínas da presente invenção podem também ser administradas no seguimento de angioplastia coronária, colocando-as preferencialmente ao longo do interior das artérias afectadas. De acordo com Karas et al., ((1991) Clin. Cardiol. 14: 791-801) a restenose ou a formação de escaras e o fecho das artérias no seguimento de angioplastia coronária é visto em aproximadamente um terço dos pacientes operados. Dado que a rede fibrosa que, em última análise, se desenvolve numa escara normalmente acumula-se rapidamente, a administração precoce, por exemplo, de R FTC-beta II:Fc irá reduzir o excesso de FTC-beta nesta área e diminuir a proliferação excessiva de tecido conjuntivo e a restenose.

Também se tem observado um excesso de FTC-beta em fibrose cardíaca após enfarte e na vasculopatia hiperten-

siva. Para ajudar numa cura apropriada, sem excesso de escaras ou de formação de tecido fibroso, pode-se administrar nestas condições as proteínas da presente invenção. Também tem sido observado o excesso de FTC-beta nos tecidos de pacientes que recebem terapia de radiação. Esse tecido é caracterizado pelo desenvolvimento excessivo de tecido conjuntivo, espessamento epitelial e oclusão dos vasos sanguíneos associadas com um sobrecrecimento das células endoteliais. A administração de R FTC-beta II:Fc irá complexar com o excesso de FTC-beta e irá contribuir para a cura da ferida sem fibrose excessiva.

VI. Formulação, Administração e Dosagem

A formulação, o processo de administração e a dosagem das proteínas da presente invenção, irá depender do distúrbio a ser tratado e da história clínica do paciente. Estes factores podem determinar-se facilmente durante a terapia. Os pacientes apropriados com condições causadas por um excesso de FTC-beta podem ser identificados por ensaios laboratoriais, história clínica e verificações físicas. O excesso de FTC-beta pode ser determinado directamente ou por imuno-ensaio do soro dos pacientes ou de um tecido afectado. O excesso de FTC-beta pode também ser determinado por bioensaios, tal como, o ensaio de proliferação de células descrito em Kekow et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 8321-25. O excesso de FTC-beta pode também ser determinado indirectamente medindo o nível de ARNm de FTC-beta (por exemplo, na reacção em cadeia de polimerase de Kekow et al.).

A história clínica pode revelar factos que suportam um diagnóstico de distúrbio fibroproliferativo, distúrbio vascular do colagénio, imunossupressão ou um potencial para

uma cicatrização problemática as feridas, tal como, nas adesões peritoniais que se seguem à cirurgia ou restenose de vasos sanguíneos após angioplastia coronária. As condições que estão identificadas como estando associadas com níveis elevados de FTC-beta e/ou proliferação de tecido fibroso, são consideradas como causadoras do excesso de FIC-beta. Os pacientes podem ter um largo espectro de indicações físicas, que são indicativas destes distúrbios. Têm-se utilizado biopsias da pele para analisar FTC-beta em pacientes com esclerose sistêmica. Nas artrites verificam-se inchaços e articulações quentes. De acordo com as utilizações das composições no processo da presente invenção, a formulação compreende as proteínas da presente invenção sob uma forma administrável. As utilizações das composições no processo da presente invenção providenciam formulações das proteínas da presente invenção sob modos que são facilmente evidentes para os especialistas nesta técnica. Preferencialmente, as proteínas da presente invenção estão dissolvidas em veículos compatíveis sob o ponto de vista fisiológico.

Os veículos compatíveis sob o ponto de vista fisiológico para as proteínas da presente invenção incluem soluções intravenosas, tais como, soluções salinas normais, albumina do soro, dextrose a 5 %, preparações de plasma, soluções contendo outras proteínas e soluções de TPN. O veículo preferido para administração parentérica é uma solução aquosa isotônica, esterilizada, tal como, uma solução salina ou dextrose a 5 %. Ainda mais preferido, é uma solução salina normal com albumina de soro humano. Para utilização das proteínas da presente invenção no reforço da resposta imunitária a vacinas, elas podem ser misturadas com uma formulação de vacina.

Consoante o modo de administração, as proteínas da presente invenção podem estar sob a forma de preparações líquidas ou em dosagens semi-sólidas, tais como, por exemplo, líquidos, suspensões ou similares. Alternativamente, pode colocar-se uma solução num implante, tal como, uma bomba osmótica, para a libertação lenta durante um período de tempo prolongado. Alternativamente, as proteínas da presente invenção podem ser dadas em formulações de veículos de libertação sustentada, tais como, veículos poliméricos semipermeáveis sob a forma de supositórios ou microcápsulas. Ver, por exemplo, a patente de invenção norte-americana U.S. 3.773.919 para matrizes microcapsulares de libertação sustentada incluindo polilactídios; Sidmon et al., Biopolymers 22 (1), 547-556 (1983) para copolímeros de ácido L-glutâmico e L-glutamato de gama-etilo; Langer et al., J. Biomed. Res. 15, 167-277 (1981) para poli-(2-hidroxietilmetacrilato) ou similares.

O modo de administração liberta proteínas da presente invenção em indivíduos de uma forma segura e eficaz sob o ponto de vista fisiológico. As proteínas da presente invenção podem ser dadas por vias de administração intraocular, intranasal, subcutânea, intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitonal, intra-articular, entérica ou outras vias de administração convencionais. Num enquadramento preferido, as proteínas da presente invenção são administradas localmente nos sítios do tecido afectado por meio de bolus de injeção ou de perfusão. Por exemplo, para VRP, o modo de administração preferido é uma única injeção intraocular. A administração local é também preferida nas feridas peritoniais para evitar a formação de adesões e noutras feridas para encorajar a cicatrização sem colóides ou escaras visíveis. Para a polipose nasal, preferem-se gotas nasais. As administrações locais e

sistêmicas são igualmente preferidas em fibrose do pulmão (injecção parentérica ou aerossol nasal ou gotas). A artrite reumatóide (AR) pode ser tratada por administração intra-articular ou sistémica.

A administração sistémica é o modo de administração preferido na glomerulonefrite e em distúrbios da pele muito difusos (tais como, esclerose sistémica progressiva, fascite difusa e morfea generalizada). A administração sistémica também é preferível quando se utilizam as proteínas da presente invenção para reforçar a resposta a vacinas, sendo as proteínas da presente invenção administradas com a vacina por injecção subcutânea, intramuscular ou intradérmica.

A dose de proteínas da presente invenção a ser administrada, pode ser facilmente determinada pelos especialistas nesta técnica, com base nos sintomas usuais dos pacientes discutidos antes. A dosagem de proteínas da presente invenção a ser dadas numa injecção é preferível que esteja entre 20 ng e 300 mg. A injecção em bolus pode ser repetida durante vários dias ou as proteínas da presente invenção podem ser infundidas de uma forma contínua. Se são dadas sob a forma de infusão intravenosa, a quantidade de proteínas da presente invenção a ser infundida, ao longo de um período de 24 horas, é de cerca de 1 mg até cerca de 100 mg.

A quantidade de proteínas da presente invenção a administrar pode ser determinada mantendo a concentração de FTC-beta ao tecido local a um nível sub-normal ou a cerca de 1-1.000 μ g/mL.

Preferencialmente, as proteínas da presente invenção aplicam-se topicamente, injectadas no sítio do problema ou injectadas intravenosamente. Mais preferencialmente, as proteínas da presente invenção são administradas por injeção em bolus no sítio em que ~~FTC-beta~~ tem de ser controlado. For Injeção intravenosa, as proteínas da presente invenção devem ser administradas a ~~uma~~ taxa tal que mantenham uma concentração no soro em circulação suficiente para reduzir o excesso de FTC-beta. Preferencialmente, o paciente começa com uma dose de proteínas da presente invenção relativamente baixa. A dose baixa deve continuar, preferencialmente, até que a fase aguda do paciente tenha melhorado ou tenha tido melhoras adequadas, conforme indicado por verificações físicas apropriadas e resultados laboratoriais. Essa melhoria pode ser evidente num prazo de duas a três semanas. Na ausência de melhorias significativas, a dose de proteínas da presente invenção deve ser aumentada.

Os processos de terapia de genes de administração de moléculas da presente invenção estão também englobados no âmbito da presente invenção. O termo "transformação" refere-se a qualquer modificação genética das células e inclui tanto a "transfecção" como a "transdução". Tal como se utiliza aqui, "transfecção de células" refere-se à aquisição por uma célula, de um novo material genético por incorporação de mais ADN. Assim, a transfecção refere-se à inserção de ácido nucleico (por exemplo, ADN) numa célula utilizando processos físicos ou químicos. As várias técnicas de transfecção são conhecidas pelos especialistas na matéria. Pelo contrário, a "trans-dução de células" refere-se ao processo de transferência de ~~ácido~~ nucleico ~~para dentro de uma~~ célula, utilizando um vírus de ADN ou de ARN. Pode-se incorporar uma ou mais sequências isoladas de

polinucleótidos, codificando uma ou mais proteínas de R FTC-beta II:Fc contidas dentro do vírus, no cromossoma da célula transduzida. Alternativamente, a célula é transduzida com um vírus mas a célula não terá incorporado o polinucleótido isolado nos seus cromossomas, mas será capaz de expressar extracromossomicamente o interferão dentro da célula. De acordo com um enquadramento, as células são transformadas (isto é, geneticamente modificadas) *ex vivo*. As células são isoladas de um mamífero (preferencialmente, um ser humano) e transformadas (isto é, transduzidas ou transfectadas *in vitro*) com um vector contendo um polinucleótido isolado, tal como, um nucleótido de R FTC-beta II:Fc ligado operacionalmente a uma ou mais sequências de controlo de expressão para expressar uma proteína recombinante segregada. As células são então administradas a um receptor mamífero para libertação da proteína *in situ*. Preferencialmente, o receptor mamífero é um ser humano e as células a serem modificadas são células autólogas, isto é, as células são isoladas do receptor mamífero. O isolamento e a cultura das células *in vitro*, já foram referenciados. De acordo com outro enquadramento, as células são transformadas ou de alguma forma modificadas geneticamente *in vivo*. As células do receptor mamífero (preferencialmente, um ser humano), são transformadas (isto é, transduzidas ou transfectadas) *in vivo* com um vector, contendo o polinucleótido isolado similar e a proteína é libertada *in situ*.

Os polinucleótidos isolados que codificam a proteína de fusão são introduzidos na célula *ex vivo* ou *in vivo* por processos genéticos de transferência, tais como, transfecção ou transdução, para originar uma célula geneticamente modificada. Os vários vectores de expressão (isto é, veículos para facilitar a libertação do

polinucleótido isolado na célula alvo) são conhecidos pelos especialistas nesta técnica. Normalmente, o material introduzido inclui um polinucleótido isolado da presente invenção em conjunto com um promotor para controlar a transcrição. Se a libertação do polinucleótido de R LTC-Beta II:Fc se destina a tecidos específicos, pode ser desejável atingir a expressão deste gene. Por exemplo, há muitos promotores descritos na literatura que são apenas expressos nalguns tecidos. Assim, seleccionando o promotor apropriado (constitutivo versus indutível; forte versus fraco), é possível controlar tanto a existência como o nível de expressão de uma proteína de fusão na célula geneticamente modificada. Se o gene que codifica proteína de fusão está sob o controlo de um promotor indutível, a libertação da proteína *in situ* é activada pela exposição da célula geneticamente modificada, *in situ*, a condições que permitam a transcrição da proteína, por exemplo, por injeção dos indutores específicos dos promotores indutíveis que controlam a transcrição do agente. Recentemente, desenvolveram-se sistemas muito sofisticados que permitem uma regulação precisa da expressão de genes por meio de moléculas pequenas administradas exogenamente. Esses sistemas incluem o sistema de FK506/rapamicina (Rivera et al., Nature Medicine 2 (9): 1028-1032, 1996); o sistema de tetraciclina (Gossen et al., Science 268: 1766-1768, 1995), 1995), o sistema de ecdisona (No et al., Proc. Nat. Acad. Sci., USA 93: 3346-3351, 1996) e o sistema de progesterona (Wang et al., Nature Biotechnology 15: 239-243, 1997).

De acordo com isto, a quantidade de proteína de fusão que é libertada *in situ* é regulada pelo controlo de factores, tais como, (1) a natureza do promotor utilizado para dirigir a transcrição do polinucleótido inserido (isto

é, se o promotor é constitutivo ou indutível, forte ou fraco ou se se trata de tecido específico); (2) o número de cópias do polinucleótido exógeno que está inserido na célula; (3) o número de células transduzidas/transfectadas que são administradas (por exemplo, implantadas, feitas no paciente); (4) a ~~dimensão~~ do implante (por exemplo, enxerto ou sistema de expressão encapsulado) em processos *ex vivo*; (5) um número de implantes em processos *ex vivo*; (6) o número de células transduzidas/transfectadas por administração *in vivo*; (7) o tempo que dura a que as células transduzidas/transfectadas ou os implantes sejam deixados no lugar tanto em processos *ex vivo* como *in vivo*; e (8) a taxa de produção da proteína de fusão pela célula geneticamente modificada.

Os vectores de expressão compatíveis com as células hospedeiras de mamíferos para serem utilizadas na terapia de genes incluem, por exemplo, plasmídeos, vectores retrovirais de aves, de murinos e de seres humanos, vectores de adenovírus; vectores virais de herpes; parvovírus; e poxvírus não replicativos. Em particular, a replicação recombinante defeituosa de vírus pode ser gerada em linhas de células em pacote, que produzem apenas vírus com replicação defeituosa. Ver, *Current Protocols in Molecular Biology: Sections 9, 10-9, 14* (Ausubel et al., eds.), Greene Publishing Associates, 1989. Vectores virais específicos para serem utilizados nos sistemas de transferência de genes estão bem estabelecidos, Ver, por exemplo, Madzak et al., *J. Gen. Virol.*, 73: 1533-36 (1992) (papovavírus SV40); Berkner et al., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158: 39-61 (1992) (adenovírus); Moss et al., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158: 25-38 (1992) (vírus de varicela); Muzyczka, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158: 97-123 (1992) (vírus adeno-associados); Margulskes, *Curr.*

Top. Microbiol. Immunol., 158: 67-93 (1992) (vírus do herpes simplex (VHS) e vírus de Epstein-Barr (VHB)); Miller, Curr. Sop. Microbiol. Immunol., 158: 1-24 (1992) (retrovírus); Brandyopadhyay et al., Mol. Cell. Biol., 4: 749-754 (1984) (retrovírus); Miller et al., Nature, 357: 455-450 (1992) (retrovírus); Anderson, Science, 256: 808-813 (1992) (retrovírus). 3s vectores preferidos são os vírus de ADN que incluem adenovírus (preferencialmente, vectores à base de Ad-2 ou Ad-5), vírus do herpes (preferencialmente, vectores à base do vírus do herpes simplex) e parvovírus (preferencialmente, vectores à base de parvovírus "defeituosos" ou não autónomos, mais preferencialmente, vectores à base de vírus adeno-associados, mais preferencialmente, vectores à base de VAA-2). Ver, por exemplo, Ali et al., Gene Therapy 1: 36384, 1994; patentes de invenção norte-americanas U.S. 4.797.368 e 5.399.346 e discussão que se segue.

Os vírus adeno-associados (VAA) também têm sido utilizados como vectores para a terapia somática de genes. O VAA é um vírus pequeno, com ADN de hélice simples (HS), com uma organização genómica simples (4,7 kb), que o torna um substrato ideal para a engenharia genética. Os dois quadros de leitura aberta codificam uma série de polipéptidos *rep* e *cap*. Os polipéptidos *rep* (*rep78*, *rep68*, *rep62* e *rep40*) estão envolvidos na replicação, resgate e integração do genoma de VAA. As proteínas *cap* (VP1, VP2 e VP3) provêm da cápside do virião. A flanquear os quadros de leitura aberta de *rep* e *cap* nas extremidades 5' e 3' estão 145 repetições de pb de terminal invertido (RTIs), as primeiras 125 pb de cada um são capazes de formar estruturas em duplex em forma de X ou de T. Da maior importância para o desenvolvimento dos vectores de VAA, os domínios completos de *rep* e *cap* podem ser excisados e

substituídos com um transgene terapêutico ou repórter. Ver, B. J. Carter, in Handbook of Parvoviruses, ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155-168 (1990). Tem sido demonstrado que as RTIs representam a sequência mínima necessária para a replicação, resgate, empacotamento e integração do genoma de VAA. O ciclo de vida de VAA é bifásico, composto por episódios latentes e líticos. Durante uma infecção latente, os viriões de VAA entram numa célula sob a forma de um ADNhs encapsidado e, pouco tempo depois, são libertados para o núcleo onde o ADN de VAA se integra estavelmente num cromossoma hospedeiro sem a necessidade aparente da divisão das células hospedeiras. Na ausência de um vírus auxiliar, o genoma de VAA integrado permanece latente mas capaz de ser activado e resgatado. A fase lítica do ciclo de vida começa quando uma célula que comporta um provírus de VAA é estimulada com uma infecção secundária por um vírus do herpes ou um adenovírus, que codificam funções mais auxiliares que são necessárias para que o VAA ajude na sua excisão da cromatina hospedeira (B. J. Carter, supra). O ACN de estrutura helicoidal simples (hs) da infecção parental expande-se para os ADNs da forma de replicação (FR) em duplex de uma maneira dependente de rep. Os genomas de VAA resgatados são empilhados em cápsides de proteínas pré-formadas (simetria icosaédrica com aproximadamente com 20 nm de diâmetro) e libertados como viriões infecciosos, que comportam empilhados quer genomas de ADNhs + ou -, seguindo a lise das células. Os VAA têm um potencial significativo na terapia dos genes. As partículas virais são muito estáveis e os VAAs recombinantes (VAAR) têm características "semelhantes a fármacos", em que VAAR pode ser purificado por aglomeração ou por associação em gradiente. São estáveis ao calor e podem ser liofilizados para formarem um pó e serem re-hidratados com uma actividade completa. O seu ADN integra-se estavelmente nos

cromossomas hospedeiros para uma expressão a longo prazo. A sua gama de hospedeiros é vasta e o VAA não causa doenças conhecidas de modo que os vectores recombinantes não são tóxicos. Recentemente, o baculovirus recombinante, derivado primeiramente do baculovirus, vírus de poli-hedrose de múltiplos núcleos de *Autographa californica* (~~VPMORC~~), tem mostrado ser capaz de transduzir células de mamífero *in vitro*. (Ver, Hofmann, C., Sandig, V., Jennings, G., Rudolph, M., Schlag, P., and Strauss, M. (1995), "Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 10099-10103; Boyce, F.M. and Bucher, N.L.R. (1996) "Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 2348-2352). Os baculovirus recombinantes têm várias vantagens potenciais para a terapia de genes. Estas vantagens incluem uma grande capacidade de inserção de ADN, uma falta de uma resposta imunitária pré-existente em seres humanos, a falta de replicação em mamíferos, uma falta de toxicidade para os mamíferos, uma falta de expressão de genes virais em células de mamíferos devido à especificidade para insectos dos promotores transcrpcionais do baculovirus e, potencialmente, uma falta de resposta citotóxica dos linfócitos T dirigida contra estas proteínas virais.

A presente invenção será ilustrada pelos exemplos não limitativos que se seguem.

Exemplo 1: Construção e Expressão da Proteína de Fusão Solúvel de R FTC-beta:Fc de Coelho

Isola-se um clone de comprimento completo (MIS-3f11) codificando o receptor de FTC-beta ("FTC β ") do tipo II de coelho, isolado de uma biblioteca de ADNc de ovário de

coelho conforme descrito (di Clemente et al., *Most. Endocrinol.* 8: 1006 [1994]). O gene de fusão de R FTC-beta II:Fc recombinante de coelho, consistindo no domínio extracelular do receptor de tipo II de coelho (nucleótidos 832-1.311 da SEQ ID N°. 2) fundido com a porção Fc de IgG1 humana (nucleótidos 1.312-1.995 da SEQ ID N°. 2), constrói-se como se segue:

Fragmento i) Um fragmento de 479 pb, contendo o domínio extracelular do receptor de FTC-beta de tipo II de coelho, é amplificado a partir do clone MIS_3f11, por RCP convencional, utilizando os iniciadores de oligonucleótidos apropriados (SEQ ID N°. 5 e SEQ ID N°. 6). Estes oligonucleótidos conferem sítios de enzimas de restrição de NotI e SalI de flanco no produto resultante de RCP, que é em seguida digerido com estas duas enzimas de restrição.

Fragmento 2) pSAB132 (Miller et al., *J. Exp. Med.* 178: 211 [1993]) é digerido com a enzima de restrição NotI e os grupos fosfato terminais são eliminados por digestão com fosfatase intestinal alcalina de bezerro.

Fragmento 3) Constrói-se pSAB144. Isola-se a região charneira contendo a região constante da cadeia pesada (L) da IgG1 humana, as sequências C_H2 e C_H3, com iniciadores específicos da cadeia P por amplificação por RCP do ADN a partir do ARN das células COS-7 que ~~estão~~ sido transfectadas com plasmido contendo inserções genômicas de 3 pares de quilobases (Miller et al., *J. Exp. Med.* 178: 211 [1993]). Os iniciadores específicos das cadeias pesadas são concebidos de tal maneira que resultem as sequências de C_H2 e C_H3 de IgG1 amplificadas por RCP, flanqueadas por sítios de

reconhecimento de enzimas de restrição SalI em 5' e NotI em 3'. pSAB144 é digerido com as enzimas de restrição NotI e SalI para libertar um fragmento de 700 pares de bases contendo a porção Fc da IgG1 humana.

Os fragmentos 1, 2 e 3 são ligados e transformados em bactérias capazes de transformação. Recuperam-se os plasmídeos a partir dos transformantes e analisa-se por digestões de enzima de restrição e electroforese em gel para saber a orientação correcta dos fragmentos unidos. Esta estrutura compreende o gene de fusão recombinante de R FTC-beta II:Fc de coelho e toda a sequência de codificação é confirmada pela sequenciação do ADN (SEQ ID N°s. 1 e 2).

O gene de fusão recombinante de R FTC-beta II:Fc de coelho é transfectado em células de ovário de hamster chinês (OHC) por electroporação a 280 volts. Depois da transfecção inicial, seleccionam-se as células para a expressão de di-hidrofolato-redutase (DHFR) por subculturas em meio selectivo sem glicina, hipoxantina e timidina. As colónias resultantes são então transferidas para placas com 24 orifícios e analisadas quanto à expressão dos genes de fusão de R FTC-beta :Fc de coelho. As culturas com a expressão mais elevada são submetidas a amplificação por exposição a quantidades crescentes de metotrexato. As células capazes de crescer em metotrexato 25 nM são clonados por diluição limitativa em placas com 96 orifícios. Os clones com a expressão mais alta são transferidos para uma cultura em suspensão e os clones que expressam os níveis mais elevados de R FTC-beta II:Fc são seleccionados para produzirem R FTC-beta II:Fc.

Os especialistas na técnica podem construir e expressar um gene recombinante similar contendo o domínio extracelular do receptor de FTC-beta de tipo II humano isolando o gene receptor de FTC-beta de tipo III humano a partir de ADNc de ovário humano disponível comercialmente (Clontech) e substituindo o iniciador de oligonucleótidos descrito na SEQ ID N°. 7 pelo iniciador de oligonucleótidos descrito na SEQ ID N°. 6. A sequência de ADN do gene de fusão humano de R FTC-beta :Fc está descrita (SEQID N°. 3 e SEQ ID N°. 4).

Exemplo 2: A Proteína de Fusão de R FTC-beta : Fc Liga-se a FTC-beta In Vitro

O gene de fusão de R FTC-beta :Fc recombinante, de coelho (SEQ ID N°. 2 contida dentro da SEQ ID N°. 1 do vector de expressão) é transfectado em células COS por electroporação a 280 volts. As células transfectadas crescem em DMEM, complementado com soro bovino fetal a 10 %. Passados 5 dias, as células são retiradas da cultura por centrifugação e avalia-se o sobrenadante quanto à expressão de R FTC-beta II:Fc recombinante de coelho, por electroforese em gel de SDS/poliacrilamida (SDS/PAGE). O R FTC-beta II:Fc presente no sobrenadante da cultura de células é analisado quanto à sua capacidade para ligar FTC-beta. [¹²⁵I]-FTC-beta (NEN Life Science Products), faz-se a sua incubação durante 2,5 horas com um meio de cultura de células condicionado contendo R FTC-beta II:Fc de coelho ou controlo de IgG e proteína A-sefarose que se liga à porção Fc de IgG. Os complexos de proteína A:Fc resultantes são recuperados por centrifugação, lavados em solução salina tamponada com fosfato e analisados por SDS/PAGE e autoradiografados. Com FTC-beta II:Fc imunoprecipita [¹²⁵I]-FTC-beta mas o mesmo não acontece com o controlo de IgG.

Exemplo 3: Ensaio de Proliferação de Células de Pulmão de Marta

A proliferação de células epiteliais de pulmão de marta (CCL64) é inibida por FTC-beta 1. Assim, pode-se verificar a capacidade de R FTC-beta :Fc para bloquear o efeito anti-proliferativo de FTC-beta 1. As células CCL64 são mantidas em MEM complementado com 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e soro bovino fetal a 10 %. Para o ensaio, faz-se a incubação de uma série de diluições de R FTC-beta :Fc com 0,1 ng/mL de FTC-beta 1, durante 1 hora, num meio de ensaio (MEM complementado com 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e soro bovino fetal a 10 %) numa placa microtituladora de cultura de tecido de 95 orifícios. As células CCL64 são novamente suspensas em meio de ensaio e adiciona-se à placa de ensaio, numa concentração de 4.000 células por cavidade. As células são incubadas a 37 °C, durante 72 horas e submetidas a impulsos com [³H]-timidina (70-86 Ci/mole) durante mais 4 horas. A síntese de ADN, que reflecte a proliferação das células, é determinada medindo a incorporação de [³H]-timidina. Quando as células começam a proliferar apenas num meio, mede-se a quantidade de [³H]-timidina incorporada a 188.745 contagens por minuto (CPM). Quando FTC-beta 1 está incluído no meio, a proliferação fica inibida e mede-se a quantidade de [³H]-timidina incorporada a 49.088 contagens por minuto. A seguir, mostram-se os resultados quando se aumentam as quantidades de R FTC-beta :Fc ou IgG de controlo, que são adicionados ao meio:

Concen. µg/mL	R FTC-beta II:Fc (CPM)	IgG de Controlo (CPM)
10	181.933	53.619
5	179.461	55.097
2,5	178.770	54.443
1,25	168.920	51.443
0,62	150.106	56.683
0,31	138.613	52.415
0,16	75.112	52.830
0,08	63.841	61.894
0,04	49.929	54.398
0,02	57.685	42.993

A quantidade de R FTC-beta II:Fc necessária para inibir o efeito anti-proliferativo de 0,1 ng/mL de FTC-beta por equivalentes de 50 %, equivale a 0,5 µg/mL.

Exemplo 4: Modelo de Traumas em Vasos de Ratos

Utilizaram-se ratos Sprague-Dawley machos, pesando 400 g e com cerca de 3-4 meses de idade (Bantin & Kingman, Edwards, WA). Todos os processos cirúrgicos foram realizados com anestesia geral por injeção intraperitoneal de xilazina (2,2 mg/kg, AnaSed TM, Lloyd Laboratories, Shenandoah, IA) e cetamina (540 mg/kg, Ketaset TM, Aveco Co., Fort Dodge, IA). A artéria carótida comum esquerda foi exposta com um cateter de balão de 2F, introduzindo o cateter através da artéria carótida externa. A carótida comum esquerda distal e as artérias carótidas externas, foram expostas através de uma incisão na linha média do pescoço. Fez-se passar o cateter três vezes com um balão suficientemente distendido com uma solução salina para gerar uma ligeira resistência. Este processo produz uma

151 GTGGAGTATT TACGGTAAAC TGCCCACTTG GCAGTACATC AAGTGTATCA
201 TATGCCAAGT ACGCCCCCTA TTGACGTCAA TGACGGTAAA TGGCCCCGCT
251 GGCATTATGC CCACTACATG ACCTTATGCG ASTTTCTAC TTGGCAGTAC
301 ATCTACGTAT TAGTCATCGC TATTACCATG GTGATGCGGT TTTGGCAGTA
351 CATCAATGCG CGTGGATAGC GGTTTGACIC ACGGGGATTT CCAAGTCTCC
401 ACCCCATTGA CGTCAATGGG AGTTTGT TTTT GGCACCAAAA TCAACGGGAC
451 TTTCCAAAAT GTCGTAACAA CTCCGCCCCA TTTACGCAAA TGGGCGGTAG
501 GCGTGTACGG TGGGAGGTCT ATATAAGCAG AGCTCGTTTA GTGAACCGTC
551 AGATCGCCTG GAGACGCCAT CCACGCTGTT TTGACCTCCA TAGAAGACAC
601 CGGGACCGAT CCAGCCTCCG GACTCTAGAG GATCCGGTAC TCGAGGAACT
651 GAAAAACCAG AAAGTTAACT GGTAAGTTTA GTCTTTTTGT CTTTTATTTT
701 AGGTCCCGGA TCCGGTGGTG GTGCAAATCA AAGAACTGCT CCI'CAGTGGA
751 TGTTGCCTTT ACTTCTAGGC CTGTACGGAA GTGTTACTTC TGCTCTAAAA
801 GCTGGGGAAT TGTACCCGCG GCCGCTCTGC CATGGGTCGG GGGCTGCTCC
851 GGGGCTGTG GCCGCTGCAC CTCGTCTGTG GGACGCGCAT CGCCAGCACG
901 ACCCCGCCGC ACGTTCAGAA GTCGGTTAAT AACGACATGA TGGTCACGGA
951 CAACAATGGC GCCGTCAAGT TCCCACAACCT GTGCAAGTTT TGCGATGTGC
1001 GATCTTCCAC CTGTGACAAC CAGAAGTCCT GCATGAGCAA CTGCAGCATC
1051 ACGTCCATCT GTGAGAAGGC ACACGAAGTC TCGGTGGCCG TCTGGAGGAA
1101 GAACGATGAA AACATAACCC SGGAGACTGT GTGTCACGAC CCAAGCTCG
1151 CCTACCATGG ATTCCTTG TG GAAGATTCTG CCTCTCCAAA GTGTATCATG
1201 AAAGAAAAGA AGGTGTTTGG GGAGACTTTC TTCATGTGTT CCTGGAGCAC
1251 TGACGAGTGC AATGACCACA TCATCTTCTC TGAGGAATAC ACCACCAGCA
1301 GTCCGGATCT GGTCGACAAA ACTCACACAT GCCACCGTG CCCAGCACCT
1351 GAACTCCTGG GGGGACCGTC AGTCTTCTC TTTCCCCCAA AACCCAAGGA
1401 CACCCTCATG ATCTCCCGGA CCCCTGAGGT CACATGCGTG GTGGTGACG
1451 TGAGCCACGA AGACCCTGAG GTCAAGTTCA ACTGGTACGT GGACGGCGTG
1501 GAGGTGCATA ATGCCAAGAC AAAGCCGCGG GAGGAGCAGT ACAACAGCAC
1551 GTACCGTGTG GTCAGCGTCC TCACCGTCCT GCACCAGGAC TGGCTGAATG
1601 GAAAGGAGTA CAAGTCCAG GTCTCCAACA AAGCCCTCCC AGCCCCCATC
1651 GAGAAAACCA TTTTCAAGC CAAAGGGGAG CCCCCGAAAC CACAGGTGTA
1701 CACCCTGCCC CCATCCCGGG ATGAGCTGAC CAAAGAGCAG GTCAGCCTGA
1751 CCTGCCTGGT CAAAGGCTTC TATCCCAGCG ACATCGCCTT GGAGTGGGAG
1801 AGCAATGCGC AGCCGAGAGG CAACTACAAG ACCACGCCTC CCGTGTTGGA

distensão da própria. carótida, liga-se a carótida esquerda até à retirada do cateter e fecha-se a incisão.

Os tratamentos experimentais incluíram uma série de injeções intravenosas de 1 mL do receptor de FTC-beta do tipo II:Fc (SEQ ID N°. 8) em SBF dado em cada um dos dias após a operação a 5 mg/kg. Passados 14 dias desde a exposição do cateter de balão, anestesiaram-se todos os ratos e fixaram-se as artérias carótidas por perfusão, a uma pressão de 120 mm Hg com paraformaldeído a 1 % e glutaraldeído a 1,25 %, no seio de tampão de fosfato 0,1 M, a pH 7,4, por via de uma cânula grande colocada de forma retrógrada na aorta abdominal. Dez minutos antes da fixação, deu-se a estes animais uma injeção intravenosa de azul de Evans (0,3 mL em solução salina a 5 %). Passados 5 minutos da perfusão, as artérias carótidas comuns esquerda e direita foram repostas, incluindo o arco aórtico. Depois, estes vasos sanguíneos foram fixados por emersão no mesmo fixador que se utilizou para a perfusão.

Fez-se a análise de segmentos da artéria para pesquisar a presença ou a ausência de endotélio obtendo-se três fragmentos da artéria carótida esquerda exposta, corada de azul e embebendo-os em parafina para um seccionamento transversal, utilizando um micro-torno "Micron". Para medir as áreas mais íntimas, obtiveram-se fotonicrográficos de 3-4 secções de cada animal. Os fotomicrográficos foram digitalizados e analisados com um software de análise de imagens (NIH Image 1.55 for Macintosh). Mediram-se as áreas íntimas por determinação da área entre o lúmen e a lâmina elástica interna. Determinaram-se as áreas médias medindo a área entre a lâmina elástica interna e externa. A relação entre as áreas íntima/média foi calculada a partir destas medições.

Efeito de R FTC-beta II:Fc (SEQ ID N°. 8) na restenose no modelo de ratos.

Quadro 1: Área da íntima (mm²)

Tratamento	Área Média	Desv. Padrão	Erro Padrão
Controlo (n=4)	0,15	0,015	0,008
Experimental:	0,068	0,016	0,007
5 mg/kg/dose			
35 mg/kg por ciclo			
de terapia (n=5)			

Um teste T desemparelhado entre tratamentos, resultou num $p = 0,0001$ significativo sob o ponto de vista estatístico.

Quadro 2: Relação entre as Áreas Íntima/Média

Tratamento	Área Média	Desv. Padrão	Erro Padrão
Controlo (n=4)	0,706	0,03	0,015
Experimental:	0,360	0,137	0,061
5 mg/kg/dose			
35 mg/kg por ciclo			
de terapia (n=5)			

Um teste T desemparelhado entre tratamentos resultou num $p = 0,0018$ significativo sob o ponto de vista estatístico, indicando que o tratamento com a SEQ ID N°. 8 reduziu significativamente a formação da íntima relativamente à média, quando comparado com os grupos não tratados.

Exemplo 5: Modelo de Fibrose do Pulmão

Uma acumulação em excesso do colagénio no pulmão é a marca de fibrose no pulmão. A quantidade de colagénio no tecido depende da taxa de síntese de colagénio e da

degradação do colagénio e, em casos de fibrose, a taxa de síntese de colagénio predomina em relação à taxa de degradação de colagénio.

Compraram-se hamsters da raça Golden Syrain isentos de doenças respiratórias crónicas, pesando 120-130 g, à Charles River (Boston, MA) e alojaram-se em gaiolas de plástico, em grupos de 4, em instalações aprovadas pela American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care. Deixaram-se os animais aclimatarem-se durante uma semana às condições do laboratório antes de iniciar as experiências. Eles tiveram acesso a Rodent Laboratory Chow 5001 (Purina Mills. Inc., St. Louis, MO) e água *ad libitum* e estiveram alojados numa sala com ar filtrado e com um ciclo de luz/escuro de 12 horas/12 horas. Os hamsters foram distribuídos pelos grupos seguintes para os estudos bioquímicos e histopatológicos.

Grupo de Tratamento	Estudo	Estudo
	Bioquímico	Histopatológico
	(n)	(n)
Sol. Salina IT + Sol. Salina IP	10	§
Bleomicina IT + Sol. Salina IP	10	§
Bleomicina IT + Recep. de FTC-beta do tipo II:Fc	10	§
Sol. Salina IT + Recep. de FTC-beta do tipo II:Fc	10	§

Dissolve-se o sulfato de bleomicina em solução salina, isotónica, esterilizada, isenta de pirogénio, imediatamente antes da instilação intra-traqueal (IT). Sob o efeito de anestesia com pentobarbital (25-35 mg/kg, ip) os hamsters, no grupo apropriado, receberam bleomicina (0,4 unidades/kg/4 mL) ou um volume equivalente (4 mL/kg) de solução salina, isotónica, isenta de pirogénio, através de uma via

tians-oral. Administra-se o receptor de FTC-beta do tipo III:Fc por via intraperitoneal (ip) ou intra-traqueal, numa dose terapêutica para o hamster em grupos apropriados, de duas vezes por semana, durante 21-28 dias após a instalação. Depois, os animais de cada grupo foram sacrificados por meio de uma overdose de pentobarbital de sódio (100-125 mg/kg, ip) e os seus pulmões foram tratados para fazer estudos bioquímicos e histopatológicos.

1. Estudo Bioquímico

Os pulmões dos animais utilizados para os estudos bioquímicos, foram perfundidos *in situ* por via do ventrículo direito com uma solução salina, isotônica, arrefecida com gelo, para lavar o sangue do sistema vascular pulmonar através de uma abertura no ventrículo esquerdo. Os glóbulos do pulmão foram rapidamente dissecados, retirou-se-lhe todo o tecido não parenquimal, mergulhou-se em azoto líquido para uma congelação rápida e depois armazenou-se a -80 °C. Os pulmões congelados foram mais tarde descongelados e homogeneizados em KC 0,1 M, tampão de Tris 0,02 M (pH 7,6) com um homogeneizador Polytron. Armazenaram-se a -80 °C, várias aliquotas de 1 mL do produto homogeneizado até ao momento de se realizarem vários ensaios bioquímicos.

Quantificou-se o teor de hidroxiprolina do produto homogeneizado do pulmão como uma medida do teor de colagénio, pelas técnicas de Woessner, Arch. Biochem. Biophys. 93: 440-447 (1961) e peroxidação de lípidos pelo processo conforme descrito em Giri, et al., Biochem. Pharmacol, 54: 1205-1216 (1997).

2. Estudo Histopatológico

Anestesiaram-se os hamsters até ao nível da secção da batida cardíaca. Abriu-se o tórax, o coração foi desligado das suas bases e fez-se passar uma cânula na traqueia. Os pulmões e o coração foram retirados em bloco, pesados e colocados num banho de uma solução salina normal e instilou-se os pulmões com um fixador de glutaraldeído-paraformaldeído a 1 %, em tampão de cacodilato 0,12 M, a 400m Osm, a uma pressão de 30 cm de H₂O. Fixaram-se os pulmões por via desta pressão durante cerca de 2 horas e depois armazenaram-se num fixador com as traqueias ocluídas. Antes de se embeber, o pulmão é isolado do coração e de todo o tecido não pulmonar por dissecação cega e é retirado. Cortam-se os blocos de tecido de, pelo menos, duas fatias sagitais (espessura de 2-3 mm) da parte craniana direita, da cauda direita e dos lóbulos esquerdos do pulmão esquerdo de cada pulmão. Corta-se cada bloco com uma face de cerca de 1 cm². Desidrataram-se os blocos numa série graduada de etanol e embeberam-se em parafina. Cortam-se secções (espessura de 5 µm) dos blocos em parafina e coram-se com haematoxilina e eosina, para fazer as avaliações histológicas.

3. Análise e Interpretação dos Dados

Os valores para os diferentes determinantes bioquímicos nos pulmões de controlo e dos animais tratados estão expressos por mg de proteína do pulmão ou ADN. Contudo, deve notar-se que a expressão dos dados baseia-se por mg de uma proteína ou do ADN do pulmão, vai tender a introduzir um abaixamento artificial dos valores nos animais tratados. Este problema é atribuído à infiltração de leucócitos, presença de proteína do plasma residual nos

pulmões mesmo após perfusão e proliferação das células do tipo II e dos fibroblastos no estudo de longo prazo, nos pulmões de hamster tratados com bleomicina. Para evitar um abaixamento artificial dos valores, os dados serão expressos numa base por pulmão. Ver, Starcher et al., Am. Rev. Resp. Dis., 117:299-305 (1973) e Witschi, Essays Toxicol., 6: 125-191 (1975).

Os dados foram analisados em termos de valores médios com os seus desvios padrão e os erros padrão das médias. Irá aplicar-se o teste T de Student, as distribuições do qui quadrado, o coeficiente de correlação, a análise de variância (ANOVA) e o teste de comparação múltipla, para definir o significado das diferenças entre os grupos de controlo e de tratamento utilizando um pacote estatístico com base em computador (SAS/STAT Guide, 6ª Ed. Cary, N.C. pp. 183-260 (1985)).

Exemplo 6: Modelo de Glomerulonefrite

O efeito das proteínas da presente invenção é avaliado num modelo de glomerulonefrite. A glomerulonefrite experimental é induzida em ratos com uma única injeção de soro de nefrotixina da membrana de base anti-glomerular (SNT) derivado de coelhos. A lesão experimental é uma glomerulonefrite mesangial proliferativa e é caracterizada pela expansão da matriz mesangial e pela hiper celularidade. As células traumatizadas são expressas em mais ARNm de FTC-beta 1 e FTC-beta 1 que, por sua vez, estimula a síntese de dois proteoglicanos, biglicanos e decorina. De particular interesse, é o facto da nefrite reprodutível progredir através das escaras glomerulares e tubulointersticiais, até ao estado final da doença renal.

Primeiro, a glomerulonefrite é induzida em ratos por uma injeção intravenosa de soro de SNT. Em seguida, durante seis dias, tratam-se dois grupos de ratos com uma injeção intravenosa diária de solução salina (o grupo de controlo negativo) ou proteínas da presente invenção. No décimo dia, os animais são sacrificados e fazem-se lâminas dos rins, que são coradas periodicamente com soluções de ácido de Schiff para enfatizar as alterações patológicas. Os rins com controlo negativo têm uma glomerulonefrite completa com material fibroso, amorfo, vermelho rosado a preencher a maior parte dos glomérulos. Os rins de controlo positivo têm um modelo de coloração que é semelhante a um glomérulo normal. O rim que é tratado com proteínas da presente invenção também tem uma aparência normal, indicando que as proteínas da presente invenção bloqueiam a resposta devido a uma secreção da sobre-produção de FTC-beta.

A extensão do trauma glomerular pode ser quantificada realizando contagens das células glomerulares desde 30 glomérulos seleccionados aleatoriamente de animais normais e de animais nefríticos em cada grupo. Por volta do 10º dia, há mais células nos glomérulos resultantes dos ratos tratados com SNT. A função renal é também avaliada por meio da medição dos níveis de albumina na origem e por quantificação da clearance da creatinina.

Uma outra medida do efeito das proteínas da presente invenção no processo de doença, consiste quantificar a quantidade de aglomeração de matriz extracelular nos glomérulos. O grau de expansão da matriz glomerular é determinado como uma percentagem de cada glomérulo ocupado pela matriz mesangial de acordo com o método de Raij et al. (1984) *Kidney Int.* 26: 137-43. Os rins tratados com R FTC-

beca II:Fc é possível que tenham percentagens semelhantes da matriz mesangial do que no rim normal e bastante menos matriz mesangial do que os rins com controlo negativo.

Exemplo 7: Modelo de Artrite

A artrite é induzida em ratos fêmea LEW sem patogêneses (Harlan Çprague Dawley, Indianapolis, Ind.), pesando cerca de 100 gramas. Cada um recebe uma dose de fragmentos de parede da célula de *streptococci* do grupo A (SCW) (30 µg ramnose/gm de peso do corpo), injectado intraperitonealmente (ip), de acordo com a técnica descrita em Brandes et al. (1991) J. Clin. Invest. 87: 1108. Injectou-se intra-articularmente (IA) aos ratos injectados SGW e aos ratos injectados LEW de controlo nos tornozelos traseiros, uma das seguintes injeções:

1. proteínas da presente invenção em 25 µl 1 SBF,
2. apenas SBF, ou
3. um controlo de IgG

Monitorizou-se clinicamente as articulações determinando a quantidade de eritema das articulações, os inchaços e a distorção numa escala de 0 (normal) a 4 (inflamação severa). Tiraram-se radiografias e avaliaram-se quanto ao inchaço dos tecidos moles, ao tratamento do espaço das articulações, às erosões e deformações dos ossos. Obtiveram-se espécies de tecido e prepararam-se para análise histopatológica, tal como descrito em Brandes et al., *ibid.* Isolou-se o ARN total de tecido sinovial excisado de acordo com o processo de Allen et al. (1990) J. Exp. Med. 171: 231.

A injeção de SCW produz uma resposta inflamatória aguda que é detectável clinicamente no prazo de algumas horas e no máximo em 3-5 dias. Quando se injecta receptor de FTG-beta do tipo II:Fc directamente na articulação antes da administração IP da SCW, a inflamação às 24 horas, é significativamente inferior à observada em articulações com o anticorpo irrelevante. No pico da resposta aguda, a inflamação dessas articulações tratadas permanece muito longe das articulações com o anticorpo irrelevante. Mesmo se as articulações são injectadas com receptor de FTC-beta de tipo II:Fc quando se desenvolve a inflamação (13º dia), a fusão tem ainda um efeito anti-inflamatório significativo, quando comparada com o anticorpo irrelevante. Dado que as proteínas da presente invenção também se ligam a FTC-beta, elas têm um efeito benéfico similar quando dadas numa fase precoce ou tardia do processo inflamatório. Outros modelos experimentais bem estabelecidos de AR incluem a artrite induzida por colagénio e adjuvante. Ver, por exemplo, Janusz MJ et al., Inflamm Res. 46: 503-508 (1997); Myers et al., Life Sci 61: 1861-1878 (1997); e Kock et al., Clin Immunol Immunopathol 86: 199-208 (1998).

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> BIOGEN, INC.

<120> Proteínas de Fusão do Receptor de FTC-beta do Tipo II e Processos

<130> A019PCT

<140> Patente de Invenção Norte-Americana PCT/US98/07587

<141> 1998-04-16

<150> 60/044.641

<151> 1997-04-18

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 9077

<212> ADN

<213> Coelho

<220>

<223> Descrição de um Organismo Desconhecido: Coelho

<400> 1

```
gaattcgagc ttgcattgcc gaaggctcgtt atataactta cggtaaattgg ccagcctggc 60
tgacgcgccca acgacccccg cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg 120
ccaataggga cttttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg 180
gcagtacatc áagtgtatca tatgccaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa 240
tggcccgccct ggcattatgc ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac 300
atctacgtat tagtcatgcg tattaccatg gtttggcagg tttggcagta catcaatggg 360
cgtggatage ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc acccattga cgtcaatggg 420
agtttgtttt ggcacaaaaa ccaacgggac ttccaaaaat gtcgtaacaa ctccgccccca 480
ttgacgcaaa tggggcgtac gctgtacgg tggggcgtct atataagcag agetcgttta 540
gtgaacgcgc agatgcgctg gagacgccat ccacgctgtt ttgacctcca tagaagaaac 600
cgggacgcgat ccagcctccg gactctagag gâtccggtag tcgaggaâct gaaaaaccag 660
aaagttaact ggtaagttaa gtctttttgt cttttatttc aggtcccga tccggtcgtg 720
gtgcaaatca aagaactgct cctcagtggg tgttgccctt acttctagga ctgtacggaa 780
gtgttaactc tgccttaaaa gctgcggaat tgtaccgcg gccgctctgc catgggtcgg 840
gggctgtctc ggggcctgtg gacgctgcac ctgctcctgt ggacgcgat cgcagcacg 900
âtccgcgcgc acgttcagaa gtcggttaat aacgacatga tggtcacgga caacaatggc 960
gccgtcaagt tcccacaact gtgcaagttt tgcgatgtgc gttttccac ctgtgacaac 1020
cagaagtctc gcatgagcaa tggcagctc acgtccatct gtgagaaggc acacgaagtc 1080
tgcttgcccg tctggaggaa gaacgatgaa aacataacca tggagactgt gtgtcacgac 1140
cccaagctcg cctaccatgg attcctctct gaagattctg cctctccaaa gtgtatcatg 1200
aaagaaaaga aggtgtctgg ggagacttct tttatgtgtt cctggaggac tgaagagtga 1260
aaggaacaga tttttttctc tgaggaatac accaccagca gtcggatctt ggtcgacaaa 1320
actcaccat gccacccgtg cccggagcct gaccccgagg ggggacgcgc agtcttctct 1380
```

ttccccccaa	aacccaagga	cāccctcāt	atctcccga	cccctgaggt	cacatgcgtg	1440
gtgggtggacg	agagccacga	agaccctgag	gtcaagttaa	actgggtacgt	ggacggcggtg	1500
gaggtggata	atgccaaagac	aaagccgcgg	gaggagcagt	acaacagcac	gtaccgtgtg	1560
gtcagcgtcc	tcaccgtcct	gcaccaggac	tggttgaatg	gcaaggagta	caagtgcgaag	1620
gtctccaaca	aagccctccc	agcccccatc	gagaaaacca	tctccaaagc	caaagggcag	1680
ccccggagaa	cacaggggta	caccctgccc	ccatcccggg	atgagctgac	caagaaccag	1740
gtcagcctga	cctgcctggt	caaaggcttc	tatcccagg	acatcgccgt	ggagtgggag	1800
aggaatgggc	agccggagaa	caactacaag	accacgcctc	ccgtgttggg	ctccgacggc	1860
tccttcttcc	tctacagcaa	gtcacccgtg	gacaagagca	gggtggcagca	ggggaacgtc	1920
ttctcatgat	ccgtgatgca	tgaggctctg	cacaaccact	ccacgcagaa	gagcctctcc	1980
ctgtctacgg	gtaaatgagt	gcgcgccggt	cgaccgtgac	ccctgcgccg	cggggaactcc	2040
tgccccgagg	gtccggacgc	gccccagctc	gcgccccttc	ccatatttat	tcggacccca	2100
agcatcgccc	caataaagac	cagcaagcaa	ccggctgggg	tgtccgtgcg	gggttagggg	2160
cccgtgggac	ctcccttgcc	gtctctcctc	gcgcacggcc	cgggtccgcc	ctgtagcgt	2220
cgtgtctct	cccctgcctg	aggcgcccca	ccaccgtctt	tcaggccccg	gacttggtgc	2280
gggttccggg	cgtaaaggag	caggtgactc	tgccgcagcag	tcgttttatt	tcgccagagt	2340
ccgggggggt	ccggaggggg	cccctggact	gggggggggg	gccggctcag	tccgcgccct	2400
tgcttgcgcg	gagcttctgg	cgactcccag	gggggggggg	cccgtcggga	ggcctcgggg	2460
acaccacaggc	ctgcttcttc	gggggggggg	cgctccctgga	gtcccgtgcc	ccgggggggg	2520
ggcccccttc	gcgtgactcc	ccgcgcctgg	gtagggcgctc	gggggggggg	ctggcgggccc	2580
gtggcctctc	ctctttccgc	ggcctctctt	tcttaggtct	ctctccttc	cgcgcttct	2640
ccttcgcggg	cttccctct	ctccgaggcc	tcccttggg	tcccaggtct	gggggggtca	2700
cacggtcctc	cgggacggcc	tctccggtgg	cctgcgccgg	ctctctctcg	tcgttctatg	2760
cagcctcccg	actcccgga	atcttgggtc	tgacctctgc	ctgggcccg	ggggcaggag	2820
gggttgcagc	ggggggtctg	ggctcgaaact	taggctgcaa	gacagagctg	gttctctggg	2880
taagcgccca	cettccccc	gggggggggg	ccttctttcc	ttggggatga	aggtcccaat	2940
gcccagaggtc	gggggggggg	agctcttacc	gggggggggg	atggctccct	gggggctcag	3000
cttgccggga	cccagggctc	gggcacacgt	gcttggagtg	ctgcctccgc	gggggggggg	3060
tctgcagcga	ccgggttcgg	acccgagtcg	gctggggcgg	ggcacgggtcc	acactgtcca	3120
tcctccctc	accctagag	cccccctccc	tggacagttg	gggtgggggt	cccccggtac	3180
ggctgagact	aaggdtgccc	ccgagccgtg	gggggggggt	ccgggactcc	gttagctcgg	3240
cgcctctct	ccgaacctcg	ctctttcaat	tggtcāttct	tccccccgac	cacgggctgt	3300
aggaggcccc	tagcaaggga	gggggttcgg	ggagtgcctc	gggggggggt	cacgagctga	3360
gcggtccaca	gggggggggg	gggggggggg	cggcagaacg	ctacgaggga	gggggggttg	3420
cacaagggttc	atccggaagc	cagaacctac	tcgcggcgag	gggaatgggc	cccgcaaaag	3480
grccacaccg	gggtgagagg	gcgcgcaagg	cccgteactt	aagggaacata	tgacgtgagc	3540
tcagatcttt	gtgaaggaaa	cttacttctg	tggtgtgaca	taattggaca	aactacctac	3600
agagatttaa	agctctaagg	taaatataaa	attttrraagt	gtataatgtg	tcaaaactcc	3660
gāttetaatt	gtttgtgtat	tttagattcc	aacctatgga	actgatgaat	gggagcagtg	3720
gtggaatgcc	tctctctctg	aaaacctgtt	tggttcagaa	gaaatggcat	ctagtgatga	3780
tgaggctact	gctgactctc	aacattctac	tctccaaaaa	aagaagagaa	aggtagaaga	3840
ccccaaggac	tttctctcag	aatcgctaag	ttttttgagt	caagggtgggt	ttagtaatatg	3900
aactcttgct	tgctttgcta	cccccctccc	aaaggaaaaa	gotgcactgc	tatacaagaa	3960
aattatggaa	aaatattctg	taacctttat	aagtaggcct	aacagttata	atcataacat	4020
gggggttctt	cttactccac	acaggcatag	agtgtctgcc	attaataact	atgctcaaaa	4080

attgtgtacc	tttagctttt	taattttgtaa	aggggttaat	aagggaatatt	tgatgtatag	4140
tgcttgact	agagatcata	atcagccata	ccacatttgt	agaggtttta	cttgatttaa	4200
aaaacczccc	acacctcccc	ctgaacctga	aacataaaat	gãatgcaatt	gttgttgtaa	4260
acttgtttat	tcgagcttat	aatggttaca	aataaagcaa	tagcatcaca	aatttcacaa	4320
ataaagcatt	tttttccttg	eattctagtt	gtggtttgtc	caaactcatc	aatgtatctt	4380
atcatgtctg	gacctctctac	gccggacgca	tctgggcggg	catcacccggc	gcccacgggtg	4440
cggttgctgg	cgcctatatac	gccgacatca	ccgatgggga	agatcgggct	cgcactttcg	4500
ggctcatgag	cgtttgtttc	ggcgtgggt*	tggtggcagg	cccggtgggc	gggggactgt	4560
tgggcgccat	ctccttgcat	gcaccattcc	ttgcggcggc	ggtgctcaac	ggcctcaacc	4620
tactactggg	ctgcttccta	atgcaggagt	cgcataaggg	agagcgtcga	gactccateri	4680
caaaaataaa	ztaaaataaa	aattaaaaaa	aaagggcctt	cgtgcaaaag	tgacagcttg	4740
tatgtttctg	ctgttgacat	ttgtgggctg	tttaccaaca	cttctggaac	acagcagcgg	4800
aagggaactt	ccagattttt	taaaattacc	cttagaaaag	ggtctgtgaa	aaacccttac	4860
ccaatttcoo	ttttgttaag	tgacctaat	aacaggagga	cacagagggt	ggctggggcag	4920
cctatgattg	gaatgtcctc	tcaagtagag	gggttgggg	tttatgagga	cacagaggag	4980
cttcctgggcj	atccagacòt	gataagatac	attgatgagt	ttggacaaac	cacaactaga	5040
atgcagtgaa	aaaaatgctt	tatttgtgaa	atttgtgatg	ctattgcttt	atttgaacc	5100
attataagct	gcaataaaca	agttaacaac	aacaattgca	ttcattttat	gtttcagggt	5160
ccgggggggg	tgctggggggg	tttttaaagc	aagtaaâacc	tctacaaatg	tggttaaggct	5220
gattatgata	tctagtcagg	gcactataca	tcaaatatto	cttattaacc	cctttacaaa	5280
rtaaaaagct	aaaggtagac	aatttttgag	catagttaact	aatagcagac	actctatgcc	5340
gggtgtgggg	aagaaaaaac	agtatgttat	gattataact	gttatgccta	cttataaagg	5400
ttacagaata	tttttccata	attttcottgt	atagcagtgc	agctttttcc	tttgtgggtg	5460
aaatagcaaa	gcaagcaaga	gttctattac	taaacacagc	atgactcaaa	aaacgtgtca	5520
attctgaagg	aaagtccctg	gggtottcta	cotttttcct	cttttttggg	ggagtagaat	5580
gttgagagtc	agcagtagcc	tcacatcac	tagatggcat	tzcttctgag	caaaacaggt	5640
tttctcatt	aaaggcactc	caccactgct	ccatttcac	agttccatag	gttggaatct	5700
aaaatacaca	aacaattaga	atcagtagtt	taacacatta	racacttaaa	aattttatat	5760
ttacctaga	gctttaaatc	tctgtaggtg	gtttgtccaa	ttatgtcaca	ccacagaagt	5820
aaggttcctt	cacaaagatc	taaagccagc	aaaagtccca	tggtcttata	aaaacgcata	5880
gctttaggag	gggggggggg	aacttgaaag	catcttcctg	ttagtccctc	ttctcgtaga	5940
cttcaaactt	atacttgatg	cctttttcct	cctggacctc	gggggggggag	cctgggtatt	6000
ctgggagaag	tctacatttc	cccaaataca	ettccgggaa	aaacgtgtca	ctttcaaatt	6060
cctgcacgat	ccttgtcaca	aagagtctga	gggtgggggg	ttgattcatg	gcttcctggg	6120
aaacagaact	ggcctggggg	atccaaacca	tgtctacttt	acttgccaat	tccggttggt	6180
caataagtct	taaggcatca	tccaaacttt	tggcaagaaa	atgagatcct	cgtgggtggt	6240
ctttgagttc	tctactgaga	actariattaa	ttctgtcctt	taaagggtcga	ttcttctcag	6300
gaatggagaa	ccaggttttc	ctacccaaaa	tcaccagatt	ctgcttcctt	tccactgaag	6360
aggttggtgt	cattcttttg	aagtaactga	actcgttcct	gagcggaggc	cagggtagggt	6420
ctccgttctt	gccaatcccc	atattttggg	acaaggcgac	gatgcagttc	aatggtcgaa	6480
ccatgatggc	gggggggggt*	aaatcctacc	agccttcacg	ctaggattgc	cgtcaagttt	6540
ggcgcgaaat	cgcagccctg	agctgtcccc	ccccccaagc	tttttgcaaa	agcctaggcc	6600
tccaaaaaag	ccccctcccc	acttctggaa	tagctcagag	gggggggggg	cctcggcctc	6660
tgcataaata	aaaaaaatta	gtcagccatg	gggcggagaa	tgggcggaaac	ggggggggggg	6720
gggggggggg	argggcgag	ttagggcgcg	ggctgggggt	gctgactaat	tgagatgctg	6780

cctcgcgcgt	ttcgggtgatg	acgggtgaaaa	cctctgacac	atgcagctcc	cggagacggg	8848
cacagattgt	ctgtaagcgg	atgcggggag	cagacaagcc	cgtcagggcg	cgtcagcggg	8908
tgttggcggg	tgtcggggcg	cagccazgac	caagtcacgt	agcgatagcg	gagtgtatac	8968
tggtttaact	atgcggcacc	agagcagatt	gtactgagag	tgcaccatat	gcggtgtgaa	9028
atacgcaca	gatgcgtaag	gagaaaatac	cgcacagggc	gctcttcgcg	ttcctcgcgc	9088
actgactcgc	tgcgctcggg	cgcgcggctg	cggcgagcgg	tatcagctca	ctcaaaggcg	9148
gtaatacggg	tatccacaga	atcaggggat	aacgcaggaa	agaacatgtg	agcaaaaggc	9208
cagcaaaagg	cgggataccg	taaaaaggcc	gaggtgaggg	cgtttttcca	taggctccgc	9268
ccccctgacg	agcatocaaa	aaatcgacgc	tcaagtcaga	ggtggcgggg	cccgacagga	9328
ctataaagat	accaggcggt	tccccctgga	agctccctcg	tgcgctctcc	tgttccgacc	9388
ctgcgcgtta	cgggatacct	gtccgccttt	ctcccttcgg	gaagcgtggc	gctttctcat	9448
agctcacgct	gtaggtatct	cagttcgggtg	taggtcgrtc	gctccaagct	gggctgtgtg	9508
cacgaacccc	cogttcagcc	cgaccgctgc	gccttatccg	gtaactatcg	tcrtgagtoc	9568
aaccgcggca	gacacgattt	atcgccactg	gcagcagcca	ctggtaacag	gattagcaga	9628
gcgaggtatg	taggcgggtgc	tacagagtto	ttgaagtggg	ggcctaacta	cggctacact	9688
agaaggacag	tatttgggat	ctgcgctctg	ctgaagccag	ttacottcgg	ãaaaagagtt	9748
ggtagctczt	gatccggcaa	acaaaccaa	gatggtagcg	gtgggttttt	tgtttgcaag	9808
cagcagatra	cgcgcagaaa	aaaaggatct	caagaagatc	cttcgatctt	ttctacgggg	9868
rctgaagatc	agtggaacga	aaactcacgt	taagggattt	tggtcatgag	attatgaaaa	9928
aggatcttca	cctagatcct	tttaaattaa	aatgaagtt	ttaaatcaat	ctaaagtata	9988
tatgagtaaa	cttggtctga	cagttaccaa	tgcttaatac	gcgaggcacc	tatctcagcg	8048
atctgtctat	ttcgttcacg	catagttgcc	tgcactcccg	tcgtgtagat	aactacgata	8108
gggggggggg	taccatctgg	ccccagtgct	gcaatgatac	cgcgagaccc	acgctcaccg	8168
gccccagatt	tatcagcaat	aaaccagcca	gggggggggg	cgcagcgcag	ãagtggtoct	8228
gcaactttat	cgcctccat	ccagttctatt	aattgttgcc	gggggggggg	agtaagtagt	8288
tcgccagtta	atagtttgcg	caacgttggt	gccactgctg	caggcatcgt	ggtgtcacgc	8348
tcgtcgtttg	gtatggcttc	attcagctcc	ggttccgaac	gatcaaggcg	agttacatga	8408
tcccccatgt	gggggaaaaa	agcggttagc	tccttcggtc	ctccgatcgt	tgtcagaagt	8468
aagttggcgc	cagtgatgct	actcatgggt	atggcagcac	tgcataatcc	tattactgtc	8528
acgcccctcg	taagatgctt	ttctgtgact	ggtgagtact	caaccaagtc	attctgagaa	8588
tagtgatgct	ggcgaccgag	ttgctcttgc	cggcgiccaa	cacgggataa	taccgcgcca	8648
catagcagaa	ctttaaaagt	gctcatcatt	ggaaaacgtt	gggggggggg	aaaactotca	8708
aggatctttac	cgtgatgag	atccagttcg	atgtaaccca	ctcgtgcacc	caactgatct	8768
tcagcatcct	ttactttcac	cagcgtttct	gggtgagcaa	aaacaggaag	gcaaaaatgcc	8828
gcaaaaaagg	gaataagggc	gacacggaaa	tgttgaatac	teatactctt	cctttttcaa	8888
tattatttgaa	gcatttatca	gggttattgt	ctcatgagcg	gatacatatt	tgaatgtatt	8948
tagaaaaata	aacaaatagg	ggttcgcgcg	acatttcccc	gaaaagtgcg	acctgaagtc	9008
taagaaacca	ttattatcat	gacattaacc	tataaaaaata	ggcgtatcac	gaggcccttt	9068
cgtcttcaag	aattcag					9077

<210> 2

<211> 1164

<212> ACN

<213> Coelho

<220>

<221> Descrição de um Organismo Desconhecido: Coelho

<400> 2

```
atgggtcggg  ggctgctcgg  gggcctgggg  ccgtgcacc  tcgtcctgag  gacacgcac  60
gccagcacga  tcccccgcca  cgritcagaag  tcggttaata  acgacatgat  ggttcgggc  120
aacaatggcg  ccgtcaagtt  ccacaaactg  tgcaagcttt  gcgatgtgcg  atctcccacc  180
tgtgacaaaa  agaagtcctg  cacgagcaac  tgcagcatca  cgtccacety  tgagaaggca  240
cacgaagcct  gggggggcgt  gggggggcgt  aacgatgaaa  acataaccct  ggagactgtg  300
tgtcacgacc  ccaagctcgc  ctaccatgga  ttcttcagg  aagattccgc  atctccaaag  360
cgtatcatgo  aagaaaagaa  ggtgtttggg  gagactttct  tcatgtgttc  ctgcagcact  420
gacgagtga  atgaccacat  carcttctct  gaggaatüca  ccaccagcag  tccggatatg  480
gtcgacaaaa  ctcacacaag  cccaccgtgc  ccagcacctg  aactcctggg  gggaccgtca  540
gtcttctct  tccccccaaa  acccaaggac  accctcatga  tcaacggaa  ccccgaggaa  600
acatgcgtgg  gggggggcgt  gagccacgaa  gacctgagg  tcaagtaaaa  ctggtacgtg  660
gacggcgtgg  aggtgcataa  tgccaagaca  aagccgcggg  aggagcagta  caacagcacg  720
taccgtgtgg  tcagcgtcct  caccgtcctg  caccaggact  gggggggcgt  caaggagtac  780
aagtgaagg  tctccaacaa  agccctacca  gcccccatcg  agaaaaccat  crccaaagcc  840
aaagggcagc  cccgagaacc  acaggtgtac  accctgcccc  catcccgga  tgagctgacc  900
aagaaccagg  aaagcctgac  ctgcctggtc  aaaggcttct  atcccagcga  catcgccgtg  960
ggggggggg  gcaatgggca  gccggagaac  aactacaaga  ccacgcctcc  cgtgttggac  1020
tcogaaggct  ccttcttct  ctacügaag  caaacctgg  acaagagcag  gggggggcgt  1080
gggaacgtct  tctcatgtct  cgtgatgcac  gaggtctctg  acaaccacta  cacgcagaag  1140
agcctctccc  tgctccggg  taaa  1184
```

<210> 3

<211> 9077

<212> ADN

<213> Coelho

<400> 1

```
gacttcgggt  ttgcatgcct  ggggttcgtt  acataactta  cggtaaatgg  cccgcctggc  60
tgaccgcttc  acgacccccg  cccattggag  tcaataacga  cgtatgttcc  catagtaacg  120
ccactcggga  ctttccattg  ccgtccctgg  gtggagtatt  cccctccccc  tgcccacttg  180
gggtcccttc  aagtgtatca  tctgcctcgt  acgcccccta  ttgacgtcaa  tgacggtaaa  240
gggtcccttc  ggcattatgc  cccgccccct  accttatggg  actttcctac  ttggcagtac  300
ctctacgtat  tagtcatcgc  tcttaccctg  gtgatgcggt  tttggcagta  catcaatggg  360
cgtggataga  ggtttgactc  accgggactt  ccaagtcctc  accccattga  cggggggggg  420
gggtttgact  gggacaaaaa  cccgggggac  tttccaaaat  gtcgtaacaa  ctccgcccc  480
```

ttgacgcaaa	tgggcggtag	gcgtgtacgg	tgggaggtct	anataagcág	agctcgttta	540
gtgaaccgtr	agatcgccctg	gagacgccat	ccacgctgrt	ttgãccctcca	tagaagacac	550
cgggaccgat	ccagcctccg	gactctagag	gatccggtac	tcgaggaact	gaaaaaccag	560
aaagttaact	ggtaagttta	gtctttttgt	cttttatttc	aggncccgga	tccggtggtg	570
gtgcaaatca	aagaactgct	cctcagtgga	tgrtgcattt	acttctaggc	ctgtacggaa	580
gtgntacttc	tgctctaaaa	gctgcggaat	tgtacccgcg	gcgctctgc	catgggtcgg	590
gggctgctca	ggggcctgtg	gccgctgcac	atc-jtctgt	ggaagcgtat	cgcagcacg	600
atccaaccgc	acgttcagaa	gtcggttaat	aacgacatga	tagtcaactga	caacaacggt	610
gcagrcaagt	ttccacãact	grgtaaatth	tgtyatgtga	gattttccac	ctgtgacaac	620
cagaaatcct	gcatgagcaa	ctgcagcatc	acctecatct	gtgagaagcc	acaggaagtc	630
tgtgtggctg	tatggagaaa	gaatgacgag	aacataacac	tagagaaagt	ttgccazgac	640
cccaagctcc	cctaccatga	ctttatcctg	gaagatgctg	cttctccaaa	gtgcattatg	650
aaggaaaaaa	aaaagcctgg	tgagactttc	ttcatgtgtt	cctgtagctc	tgatgagtgc	660
aacgacaaca	tcactttctc	agaagaatat	aacaccagca	atcctgàctr	ggtcgacaaa	670
actcacacat	gaccaccgtg	cccagcacct	gaactcctgg	gggacccgtc	agtcttctct	680
ttccccccaa	aacccaagga	cacccccatg	atctcccgga	ccctgaggt	cacatgagtg	690
ggcgtggtgg	cgagccacga	agaccctgag	gtcaagctca	actggtacgt	ggcggcgctg	700
gaggtgcâta	atgccaaagac	aaagccgcgg	gaggagcagt	acaacagcac	gtaccgtgtg	710
gtcagcgtcc	tcacgcctct	gcaccaggac	tggctgaatg	gcaaggagta	caagtgcaag	720
gtctccaaca	aagcctctcc	agccccccac	gagaaaacca	tctcraaagc	caaagggcag	730
ccccaaagac	cacaggtgta	caccctgccc	ccatccgggg	atgagctgac	caagaaccag	740
gtcagcctga	cctgctgtgt	caaaggcttc	tatcccagcg	acatcgccgt	gggtggtgag	750
agcaatgggc	agccggagaa	caactacaag	accacgcctc	cgtgttgga	ctccgacggc	760
tcctttcttc	tctacagcaa	gtcaccgtg	gacaagagca	gggggacgta	ggggaaagtt	770
ttctcatgct	cgtgatgca	tgaggctctg	cacaaccacc	acacgcagaa	gagcctctcc	780
ctgtctccgg	gtaaattgagt	ggggcccggt	cgaccgtgac	ccctgcgccg	cgggactcc	790
tgcctgaggt	gtccggaagc	gccccagctc	gcgccccttc	ccatatttat	tccgacccca	800
agcatcgccc	caataaagac	cagcaagcaa	gggtgtgggt	tgaccgtgcg	tggtcagggg	810
cccggtggac	ctcccttgcc	gtctctctct	gcgcacggcc	cgggtccgcc	ctgtagcgct	820
cgtgtctct	ccctgcctg	aagcgcccca	ccaccgtctt	tcaggccccc	ggcctggctg	830
cgggtccagg	cgtaaaggag	caggtgactc	tgcgcagcac	tcgctctatt	tgcgcagagt	840
ggcggggggt	gggaaagggg	ccctgggact	ggggcgggg	gccggctcag	tcccgccct	850
tgctgcgcg	gagcttctgg	cgactcccag	gcgctgctc	ctcgtcggga	ggcctcaggg	860
acacccaggc	ctgctccttc	ctgggtctgg	cgtccctgga	gtcccgtgcc	cacggccggt	870
ggcccccttc	gcgtgaczc	cagcgtggg	gtaggggttc	cgggggctcc	ctggcgggcc	880
gtggcctctc	ctctttccgc	ggcctczctt	tcttaggtct	ctctctcttc	cgcggccact	890
ccttcgcgg	cttccctct	ctccgaggcc	tctccttggg	tcccgggtct	gcgagggta	900
cacggctctc	cgggacggcc	tctccgggtg	cctcgccggg	ztctcttctg	tcttctctg	910
cagcctcccg	actcccgga	atcttgggtc	tgacctctgt	ccgggcccg	ggcgagggcg	920
gcgctgatgg	aggcgctgg	gcctcgaact	taggctgcaa	gacagagtgg	gggctcgggg	930
taagtgccca	ccctccctcc	ggcccgggct	ccttcttttc	ttggggatga	ôqgtcccaat	940
gggggggttc	agtggaagga	agctcttacc	aggggcgacg	atggctccct	ggggcctggg	950
cttgccggga	cccagggtcc	gggcacacgt	gcttgagtg	ctgcctccgc	agggacggcg	960
tctgcagcga	cagggtcggg	acccgagtc	gccgggccga	ggcacggtcc	acâctgtcca	970
gggggggggt	acccctagag	ccccctccc	tggacagttg	gagtgggggt	cccccggtac	980

ggctgagact	aaggatggcc	ccgagccgtg	gggaggggag	ccgggactcc	gctgcgcggg	3040
cgccccact	ctgaacctgg	ctctttcaac	tggtcattct	tcccccgac	cacgggctgr	3050
aggaggcccc	tagcaaggga	gggggtcgag	gagtgcctcc	ggggggcgct	cacgagctga	3060
gcggtcccc	gagagggcgc	aggggaaagg	cggcagaacg	ctacgaggca	gggggggttg	3070
cacaagggtc	otccggaagc	cagaacctac	ggggggggag	gggggggggg	cccgcaaaag	3080
gtccacaccg	ggtgagaggg	gcgcgcaagg	cccgtcactt	aagggaacata	tgacgtgagc	3090
tcagatcttt	gtgaaggaac	cttactttctg	tgggttgaca	taattggaca	aactacctac	3100
agagatttaa	agctctaagg	taaatataaa	atttttaagt	gtataatgtg	ttaaactact	3110
gattctaatt	gtttgtgtat	cttagattcc	aacctatgga	actgatgaat	gggagcagtg	3120
gtggaatgac	tttaatgagg	aaaacctggt	ctgctcagaa	gaaatgccat	ctagtgatga	3130
tgaggctact	gctgactctc	aacattctac	tcctccaaaa	aagaagagaa	aggtagaaga	3140
ccccaggac	tttcttccag	aattgctaag	ttttttgagc	catcjtgtgt	ttagtaatag	3150
aactcttget	tgetttgcta	tttacaccac	aaaggaaaaa	gctgcactgc	tatacaagaa	3160
aattatggaa	aaacattctg	taacctttat	aagtaggcac	aacagttaca	atcataacat	3170
actgtttttt	gttactccac	acaggcatag	agtgtctgct	attaãtaact	atgccaaaaa	3180
attgtgtacc	tttaggtttt	taattttgta	aggggttaat	aaggaatatt	tgatgtatag	3190
tgcttgact	agagaacata	atcagccata	ccacatttgt	agaggtttta	cttgctttaa	3200
üaaacctccc	acacctcccc	ctgaacctga	aacataaaat	gaatgcaatt	gttgttgтта	3210
acttgtttat	tgcagcttat	aatgcttaca	aataaagaaa	tagcatcaca	ãatttcacaa	3220
ataaagcatt	tttttccttg	cattctagtt	gtggtttgtc	caaactcacc	aatgtatctt	3230
atcatgtctg	gatcctctac	gcgggacgca	gggggggggg	catcaccggc	gccacaggtg	3240
gggttgctgg	cgcttatatc	gccgacatca	gggggggggg	agatcgggct	cgccacttcg	3250
ggctcatgag	cgcttggttc	ggcctgggtc	gggtggcgag	ccccgtggcc	gggggggggg	3260
tgggcgccat	ctccttgcat	gcaccattcc	gggggggggg	ggtgctcaac	ggcctcaacc	3270
tactactggg	ctgctcccta	atgcaggagt	cgcataaggg	agagcgtcga	gactccatct	3280
caaaaataaa	ataaaataaa	gattaaaaaa	aaagggccct	gggtgctggg	tgacãgcttg	3290
tatgtttctg	ctgttgacat	gggtgggttg	tttaccacaa	cttctggaac	acagcagtg	3300
aagggaactc	ccagatattt	taaaattacc	cttagaaagc	ggtctgtgaa	aaacccttac	3310
ccaatttctc	ttttgttaag	tgacctaat	aacaggagga	cacagagggt	ggatgggggg	3320
cctatgattg	gaatgtctc	tcaagtagag	gggggttgag	tttatgagga	cacagaggag	3330
cttcctgggg	atccagacat	gataagatag	attgatgagt	ttggaaaaac	cacaactaga	3340
atgcagtga	aaaaatgctt	tatttgtgaa	atttgtgatg	ctattgcttt	atttghtaacc	3350
attataagct	gcaataaaca	agttaacaac	aacaattgca	gggggggggg	gtttoaggct	3360
gggggggggg	tgtgggagg	tttttaaagc	aagtaaaacc	tctacaaatg	tggtatgggt	3370
gattôtgato	tctagtcaag	gcactataca	tcaaacattc	cttattaacc	cctttacaãa	3380
ttaaaaagct	aaaggtagac	aatttttgag	catagttatt	aatagcagac	actctatgcc	3390
tgtgtggagt	aagaaaaaac	agtatgttat	güttataact	gttatgccta	cttataaagg	3400
ttacagaata	tttttccata	attttcttgt	atagcagtg	agctttttcc	tttgtggtgt	3410
aaatagcaaa	gcaagcaaga	gttotattac	taaacacagc	atgactcaaa	aaacttagca	3420
attctgaagg	aaagtcttg	gggtcttcta	cotttctctt	cttttttgga	ggagtagaat	3430
gttgagagtc	agcagtagcc	tcatcatcac	tagatggcat	ttttttgggg	cùbaacagg	3440
ttctctctct	aaaggcattc	gggggggggg	cccatctc	agttccôtag	gttggaatct	3450
aaaatacaca	aacaattaga	atcagtagtt	gggggggggg	tacacttaaa	aaïtttatat	3460
ttacottaga	gctttaaatc	tctgtaggta	gtttgtccaa	gggggggggg	ccacagaagt	3470
aagggttcctt	cacaaagatc	taaagccagc	aaaagtccca	tggtcttata	aaaatgcata	3480

gctttaggag	gggggaggg	aacttgaaag	catcttctcg	ttagtttttc	ttctcgtaga	5940
cttcaaactt	atacttgatg	cotttztcoct	cctggacctc	agagaggacg	cctgggtatt	6000
ctgggagaa	tttatatttc	cccaaataca	ttctctggga	aaacgtgtca	tttcaaaatt	6060
cctgcattgat	ccttggtgaca	aagagtctga	ggtagcctgg	ttgattcatg	gcttctcggg	6120
aaacagaact	gcctccgact	attcaaacca	tgtctacott	acttgccaat	tccgggttgt	5180
caataagtct	taaggcatca	tccaaactct	tggcaagaaa	atgagctcct	cgtgggtggg	6240
ctttgagttc	tctactgaga	actatattaa	ttctgacctt	taaaggctga	ttcttctcag	5300
gaatggagaa	ccagggtttc	ctaccataaa	tgaactgatt	ctgtttacct	tccaccgaag	6360
aggttgtggg	cattctttgg	aagtacttga	actcgttctc	gagcggaggc	cagggttaggt	6420
ctccgttctt	gccaatcccc	atattttggg	acacggigac	gatgcagttc	aatgggtcga	6480
ccatgatggc	agcggggata	aaatcctacc	agcctccacg	ctaggattgc	cgtcaagttt	6540
ggcgcgaaat	cgcagccctg	agctgtcccc	ccccccaagc	tttttgcaaa	agcctaggcc	6600
tccaaaaaag	cctcctcact	acttctggaa	tagctcagag	ggcgaggcgg	cctcggcctc	6660
cgcataaata	aāaaaaatta	gtcagccatg	gggcggagaa	tgggcggaac	tgggcggagt	6720
ttgggggggg	ttgggggggg	ttagggggcg	gactatgggt	gctgactaat	tgagatgctg	6780
cctcgcgcgt	ttcgggtgatg	acggtgaaaa	cctctgtcac	atgcagctcc	cggagacggg	6840
caCagcttgt	ctgtaagcgg	atgccgggag	cagacaagcc	cgtcagggcg	cgtcagcggg	6900
ttttgggggg	ttttgggggg	cagccatgac	ccagtcacgt	agcgatagcg	gagtgtatac	6960
tggcttaact	atgcggcatc	agagcagatt	gtactgagag	tgcaccatat	gcggtgtgaa	7020
ataccgcaca	gatgcgtaag	gagaaaatac	cgcctcaggc	cctcttccgc	ttcctcgcct	7080
actgactcgc	tgcgctcggg	cgttcggctg	cggcgagcgg	tatcagctca	cccaaaggcg	7140
gtaatacggg	tatccacaga	atcaggggat	aacgcaggaa	agaacatgtg	aggaaaaggc	7200
cagcaaaagg	ccaggaaccg	taaaaaggcc	gcgttgctgg	cctttttcaa	taggctccgc	7260
ccccctgacg	agcatcacaa	aaatcgacgc	tcaagtcaga	ggtggcgaaa	cccgacagga	7320
ctataaagat	accaggcggt	tccccctgga	agctccctcg	tgcgctctcc	tggtccgacc	7380
ctgcgcgtta	cgggatacct	gtccgccttt	ctcccttcgg	gaagcgtggc	gctttctcat	7440
agctcacgct	gtagggtatct	cagrtcgggtg	taggtcgttc	gctccaagct	gggctgtgtg	7500
cacgaaaacc	cgttccagac	cgaacgctgc	gccttatccg	gtaaatactg	tcttgagtcc	7560
aaccgcgtta	gacacgactt	atcgccactg	gcagcagcca	ctggtaacag	gattagcaga	7620
gggggggtatg	ttgggggggg	tacagagttc	ttgaagtggg	ggcctaacta	cggctacact	7680
agaaggacag	tattcgggtat	ctgcgctctg	ccgaagccag	ttaccttcgg	aaaaagagtt	7740
gotagctctt	gatccggcaa	acaaaccacc	gctggttagcg	gtggtttttt	tgtttgcaag	7800
cagcagatta	cgcgcagaaa	aaaaggatct	caagaagatc	ctttgatctt	ttctacgggg	7860
totgacgcta	agtggaacga	aaactcacgt	taagggatct	tggtcatgag	attatcaaaa	7920
aggatcttca	cctagatcct	tttaaatcaa	aaatgaagtt	ttaaatcaat	ctaaagtata	7980
tatgagtaaa	cttggtctga	cagttaccaa	tgtttaataa	gtgaggcacc	tatctcagcg	8040
atctgtctat	ttcgttcctc	catagttgcc	tgaactcccc	togttagatg	aactacgata	8100
cgggagggtc	taccatccgg	ccccagtgct	gcaatgatac	cgcgagacc	acgctcaccg	8160
gctccagatt	ttttgggggg	aaaccagcca	gcgggaaggg	ccgagcgcag	aagtggccct	8220
gcaactttat	ccgcctccat	ccagttctatt	aattgttgac	gggaagctag	agtaagtagt	8280
tgcgcagtta	atagtttgcg	caacgttggt	gccattgctg	caggcatcgt	ggtgtcacgc	8340
togtcttttg	gtatggtctc	attcagctcc	ggttcccaac	gatcaaggcg	agttacatga	E403
tctcccatgt	tgtgcaaaaa	agcgggttagc	tccttcggtc	ctccgatcgt	tgtcagaagt	8460
aagttggcgc	cagtggttatc	ttctccgggg	atggcagcac	tgcataattc	tcttactgtc	8520
ttggggtccg	taagatgctt	ttctgtgact	ggtgagtact	caaccaagtc	attctgagaa	8580

tagtgtatgc	ggcgaccgag	ttgctcttgc	cgggcgtcaa	cacgggataa	taccgcgcca	8640
catagcagaa	ctttaaaagt	gctcatcatt	ggaaaaagtt	cttcggggcg	aaaactctca	8740
aggatcttac	cgctgttgag	atccagttcg	atgaaaccca	ctcgtgcacc	caaaagator	8760
tcagcatctt	ttacattacc	gaggtcttct	gggtgagcaa	aaacaggaag	gcaaaatgcc	8820
gcaaaaaagg	gaataaggga	gaaaaggaaa	tgttgaatac	aaatactctt	cctttttcaa	8880
ratzattgaa	gcatttatca	gggttatttt	ctcatgagcg	gatacatatt	tgaacgtatt	8940
tagaaaaata	aacaaatagg	ggttccgcgc	acatttcccc	gaaaagtgcc	acctgacgtc	9000
aaagaaacca	ttattatcat	gacattaacc	tataaaaata	ggcgtatcac	gaggcccttt	9060
cgtcttcaag	aattccg					9077

<210> 4

<211> 1185

<212> ADN

<213> Coelho

<400> 4

ggctgctcag	ggcctcagag	ccgctgcaca	tcgtcctgtg	gacgcgtatc	60
gccagcacga	tcccaccgca	cgttcagaag	tcggtaaata	acgacatgat	120
aacaacgggtg	cagtcaagtt	tccacaactg	tgtaaatttt	gtgacgtgag	180
tgtgacaacc	agaaar-aaag	catgagcaac	tgcagcatca	cctccatctg	240
caggaaagtct	gtgtgggtgt	atggagaaaag	aatgacgaga	acataaact	300
cgccatgacc	ccaagctccc	ctaccatgac	tttattcttg	aagatgctgc	360
tgcattatga	aggaaaaaaa	aaagcctggt	gagactttct	tcattgtgttc	420
gatgagtgca	atgacaacat	catctttctca	gaagaatata	acaccagcaa	480
gtcgacaaaa	ctcacacatg	cccaccgtgc	ccagcacctg	aactcctggg	540
gtcttctcr-ct	tcccccaaaa	acccaaggac	acctcatga	tctcccgac	600
acatgcgtgg	tggtggacgt	gagccacgaa	gacctgagg	tcaagttcaa	660
ggcgggtgag	agggtcataa	tgccaagaca	aggagcagta	caacagcacg	720
taccgtgtgg	tcagcgtcct	caccgtcctg	caccaggact	ggctggaattg	780
aagtgcgaagg	tctccâacaa	agccctccca	gcccccatcg	agaaaaccat	840
aaagggcagc	cccgagaacc	acagggtgtac	acctgcccc	catcccggga	900
aagaaccagg	tcagcctgac	ctgcctggtc	aaaggcttct	atcccagcga	960
gggtggggag	gcaatgggga	gccgggagaac	aactacaaga	ccacgcctcc	1020
tcaggagggct	ccttcttctc	ctacagcaag	ctcaccgtgg	acaagagcag	1080
gggaacgtct	tctcatgctc	cgtgatgcat	gaggctctgc	ãraaccacta	1140
agcctctctcc	tgtctccggg	taaat			1185

<210> 5

<211> 19

<212> ADNA

<213> Coelho

<400> 5

aaggaaaaaa gcggccgctc tgccatgggt cgggggctg 39

<210> 6

<211> 34

<212> ADN

<213> Coelho

<400> 6

agttttgtcg accagatccg gactgctggg tggt 34

<210> 7

<211> 34

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 7

agttttgtcg accaagtcag gattgctggg gtta 34

<210> 8

<211> 388

<212> PRS

<213> Coelho

<400> 8

Met	i	Arg	Gli	Leu	Leu	Arg	Gli	Leu	Trp	Pro	Leu	Bis	Leu	Val	Leu
				5					70					15	
Trp	Tre	Arg	Ile	Ala	Ser	Tre	Ile	Fro	Pro	Ala	Val	Gln	Lis	Ser	Val
			20					25				30			
Asn	Asn	Arg	Met	Met	Val	Tre	Asp	Asa	Asn	Gli	Ala	Val	Lis	Fen	Pro
		35					40					45			
Gln	Leu	Cis	Lis	Fen	Cis	Asp	Val	Arg	Ser	Ser	Tre	Cis	Asp	Asn	Gln
		50				55					60				
Lis	Ser	Cis	Met	Ser	Arg	Cis	Ser	Ile	Tre	Ser	Ile	Cis	Glu	Lis	Ala

65					70					75				20	
His	Glu	Val	Cis	Val	Ala	Val	Trp	Arg	Lis	Asn	Asp	Glu	Asn	Ile	Tre
				85					90					95	
Leu	Glu	Tre	Val	Cis	His	Asp	Pro	Lis	Leu	Ala	Tir	His	Gli	Fen	Tre
			100					105					110		
Leu	Glu	Asp	Ser	Ala	Ler	Pro	Lis	Cis	Ile	Met	Lis	Glu	Ala	Lis	
		115					120					125			
Fen	Ala	Glu	Tre	Fen	Fen	Met	Cis	Ser	Lis	Ser	Tre	Asp	Glu	Cis	Asn
	130					135					140				
Asp	His	Ile	Ile	Fen	Ser	Glu	Ala	Tir	Tre	Tre	Ser	Ser	Pro	Asp	Glu
135				150					155					160	
Val	Asp	Lis	Tre	Ala	Tre	Cis	Pro	Pro	Cis	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Ala
			165					170					175		
Gli	Gli	Pro	Ser	Val	Fen	Leu	Fen	Pro	Pro	His	Pro	Lis	Asp	Tre	Leu
		180					185					190			
Met	Ile	Ser	Arg	Tre	Pro	Glu	Val	Tre	Cis	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
	195					200					205				
Eis	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lis	Fen	Asn	Trp	Tir	Val	Asp	Gli	Val	Glu
210				215				220							
Val	His	Asn	Ala	Lis	Tre	Lis	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tir	Asn	Ser	Tre
225				230				235						240	
Tir	Asp	Val	Val	Ser	Val	Leu	Tre	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn
		245				250					255				
Gli	Lis	Glu	Tir	Lis	Cis	Lis	Val	Ser	Asn	Lis	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro
	260					265					270				
Ile	Glu	Lis	Tre	Ile	Ser	Lis	Ala	Lis	Gli	Gln	Pro	Asp	Glu	Pro	Gln
	275					280					285				
Val	Tir	Tre	Leu	Pro	Pro	Ser	Asp	Asp	Glu	Leu	Tre	Lis	Asn	Gln	Val
290				295				300							
Ser	Leu	Tre	Cis	Leu	Val	Lis	Gli	Fen	Tir	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val
305				310				315						320	
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gli	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tir	Lis	Tre	Tre	Pro
		325					330						335		
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gli	Ser	Fen	Fen	Leu	Tir	Ser	Lis	Leu	Tre
	340					345						350			
Val	Asp	Lis	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gli	Asn	Val	Fen	Ser	Cis	Ser	Val
	355					360					365				
Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tir	Tre	Gln	Lis	Ser	Leu	Ser	Leu
	370					375					380				
Ser	Pro	Ala	Ala												

<210> 3

<211> 388

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met	Gli	Asn	Gli	Leu	Leu	Asp	Glr	Leu	Trp	Pro	Leu	His	Ile	Val	Leu	
				5					10					15		
Trp	Tre	Rrg	Ile	Ala	Ser	Tre	Ile	Pro	Pro	His	Asn	Gln	Lis	Ser	Val	
				20					25					30		
Asn	Asn	Asp	Met	Ile	Vai	Tre	Asp	Asn	Asn	Gli	Ala	Val	Lis	Fen	Pro	
				31					40					45		
Gln	Leu	Cis	Lis	Fen	Cis	Asp	Val	Asp	Fen	Ser	Tre	Cis	Asp	Asn	Gln	
				50					55					60		
Lis	Ser	Cis	Met	Ser	His	Cis	Ser	Ile	Tre	Ser	Ile	Cis	Glu	Lis	Pro	
				65					73					75		
Gln	Glu	Vai	Cis	Val	Ala	Val	Trp	Asp	Lis	Asn	Asp	Glu	Asn	Ile	Tre	
				85					90					95		
Leu	Glu	Tre	Val	Cis	His	Asp	Pro	Lis	Leu	Pro	Tir	His	Asp	Fen	Ile	
				100					105					110		
Leu	Glu	Asp	Ala	Ala	Ser	Pro	Lis	Cis	Ile	Met	Lis	Glu	Lis	Lis	Lis	
				115					120					125		
Pro	Gli	Glu	Tre	Fen	Fen	Met	Cis	Ser	Cis	Ser	Ser	Asp	Glu	Cis	Asn	
				130					135					140		
Asp	Asn	Ile	Ile	Fen	Ser	Glu	Glu	Tir	Asn	Tre	Ser	Asn	Pro	Asp	Leu	
				145					150					155		
Vai	Asp	Lis	Tre	His	Tre	Cis	Pro	Pro	Cis	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	
				165					170					175		
Gli	Gli	Pro	Ser	Val	Fen	Leu	Fen	Pro	Pro	Lis	Pro	Lis	Asp	Tre	Leu	
				180					185					190		
Met	Ile	Ser	Asp	Tre	Pro	Glu	Val	Tre	Cis	Val	Vai	Val	Asp	Val	Ser	
				195					200					205		
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lis	Fen	Asn	Trp	Tir	Vai	Asp	Glu	Val	Glu	
				210					215					220		
Val	His	Asn	Ala	Lis	Tre	Lis	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tir	Asn	Ser	Tre	
				225					230					235		
Tkr	Arg	Vai	Val	Ser	Val	Leu	Tre	Val	Leu	His	Gln	Asp	Lrp	Leu	Asn	
				245					250					255		
Gli	Lis	Gln	Tir	Lis	Cis	Asp	Val	Ser	Asn	Lis	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	
				260					265					270		
Ile	Glu	Lis	Ile	Lis	Ser	Asp	Ala	Lis	Gln	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	
				275					280					285		
Asn	Tir	Ile	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Gln	Leu	Tre	Lis	Asn	Gln	Val	
				290					295					300		
Ser	Leu	Tre	Cis	Leu	Val	Lis	Gln	Fen	Tir	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	

```

totcagaaga atataacacc agcaatcctg acttgggtoga caaaaactcac acatgcccac 60
cgtgccca                                         68

```

<210> L3

<211> 22

<212> PRT

<213> Wcmo sapiens

<400> 13

```

Ser  Glu  Glu  Trp  Acp  Tre  Ser  Acp  Pro  Asp  Leu  Val  Asp  Lis  Tre  His
1                               5               10               15
Tre  Cis  Pro  Pro  Cis  Pro
                20

```

Lisboa, 19 de Setembro de 2007

REIVINDICAÇÕES

I. Composição que compreende uma proteína de fusão do receptor de FTC-beta do tipo LI (R FTC-beta LI), caracterizada pelo facto de compreender

(a) um polipéptido codificado pelo polinucleótido mostrado na SEQ ID N°. 2;

(b) um polipéptido que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID N°. 8; ou

(c) um polipéptido que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 98 % idêntica à sequência de aminoácidos da SEQ ID N°. 8,

e uma região constante de uma imunoglobulina, em que a referida proteína de fusão de R FTC-beta II se liga a FTC-beta.

2. Composição que compreende uma proteína de fusão do receptor de FTC-beta do tipo II (R FTC-beta II), caracterizada pelo facto de compreender

(d) um polipéptido codificado pelo polinucleótido mostrado na SEQ ID N°. 2;

(e) um polipéptido que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID N°. 8; ou

(f) um polipéptido que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 98 % idêntica à sequência de aminoácidos da SEQ ID N°. 8

e uma região constante de uma imunoglobulina, em que a referida proteína de fusão de R FTC-Seta II se liga a FTC-beta para ser utilizada como um medicamento.

3. Composição, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo facto de a região constante ser de IgG1.
4. Composição, de acordo com a reivindicação 2 ou 3, caracterizada pelo facto de a região constante compreender a charneira, que é a porção CH2 ou CH3 de IgG1.
5. Composição, de acordo com uma qualquer das reivindicações 2 a 4, caracterizada pelo facto de a proteína de fusão de R FTC-beta II ser um homodímero.
6. Utilização de uma proteína de fusão de R FTC-beta II, caracterizada pelo facto de compreender
 - (a) um polipéptido codificado pelo polinucleótido mostrado na SEQ ID N°. 2 ou 4;
 - (b) um polipéptido que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID N°. 8 ou 9; ou
 - (c) um polipéptido que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 98 % idêntica à sequência de aminoácidos da SEQ ID N°. 8 ou 9

e uma região constante de uma imunoglobulina, em que a referida proteína de fusão de R FTC-beta II se liga a FTC-beta, para a preparação de uma composição farma-

cêutica para o tratamento de um indivíduo que sofre de um distúrbio fibroproliferativo.

7. Utilização, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo facto de o distúrbio fibroproliferativo ser artrite, nefropatia diabética, glomerulonefrite, vitreoretinopatia proliferativa, mielofibrose ou um distúrbio vascular do colagénio seleccionado no grupo que consiste em esclerose sistémica, polimiosite, escleroderma, dermatomiosite ou lúpus eritematoso sistémico.
8. Utilização, de acordo com a reivindicação 6 ou 7, caracterizada pelo facto de a região constante ser de IgG1.
9. Utilização, de acordo com uma qualquer das reivindicações 6 a 8, caracterizada pelo facto de a região constante compreender a charneira, que é a porção CH2 ou CH3 de IgG1.
10. Utilização, de acordo com uma qualquer das reivindicações 6 a 9, caracterizada pelo facto de a proteína de fusão de R FTC-beta II ser um homodímero.

Lisboa, 19 de Setembro de 2007