(11) Número de Publicação: **PT 2161283 E**

(51) Classificação Internacional:
C07K 16/30 (2014.01)

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

(22) Data de pedido: **2004.11.16**

(30) Prioridade(s): **2003.11.17 US 520842 P**
2003.12.24 US 532426 P

(43) Data de publicação do pedido: **2010.03.10**

(45) Data e BPI da concessão: **2014.06.04**
165/2014

(73) Titular(es):
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY SOUTH SAN FRANCISCO CA 94080-4990 **US**

(72) Inventor(es):
DAN L. EATON **US**
VICTORIA SMITH **US**
ALLEN J. EBENS **US**
ANDREW POLSON **US**
CRAIG CROWLEY **US**

(74) Mandatário:
JOSÉ RAUL DE MAGALHÃES SIMÕES
RUA CASTILHO, 167 - 2.º 1070-050 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES QUE COMPREENDEM ANTICORPOS CONTRA CD79B CONJUGADOS A UM AGENTE DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO OU AGENTE CITOTÓXICO E MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DE TUMOR DE ORIGEM HEMATOPOIÉTICA**

(57) Resumo:
A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A COMPOSIÇÕES QUE COMPREENDEM ANTICORPOS CONTRA CD79B CONJUGADOS A UM AGENTE DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO OU AGENTE CITOTÓXICO ÚTEIS PARA O TRATAMENTO DE TUMOR HEMATOPOIÉTICO EM MAMÍFEROS E A MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO DE AQUELAS COMPOSIÇÕES DE MATÉRIA PARA O MESMO.

RESUMO

COMPOSIÇÕES QUE COMPREENDEM ANTICORPOS CONTRA CD79B CONJUGADOS A UM AGENTE DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO OU AGENTE CITOTÓXICO E MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DE TUMOR DE ORIGEM HEMATOPOIÉTICA

A presente invenção refere-se a composições que compreendem anticorpos contra CD79b conjugados a um agente de inibição do crescimento ou agente citotóxico úteis para o tratamento de tumor hematopoiético em mamíferos e a métodos de utilização de aquelas composições de matéria para o mesmo.

DESCRIÇÃO

COMPOSIÇÕES QUE COMPREENDEM ANTICORPOS CONTRA CD79B CONJUGADOS A UM AGENTE DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO OU AGENTE CITOTÓXICO E MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DE TUMOR DE ORIGEM HEMATOPOIÉTICA

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a composições de matéria para utilização no tratamento de linfoma folicular, linfoma de célula de manto ou linfoma de célula grande difusa.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Tumores malignos (cancros) são a segunda causa principal de morte nos Estados Unidos, após doença cardíaca (Boring *et al.*, CA Cancel J. Clin. 43:7 (1993)). O cancro é caraterizado pelo aumento no número de células anormais ou neoplásicas derivadas de um tecido normal que se prolifera para formar uma massa tumoral, a invasão dos tecidos adjacentes por estas células tumorais neoplásicas, e a geração de células malignas que eventualmente se espalham via o sistema sanguíneo ou linfático a gânglios linfáticos regional e a locais distantes via um processo denominado metástase. Num estado canceroso, uma célula se prolifera sob condições em que células normais não cresceriam. O próprio cancro se manifesta num ampla variedade de formas, caraterizado por diferente graus de invasividade e agressividade.

Os cancros que envolvem células geradas durante hematopoiese, um processo pelo qual elementos celulares do sangue, tal como linfócitos, leucócitos, plaquetas, eritrócitos e células assassinas naturais são gerados são

referidos como cancros hematopoiéticos. Linfócitos que podem ser encontrados no sangue e tecido linfático e são críticos para a resposta imune, são categorizados em duas classes principais de linfócitos: linfócitos B (células B) e linfócitos T (células T), que mediam a imunidade humoral e mediada por células, respetivamente.

As células B amadurecem dentro da medula óssea e deixam a medula que expressa um anticorpo de ligação a antigénio na sua superfície celular. Quando uma célula B naïve encontra pela primeira vez o antigénio para o qual seu anticorpo ligado à membrana é específico, a célula começa a se dividir rapidamente e sua progénie se diferencia em células B de memória e células efetoras denominadas "células plasmáticas". As células B de memória têm um tempo de vida mais longo e continuam a expressar anticorpo ligado à membrana com a mesma especificidade como a célula parental original. Células plasmáticas não produzem anticorpo ligado à membrana, mas em vez disso produzem o anticorpo numa forma que pode ser segregada. Anticorpos segregados são a principal molécula efetora de imunidade humoral.

As células T amadurecem dentro do timo que fornece um ambiente para a proliferação e diferenciação de células T imaturas. Durante o amadurecimento da célula T, as células T sofrem os rearranjos do gene que produzem o recetor de célula T e a seleção positiva e negativa que ajuda a determinar o fenótipo superfície celular da célula T madura. Marcadores de superfície celular característicos de células T maduras são o complexo CD3:recetor de célula T e um dos co-recetores, CD4 ou CD8.

Em tentativas de descobrir alvos celulares eficazes para a terapêutica do cancro, investigadores têm procurado

identificar polipéptidos transmembrana ou de outra forma associados à membrana que são especificamente expressas na superfície de um ou mais tipo(s) particular(es) de célula de cancro em comparação com uma ou mais células não cancerosas normais. Com frequência, tais polipéptidos associados a membrana são mais abundantemente expressos na superfície das células de cancro em comparação com na superfície das células não cancerosas. A identificação de tais polipéptidos de antigénio de superfície celular associado a tumor ocasionou a capacidade de especificamente dirigir células de cancro para destruição via terapêuticas com base em anticorpo. Com relação a isso, nota-se que a terapêutica com base em anticorpo provou ser muito eficaz no tratamento de certos cancros. Por exemplo, HERCEPTIN® e RITUXAN® (ambos de Genentech Inc., South San Francisco, Califórnia) são anticorpos que têm sido usados com sucesso para tratar cancro de mama e linfoma não-Hodgkin, respetivamente. Mais especificamente, HERCEPTIN® é anticorpo monoclonal humanizado derivado de ADN recombinante, que seletivamente liga-se a o domínio extracelular do proto-oncogene do recetor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2). A sobre-expressão da proteína HER2 é observada em 25-30 % dos cancros de mama primários. RITUXAN® é um anticorpo monoclonal quimérico humano/murino modificado por engenharia genética dirigido contra o antigénio de CD20 encontrado na superfície dos linfócitos B normais e malignos. Ambos estes anticorpos são produzidos de forma recombinante em células CHO.

Em outras tentativas de descobrir alvos celulares eficazes para a terapêutica do cancro, investigadores têm procurado identificar (1) polipéptidos não associados a membrana que são especificamente produzidos por um ou mais tipo(s) particular(es) de célula(s) de cancro em comparação com um ou mais tipo(s) particular(es) de célula(s)

normal(is) não de cancro, (2) polipéptidos que são produzidos por células de cancro a um nível de expressão que é significativamente maior que aquele de uma ou mais células não cancerosas normais, ou (3) polipéptidos cuja expressão é especificamente limitada a somente um único (ou número muito limitada de diferente) tipo(s) de tecido em tanto no estado canceroso como não canceroso (por exemplo, tecido próstata normal e de próstata com tumor). Tais polipéptidos podem permanecer intracelularmente localizado ou pode ser segregado pela célula de cancro. Além disso, tais polipéptidos podem ser expressos não pela própria célula de cancro, mas ao invés disso por células que produzem e/ou segregam polipéptidos que tem um efeito de potenciação ou aumento do crescimento em células de cancro. Tais polipéptidos segregados são com frequência proteínas que fornecem células de cancro com uma vantagem de crescimento sobre as células normais e incluem tais coisas como, por exemplo, fatores angiogénicos, fatores de adesão celular, fatores de crescimento, e semelhantes. Seria esperado que a identificação de antagonistas de tais polipéptidos não associados à membrana servisse como agentes terapêuticos eficazes para o tratamento de tais cancros. Além disso, a identificação do padrão de expressão de tais polipéptidos seria útil para o diagnóstico de particulares cancros em mamíferos.

Apesar dos avanços identificados acima na terapêutica do cancro em mamíferos, existe uma grande necessidade de agentes terapêuticos adicionais capazes de detetar a presença de tumor num mamífero e para inibir efetivamente o crescimento de células neoplásicas, respetivamente. Consequentemente, é um objetivo do presente pedido identificar polipéptidos, polipéptidos associados a membrana celular, segregados ou intracelulares cuja expressão é especificamente limitada a somente um único (ou

número muito limitado de diferentes) tipo(s) de tecido, tecidos hematopoiéticos, tanto num estado canceroso como não canceroso, e a utilização daqueles polipéptidos, e os seus ácidos nucleicos codificantes, para produzir composições de matéria útil na deteção de tratamento terapêutico de cancro hematopoiético em mamíferos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A. Formas de Realização

Na presente memória descritiva, os depositantes descrevem pela primeira vez a identificação de vários polipéptidos celulares (e os seus ácidos nucleicos codificantes ou fragmentos dos mesmos) que são especificamente expressos tanto por células tumorais como normais de um tipo de célula específico, por exemplo, células geradas durante hematopoiese, isto é, linfócitos, leucócitos, eritrócitos e plaquetas. Todos os polipéptidos acima são, no presente documento, denominados como **T**umor **A**ntigénios de polipéptidos de **O**rigem **H**ematopoiética (polipéptidos "TAHO") e são esperados que sirvam como alvos eficazes para a terapêutica do cancro em mamíferos.

Consequentemente, o pedido descreve uma molécula de ácido nucleico isolada que tem uma sequência de nucleótidos que codifica um antigénio tumoral de polipéptido de origem hematopoiética (um polipéptido "TAHO") ou fragmento do mesmo.

Em certos aspetos, a molécula de ácido nucleico isolada compreende uma sequência de nucleótidos que tem pelo menos cerca de 80 % de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %,

92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % ou 100 % de identidade de sequência de ácido nucleico, a (a) uma molécula de ADN que codifica um polipéptido TAHO de comprimento total que tem uma sequência de aminoácidos como é revelado no presente documento, uma sequência de aminoácidos de polipéptido TAHO que não possui o péptido sinal como é revelado no presente documento, um domínio extracelular de um polipéptido TAHO transmembrana, com ou sem o péptido sinal, como é revelado no presente documento ou qualquer outro fragmento especificamente definido de uma sequência de aminoácidos de polipéptido TAHO de comprimento total como é revelado no presente documento, ou (b) o complemento da molécula de ADN de (a).

Em outros aspetos, a molécula de ácido nucleico isolada compreende uma sequência de nucleótidos que tem pelo menos cerca de 80 % de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % ou 100 % de identidade de sequência de ácido nucleico, a (a) uma molécula de ADN que compreende a sequência codificante de um ADNc de polipéptido TAHO de comprimento total como é revelado no presente documento, a sequência codificante de um polipéptido TAHO que não possui o péptido sinal como é revelado no presente documento, a sequência codificante de um domínio extracelular de um polipéptido TAHO transmembrana, com ou sem o péptido sinal, como é revelado no presente documento ou a sequência codificante de qualquer outro fragmento especificamente definido da sequência de aminoácidos de polipéptido TAHO de comprimento total como é revelado no presente documento, ou (b) o complemento da molécula de ADN de (a).

Em aspetos adicionais, o pedido descreve uma molécula

de ácido nucleico isolada que compreende uma sequência de nucleótidos que tem pelo menos cerca de 80 % de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % ou 100 % de identidade de sequência de ácido nucleico, a (a) uma molécula de ADN que codifica o mesmo polipéptido maduro codificado pela região codificante de comprimento total de qualquer dos ADNc de proteína humana depositados com o ATCC como é revelado no presente documento, ou (b) o complemento da molécula de ADN de (a).

O pedido também descreve uma molécula de ácido nucleico isolada que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido TAHO que é desprovido de domínio transmembrana ou tem o domínio transmembrana inativado, ou é complementar a tal sequência de nucleótidos codificante, em que o(s) domínio(s) transmembrana(s) de tal(is) polipéptido(s) é/são revelados no presente documento. Portanto, domínios extracelulares solúveis dos polipéptidos TAHO descritos no presente documento são contemplados.

O pedido também descreve moléculas de ácido nucleico isoladas que hibridam com (a) uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido TAHO que tem uma sequência de aminoácidos de comprimento total como é revelado no presente documento, uma sequência de aminoácidos de polipéptido TAHO que não possui o péptido sinal como é revelado no presente documento, um domínio extracelular de um polipéptido TAHO transmembrana, com ou sem o péptido sinal, como é revelado no presente documento ou qualquer outro fragmento especificamente definido de uma sequência de aminoácidos de polipéptido TAHO de comprimento total como é revelado no presente documento, ou (b) o complemento

da sequência de nucleótidos de (a). Com relação a isso, os fragmentos de uma sequência codificante de polipéptido TAHO de comprimento total, ou o complemento dos mesmos, como é revelado no presente documento, pode ser útil como, por exemplo, sondas de hibridação úteis como, por exemplo, sondas de deteção, sondas de oligonucleótido antissense, ou para codificar fragmentos de um polipéptido TAHO de comprimento total que pode codificar opcionalmente um polipéptido que compreende um local de ligação para um anticorpo anti-polipéptido TAHO, um oligopéptido de ligação a TAHO ou outra molécula orgânica pequena que se liga a polipéptido TAHO. Tais fragmentos de ácido nucleico são usualmente pelo menos de cerca de 5 nucleótidos em comprimento, alternativamente pelo menos de cerca de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, ou 1000 nucleótidos em comprimento, em que neste contexto o termo “cerca de” significa o comprimento de sequência de nucleótidos de referência mais ou menos 10 % desse comprimento de referência. É notado que novos fragmentos de uma sequência de nucleótidos codificante de polipéptido TAHO podem ser determinados de uma maneira de rotina por meio do alinhamento da sequência de nucleótidos codificante de polipéptido TAHO com outras sequências de nucleótidos conhecidas usando qualquer de uma série de programas de alinhamento de sequências bem conhecidos e determinação de

qual(is) fragmento(s) de sequência de nucleótidos codificante de polipéptido TAHO é/são novos. Todos de tais novos fragmentos de sequências de nucleótidos codificantes de polipéptido TAHO são contemplados no presente documento. Também se contemplam os fragmentos de polipéptido TAHO codificados por estes fragmentos de molécula de nucleótidos, preferentemente aqueles fragmentos de polipéptido TAHO que compreendem um local de ligação para um anticorpo anti-TAHO, um oligopéptido de ligação a TAHO ou outra molécula orgânica pequena que se liga a um polipéptido TAHO.

O pedido também descreve polipéptidos TAHO isolados codificados por quaisquer das sequências de ácido nucleico isoladas identificadas acima no presente documento.

O pedido também descreve um polipéptido TAHO isolado, que compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos de cerca de 80 % de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos de cerca de 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % ou 100 % de identidade de sequência de aminoácidos, a um polipéptido TAHO que tem uma sequência de aminoácidos de comprimento total como é revelado no presente documento, uma sequência de aminoácidos de polipéptido TAHO que não possui o péptido sinal como é revelado no presente documento, um domínio extracelular de uma proteína de polipéptido TAHO transmembrana, com ou sem o péptido sinal, como é revelado no presente documento, uma sequência de aminoácidos codificados por quaisquer das sequências de ácido nucleico reveladas no presente documento ou qualquer outro fragmento especificamente definido de uma sequência de aminoácidos de polipéptido TAHO de comprimento total como é revelado no presente documento.

O pedido também descreve um polipéptido TAHO isolado que compreende uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos de cerca de 80 % de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos de cerca de 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, ou 99 % de identidade de sequência de aminoácidos, a uma sequência de aminoácidos codificados por quaisquer dos ADNc de proteína humana depositados com o ATCC como é revelado no presente documento.

O pedido descreve mais especificamente um polipéptido TAHO isolado sem a sequência sinal N-terminal e/ou sem a metionina de iniciação e é codificado por uma sequência de nucleótidos que codifica tal sequência de aminoácidos como foi descrito anteriormente no presente documento. Os processos para produzir o mesmo são também descritos no presente documento, em que aqueles processos compreendem cultivar uma célula hospedeira que compreende um vetor que compreende a molécula de ácido nucleico codificante apropriada sob condições adequadas para a expressão do polipéptido TAHO e recuperar o polipéptido TAHO da cultura celular.

Também se descreve um polipéptido TAHO isolado que é desprovido do domínio transmembrana ou tem o domínio transmembrana inativado. Os processos para produzir o mesmo são também descritos no presente documento, em que aqueles processos compreendem cultivar uma célula hospedeira que compreende um vetor que compreende a molécula de ácido nucleico codificante apropriada sob condições adequadas para a expressão do polipéptido TAHO e recuperar o polipéptido TAHO da cultura celular.

O pedido descreve ainda vetores que compreendem ADN

que codifica quaisquer dos polipéptidos descritos no presente documento. Células hospedeiras que compreendem qualquer tal vetor são também proporcionadas. Por meio de exemplo, as células hospedeiras podem ser células CHO, células de *E. coli*, ou células de levedura. Um processo para produzir quaisquer dos polipéptidos descritos no presente documento é ainda proporcionado e compreende cultivar células hospedeiras sob condições adequadas para a expressão do polipéptido desejado e recuperar o polipéptido desejado da cultura celular.

Também se descrevem polipéptidos quiméricos isolados que compreendem quaisquer dos polipéptidos TAHO descritos no presente documento fusionados a um polipéptido heterólogo (não TAHO). Exemplos de tais moléculas quiméricas compreendem quaisquer dos polipéptidos TAHO descritos no presente documento fusionados a um polipéptido heterólogo tal como, por exemplo, uma sequência de etiqueta de epítopo ou uma região Fc de uma imunoglobulina.

A invenção proporciona um anticorpo que se liga, preferentemente especificamente, a um polipéptido que tem a sequência de aminoácidos da Figura 10, com ou sem seu péptido sinal associado, para utilização de acordo com as reivindicações. Opcionalmente, o anticorpo é um anticorpo monoclonal, fragmento de anticorpo, anticorpo quimérico, anticorpo humanizado, anticorpo de cadeia simples ou anticorpo que inibe competitivamente a ligação de um anticorpo anti-polipéptido TAHO ao seu respetivo epítopo antigénico. Os anticorpos para utilização na presente invenção são conjugados a um agente de inibição do crescimento ou agente citotóxico tal como uma toxina, incluindo, por exemplo, um maitansinoide ou caliqueamicina, um antibiótico, um isótopo radioativo, uma enzima nucleolítica, ou similares. Os anticorpos úteis na presente

invenção podem opcionalmente ser produzidos em células CHO ou células bacterianas e preferentemente induzem a morte de uma célula à qual se ligam. Para propósitos de deteção, os anticorpos podem ser marcados de modo detetável, unidos a um suporte sólido, ou similares.

Também se descrevem vetores que compreendem ADN que codifica quaisquer dos anticorpos descritos no presente documento. As células hospedeiras que compreendem qualquer tal vetor são também proporcionadas. Por meio de exemplo, as células hospedeiras podem ser células CHO, células de *E. coli*, ou células de levedura. Um processo para produzir quaisquer dos anticorpos descritos no presente documento é ainda proporcionado e compreende cultivar células hospedeiras sob condições adequadas para a expressão do anticorpo desejado e recuperar o anticorpo desejado da cultura celular.

Também se descrevem oligopéptidos ("oligopéptidos de ligação a TAHO") que se ligam, preferentemente especificamente, a quaisquer dos polipéptidos TAHO descritos acima ou a seguir. Opcionalmente, os oligopéptidos de ligação a TAHO da presente invenção podem ser conjugados a um agente de inibição do crescimento ou agente citotóxico tal como uma toxina, incluindo, por exemplo, um maitansinoide ou caliqueamicina, um antibiótico, um isótopo radioativo, uma enzima nucleolítica, ou similares. Os oligopéptidos de ligação a TAHO da presente invenção podem opcionalmente ser produzidos em células CHO ou células bacterianas e preferentemente induzem a morte de uma célula à qual se ligam. Para propósitos de deteção, os oligopéptidos de ligação a TAHO da presente invenção podem ser marcados de modo detetável, unidos a um suporte sólido, ou similares.

Também se descrevem vetores que compreendem ADN que codifica quaisquer dos oligopéptidos de ligação a TAHO descritos no presente documento. As células hospedeiras que compreendem qualquer tal vetor são também proporcionadas. Por meio de exemplo, as células hospedeiras podem ser células CHO, células de *E. coli*, ou células de levedura. Um processo para produzir quaisquer dos oligopéptidos de ligação a TAHO descritos no presente documento é ainda proporcionado e compreende cultivar células hospedeiras sob condições adequadas para a expressão do oligopéptido desejado e recuperar o oligopéptido desejado da cultura celular.

Descrevem-se ainda moléculas orgânicas pequenas ("moléculas orgânicas de ligação a TAHO") que se ligam, preferentemente especificamente, a quaisquer dos polipéptidos TAHO descritos acima ou a seguir. Opcionalmente, as moléculas orgânicas de ligação a TAHO podem ser conjugadas a um agente de inibição do crescimento ou agente citotóxico tal como uma toxina, incluindo, por exemplo, um maitansinoide ou caliqueamicina, um antibiótico, um isótopo radioativo, uma enzima nucleolítica, ou similares. As moléculas orgânicas de ligação a TAHO preferentemente induzem a morte de uma célula à qual se ligam. Para propósitos de deteção, as moléculas orgânicas de ligação a TAHO podem ser marcados de modo detetável, unidos a um suporte sólido, ou similares.

Também se descreve ainda uma composição de matéria que compreende um polipéptido TAHO como descrito no presente documento, um polipéptido TAHO quimérico como descrito no presente documento, um anticorpo anti-TAHO como descrito no presente documento, um oligopéptido de ligação a TAHO como descrito no presente documento, ou uma molécula orgânica de ligação a TAHO como descrito no presente documento, em

combinação com um portador. Opcionalmente, o portador é um portador farmaceuticamente aceitável.

Descreve-se ainda um artigo industrializado que compreende um recipiente e uma composição de matéria contida dentro do recipiente, em que a composição de matéria pode compreender um polipéptido TAHO como descrito no presente documento, um polipéptido TAHO quimérico como descrito no presente documento, um anticorpo anti-TAHO como descrito no presente documento, um oligopéptido de ligação a TAHO como descrito no presente documento, ou uma molécula orgânica de ligação a TAHO como descrito no presente documento. O artigo pode opcionalmente compreender ainda um marcador fixo ao recipiente, ou uma bula incluída com o recipiente, que se refere à utilização da composição de matéria para o tratamento terapêutico.

Uma forma de realização da presente invenção refere-se à utilização de um anticorpo anti-polipéptido TAHO, como descrito nas reivindicações para a preparação de um medicamento para o tratamento de linfoma folicular, linfoma de célula de manto, ou linfoma de célula grande difusa, em que dito anticorpo é conjugado a um agente de inibição do crescimento ou agente citotóxico e é internalizado por e inibe o crescimento de uma célula de linfoma folicular, célula de linfoma de célula de manto ou célula de linfoma de célula grande difusa que expressa dito polipéptido.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 9 mostra uma sequência de nucleótidos (SEQ ID NO:9) de um ADNc de TAHO5 (PRO36249), em que SEQ ID NO: 9 é um clone designado no presente documento como "DNA225786" (também referido no presente documento como "CD79B").

A Figura 10 mostra a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:10) derivada da sequência codificante de SEQ ID NO:9 mostrada na Figura 9.

As Figuras 77A-77D mostram dados de microarranjo que mostram a expressão de TAHO5 em amostras normais e em amostras doentes, tal como expressão significativa em amostras NHL. As abreviações usadas nas Figuras são designadas como se segue: Linfoma Não-Hodgkin (NHL), linfoma folicular (FL), nódulo linfático normal (NLN), células B normais (NB), células de mieloma múltiplo (MM), intestino delgado (intestino d.), fígado fetal (fígado f.), músculo liso (músculo l.), cérebro fetal (cérebro f.), células assassinas naturais (NK), neutrófilos (N'phil), dendrócitos (DC), células B de memória (mem B), células plasmáticas (PC), células plasmáticas de medula óssea (BM PC).

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FORMAS DE REALIZAÇÃO PREFERIDAS

I. Definições

Os termos "polipéptido TAHO" e "TAHO" como usado no presente documento e quando imediatamente seguido por uma designação numérica, referem-se a vários polipéptidos, em que a designação completa (ou seja, TAHO/número) designa sequências de polipéptidos específicas conforme descrito no presente. As expressões "TAHO/polipéptido número" e "TAHO/número", em que o termo "número" é proporcionado na forma de designação numérica real da forma utilizada no presente, abrange polipéptidos de sequência nativa, variantes de polipéptidos e fragmentos de polipéptidos de sequência nativa e variantes de polipéptidos (que são adicionalmente definidos no presente documento). Os

polipéptidos TAHO descritos no presente documento podem ser isolados a partir de uma série de fontes, tais como a partir de tipos de tecidos humanos ou de outra fonte, ou preparados por meio de métodos sintéticos e/ou recombinantes. A expressão "polipéptido TAHO" designa cada polipéptido TAHO/número individual descrito no presente documento. Todas as descrições na presente memória descritiva referentes ao "polipéptido TAHO" designam cada um dos polipéptidos individual e coletivamente. Descrições, por exemplo, da preparação, purificação, derivação, formação de anticorpos para ou contra, formação de oligopéptidos de ligação a TAHO para ou contra, formação de moléculas orgânicas de união de TAHO para ou contra, administração de, composições que contêm, tratamento de doença com etc. referem-se a cada polipéptido de acordo com a presente invenção individualmente. A expressão "polipéptido TAHO" também inclui variantes dos polipéptidos TAHO/número descritos no presente documento.

"TAHO1" é também no presente documento denominado como "RP105", "CD180" ou "LY64". "TAHO2" é também no presente documento denominado como "CD20" ou "MS4A1". "TAHO3" é também no presente documento denominado como "FcRH2" ou "SPAP1". "TAHO4" é também no presente documento denominado como "CD79A". "TAHO5" é também no presente documento denominado como "CD79B". "TAHO6" é também no presente documento denominado como "CR2" ou "CD21". "TAHO7" é também no presente documento denominado como "CCR6". "TAHO8" é também no presente documento denominado como "CD72". "TAHO9" é também no presente documento denominado como "P2RX5" ou "UNQ2170". "TAHO10" é também no presente documento denominado como "HLA-DOB". "TAHO11" é também no presente documento denominado como "CXCR5" ou "BLR1". "TAHO12" é também no presente documento denominado como "FCER2" ou "CD23". "TAHO13" é também no presente documento

denominado como "GPR2" ou "UNQ12100". "TAHO14" é também no presente documento denominado como "BTig". "TAHO15" é também no presente documento denominado como "NAG14" ou "LRRC4". "TAHO16" é também no presente documento denominado como "SLGC16270". "TAHO17" é também no presente documento denominado como "FcRH1" ou "IRTA5". "TAHO18" é também no presente documento denominado como "IRTA2" ou "FcRH5". "TAHO19" é também no presente documento denominado como "ATWD578". "TAHO20" é também no presente documento denominado como "FcRH3" ou "IRTA3". "TAHO21" é também no presente documento denominado como "IRTA1" ou "FcRH4". "TAHO22" é também no presente documento denominado como "FcRH6" ou "FAIL". "TAHO23" é também no presente documento denominado como "BCMA". "TAHO24" é também no presente documento denominado como "239287_at". "TAHO25" é também no presente documento denominado como "CD19". "TAHO26" é também no presente documento denominado como "CD22". "TAHO27" é também no presente documento denominado como "CXCR3" ou "UNQ8371". "TAHO28" é também no presente documento denominado como "SILV" ou "UNQ 1747". "TAHO29" é também no presente documento denominado como "KCNK4" ou "UNQ11492". "TAHO30" é também no presente documento denominado como "CXorf1" ou "UNQ9197". "TAHO31" é também no presente documento denominado como "LRRN5" ou "UNQ256". "TAHO32" é também no presente documento denominado como "UNQ9308". "TAHO33" é também no presente documento denominado como "IGSF4B" ou "UNQ225". "TAHO34" é também no presente documento denominado como "BC021178" ou "UNQ13267". "TAHO35" é também no presente documento denominado como "FLJ12681" ou "UNQ6034". "TAHO36" é também no presente documento denominado como "I_928646" ou "UNQ12376".

Um "polipéptido TAHO de sequência nativa" compreende polipéptido que contém a mesma sequência de aminoácidos do

polipéptido TAHO correspondente derivado da natureza. Esses polipéptidos TAHO de sequência nativa podem ser isolados da natureza ou podem ser produzidos por meios sintéticos ou recombinantes. A expressão "polipéptido TAHO de sequência nativa" abrange especificamente formas segregadas ou truncadas de ocorrência natural do polipéptido TAHO específico (tais como sequência de domínio extracelular), formas variantes de ocorrência natural (tais como formas alternativamente divididas) e variantes alélicas de ocorrência natural do polipéptido. Em certas realizações da presente invenção, os polipéptidos TAHO de sequência nativa descritos no presente são polipéptidos de sequência nativa maduros ou de comprimento total que compreendem as sequências de aminoácidos de comprimento total exibidas nas figuras anexas. Codões de início e de parada (se forem indicados) são exibidos em negrito e sublinhados nas figuras. Os resíduos de ácido nucleico indicados como "N" nas figuras anexas são quaisquer resíduos de ácido nucleico. Embora se demonstre que os polipéptidos TAHO descritos nas figuras anexas começam com resíduos de metionina denominados no presente posição de aminoácido 1 nas figuras, é possível e concebível que outros resíduos de metionina localizados acima ou abaixo no fluxo a partir da posição de aminoácido 1 nas figuras possam ser utilizados como o resíduo de aminoácido inicial para os polipéptidos TAHO.

O "domínio extracelular" ou "ECD" de polipéptido TAHO designa uma forma do polipéptido TAHO que é essencialmente livre dos domínios citoplasmáticos e de transmembrana. Normalmente, ECD de polipéptido TAHO conterá menos de 1 % desses domínios citoplasmáticos e/ou de transmembrana e, preferencialmente, conterá menos de cerca de 0,5 % desses domínios. Compreender-se-á que quaisquer domínios de transmembrana identificados para os polipéptidos TAHO do

presente pedido são identificados de acordo com critérios rotineiramente utilizados na técnica para identificar aquele tipo de domínio hidrofóbico. As fronteiras exatas de domínio transmembrana podem variar, mas, muito provavelmente, em não mais de cerca de cinco aminoácidos em cada extremidade do domínio, conforme identificado inicialmente no presente documento. Opcionalmente, portanto, domínio extracelular de polipéptido TAHO pode conter cerca de cinco ou menos aminoácidos sobre cada lado da fronteira entre domínio de transmembrana e domínio extracelular, conforme identificado nos Exemplos ou na memória descritiva e esses polipéptidos, com ou sem o péptido de sinal associado e ácido nucleico que os codifica, são contemplados pelo presente pedido.

A localização aproximada dos "péptidos de sinal" dos diversos polipéptidos TAHO descritos no presente pode ser exibida na presente memória descritiva e/ou nas figuras anexas. Observa-se, entretanto, que a fronteira C-terminal de péptido de sinal pode variar, mas mais provavelmente em não mais de cerca de cinco aminoácidos sobre cada lado da fronteira C-terminal de péptido de sinal conforme identificado inicialmente no presente documento, em que a fronteira C-terminal do péptido de sinal pode ser identificada de acordo com critérios utilizados rotineiramente na técnica para identificar aquele tipo de elemento de sequência de aminoácidos (tal como Nielsen *et al., Prot. Eng.* 10: 1-6 (1997) e von Heinje *et al., Nucl. Acids. Res.* 14: 4683-4690 (1986)). Além disso, também se reconhece que, em alguns casos, a divisão de sequência de sinal de polipéptido segregado não é totalmente uniforme, o que resulta em mais de uma substância segregada. Estes polipéptidos maduros, em que o péptido de sinal é dividido em não mais de cerca de cinco aminoácidos sobre cada lado da fronteira C-terminal do péptido de sinal conforme

identificado no presente documento, e os polinucleótidos que os codificam são contemplados pelo presente pedido.

"Variante de polipéptido TAHO" indica polipéptido TAHO, preferencialmente polipéptido TAHO ativo, conforme definido no presente documento, que possui pelo menos de cerca de 80 % de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de polipéptidos TAHO de sequência nativa de comprimento total conforme descrito no presente documento, sequência de polipéptidos TAHO que não contém o péptido de sinal conforme descrito no presente documento, domínio extracelular de polipéptido TAHO, com ou sem o péptido de sinal conforme descrito no presente ou qualquer outro fragmento de sequência de polipéptidos TAHO de comprimento total conforme descrito no presente (tal como os codificados por ácido nucleico que representa somente uma parte da sequência de codificação completa para polipéptido TAHO de comprimento total). Essas variantes de polipéptidos TAHO incluem, por exemplo, polipéptidos TAHO em que são adicionados ou excluídos um ou mais resíduos de aminoácidos no terminal N ou C da sequência de aminoácidos nativa de comprimento total. Normalmente, variante de polipéptido TAHO possuirá pelo menos de cerca de 80 % de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos de cerca de 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % de identidade de sequência de aminoácidos para sequência de polipéptidos TAHO de sequência nativa de comprimento total conforme descrito no presente documento, sequência de polipéptidos TAHO que não contém o péptido de sinal conforme descrito no presente documento, domínio extracelular de polipéptido TAHO com ou sem o péptido de sinal conforme descrito no presente ou qualquer outro fragmento especificamente definido de sequência de polipéptidos TAHO de comprimento total conforme descrito no

presente documento. Normalmente, os polipéptidos variantes TAHO possuem pelo menos de cerca de dez aminoácidos de comprimento, alternativamente pelo menos de cerca de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100; 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200; 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300; 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400; 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500; 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600 aminoácidos de comprimento ou mais. Opcionalmente, os polipéptidos variantes TAHO possuirão não mais de uma substituição de aminoácido conservadora em comparação com a sequência de polipéptidos TAHO nativa, alternativamente não mais de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 substituições de aminoácidos conservadoras em comparação com a sequência de polipéptidos TAHO nativa.

"Percentual (%) de identidade de sequência de aminoácidos", com relação às sequências de polipéptidos TAHO identificadas no presente documento, é definido como o percentual de resíduos de aminoácidos em possível sequência que são idênticos aos resíduos de aminoácidos na sequência de polipéptidos TAHO especifica, após o alinhamento das sequências e introdução de intervalos, se necessário, para atingir o percentual máximo de identidade de sequências, sem considerar nenhuma substituição conservadora como parte da identidade de sequências. O alinhamento para propósitos de determinação do percentual de identidade de sequências de aminoácidos pode ser atingido de várias formas que se encontram dentro do conhecimento da técnica, utilizando, por exemplo, software de computador disponível ao público, tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN ou Megalign (DNASTAR). Os técnicos no assunto podem determinar parâmetros apropriados para medir o alinhamento, incluindo quaisquer algoritmos necessários para atingir o alinhamento máximo ao longo do comprimento total das sequências sendo

comparadas. Para os propósitos do presente documento, entretanto, valores de percentual de identidade de sequências de aminoácidos são gerados utilizando o programa de computador de comparação de sequências ALIGN-2, em que o código fonte completo para o programa ALIGN-2 é proporcionado no Quadro 1 a seguir. O programa de computador de comparação de sequências ALIGN-2 foi elaborado pela Genentech, Inc. e o código fonte exibido no Quadro 1 abaixo foi depositado com documentação de usuário no Escritório Norte-Americano de Direitos Autorais, Washington DC 20559, Estados Unidos, onde foi registrado com o nº de Registro de Direitos Autorais Norte-Americano TXU510087. O programa ALIGN-2 é disponível ao público por meio da Genentech, Inc., South San Francisco, Califórnia, ou pode ser compilado a partir do código fonte proporcionado no Quadro 1 a seguir. O programa ALIGN-2 deverá ser compilado para uso em sistema operativo UNIX, preferencialmente UNIX digital V4.0D. Todos os parâmetros de comparação de sequências são estabelecidos pelo programa ALIGN-2 e não variam.

Em situações em que ALIGN-2 é utilizado para comparações de sequências de aminoácidos, o percentual de identidade de sequências de aminoácidos de uma dada sequência de aminoácidos A para, com ou contra uma dada sequência de aminoácidos B (que pode ser alternativamente expressa como dada sequência de aminoácidos A que possui ou compreende certo percentual de identidade de sequências de aminoácidos para, com ou contra uma dada sequência de aminoácidos B) é calculado como se segue:

100 vezes a fração X/Y

em que X é a quantidade de resíduos de aminoácidos avaliados como coincidências idênticas pelo programa de

alinhamento de sequências ALIGN-2 no alinhamento de A e B naquele programa e em que Y é a quantidade total de resíduos de aminoácidos em B. Apreciar-se-á que, quando o comprimento da sequência de aminoácidos A não for igual ao comprimento da sequência de aminoácidos B, o percentual de identidade de sequências de aminoácidos de A para B não será igual ao percentual de identidade de sequências de aminoácidos de B para A. Como exemplos de cálculos de percentuais de identidade de sequências de aminoácidos utilizando este método, as Tabelas 2 e 3 demonstram como calcular o percentual de identidade de sequências de aminoácidos da sequência de aminoácidos denominada "Proteína de Comparação" e a sequência de aminoácidos denominada "TAHO", em que "TAHO" representa a sequência de aminoácidos de polipéptido TAHO hipotético de interesse, "Proteína de Comparação" representa a sequência de aminoácidos de polipéptido com o qual o polipéptido "TAHO" de interesse está sendo comparado e cada um dentre "X", "Y" e "Z" representa diferentes resíduos de aminoácidos hipotéticos. A menos que especificado especificamente em contrário, todos os valores percentuais de identidade de sequências de aminoácidos utilizados no presente são obtidos conforme descrito no parágrafo imediatamente anterior, utilizando o programa de computador ALIGN-2.

"Polipéptido variante TAHO" ou "sequência de ácido nucleico variante TAHO" indica molécula de ácido nucleico que codifica polipéptido TAHO, preferencialmente polipéptido TAHO ativo, conforme definido no presente documento, que possui pelo menos de cerca de 80 % de identidade de sequência de ácido nucleico com sequência de ácido nucleico que codifica sequência de polipéptidos TAHO de sequência nativa e comprimento total conforme descrito no presente documento, sequência de polipéptidos TAHO de sequência nativa e comprimento total que não contém o

péptido de sinal conforme descrito no presente documento, domínio extracelular de polipéptido TAHO, com ou sem o péptido de sinal conforme descrito no presente ou qualquer outro fragmento de sequência de polipéptidos TAHO de comprimento total conforme descrito no presente (tal como os codificados por ácido nucleico que representa somente uma parte da sequência de codificação completa para polipéptido TAHO de comprimento total). Normalmente, polipéptido variante TAHO possuirá pelo menos de cerca de 80 % de identidade de sequência de ácidos nucleicos, alternativamente pelo menos de cerca de 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % de identidade de sequência de ácidos nucleicos para sequência de ácidos nucleicos que codifica sequência de polipéptidos TAHO de sequência nativa e comprimento total conforme descrito no presente documento, sequência de polipéptidos TAHO de sequência nativa e comprimento total que não contém o péptido de sinal conforme descrito no presente documento, domínio extracelular de polipéptido TAHO com ou sem a sequência de sinal conforme descrito no presente ou qualquer outro fragmento especificamente definido de sequência de polipéptidos TAHO de comprimento total conforme descrito no presente documento. As variantes não englobam a sequência de nucleótidos nativa.

Normalmente, os polinucleótidos variantes de TAHO possuem menos de cerca de cinco nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos de cerca de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60,65,70,75,80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460,

470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, ou 1000 nucleótidos em comprimento, em que neste contexto o termo "cerca de" significa o comprimento de sequência de nucleótidos de referência mais ou menos 10 % desse comprimento de referência.

"Percentual (%) de identidade de sequência de ácidos nucleicos", com relação às sequências de ácidos nucleicos codificadoras de TAHO identificadas no presente documento, é definido como o percentual de nucleótidos em possível sequência que são idênticos aos nucleótidos na sequência de ácidos nucleicos de TAHO de interesse, após o alinhamento das sequências e introdução de intervalos, se necessário, para atingir o percentual máximo de identidade de sequências. O alinhamento para propósitos de determinação do percentual de identidade de sequências de ácido nucleico pode ser atingido de várias formas que se encontram dentro do conhecimento da técnica, utilizando, por exemplo, software de computador disponível ao público, tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN ou Megalign (DNASTAR). Para os propósitos do presente documento, entretanto, valores de percentual de identidade de sequências de ácidos nucleicos são gerados utilizando o programa de computador de comparação de sequências ALIGN-2, em que o código fonte completo para o programa ALIGN-2 é proporcionado no Quadro 1 a seguir. O programa de computador de comparação de sequências ALIGN-2 foi elaborado pela Genentech, Inc. e o código fonte exibido no Quadro 1 abaixo foi depositado com documentação de usuário no Escritório Norte-Americano de Direitos Autorais, Washington DC 20559, Estados Unidos, onde foi registrado com o nº de Registro de Direitos

Autorais Norte-Americano TXU510087. O programa ALIGN-2 é disponível ao público por meio da Genentech, Inc., South San Francisco, Califórnia, ou pode ser compilado a partir do código fonte proporcionado no Quadro 1 a seguir. O programa ALIGN-2 deverá ser compilado para uso em sistema operativo UNIX, preferencialmente UNIX digital V4.0D. Todos os parâmetros de comparação de sequências são estabelecidos pelo programa ALIGN-2 e não variam.

Em situações em que ALIGN-2 é utilizado para comparações de sequências de ácidos nucleicos, o percentual de identidade de sequências de ácidos nucleicos de uma dada sequência de ácidos nucleicos C para, com ou contra uma dada sequência de ácidos nucleicos D (que pode ser alternativamente expressa como dada sequência de ácidos nucleicos C que possui ou compreende certo percentual de identidade de sequências de ácidos nucleicos para, com ou contra uma dada sequência de ácidos nucleicos D) é calculado como se segue:

100 vezes a fração W/Z

em que W é a quantidade de nucleótidos avaliados como coincidências idênticas pelo programa de alinhamento de sequências ALIGN-2 no alinhamento de C e D naquele programa e em que Z é a quantidade total de nucleótidos em D. Apreciar-se-á que, quando o comprimento da sequência de ácidos nucleicos C não for igual ao comprimento da sequência de ácidos nucleicos D, o percentual de identidade de sequências de ácidos nucleicos de C para D não será igual ao percentual de identidade de sequências de ácidos nucleicos de D para C. Como exemplos de cálculos de percentuais de identidade de sequências de ácidos nucleicos, as Tabelas 4 e 5 demonstram como calcular o percentual de identidade de sequências de ácidos nucleicos

da sequência de ácidos nucleicos denominada "ADN de Comparação" para a sequência de ácidos nucleicos denominada "TAHO-ADN", em que "TAHO-ADN" representa a sequência de ácidos nucleicos codificadora de TAHO hipotética de interesse, "ADN de Comparação" representa a sequência de nucleótidos de molécula de ácido nucleico com a qual a molécula de ácido nucleico "TAHO-ADN" de interesse está sendo comparada e cada um dentre "N", "L" e "V" representa nucleótidos hipotéticos diferentes. A menos que especificado especificamente em contrário, todos os valores percentuais de identidade de sequências de ácidos nucleicos utilizados no presente são obtidos conforme descrito no parágrafo imediatamente anterior, utilizando o programa de computador ALIGN-2.

Em outras formas de realização, os polinucleótidos variantes de TAHO são moléculas de ácido nucleico que codificam polipéptido TAHO e que são capazes de hibridização, preferencialmente sob condições de lavagem e hibridização restringentes, em sequências de nucleótidos que codificam polipéptido TAHO de comprimento total conforme descrito no presente documento. Polipéptidos variantes de TAHO podem ser aqueles que são codificados por polinucleótido variante de TAHO.

A expressão "região de codificação de comprimento total", quando utilizada em referência a ácido nucleico que codifica polipéptido TAHO, designa a sequência de nucleótidos que codificam o polipéptido TAHO de comprimento total do pedido (que frequentemente é exibida entre codões de início e de parada, inclusive, nas figuras anexas). A expressão "região de codificação de comprimento total", da forma utilizada com referência a ácido nucleico depositado na ATCC, designa a parte do ADNc que codifica polipéptido TAHO que é inserida no vetor depositado na ATCC (que

frequentemente é exibida entre codões de início e de parada, inclusive do mesmo, nas figuras anexas (codões de início e de parada estão em negrito e sublinhados nas figuras)).

"Isolado", quando utilizado para descrever os vários polipéptidos TAHO descritos no presente documento, indica polipéptido que foi identificado e separado e/ou recuperado a partir de componente do seu ambiente natural. Os componentes contaminantes do seu ambiente natural são materiais que tipicamente interfeririam com utilizações terapêuticas para o polipéptido e podem incluir enzimas, hormonas e outros solutos proteáceos ou não proteáceos. Em formas de realização preferidas, o polipéptido será purificado (1) até grau suficiente para a obtenção de pelo menos quinze resíduos de sequência de aminoácidos interna ou N-terminal, utilizando sequenciador de xícaras de centrifugação; ou (3) até a homogeneidade, por meio de SDS-PAGE, sob condições redutoras ou não redutoras, utilizando azul de Coomassie ou, preferivelmente, manchas de prata. O polipéptido isolado inclui o polipéptido *in situ* em células recombinantes, já que pelo menos um componente do ambiente natural do polipéptido TAHO não estará presente. Normalmente, entretanto, o polipéptido isolado será preparado por meio de pelo menos uma etapa de purificação.

Ácido nucleico codificador de polipéptido TAHO "isolado" ou outro ácido nucleico codificador de polipéptido é molécula de ácido nucleico que é identificada e separada de pelo menos uma molécula de ácido nucleico contaminante com a qual normalmente é associada na fonte natural do ácido nucleico codificador de polipéptido. Uma molécula de ácido nucleico codificadora de polipéptido isolada é diferente na forma ou ambiente em que é encontrada na natureza. As moléculas de ácido nucleico

codificadoras de polipéptidos isoladas são diferenciadas, portanto, da molécula de ácido nucleico codificadora de polipéptido específica que existe em células naturais. Molécula de ácido nucleico codificadora de polipéptido isolada inclui, entretanto, moléculas de ácido nucleico codificadoras de polipéptido contidas em células que normalmente expressam o polipéptido no qual, por exemplo, a molécula de ácido nucleico encontra-se em local cromossômico diferente de células naturais.

A expressão "sequências de controlo" designa sequências de ADN necessárias para a expressão de sequência de codificação ligada operativamente em organismo hospedeiro específico. As sequências de controlo que são apropriadas para procariotas, por exemplo, incluem promotor, opcionalmente sequência de operadores, e local de união de ribossomas. As células eucarióticas são conhecidas por utilizarem promotores, sinais de poliadenilação e aprimoradores.

Ácido nucleico é "ligado operativamente" quando é colocado em relação funcional com outra sequência de ácido nucleico. ADN para sequência prévia ou líder de secreção, por exemplo, é ligado operativamente a ADN para polipéptido caso seja expresso na forma de proteína prévia que participa da secreção do polipéptido; promotor ou amplificador é ligado operativamente a sequência de codificação caso afete a transcrição da sequência; ou local de união de ribossomas é ligado operativamente a sequência de codificação caso seja posicionado de forma a possibilitar a tradução. Geralmente, "ligado operativamente" indica que as sequências de ADN que estão ligadas são contíguas e, no caso de líder de secreção, contíguas e em fase de leitura. Os aprimoradores, entretanto, não necessitam ser contíguos. A ligação é

obtida por meio de ligação em locais de restrição convenientes. Caso estes locais não existam, os adaptadores de oligonucleótidos sintéticos ou ligantes são utilizados de acordo com a prática convencional.

A "restringência" das reações de hibridação pode ser facilmente determinada pelos peritos ordinários na especialidade e geralmente é cálculo empírico dependente do comprimento da sonda, temperatura de lavagem e concentração de sal. De forma geral, sondas mais compridas necessitam de temperaturas mais altas para combinação apropriada, enquanto sondas mais curtas necessitam de temperaturas mais baixas. A hibridação geralmente depende da capacidade de recombinação de ADN desnaturado quando cadeias complementares estiverem presentes em ambiente abaixo da sua temperatura de fusão. Quanto mais alto o grau de homologia desejado entre a sonda e a sequência hibridizável, mais alta a temperatura correspondente que pode ser utilizada. Como resultado, segue-se que temperaturas correspondentes mais altas tenderiam a tomar as condições de reação mais restringentes, enquanto temperaturas mais baixas o fazem em menor proporção. Para pormenores adicionais e explicações sobre a restringência das reações de hibridação, veja-se Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers (1995).

"Condições restringentes" ou "condições de alta restringência", da forma definida no presente documento, podem ser identificadas por aquelas que: (1) utilizam baixa resistência iónica e alta temperatura para lavagem, tal como 0,015 M de cloreto de sódio/0,0015 M de citrato de sódio/0,1 % de dodecil sulfato de sódio a 50 °C; (2) utilizam durante a hibridação agente desnaturante, tal como formamida, por exemplo 50 % (v/v) formamida com albumina de

soro bovino a 0,1 %/0,1 % de Ficoll/0,1 % de polivinilpirrolidona/50 mM de tampão fosfato de sódio sob pH 6,5 com 750 mM de cloreto de sódio, 75 mM de citrato de sódio a 42 °C; ou (3) hibridação durante a noite em solução que utiliza 50 % de formamida, 5 x SSC (0,75 M de NaCl, 0,075 M de citrato de sódio), 50 mM de fosfato de sódio (pH 6,8), 0,1 % de pirofosfato de sódio, 5 x solução de Denhardt, ADN de esperma de salmão sonicado (50 µg/ml), 0,1 % de SDS e 10 % de sulfato de dextrano a 42 °C, com lavagem durante dez minutos a 42 °C em 0,2 x SSC (cloreto de sódio/citrato de sódio), seguidos por lavagem em alta restringência durante dez minutos que consiste em 0,1 x SSC contendo EDTA a 55 °C.

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

O termo "etiquetado por epítopo" utilizado no presente documento designa polipéptido quimérico que compreende um

polipéptido TAHO ou anticorpo anti-TAHO fusionado a um "polipéptido de etiqueta". O polipéptido de etiqueta contém resíduos suficientes para fornecer epítopo contra o qual pode ser fabricado um anticorpo, mas ainda é suficientemente curto para não interferir com a atividade do polipéptido ao qual é fusionado. O polipéptido de etiqueta também é, de preferência, razoavelmente exclusivo, de forma que o anticorpo não apresente reação cruzada substancial com outros epítopos. Os polipéptidos de marca apropriados contêm pelo menos seis resíduos de aminoácidos e normalmente cerca de 8 a 50 resíduos de aminoácidos (preferivelmente, cerca de dez a vinte resíduos de aminoácidos).

"Ativo" ou "atividade" para os propósitos do presente documento indica forma(s) de polipéptido TAHO que retém(êm) atividade biológica e/ou imunológica de TAHO nativo ou de ocorrência natural, em que atividade "biológica" indica função biológica (seja inibidora ou estimulante) causada por TAHO nativo ou de ocorrência natural diferente da capacidade de induzir a produção de anticorpo contra epítopo antigénico possuído por TAHO nativo ou de ocorrência natural e atividade "imunológica" designa a capacidade de indução da produção de anticorpo contra epítopo antigénico possuído por TAHO nativo ou de ocorrência natural.

O termo "antagonista" é utilizado no sentido mais amplo e inclui qualquer molécula que bloqueie, iniba ou neutralize, total ou parcialmente, a atividade biológica de polipéptido TAHO nativo descrito no presente documento. De forma similar, o termo "agonista" é utilizado no sentido mais amplo e inclui qualquer molécula que imite atividade biológica de polipéptido TAHO nativo descrito no presente documento. Moléculas agonistas ou antagonistas apropriadas

incluem especificamente anticorpos agonistas ou antagonistas ou fragmentos de anticorpos, fragmentos ou variantes de sequências de aminoácidos de polipéptidos TAHO nativos, péptidos, oligonucleótidos sem sentido, moléculas orgânicas pequenas etc. Métodos de identificação de agonistas ou antagonistas de polipéptido TAHO podem compreender o contato de polipéptido TAHO com possível molécula agonista ou antagonista e medição de mudança detetável numa ou mais atividades biológicas normalmente associadas ao polipéptido TAHO.

"Tratar, "tratamento" ou "melhoria" designa o tratamento terapêutico e medidas profiláticas ou preventivas, em que o objeto é o de evitar ou reduzir a velocidade (diminuir) da condição ou disfunção patológica desejada. Os necessitados de tratamento incluem os que já possuem a disfunção, bem como os propensos a ter a disfunção ou aqueles em que a disfunção deva ser evitada. Um sujeito ou mamífero é "tratado" com sucesso de cancro que expresse polipéptido TAHO se, após receber quantidade terapêutica de anticorpo anti-TAHO, oligopéptido de ligação a TAHO ou molécula orgânica de união de TAHO segundo os métodos do presente pedido, o paciente mostra redução observável e/ou mensurável ou ausência de um ou mais dos seguintes: redução da quantidade de células cancerosas ou ausência das células cancerosas, redução do tamanho do tumor, inibição (ou seja, redução da velocidade até certo ponto e, preferivelmente, suspensão) da infiltração de células cancerosas em órgãos periféricos, incluindo a difusão de cancro em tecido mole e ossos; inibição (ou seja, redução até certo ponto e, preferivelmente, suspensão) da metástase tumoral; inibição, até certo ponto, do crescimento de tumores; e/ou melhoria, até certo ponto, de um ou mais dos sintomas associados ao cancro específico, redução da morbidez e mortalidade e melhoria de questões de

qualidade de vida. Desde que possa evitar o crescimento de células cancerosas existentes e/ou matá-las, o anticorpo anti-TAHO ou oligopéptido de ligação a TAHO pode ser citostático e/ou citotóxico. A redução desses sinais ou sintomas pode também ser sentida pelo paciente.

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

Para cancro da bexiga, que é cancro mais localizado, os métodos de determinação do progresso da doença incluem avaliação citológica urinária por meio de cistoscopia, monitoramento da presença de sangue na urina, visualização do trato urotelial por meio de sonografia ou pielograma intravenoso, tomografia computadorizada (CT) e formação de imagens por ressonância magnética (MRI). A presença de metástases diretas pode ser determinada por meio de CT do abdómen, raios X do tórax ou formação de imagem do esqueleto por radionuclídeo.

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

"Mamífero", para os propósitos de tratamento, redução dos sintomas de um cancro, designa qualquer animal classificado como mamífero, incluindo seres humanos, animais domésticos e de fazenda, bem como animais domésticos, de desportos ou zoológico, tais como cães, gatos, bois, cavalos, carneiros, porcos, cabras, coelhos etc. Preferivelmente, o mamífero é ser humano.

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

"Veículos", da forma utilizada no presente documento, incluem veículos, excipientes ou estabilizantes farmaceuticamente aceitáveis que são atóxicos para a célula ou mamífero a eles a serem expostos nas dosagens e concentrações utilizadas. Frequentemente, o veículo fisiologicamente aceitável é solução tamponada com pH aquoso. Exemplos de veículos fisiologicamente aceitáveis incluem tampões tais como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes, incluindo ácido ascórbico; polipéptido de baixo peso molecular

(menos de cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina de soro, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tais como glicina, glutamina, asparagina, arginina ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros hidratos de

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

Por "fase sólida" ou "suporte sólido", indica-se matriz não aquosa à qual anticorpo, oligopéptido de ligação a TAHO ou molécula orgânica de união de TAHO do presente pedido pode aderir-se ou fixar-se. Exemplos de fases sólidas abrangidas no presente documento incluem as formadas total ou parcialmente de vidro (tal como vidro de poros controlados), polissacarídeos (tais como agarose), poliacrilamidas, poliestireno, álcool polivinílico e silicones. Em certas formas de realização, dependendo do contexto, a fase sólida pode compreender a cavidade de placa de teste; em outras, é coluna de purificação (tal como coluna de cromatografia de afinidade). Esta expressão também inclui fase sólida descontínua de partículas discretas, tais como as descritas na Patente US nº 4.275.149.

"Lipossoma" é pequena bolha composta de diversos tipos de lípidos, fosfolípidos e/ou tensioativo que é útil para o fornecimento de fármacos (tais como polipéptido TAHO, seu anticorpo ou oligopéptido de ligação a TAHO) a mamíferos. Os componentes do lipossoma são normalmente dispostos em formação bicamadas, similar à disposição de lípidos de membranas biológicas.

Molécula "pequena" ou molécula orgânica "pequena" é definida no presente como tendo peso molecular de menos de cerca de 500 Daltons.

"Quantidade eficaz" de polipéptido, anticorpo,

oligopéptido de ligação a TAHO, molécula orgânica de união de TAHO ou seu agonista ou antagonista, da forma descrita no presente documento, é quantidade suficiente para conduzir propósito especificamente indicado. "Quantidade eficaz" pode ser determinada empiricamente e de maneira rotineira, com relação ao propósito indicado.

A expressão "quantidade terapeuticamente eficaz" designa a quantidade de anticorpo, polipéptido, polipéptido de união de TAHO, molécula orgânica de união de TAHO ou outra fármaco eficaz para o "tratamento" de doença ou disfunção em paciente ou mamífero. No caso de cancro, a quantidade terapeuticamente eficaz do fármaco pode reduzir o número de células cancerosas, reduzir o tamanho do tumor, inibir (ou seja, reduzir a velocidade até certo ponto e, preferivelmente, suspender) a infiltração de células cancerosas em órgãos periféricos; inibir (ou seja, reduzir até certo ponto e, preferivelmente, suspender) a metástase tumoral; inibir, até certo ponto, o crescimento de tumores; e/ou melhorar, até certo ponto, um ou mais dos sintomas associados ao cancro. Veja-se a definição de "tratamento" no presente documento. Desde que possa evitar o crescimento de células cancerosas existentes e/ou matá-las, o fármaco pode ser citostático e/ou citotóxico.

"Quantidade inibidora do crescimento" de anticorpo anti-TAHO, polipéptido TAHO, oligopéptido de ligação a TAHO ou molécula orgânica de união de TAHO é quantidade capaz de inibir o crescimento de células, especialmente tumorosas, tais como células de cancro, *in vitro* ou *in vivo*. "Quantidade inibidora do crescimento" de anticorpo anti-TAHO, polipéptido TAHO, oligopéptido de ligação a TAHO ou molécula orgânica de união de TAHO para os propósitos de inibição do crescimento de células neoplásticas pode ser determinada empiricamente e de forma rotineira.

"Quantidade citotóxica" de anticorpo anti-TAHO, polipéptido TAHO, oligopéptido de ligação a TAHO ou molécula orgânica de união de TAHO é quantidade capaz de causar a destruição de células, especialmente tumorosas, tais como células de cancro, *in vitro* ou *in vivo*. "Quantidade citotóxica" de anticorpo anti-TAHO, polipéptido TAHO, oligopéptido de ligação a TAHO ou molécula orgânica de união de TAHO para os propósitos de inibição do crescimento de células neoplásticas pode ser determinada empiricamente e de forma rotineira.

O termo "anticorpo" é utilizado no sentido mais amplo e cobre especificamente, por exemplo, anticorpos monoclonais anti-TAHO isolados (incluindo anticorpos agonistas, antagonistas e neutralizantes), composições de anticorpos anti-TAHO com especificidade poliepitópica, anticorpos policlonais, anticorpos anti-TAHO de fita única e fragmentos de anticorpos anti-TAHO (veja-se abaixo), desde que exibam a atividade biológica ou imunológica desejada. O termo "imunoglobulina" (Ig) é utilizado de forma intercambiável com anticorpo no presente documento.

"Anticorpo isolado" é aquele que tenha sido identificado, separado e/ou recuperado a partir de um componente do seu ambiente natural. Os componentes contaminantes do seu ambiente natural são materiais que interfeririam com utilizações terapêuticas para o anticorpo e podem incluir enzimas, hormonas e outros solutos proteáceos ou não proteáceos. Em formas de realização preferidas, o anticorpo será purificado (1) até mais de 95 % em peso de anticorpo, conforme determinado por meio do método de Lowry, e, de maior preferência, mais de 99 % em peso; (2) até grau suficiente para a obtenção de pelo menos quinze resíduos de sequência de aminoácidos interna ou N-terminal, utilizando sequenciador de xícara de

centrifugação; ou (3) até a homogeneidade, por meio de SDS-PAGE, sob condições redutoras ou não redutoras, utilizando azul de Coomassie ou, preferivelmente, manchas de prata. O anticorpo isolado inclui o anticorpo *in situ* em células recombinantes, desde que pelo menos um componente do ambiente natural do anticorpo não esteja presente. Normalmente, entretanto, o anticorpo isolado será preparado por meio de pelo menos uma etapa de purificação.

A unidade básica de anticorpo de 4 cadeias é glicoproteína heterotetramérica composta de duas cadeias leves (L) idênticas e duas cadeias pesadas (H) idênticas (um anticorpo de IgM consiste em cinco das unidades heterotetraméricas básicas, juntamente com um polipéptido adicional denominado cadeia J, contendo, portanto, 10 locais de união de antigénios, enquanto os anticorpos de IgA segregados podem polimerizar-se para formar conjuntos polivalentes que compreendem de duas a cinco das unidades básicas de quatro cadeias juntamente com a cadeia J). No caso de IgG, a unidade de quatro cadeias é geralmente de cerca de 150.000 daltons. Cada cadeia L é ligada a uma cadeia H por uma união de dissulfeto covalente, enquanto as duas cadeias H são ligadas entre si por uma ou mais uniões de dissulfeto, dependendo do isotipo de cadeia H. Cada cadeia H e L também contém pontes de dissulfeto intracadeias em espaços regulares. Cada cadeia H contém, no terminal N, um domínio variável ($_{H}Y$) seguido por três domínios constantes (C_H) para cada uma das cadeias α e γ e quatro domínios C_H para os isotipos μ e ε. Cada cadeia L contém, no terminal N, um domínio variável (V_L) seguido por um domínio constante (C_L) na sua outra extremidade. O V_L é alinhado ao V_H e o C_L é alinhado ao primeiro domínio constante da cadeia pesada (C_H1). Acredita-se que resíduos de aminoácidos específicos formem superfície intermediária entre os domínios variáveis de cadeia leve e de cadeia

pesada. O emparelhamento de V_H e V_L entre si forma um único local de união de antigénios. Para a estrutura e propriedades das diferentes classes de anticorpos, veja-se, por exemplo, *Basic and Clinical Immunology*, 8ª edição, Daniel P. Stites, Abba I. Terr e Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk CT, 1994, pág. 71 e Capítulo 6.

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

O termo "variável" designa o tato de que certos segmentos dos domínios variáveis diferem extensamente de sequência entre os anticorpos. O domínio V media a união de antigénios e define a especificidade de anticorpo específico para o seu antigénio específico. Entretanto, a variabilidade não é distribuída regularmente ao longo da série de 110 aminoácidos dos domínios variáveis. Ao contrário, as regiões V consistem de estiramentos relativamente sem variação denominados regiões estruturais (FRs) de quinze a trinta aminoácidos separados por regiões mais curtas de extrema variabilidade, denominadas "regiões hipervariáveis" que contêm de nove a doze aminoácidos de

comprimento. Os domínios variáveis de cadeias leve e pesada nativas compreendem quatro FRs cada um, adotando em grande parte configuração de folha β, conectadas por três regiões hipervariáveis, que formam laços que conectam e, em alguns casos, fazem parte da estrutura de folha β. As regiões hipervariáveis de cada cadeia são mantidas juntas em boa proximidade pelas FRs e, com as regiões hipervariáveis da outra cadeia, contribuem para a formação do local de união de antigénios de anticorpos (veja-se Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest,* quinta edição, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda MD (1991)). Os domínios constantes não estão diretamente envolvidos na união de anticorpo a antigénio, mas exibem diversas funções efetoras, tais como a participação do anticorpo em citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC).

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

A expressão "anticorpo monoclonal", da forma utilizada no presente documento, designa anticorpo obtido a partir de

população de anticorpos substancialmente homogéneos, ou seja, os anticorpos individuais que compreendem a população são idênticos, exceto por possíveis mutações de ocorrência natural que podem estar presentes em quantidades menores. Os anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo dirigidos para um único local antigénico. Além disso, ao contrário das preparações de anticorpos policlonais que incluem diferentes anticorpos dirigidos a diferentes determinantes (epítopos), cada anticorpo monoclonal é direcionado a um único determinante sobre o antigénio. Além da sua especificidade, os anticorpos monoclonais são vantajosos por poderem ser sintetizados de forma não contaminada por outros anticorpos. O adjetivo "monoclonal" não deve ser considerado exigindo a produção do anticorpo por meio de qualquer método específico. Os anticorpos monoclonais úteis na presente invenção podem ser preparados, por exemplo, por meio da metodologia de hibridoma descrita em primeiro lugar por Kohler *et al.*, *Nature*, 256: 495 (1975), ou pode ser fabricada utilizando métodos de ADN recombinante em células vegetais, animais, eucarióticas ou bacterianas (veja-se, por exemplo, a Patente US nº 4.816.567). Os "anticorpos monoclonais" podem também ser isolados a partir de bibliotecas de anticorpos de fagos, utilizando as técnicas descritas, por exemplo, em Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991) e Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991).

Os anticorpos monoclonais do presente documento incluem anticorpos "quiméricos", em que uma parte da cadeia leve e/ou pesada é idêntica ou homóloga a sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie específica ou pertencentes a uma classe ou subclasse específica de anticorpos, enquanto o restante da(s) cadeia(s) é idêntico ou homólogo a sequências correspondentes de anticorpos derivados de outras espécies

ou pertencentes a outra classe ou subclasse de anticorpos, bem como fragmentos desses anticorpos, desde que exibam a atividade biológica desejada (veja-se a Patente US nº 4.816.567; e Morrison *et al., Proc. Nati. Acad. Sei.* USA, 81: 6851-6855 (1984)). Os anticorpos quiméricos de interesse no presente documento incluem anticorpos "primatizados", que compreendem sequências de união de antigénios de domínio variável derivadas de primatas não humanos (por exemplo, Macaco do Velho Mundo, Chimpanzé etc.) e sequências de regiões constantes humanas.

Anticorpo "intato" é aquele que compreende um local de união de antigénios, bem como um CL e pelo menos domínios contantes de cadeia pesada, C_H1, C_H2 e C_H3. Os domínios constantes podem ser domínios constantes de sequência nativa (por exemplo, domínios constantes de sequências nativas humanas) ou suas variantes de sequências de aminoácidos. Preferivelmente, o anticorpo intato possui uma ou mais funções efetoras.

"Fragmentos de anticorpos" compreendem uma parte de anticorpo intato, preferivelmente a região variável ou de união de antigénios do anticorpo intato. Exemplos de fragmentos de anticorpos incluem fragmentos de Fab, Fab', $F(ab')_2$ e Fv; diacorpos; anticorpos lineares (veja-se Patente US nº 5.641.870, Exemplo 2; Zapata *et al., Protein Eng.* 8 (10): 1057-1062 (1995)); moléculas de anticorpos de cadeia única; e anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpos.

A digestão de papaína de anticorpos produz dois fragmentos idênticos de união de antigénios, denominados fragmentos "Fab", e um fragmento "Fc" residual, cuja designação reflete a capacidade de cristalização rápida. O fragmento de Fab consiste numa cadeia L inteira, juntamente

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

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

"Fv" é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um local de reconhecimento e de união de antigénios completo. Esse fragmento consiste num dímero de um domínio de região variável de cadeia leve e de cadeia pesada em associação firme e não covalente. Da dobra desses dois domínios, emanam seis laços hipervariáveis (três laços da cadeia H e L cada) que contribuem com os resíduos de aminoácidos para

união de antigénios e conferem especificidade de união de antigénios ao anticorpo. Entretanto, mesmo um domínio variável isolado (ou metade de um Fv que compreende apenas três CDRs específicas para um antigénio) possui a capacidade de reconhecer e unir antigénio, embora em afinidade menor que todo o local de união.

"Fv de cadeia isolada", também abreviado como "sFv" ou "scFv", são fragmentos de anticorpos que compreendem os domínios de anticorpos Vh e V_L conectados a uma cadeia de polipéptido isolada. Preferivelmente, o polipéptido de sFv compreende adicionalmente uma ligação de polipéptido entre os domínios V_H e V_L, o que permite que o sFv forme a estrutura desejada para união de antigénios. Para análise de sFv, veja-se Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,* vol. 113, Rosenburg e Moore eds., Springer-Verlag, Nova Iorque, págs. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, a seguir.

O termo "diacorpos" designa fragmentos de anticorpos pequenos preparados por meio da construção de fragmentos de sFv (veja-se parágrafo anterior) com ligações curtas (cerca de cinco a dez resíduos) entre os domínios V_H e V_L, de forma a atingir-se o emparelhamento intercadeias mas não intracadeias dos domínios V, resultando em fragmento bivalente, ou seja, fragmento contendo dois locais de união de antigénios. Os diacorpos biespecíficos são heterodímeros de dois fragmentos de sFv "cruzados", em que os domínios V_H e V_L dos dois anticorpos estão presentes sobre diferentes cadeias de polipéptidos. Os diacorpos são descritos mais completamente, por exemplo, em EP 404.097, WO 93/11161 e Hollinger *et al.*, Proc. Nati. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993).

As formas "humanizadas" de anticorpos não humanos (por

exemplo, de roedores) são anticorpos quiméricos que contêm sequência mínima derivada do anticorpo não humano. Em sua maioria, os anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo recetor), em que resíduos de região hipervariável do recetor são substituídos por resíduos de região hipervariável de espécie não humana (anticorpo doador), tal como camundongo, rato, coelho ou primata não humano que apresenta a capacidade, afinidade e especificidade de anticorpo desejada. Em alguns casos, os resíduos de região estrutural (FR) da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não humanos correspondentes. Além disso, os anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo recetor nem no anticorpo doador. Essas modificações são feitas para refinar ainda mais o desempenho do anticorpo. Geralmente, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todos dentre pelo menos um, tipicamente dois domínios variáveis, em que todos ou substancialmente todos os circuitos hipervariáveis correspondem aos de imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as FRs são as de sequência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado também compreenderá opcionalmente pelo menos uma parte de região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de imunoglobulina humana. Para pormenores adicionais, veja-se Jones *et al.*, *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Bioí.* 2: 593-596 (1992).

"Anticorpo dependente de espécie", tal como anticorpo anti-IgE humano de mamífero, é anticorpo que possui afinidade de união mais forte para antigénio de primeira espécie de mamífero que para homólogo daquele antigénio de segunda espécie de mamífero. Normalmente, o anticorpo dependente de espécie "liga-se especificamente" a antigénio humano (ou seja, possui valor de afinidade de união (Kd) de

não mais de cerca de 1 x 10^{-7} M, preferivelmente não mais de cerca de 1 x 10^{-8} e, de maior preferência, não mais de cerca de 1 x 10^{-9} M), mas possui afinidade de união para homólogo do antigénio de segunda espécie de mamífero não humano que é pelo menos de cerca de cinquenta vezes, pelo menos de cerca de quinhentas vezes ou pelo menos de cerca de mil vezes mais fraca que a sua afinidade de união para o antigénio humano. O anticorpo dependente de espécie pode ser de qualquer dos diversos tipos de anticorpos definidos acima, mas é preferivelmente anticorpo humano ou humanizado.

"Oligopéptido de ligação a TAHO" é oligopéptido que se liga, preferivelmente de forma específica, a polipéptido TAHO conforme descrito no presente documento. Os oligopéptidos de ligação a TAHO podem ser sintetizados quimicamente utilizando metodologia de síntese de oligopéptidos conhecida ou podem ser preparados e purificados utilizando tecnologia recombinante. Os oligopéptidos de ligação a TAHO normalmente possuem pelo menos de cerca de cinco aminoácidos de comprimento, alternativamente pelo menos de cerca de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, ou 100 aminoácidos de comprimento ou mais, em que esses oligopéptidos são capazes de se ligarem, preferivelmente de forma específica, a polipéptido TAHO conforme descrito no presente documento. Os oligopéptidos de ligação a TAHO podem ser identificados sem experimentação indevida, utilizando métodos bem conhecidos. Neste particular, observa-se que os métodos de seleção de bibliotecas de

oligopéptidos em busca de oligopéptidos que sejam capazes de se ligarem especificamente a polipéptido alvo são bem conhecidos na especialidade (veja-se, por exemplo, Patente US N° 5.556.762,5.750.373, 4.708.871, 4.833.092, 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689, 5.663.143; Publicação PCT N° WO 84/03506 e WO84/03564; Geysen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984); Geysen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985); Geysen *et al.*, em Synthetic Peptides as Antigens,130-149 (1986); Geysen *et al.*, J. Immunol. Met.,102:259-274 (1987); Schoofs *et al.*, J. Immunol.,140:611-616 (1988), Cwirla, S. E. *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378; Lowman, H.B. *et al.* (1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T. *et al.* (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. *et al.* (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A.S. *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363, e Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668).

"Molécula orgânica de ligação a TAHO" é molécula orgânica diferente de oligopéptido ou anticorpo conforme definido no presente que se liga, preferivelmente de forma específica, a polipéptido TAHO conforme descrito no presente documento. Moléculas orgânicas de ligação a TAHO podem ser identificadas e sintetizadas quimicamente utilizando metodologia conhecida (veja-se, por exemplo, as Publicações PCT n° WO 00/00823 e WO 00/39585). As moléculas orgânicas de ligação a TAHO normalmente possuem tamanho de menos de cerca de 2000 daltons, alternativamente tamanho de menos de cerca de 1500, 750, 500, 250 ou 200 daltons, em que essas moléculas orgânicas que são capazes de ligação, preferivelmente de forma específica, a polipéptido TAHO conforme descrito no presente documento, podem ser identificadas sem experimentação indevida utilizando métodos bem conhecidos. Neste particular, observa-se que os métodos de seleção de bibliotecas de moléculas orgânicas em

busca de moléculas que sejam capazes de se ligarem a polipéptido alvo são bem conhecidos na técnica (veja-se, por exemplo, Patentes PCT nº WO 00/00823 e WO 00/39585).

Um anticorpo, oligopéptido ou outra molécula orgânica "que se liga" ao antigénio de interesse, tal como antigénio de polipéptido associado a tumor alvo, é aquele que se liga ao antigénio com afinidade suficiente para que o anticorpo, oligopéptido ou outra molécula orgânica seja útil como agente terapêutico e/ou de diagnóstico para dirigir uma célula ou tecido que expresse o antigénio e não apresente reação cruzada significativa com outras proteínas. Nessas formas de realização, a extensão da ligação do anticorpo, oligopéptido ou outra molécula orgânica à proteína "não alvo" será de menos de cerca de 10 % da ligação do anticorpo, oligopéptido ou outra molécula orgânica à sua proteína alvo específica, conforme determinado por meio de análise de ordenamento de células ativadas por fluorescência (FACS) ou radioimunoprecipitação (RIA). Com relação à ligação de anticorpo, oligopéptido ou outra molécula orgânica a molécula alvo, a expressão "ligação específica", "liga-se especificamente a" ou "é específica para" polipéptido específico ou epítopo sobre polipéptido alvo específico indica ligação que é, de modo mensurável, diferente de interação não específica. A ligação específica pode ser medida, por exemplo, por meio da determinação da ligação de molécula em comparação com a ligação de molécula controlo, que geralmente é molécula com estrutura similar que não possui atividade de ligação. A ligação específica pode ser determinada, por exemplo, por meio de competição com molécula controlo que é similar ao alvo, tal como excesso de alvo não marcado. Neste caso, indica-se ligação específica caso a ligação do alvo marcado a uma sonda seja competitivamente inibida por alvo não marcado em excesso. A expressão "ligação específica", "liga-se especificamente a"

ou "é específico para" polipéptido específico ou epítopo sobre polipéptido alvo específico, da forma utilizada no presente documento, pode ser exibida, por exemplo, por molécula que possui Kd para o alvo de pelo menos de cerca de 10^{-4} M, alternativamente pelo menos de cerca de 10^{-5} M, alternativamente pelo menos de cerca de 10^{-6} M, alternativamente pelo menos de cerca de 10^{-7} M, alternativamente pelo menos de cerca de 10^{-8} M, alternativamente pelo menos de cerca de 10^{-9} M, alternativamente pelo menos de cerca de 10^{-10} M, alternativamente pelo menos de cerca de 10^{-11} M, alternativamente pelo menos de cerca de 10^{-12} M, ou mais. Numa forma de realização, a expressão "ligação específica" indica ligação em que uma molécula liga-se a polipéptido específico ou epítopo sobre polipéptido específico sem ligação substancial a nenhum outro polipéptido ou epítopo de polipéptido.

Um anticorpo, oligopéptido ou outra molécula orgânica que "inibe o crescimento de células tumorais que expressam polipéptido TAHO" ou anticorpo, oligopéptido ou outra molécula orgânica "inibidora do crescimento" é aquele que resulta na inibição mensurável do crescimento de células cancerosas que expressem ou sobre-expressem o polipéptido TAHO apropriado. O polipéptido TAHO pode ser polipéptido transmembrana expresso sobre a superfície de célula cancerosa ou pode ser polipéptido que é produzido e segregado por célula cancerosa. Os anticorpos anti-TAHO, oligopéptidos ou moléculas orgânicas inibidoras do crescimento preferidas inibem o crescimento de células tumorais que expressam TAHO em mais de 20 %, preferivelmente cerca de 20 % a cerca de 50 % e, de preferência ainda maior, mais de 50 % (por exemplo, cerca de 50 % a cerca de 100 %) em comparação com o controlo apropriado, em que o controlo é tipicamente de células

tumorais não tratadas com o anticorpo, oligopéptido ou outra molécula orgânica sendo testada. Numa forma de realização, a inibição do crescimento pode ser medida em concentração de anticorpos de cerca de 0,1 a 30 µg/ml ou cerca de 0,5 nM a 200 nM em cultivo celular, em que a inibição do crescimento é determinada num a dez dias após a exposição das células tumorais ao anticorpo. A inibição do crescimento de células tumorais *in vivo* pode ser determinada de diversas formas, conforme descrito no capítulo de Exemplos Experimentais a seguir. O anticorpo é inibidor do crescimento *in vivo* caso a administração do anticorpo anti-TAHO a cerca de 1 µg/kg até cerca de 100 mg/kg de peso do corpo resulte na redução do tamanho do tumor ou proliferação de células tumorais em até cerca de cinco dias a três meses a partir da primeira administração do anticorpo, preferivelmente em até cerca de 5 a 30 dias.

Um anticorpo, oligopéptido ou outra molécula orgânica que "induz a apoptose" é aquela que induz a morte celular programada, conforme determinado por meio da ligação de anexina V, fragmentação de ADN, contração celular, dilatação do retículo endoplasmático, fragmentação celular e/ou formação de vesículas de membrana (denominadas corpos apoptóticos). A célula é normalmente aquela que sobre-expressa polipéptido TAHO. Preferivelmente, a célula é célula tumoral, por exemplo, uma célula hematopoiética, tal como uma célula B, célula T, basófilo, eosinófilo, neutrófilo, monócito, plaqueta ou eritrócito. Vários métodos estão disponíveis para a avaliação dos eventos celulares associados à apoptose. A translocação de fosfatidil serina (PS), por exemplo, pode ser medida pela ligação de anexina; a fragmentação de ADN pode ser avaliada por meio de escalas de ADN; e condensação nuclear/de cromatina juntamente com fragmentação de ADN pode ser avaliada por meio de qualquer aumento das células

hipodiploides. Preferivelmente, o anticorpo, oligopéptido ou outra molécula orgânica que induz a apoptose é aquela que resulta em cerca de duas a 50 vezes, preferivelmente cerca de cinco a 50 vezes e, de maior preferência, cerca de dez a 50 vezes, a indução de ligação de anexina com relação à célula não tratada em teste de ligação de anexinas.

As "funções efetoras" de anticorpos designam as atividades biológicas atribuíveis à região Fc (região Fc de sequência nativa ou região Fc com variação de sequência de aminoácidos) de anticorpo e variam de acordo com o isotipo do anticorpo. Exemplos das funções efetoras de anticorpos incluem: citotoxicidade dependente de complemento e ligação de C1q; ligação de recetor Fc; citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC); fagocitose; regulação negativa de recetores da superfície celular (tais como recetores de células B); e ativação de células B.

"Citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos" ou "ADCC" indica uma forma de citotoxicidade na qual Ig segregado unido a recetores Fc (FcR) presentes sobre certas células citotóxicas (tais como células Matadoras Naturais (NK), neutrófilos e macrófagos) permitem que essas células efetoras citotóxicas unam-se especificamente a uma célula alvo que contenha antigénios e subsequentemente matem a célula desejada com citotoxinas. Os anticorpos "armam" as células citotóxicas e são absolutamente necessários para essa matança. As células primárias para a mediação de ADCC, células NK, expressam unicamente FcγRIII, enquanto monócitos expressam FcγRI, FcγRII e FcγRIII. A expressão de FcR sobre células hematopoiéticas é resumida no Quadro 3 da página 464 de Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). Para determinar a atividade de ADCC de molécula de interesse, pode ser realizado um ensaio de ADCC *in vitro,* tal como o

descrito na Patente US nº 5.500.362 ou 5.821.337. As células efetoras úteis para esses testes incluem células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) e células Matadoras Naturais (NK). Alternativa ou adicionalmente, a atividade de ADCC da molécula de interesse pode ser determinada *in vivo*, tal como em modelo animal como o descrito em Clynes *et al., (USA)* 95: 652-656 (1998).

"Recetor de Fc" ou "FcR" descreve recetor que se liga à região Fc de anticorpo. O FcR preferido é FcR humano de sequência nativa. Além disso, FcR preferido é aquele que une anticorpo IgG (recetor gama) e inclui recetores das subclasses FcγRI, FcγRII e FcγRIII, incluindo variantes alélicas e, alternativamente, formas divididas desses recetores. Os recetores de FcγRII incluem FcγRIIA ("recetor de ativação") e FcγRIIB ("recetor de inibição"), que possuem sequências de aminoácidos similares que diferem principalmente nos seus domínios citoplasmáticos. O recetor de ativação FcγRIIA contém motivo de ativação com base em tirosina imunorrecetora (ITAM) no seu domínio citoplasmático. O recetor de inibição FcγRIIB contém motivo de inibição com base em tirosina imunorrecetora (ITIM) no seu domínio citoplasmático. (veja-se análise M. em Daéron, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234 (1997)). FcR são analisadas em Ravetch e Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991); Capei *et al., Immunomethods* 4; 25-34 (1994); e de Haas *et al., J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). Outros FcR, incluindo aqueles a serem identificados no futuro, são abrangidos pelo termo "FcR" no presente documento. O termo também inclui o recetor neonatal, FcRn, que é responsável pela transferência de IgG maternos para o feto (Guyer *et al., J. Immunol.* 117: 587 (1976) e Kim *et al., J. Immunol.* 24: 249 (1994)).

As "células efetoras humanas" são leucócitos que

expressam um ou mais FcR e realizam funções efetoras. Preferivelmente, as células expressam pelo menos FcγRIII e realizam função efetora de ADCC. Exemplos de leucócitos humanos que medeiam ADCC incluem células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC), células matadoras naturais (NK), monócitos, células T citotóxicas e neutrófilos; em que PBMCs e células NK são preferidas. As células efetoras podem ser isoladas a partir de fonte nativa, tal como sangue.

"Citotoxicidade dependente de complemento" ou "CDC" designa a lise de célula desejada na presença de complemento. A ativação do processo clássico de complemento é iniciada pela ligação do primeiro componente do sistema de complemento (C1 q) a anticorpos (da subclasse apropriada) que são unidos ao seu antigénio cognato. Para determinar a ativação do complemento, pode ser realizado teste de CDC, conforme descrito, por exemplo, em Gazzano-Santoro *et al., J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996).

Os termos "cancro" e "canceroso" designam ou descrevem a condição fisiológica em mamíferos que é tipicamente caraterizada pelo crescimento celular desregulado. Exemplos de cancro incluem, mas não são limitados a, cancros hematopoiéticos ou cancros relacionados com o sangue, tal como linfoma, leucemia, mieloma ou malignidades linfoides, mas também cancros do baço e cancros dos gânglios linfáticos. Exemplos mais particulares de tais cancros associados a célula B, incluindo, por exemplo, linfomas de grau alto, intermediário e baixo (incluindo linfomas de célula B tais como, por exemplo, linfoma de célula B de tecido linfoide associado a mucosa e linfoma não-Hodgkin, linfoma de célula de manto, linfoma de Burkitt, linfoma linfocítico pequeno, linfoma de zona marginal, linfoma de célula grande difusa, linfoma folicular, e linfoma de

Hodgkin e linfomas de célula T) e leucemias (incluindo leucemia secundária, leucemia linfocítica crónica, tal como leucemia de célula B (linfócitos B CD5+), leucemia mieloide, tal como leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoide, tal como leucemia linfoblástica aguda e mielodisplasia), mieloma múltiplo, tal como malignidade de célula plasmática, e outros cancros associados a célula T ou célula B e/ou hematológicos. Também se incluem cancros de células hematopoiéticas adicionais, incluindo leucócitos polimorfonucleares, tais como basófilos, eosinófilos, neutrófilos e monócitos, células dendríticas, plaquetas, eritrócitos e células assassinas naturais. As origens de cancros de célula B são como se segue: origens de linfoma de célula B de zona marginal em células B de memória em zona marginal, linfoma folicular e linfoma de célula B grande difusa origina em centrócitos na zona clara de centros germinais, mieloma múltiplo origina em células plasmáticas, leucemia linfocítica crónica e leucemia linfocítica pequena origina em células B 1 (CD5+), linfoma de célula de manto origina em células B naïve na zona do manto e linfoma de Burkitt origina em centroblastos na zona escura de centros germinais. Os tecidos que incluem células hematopoiéticas denominadas no presente documento como "tecidos de célula hematopoiética" incluem timo e medula óssea e tecidos linfoides periféricos, tais como baço, gânglios linfáticos, tecidos linfoides associados com mucosa, tais como os tecidos linfoides associados ao intestino, tonsilas, placas de Peyer e apêndice e tecidos linfoides associados com outra mucosa, por exemplo, os forros brônquicos.

As expressões "distúrbio proliferativo celular" e "distúrbio proliferativo" designam distúrbios que são associados a algum grau de proliferação celular anormal. Numa forma de realização, o distúrbio proliferativo celular

é cancro.

"Tumor", como é usado no presente documento, refere-se a toda proliferação e crescimento de células neoplásicas, sejam malignas ou benignas, e todas as células e tecidos pré-cancerosos e cancerosos.

Um anticorpo, oligopéptido ou outra molécula orgânica que "induz a morte celular" é aquela que faz com que uma célula viável se torne não viável. A célula é aquela que expressa polipéptido TAHO e é de um tipo de célula que especificamente expressa ou sobre-expressa um polipéptido TAHO. A célula pode ser cancerosa ou células normais do tipo de célula particular. O polipéptido TAHO pode ser um polipéptido de transmembrana expresso na superfície de uma célula de cancro ou pode ser um polipéptido que é produzido e segregado por uma célula de cancro. A célula pode ser uma célula de cancro, por exemplo, uma célula B ou célula T. A morte celular *in vitro* pode ser determinada na ausência de células efetoras imunes e complementares para distinguir a morte celular induzida por citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC) ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC). Desta forma, o ensaio de morte celular pode ser realizado utilizando soro desativado por calor (ou seja, na ausência de complemento) e na ausência de células efetoras imunes. Para determinar se o anticorpo, oligopéptido ou outra molécula orgânica é capaz de induzir a morte celular, a perda da integridade da membrana conforme avaliado por meio da absorção de iodeto de propídio (PI), azul de tripano (veja-se Moore *et al.*, Cytotechnology 17: 1-11 (1995)) ou 7AAD pode ser avaliada com relação a células não tratadas. Os anticorpos, oligopéptidos ou outras moléculas orgânicas indutoras da morte celular preferidas são as que induzem a absorção de PI no teste de absorção de PI em células BT474.

Uma "célula que expressa TAHO" é uma célula que expressa um polipéptido TAHO endógeno ou transfetado sobre a superfície celular ou numa forma segregada. Um "cancro que expressa TAHO" é um cancro que compreende células que contêm polipéptido TAHO presente sobre a superfície celular ou que produzem e segregam um polipéptido TAHO. Um "cancro que expressa TAHO" produz opcionalmente níveis suficientes de polipéptido TAHO sobre a superfície das suas células, de forma que o anticorpo anti-TAHO, oligopéptido ou outra molécula orgânica possa unir-se a elas e apresentar um efeito terapêutico com relação ao cancro. Em outra forma de realização, um "cancro que expressa TAHO" opcionalmente produz e segrega níveis suficientes de polipéptido TAHO, de forma que o anticorpo anti-TAHO, oligopéptido ou outro antagonista de molécula orgânica possa unir-se a elas e apresentar um efeito terapêutico com relação ao cancro. Com relação a este último, o antagonista pode ser um oligonucleótido antissense que reduz, inibe ou evita a produção e secreção do polipéptido TAHO segregado por células tumorais. Um cancro que "sobre-expressa" um polipéptido TAHO é aquele que apresenta níveis significativamente mais altos de polipéptido TAHO na sua superfície celular, ou o produz e segrega, em comparação com a célula não cancerosa do mesmo tipo de tecido. Essa sobre-expressão pode ser causada por meio de amplificação genética ou por meio de maior transcrição ou tradução. A sobre-expressão de polipéptido TAHO pode ser determinada num ensaio de deteção ou prognóstico por meio da avaliação dos níveis mais altos da proteína TAHO presente sobre a superfície de uma célula ou segregada pela célula (por exemplo, por meio de ensaio de imunohistoquímica utilizando anticorpos anti-TAHO preparados contra polipéptido TAHO isolado que pode ser preparado utilizando tecnologia de ADN recombinante de ácido nucleico isolado que codifica o polipéptido TAHO; análise FACS, etc.). Alternativa, ou

adicionalmente, pode-se medir os níveis de ARNm ou ácido nucleico codificador de polipéptido TAHO na célula, por meio, por exemplo, de hibridação *in situ* fluorescente utilizando sonda com base em ácido nucleico correspondente a ácido nucleico que codifica TAHO ou seu complemento (FISH; veja-se documento WO 98/45479 publicado em Outubro de 1998), Southern Blot, Northern Blot ou técnicas de reação em cadeia de polimerase (PCR), tais como PCR quantitativa em tempo real (RT-PCR). Pode-se também estudar a sobre-expressão de polipéptido TAHO, medindo-se o antigénio retirado em fluido biológico tal como soro, utilizando, por exemplo, ensaios com base em anticorpos (veja-se também, por exemplo, a Patente US nº 4.933.294 concedida em 12 de Junho de 1990; documento WO 91/05264 publicado em 18 de Abril de 1991; Patente US nº 5.401.638 concedida em 28 de Março de 1995; e Sias *et al.*, *J. Immunol. Methods* 132: 73-80 (1990)). Além dos ensaios acima, diversos outros ensaios *in vivo* estão disponíveis para os peritos na especialidade. Pode-se, por exemplo, expor as células no corpo do paciente a anticorpo que seja opcionalmente marcado com marcador detetável, tal como isótopo radioativo, e pode-se avaliar a ligação do anticorpo a células no paciente, por exemplo, por meio de varrimento externo para avaliação da radioatividade ou de análise de biópsia retirada de um paciente exposto anteriormente ao anticorpo.

Como é usado no presente documento, o termo "imunoadesina" designa moléculas similares a anticorpos que combinam a especificidade de ligação de proteína heteróloga ("adesina") com as funções efetoras de domínios constantes de imunoglobulina. Estruturalmente, as imunoadesinas compreendem fusão de sequência de aminoácidos com a especificidade de ligação desejada, que é diferente do local de ligação e reconhecimento de antigénios de

anticorpo (ou seja, é "heteróloga") e sequência de domínio constante de imunoglobulina. A parte de adesina de molécula de imunoadesina é tipicamente sequência de aminoácidos contígua que compreende pelo menos o local de ligação de recetor ou ligante. A sequência de domínio constante de imunoglobulina na imunoadesina pode ser obtida a partir de qualquer imunoglobulina, tal como os subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 ou IgG-4, IgA (incluindo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD ou IgM.

A palavra "marcador", como é usado no presente documento, designa composto ou composição detetável que é conjugado direta ou indiretamente ao anticorpo, oligopéptido ou outra molécula orgânica, de forma a gerar anticorpo, oligopéptido ou outra molécula orgânica "marcada". O marcador pode ser detetável por si próprio (tais como marcadores de radioisótopos ou marcadores fluorescentes) ou, no caso de marcador enzimático, pode catalisar a alteração química de composto ou composição de substrato que seja detetável.

O termo "agente citotóxico", como é usado no presente documento, indica substância que inibe ou evita o funcionamento das células e/ou causa a destruição das células. O termo destina-se a incluir isótopos radioativos (tais como At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32} e isótopos radioativos de Lu), agentes quimioterápicos, tais como metotrexato, adriamicina, vinca alcaloides (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina ou outros agentes intercalantes, enzimas e seus fragmentos, tais como enzimas nucleolíticas, antibióticos e toxinas, tais como toxinas de moléculas pequenas ou toxinas enzimaticamente ativas de origem animal, vegetal, fúngica ou bacteriana, incluindo seus fragmentos e/ou variantes, e

os diversos agentes antitumorais ou anticancerígenos descritos a seguir. Outros agentes citotóxicos são descritos a seguir. Um agente tumoricida causa a destruição de células tumorais.

Um "agente de inibição do crescimento" quando usado no presente documento refere-se a um composto ou composição que inibe o crescimento de uma célula, especialmente célula cancerosa que expressa TAHO, seja *in vitro* ou *in vivo*. Desta forma, o agente de inibição do crescimento pode ser aquele que reduz significativamente o percentual de células que expressam TAHO em fase S. Exemplos de agentes de inibição do crescimento incluem agentes que bloqueiam o progresso do ciclo celular (em local diferente da fase S), tais como agentes que induzem a suspensão de G1 e a suspensão da fase M. Bloqueadores clássicos de fase M incluem as vincas (vincristina e vimblastina), taxanos e inibidores da topoisomerase II, tais como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido e bleomicina. Os agentes que prendem G1 também invadem a prisão da fase S, por exemplo, agentes alquilantes de ADN, tais como tamoxifen, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatina, metotrexato, 5-fluorouracil e ara-C. Informações adicionais podem ser encontradas em *The Molecular Basis of Cancer,* Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, intitulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" por Murakami *et al*. (WB Saunders: Filadélfia, 1995), especialmente pág. 13. Os taxanos (paclitaxel e docetaxel) são fármacos anticancerígenos, ambos derivados da árvore de teixo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado do teixo europeu, é análogo semissintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel e docetaxel promovem a reunião de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina e estabilizam microtúbulos ao evitarem a despolimerização, que resulta na

inibição de mitose em células.

"Doxorubicina" é antibiótico de antraciclina. O nome químico completo de doxorubicina é (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi-α-L-lixo-hexapiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetraidro-6,8,11-trihidroxi-9-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacenodiona.

O termo "citocina" é termo genérico para proteínas libertadas por uma população celular que agem sobre outra célula como mediadores intercelulares. Exemplos dessas citocinas são linfocinas, monocinas e hormonas de polipéptidos tradicionais. Encontram-se incluídos entre as citocinas hormonas do crescimento, tais como hormona do crescimento humano, hormona do crescimento humano N-metionilo e hormona do crescimento bovino; hormona paratireoide; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; pró-relaxina; hormonas de glicoproteínas tais como hormona estimulante dos folículos (FSH), hormona estimulante da tireoide (TSH) e hormona luteinizante (LH); fator do crescimento hepático; fator de crescimento dos fibroblastos; prolactina; lactogénio da placenta; fator de necrose tumoral α e β; substância inibidora mulleriana; péptido associado a gonadotropina de ratinhos; inibina; activina; fator de crescimento endotelial vascular; integrina; trombopoietina (TPO); fatores de crescimento dos nervos tais como NGF-β; fator de crescimento das plaquetas, fatores de crescimento de transformação (TGFs) tais como TGF-α e TGF-β; fator de crescimento similar à insulina I e II; eritropoietina (EPO); fatores osteoindutivos; interferonas, tais como interferão-α, β e γ; fatores estimulantes de colônias (CSFs) tais como macrófago-CSF (M-CSF); granulócito-macrófago-CSF (GM-CSF); e granulócito-CSF (G-CSF); interleucinas (ILs) tais como IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL- 4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11,

IL-12; fator de necrose tumoral tal como TNF-α ou TNF-B; e outros fatores de polipéptidos que incluem LIF e ligando de kits (KL). Como é usado no presente documento, o termo citocina inclui proteínas de fontes naturais ou de cultivo celular recombinante e equivalentes biologicamente ativos das citocinas de sequência nativa.

O termo "bula" é utilizado para indicar instruções costumeiramente incluídas em embalagens comerciais de produtos terapêuticos que contêm informações sobre as indicações, utilização, dosagem, administração, contraindicações e/ou avisos com referência à utilização desses produtos terapêuticos.

Quadro 1

```
/*
 *
 * C-C increased from 12 to 15
 * Z is average of EQ
 * B is average of ND
 * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
 */
#define  _M      -8        /* value of a match with a stop */

int      _day[26][26] = {
/*    A  B  C  D  E  F  G  H  I  J  K  L  M  N  O  P  Q  R  S  T  U  V  W  X  Y  Z */
/* A */  { 2, 0,-2, 0, 0,-4, 1,-1,-1, 0,-1,-2,-1, 0,_M, 1, 0,-2, 1, 1, 0, 0,-6, 0,-3, 0},
/* B */  { 0, 3,-4, 3, 2,-5, 0, 1,-2, 0, 0,-3,-2, 2,_M,-1, 1, 0, 0, 0, 0,-2,-5, 0,-3, 1},
/* C */  {-2,-4,15,-5,-5,-4,-3,-3,-2, 0,-5,-6,-5,-4,_M,-3,-5,-4, 0,-2, 0,-2,-8, 0, 0,-5},
/* D */  { 0, 3,-5, 4, 3,-6, 1, 1,-2, 0, 0,-4,-3, 2,_M,-1, 2,-1, 0, 0, 0,-2,-7, 0,-4, 2},
/* E */  { 0, 2,-5, 3, 4,-5, 0, 1,-2, 0, 0,-3,-2, 1,_M,-1, 2,-1, 0, 0, 0,-2,-7, 0,-4, 3},
/* F */  {-4,-5,-4,-6,-5, 9,-5,-2, 1, 0,-5, 2, 0,-4,_M,-5,-5,-4,-3,-3, 0,-1, 0, 0, 7,-5},
/* G */  { 1, 0,-3, 1, 0,-5, 5,-2,-3, 0,-2,-4,-3, 0,_M,-1,-1,-3, 1, 0, 0,-1,-7, 0,-5, 0},
/* H */  {-1, 1,-3, 1, 1,-2,-2, 6,-2, 0, 0,-2,-2, 2,_M, 0, 3, 2,-1,-1, 0,-2,-3, 0, 0, 2},
/* I */  {-1,-2,-2,-2,-2, 1,-3,-2, 5, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-2,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-5, 0,-1,-2},
/* J */  { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */  {-1, 0,-5, 0, 0,-5,-2, 0,-2, 0, 5,-3, 0, 1,_M,-1, 1, 3, 0, 0, 0,-2,-3, 0,-4, 0},
/* L */  {-2,-3,-6,-4,-3, 2,-4,-2, 2, 0,-3, 6, 4,-3,_M,-3,-2,-3,-3,-1, 0, 2,-2, 0,-1,-2},
/* M */  {-1,-2,-5,-3,-2, 0,-3,-2, 2, 0, 0, 4, 6,-2,_M,-2,-1, 0,-2,-1, 0, 2,-4, 0,-2,-1},
/* N */  { 0, 2,-4, 2, 1,-4, 0, 2,-2, 0, 1,-3,-2, 2,_M,-1, 1, 0, 1, 0, 0,-2,-4, 0,-2, 1},
/* O */  {_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M, 0,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M},
/* P */  { 1,-1,-3,-1,-1,-5,-1, 0,-2, 0,-1,-3,-2,-1,_M, 6, 0, 0, 1, 0, 0,-1,-6, 0,-5, 0},
/* Q */  { 0, 1,-5, 2, 2,-5,-1, 3,-2, 0, 1,-2,-1, 1,_M, 0, 4, 1,-1,-1, 0,-2,-5, 0,-4, 3},
/* R */  {-2, 0,-4,-1,-1,-4,-3, 2,-2, 0, 3,-3, 0, 0,_M, 0, 1, 6, 0,-1, 0,-2, 2, 0,-4, 0},
/* S */  { 1, 0, 0, 0, 0,-3, 1,-1,-1, 0, 0,-3,-2, 1,_M, 1,-1, 0, 2, 1, 0,-1,-2, 0,-3, 0},
/* T */  { 1, 0,-2, 0, 0,-3, 0,-1, 0, 0, 0,-1,-1, 0,_M, 0,-1,-1, 1, 3, 0, 0,-5, 0,-3, 0},
/* U */  { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */  { 0,-2,-2,-2,-2,-1,-1,-2, 4, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-1,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-6, 0,-2,-2},
/* W */  {-6,-5,-8,-7,-7, 0,-7,-3,-5, 0,-3,-2,-4,-4,_M,-6,-5, 2,-2,-5, 0,-6,17, 0, 0,-6},
/* X */  { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */  {-3,-3, 0,-4,-4, 7,-5, 0,-1, 0,-4,-1,-2,-2,_M,-5,-4,-4,-3,-3, 0,-2, 0, 0,10,-4},
/* Z */  { 0, 1,-5, 2, 3,-5, 0, 2,-2, 0, 0,-2,-1, 1,_M, 0, 3, 0, 0, 0, 0,-2,-6, 0,-4, 4}
};
```

Quadro 1 (cont.)

```
/*
 */
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define  MAXJMP          16      /* max jumps in a diag */
#define  MAXGAP          24      /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define  JMPS            1024    /* max jmps in an path */
#define  MX              4       /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define  DMAT            3       /* value of matching bases */
#define  DMIS            0       /* penalty for mismatched bases */
#define  DINS0           8       /* penalty for a gap */
#define  DINS1           1       /* penalty per base */
#define  PINS0           8       /* penalty for a gap */
#define  PINS1           4       /* penalty per residue */

struct jmp {
        short           n[MAXJMP];      /* size of jmp (neg for dely) */
        unsigned short  x[MAXJMP];      /* base no. of jmp in seq x */
};                                      /* limits seq to 2^16 -1 */

struct diag {
        int             score;          /* score at last jmp */
        long            offset;         /* offset of prev block */
        short           ijmp;           /* current jmp index */
        struct jmp      jp;             /* list of jmps */
};

struct path {
        int     spc;            /* number of leading spaces */
        short   n[JMPS];/* size of jmp (gap) */
        int     x[JMPS];/* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char            *ofile;                 /* output file name */
char            *namex[2];              /* seq names: getseqs() */
char            *prog;                  /* prog name for err msgs */
char            *seqx[2];               /* seqs: getseqs() */
int             dmax;                   /* best diag: nw() */
int             dmax0;                  /* final diag */
int             dna;                    /* set if dna: main() */
int             endgaps;                /* set if penalizing end gaps */
int             gapx, gapy;             /* total gaps in seqs */
int             len0, len1;             /* seq lens */
int             ngapx, ngapy;           /* total size of gaps */
int             smax;                   /* max score: nw() */
int             *xbm;                   /* bitmap for matching */
long            offset;                 /* current offset in jmp file */
struct  diag    *dx;                    /* holds diagonals */
struct  path    pp[2];                  /* holds path for seqs */

char            *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char            *getseq(), *g_calloc();
```

Quadro 1 (cont.)

```
/* Needleman-Wunsch alignment program
 *
 * usage: progs file1 file2
 *  where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
 *  The sequences can be in upper- or lower-case an may contain ambiguity
 *  Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
 *  Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
 *  A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
 *  Output is in the file "align.out"
 *
 * The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
 * Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
 */
#include "nw.h"
#include "day.h"

static    _dbval[26] = {
        1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static    _pbval[26] = {
        1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
        128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
        1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
        1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

main(ac, av)                                                          main
        int     ac;
        char    *av[];
{
        prog = av[0];
        if (ac != 3) {
                fprintf(stderr,"usage: %s file1 file2\n", prog);
                fprintf(stderr,"where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
                fprintf(stderr,"The sequences can be in upper- or lower-case\n");
                fprintf(stderr,"Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
                fprintf(stderr,"Output is in the file \"align.out\"\n");
                exit(1);
        }
        namex[0] = av[1];
        namex[1] = av[2];
        seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
        seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
        xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

        endgaps = 0;                    /* 1 to penalize endgaps */
        ofile = "align.out";            /* output file */

        nw();                   /* fill in the matrix, get the possible jmps */
        readjmps();             /* get the actual jmps */
        print();                /* print stats, alignment */

        cleanup(0);             /* unlink any tmp files */}
```

Quadro 1 (cont.)

```
/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
nw()                                                                    nw
{
        char            *px, *py;       /* seqs and ptrs */
        int             *ndely, *dely;  /* keep track of dely */
        int             ndelx, delx;    /* keep track of delx */
        int             *tmp;           /* for swapping row0, row1 */
        int             mis;            /* score for each type */
        int             ins0, ins1;     /* insertion penalties */
        register        id;             /* diagonal index */
        register        ij;             /* jmp index */
        register        *col0, *col1;   /* score for curr, last row */
        register        xx, yy;         /* index into seqs */

        dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));
        ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
        dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
        col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
        col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
        ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
        ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;
        smax = -10000;
        if (endgaps) {
                for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
                        col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
                        ndely[yy] = yy;
                }
                col0[0] = 0;            /* Waterman Bull Math Biol 84 */
        }
        else
                for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
                        dely[yy] = -ins0;
        /* fill in match matrix
         */
        for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
                /* initialize first entry in col
                 */
                if (endgaps) {
                        if (xx == 1)
                                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
                        else
                                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
                        ndelx = xx;
                }
                else {
                        col1[0] = 0;
                        delx = -ins0;
                        ndelx = 0;
                }
```

Quadro 1 (cont.)

...nw

```
for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
        mis = col0[yy-1];
        if (dna)
                mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
        else
                mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

        /* update penalty for del in x seq;
         * favor new del over ongong del
         * ignore MAXGAP if weighting endgaps
         */
        if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
                if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
                        dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
                        ndely[yy] = 1;
                } else {
                        dely[yy] -= ins1;
                        ndely[yy]++;
                }
        } else {
                if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
                        dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
                        ndely[yy] = 1;
                } else
                        ndely[yy]++;
        }

        /* update penalty for del in y seq;
         * favor new del over ongong del
         */
        if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
                if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
                        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
                        ndelx = 1;
                } else {
                        delx -= ins1;
                        ndelx++;
                }
        } else {
                if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
                        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
                        ndelx = 1;
                } else
                        ndelx++;
        }

        /* pick the maximum score; we're favoring
         * mis over any del and delx over dely
         */
```

...nw

```
        id = xx - yy + len1 - 1;
        if (mis >= delx  && mis >= dely[yy])
                col1[yy] = mis;
```

Quadro 1 (cont.)

```
                else if (delx >= dely[yy]) {
                        col1[yy] = delx;
                        ij = dx[id].ijmp;
                        if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
                        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
                                dx[id].ijmp++;
                                if (++ij >= MAXJMP) {
                                        writejmps(id);
                                        ij = dx[id].ijmp = 0;
                                        dx[id].offset = offset;
                                        offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
                                }
                        }
                        dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
                        dx[id].jp.x[ij] = xx;
                        dx[id].score = delx;
                }
                else {
                        col1[yy] = dely[yy];
                        ij = dx[id].ijmp;
if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
                        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
                                dx[id].ijmp++;
                                if (++ij >= MAXJMP) {
                                        writejmps(id);
                                        ij = dx[id].ijmp = 0;
                                        dx[id].offset = offset;
                                        offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
                                }
                        }
                        dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
                        dx[id].jp.x[ij] = xx;
                        dx[id].score = dely[yy];
                }
                if (xx == len0 && yy < len1) {
                        /* last col
                         */
                        if (endgaps)
                                col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
                        if (col1[yy] > smax) {
                                smax = col1[yy];
                                dmax = id;
                        }
                }
        }
        if (endgaps && xx < len0)
                col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
        if (col1[yy-1] > smax) {
                smax = col1[yy-1];
                dmax = id;
        }
        tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;                    }
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);                              }
```

Quadro 1 (cont.)

```
/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() - -put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

#include "nw.h"

#define SPC     3
#define P_LINE  256     /* maximum output line */
#define P_SPC   3       /* space between name or num and seq */

extern  _day[26][26];
int     olen;           /* set output line length */
FILE    *fx;            /* output file */

print()                                                          print
{
        int     lx, ly, firstgap, lastgap;      /* overlap */

        if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
                fprintf(stderr,"%s: can't write %s\n", prog, ofile);
                cleanup(1);
        }
        fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
        fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
        olen = 60;
        lx = len0;
        ly = len1;
        firstgap = lastgap = 0;
        if (dmax < len1 - 1) {          /* leading gap in x */
                pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
                ly -= pp[0].spc;
        }
        else if (dmax > len1 - 1) {     /* leading gap in y */
                pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
                lx -= pp[1].spc;
        }
        if (dmax0 < len0 - 1) {         /* trailing gap in x */
                lastgap = len0 - dmax0 -1;
                lx -= lastgap;
        }
        else if (dmax0 > len0 - 1) {    /* trailing gap in y */
                lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
                ly -= lastgap;
        }
        getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
        pr_align();             }
```

Quadro 1 (cont.)

getmat

```
/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)
        int     lx, ly;                 /* "core" (minus endgaps) */
        int     firstgap, lastgap;      /* leading trailing overlap */
{
        int             nm, i0, i1, siz0, siz1;
        char            outx[32];
        double          pct;
        register        n0, n1;
        register char   *p0, *p1;
        /* get total matches, score
         */
        i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
        p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
        p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
        n0 = pp[1].spc + 1;
        n1 = pp[0].spc + 1;
        nm = 0;
        while ( *p0 && *p1 ) {
                if (siz0) {
                        p1++;
                        n1++;
                        siz0--;
                }
                else if (siz1) {
                        p0++;
                        n0++;
                        siz1--;
                }
                else {
                        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                                nm++;
                        if (n0++ == pp[0].x[i0])
                                siz0 = pp[0].n[i0++];
                        if (n1++ == pp[1].x[i1])
                                siz1 = pp[1].n[i1++];
                        p0++;
                        p1++;
                }
        }

        /* pct homology:
         * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
         * else, knock off overhangs and take shorter core
         */
        if (endgaps)
                lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
        else
                lx = (lx < ly)? lx : ly;
        pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
        fprintf(fx, "\n");
        fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
                nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
```

Quadro 1 (cont.)

...getmat

```
        fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
        if (gapx) {
                (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
                        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "":"s");
                fprintf(fx,"%s", outx);
        fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
        if (gapy) {
                (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
                        ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "":"s");
                fprintf(fx,"%s", outx);
        }
        if (dna)
                fprintf(fx,
                "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
                smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
        else
                fprintf(fx,
                "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d  + %d per residue)\n",
                smax, PINS0, PINS1);
        if (endgaps)
                fprintf(fx,
                "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
                firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
                lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
        else
                fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}
static          nm;             /* matches in core -- for checking */
static          lmax;           /* lengths of stripped file names */
static          ij[2];          /* jmp index for a path */
static          nc[2];          /* number at start of current line */
static          ni[2];          /* current elem number -- for gapping */
static          siz[2];
static char     *ps[2];         /* ptr to current element */
static char     *po[2];         /* ptr to next output char slot */
static char     out[2][P_LINE]; /* output line */
static char     star[P_LINE];   /* set by stars() */
/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
```

pr_align

```
pr_align()
{
        int             nn;     /* char count */
        int             more;
        register        i;

        for (i =  0, lmax = 0; i < 2; i++) {
                nn = stripname(namex[i]);
                if (nn > lmax)
                        lmax = nn;
                nc[i] = 1;
                ni[i] = 1;
                siz[i] = ij[i] = 0;
                ps[i] = seqx[i];
                po[i] = out[i];                 }
```

Quadro 1 (cont.)

...pr_align

```
        for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {
                for (i = more = 0; i < 2; i++) {
                        /*
                         * do we have more of this sequence?
                         */
                        if (!*ps[i])
                                continue;
                        more++;
                        if (pp[i].spc) {        /* leading space */
                                *po[i]++ = ' ';
                                pp[i].spc--;
                        }
                        else if (siz[i]) {      /* in a gap */
                                *po[i]++ = '-';
                                siz[i]--;
                        }
                        else {                  /* we're putting a seq element
                                                 */
                                *po[i] = *ps[i];
                                if (islower(*ps[i]))
                                        *ps[i] = toupper(*ps[i]);
                                po[i]++;
                                ps[i]++;
                                /*
                                 * are we at next gap for this seq?
                                 */
                                if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                                        /*
                                         * we need to merge all gaps
                                         * at this location
                                         */
                                        siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
                                        while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                                                siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
                                }
                                ni[i]++;
                        }
                }
                if (++nn == olen || !more && nn) {
                        dumpblock();
                        for (i = 0; i < 2; i++)
                                po[i] = out[i];
                        nn = 0;
                }
        }
}
/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
```

dumpblock

```
dumpblock()
{
        register  i;
        for (i = 0; i < 2; i++)
                *po[i]-- = '\0';
```

Quadro 1 (cont.)

...dumpblock

```
        (void) putc('\n', fx);
        for (i = 0; i < 2; i++) {
                if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
                        if (i == 0)
                                nums(i);
                        if (i == 0 && *out[1])
                                stars();
                        putline(i);
                        if (i == 0 && *out[1])
                                fprintf(fx, star);
                        if (i == 1)
                                nums(i);
                }
        }
}
/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)                                                                    nums
        int     ix;     /* index in out[] holding seq line */
{
        char            nline[P_LINE];
        register        i, j;
        register char   *pn, *px, *py;
        for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
                *pn = ' ';
        for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
                if (*py == ' ' || *py == '-')
                        *pn = ' ';
                else {
                        if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                                j = (i < 0)? -i : i;
                                for (px = pn; j; j /= 10, px--)
                                        *px = j%10 + '0';
                                if (i < 0)
                                        *px = '-';
                        }
                        else
                                *pn = ' ';
                        i++;
                }
        }
        *pn = '\0';
        nc[ix] = i;
        for (pn = nline; *pn; pn++)
                (void) putc(*pn, fx);
        (void) putc('\n', fx);
}
/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)                                                                 putline
        int     ix;                     {
```

Quadro 1 (cont.)

...putline

```
        int             i;
        register char   *px;

        for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
                (void) putc(*px, fx);
        for (; i < lmax+P_SPC; i++)
                (void) putc(' ', fx);

        /* these count from 1:
         * ni[] is current element (from 1)
         * nc[] is number at start of current line
         */
        for (px = out[ix]; *px; px++)
                (void) putc(*px&0x7F, fx);
        (void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()                                                          stars
{
        int             i;
        register char   *p0, *p1, cx, *px;

        if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
            !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
                return;
        px = star;
        for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
                *px++ = ' ';

        for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
                if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {

                        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
                                cx = '*';
                                nm++;
                        }
                        else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                                cx = '.';
                        else
                                cx = ' ';
                }
                else
                        cx = ' ';
                *px++ = cx;
        }
        *px++ = '\n';
        *px = '\0';
}
```

Quadro 1 (cont.)

stripname

```
/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pc_align()
 */
static
stripname(pn)
        char    *pn;    /* file name (may be path) */
{
        register char   *px, *py;

        py = 0;
        for (px = pn; *px; px++)
                if (*px == '/')
                        py = px + 1;
        if (py)
                (void) strcpy(pn, py);
        return(strlen(pn));

}
```

Quadro 1 (cont.)

```
/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_calloc() -- calloc() with error checkin
 * readjmps() -- get the good jmps, from tmp file if necessary
 * writejmps() -- write a filled array of jmps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char    *jname = "/tmp/homgXXXXXX";             /* tmp file for jmps */
FILE    *fj;
int     cleanup();                              /* cleanup tmp file */
long    lseek();
/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)                                                          cleanup
        int     i;
{
        if (fj)
                (void) unlink(jname);
        exit(i);
}
/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char    *
getseq(file, len)                                                   getseq
        char    *file;  /* file name */
        int     *len;   /* seq len */
{
        char            line[1024], *pseq;
        register char   *px, *py;
        int             natgc, tlen;
        FILE            *fp;
        if ((fp = fopen(file,"r")) == 0) {
                fprintf(stderr,"%s: can't read %s\n", prog, file);
                exit(1);
        }
        tlen = natgc = 0;
        while (fgets(line, 1024, fp)) {
                if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
                        continue;
                for (px = line; *px != '\n'; px++)
                        if (isupper(*px) || islower(*px))
                                tlen++;
        }
        if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
                fprintf(stderr,"%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
                exit(1);
        }
        pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
```

Quadro 1 (cont.)

...getseq

```
        py = pseq + 4;
        *len = tlen;
        rewind(fp);
        while (fgets(line, 1024, fp)) {
                if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
                        continue;
                for (px = line; *px != '\n'; px++) {
                        if (isupper(*px))
                                *py++ = *px;
                        else if (islower(*px))
                                *py++ = toupper(*px);
                        if (index("ATGCU",*(py-1)))
                                natgc++;
                }
        }
        *py++ = '\0';
        *py = '\0';
        (void) fclose(fp);
        dna = natgc > (tlen/3);
        return(pseq+4);
}
```

g_calloc

```
char    *
g_calloc(msg, nx, sz)
        char    *msg;           /* program, calling routine */
        int     nx, sz;         /* number and size of elements */
{
        char            *px, *calloc();
        if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
                if (*msg) {
                        fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
                        exit(1);
                }
        }
        return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
```

readjmps

```
readjmps()
{
        int             fd = -1;
        int             siz, i0, i1;
        register        i, j, xx;
        if (fj) {
                (void) fclose(fj);
                if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
                        fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
                        cleanup(1);
                }
        }
        for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
                while (1) {
                        for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                                ;
```

Quadro 1 (cont.)

...readjmps

```
                if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
                        (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
                        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
                        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
                        dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;                                    }
                else
                        break;                  }
        if (i >= JMPS) {
                fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
                cleanup(1);
        }
        if (j >= 0) {
                siz = dx[dmax].jp.n[j];
                xx = dx[dmax].jp.x[j];
                dmax += siz;
                if (siz < 0) {                  /* gap in second seq */
                        pp[1].n[i1] = -siz;
                        xx += siz;
                        /* id = xx - yy + len1 - 1                                   */
                        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
                        gapy++;
                        ngapy -= siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
                        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
                        i1++;
                }
                else if (siz > 0) {     /* gap in first seq */
                        pp[0].n[i0] = siz;
                        pp[0].x[i0] = xx;
                        gapx++;
                        ngapx += siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
                        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
                        i0++;
                }
        }
        else
                break;
}
/* reverse the order of jmps    */
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
        i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
        i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
        i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
        i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
        (void) close(fd);
if (fj) {
        (void) unlink(jname);
        fj = 0;
        offset = 0;
}                                       }
```

Quadro 1 (cont.)

writejmps

```
/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejmps(ix)
        int     ix;
{
        char    *mktemp();

        if (!fj) {
                if (mktemp(jname) < 0) {
                        fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
                        cleanup(1);
                }
                if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
                        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
                        exit(1);
                }
        }
        (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
        (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}
```

Quadro 2

TAHO	XXXXXXXXXXXXXXX	(Comprimento = 15 aminoácidos)
Proteína de Comparação	XXXXXYYYYYYY	(Comprimento = 12 aminoácidos)

% de identidade de sequência de aminoácidos = (o número de resíduos de aminoácidos que se correspondem identicamente entre as duas sequências de polipéptidos como determinado por ALIGN-2) dividido por (o número total de resíduos de aminoácidos do polipéptido TAHO) = 5 dividido por 15 = 33,3 %

Quadro 3

TAHO	XXXXXXXXX	(Comprimento = 10 aminoácidos)
Proteína de Comparação	XXXXXYYYYYYZZYZ	(Comprimento = 15 aminoácidos)

% de identidade de sequência de aminoácidos = (o número de resíduos de aminoácidos que se correspondem identicamente entre as duas sequências de polipéptidos como determinado por ALIGN-2) dividido por (o número total de resíduos de aminoácidos do polipéptido TAHO) = 5 dividido por 10 = 50 %

Quadro 4

TAHO-ADN	NNNNNNNNNNNNNN	(Comprimento = 14 nucleótidos)
ADN de Comparação	NNNNNNLLLLLLLLL	(Comprimento = 16 nucleótidos)

% de identidade de sequência de ácido nucleico = (o número de nucleótidos que se correspondem identicamente entre as duas sequências de ácido nucleico como determinado por ALIGN-2) dividido por (o número total de nucleótidos da sequência de ácido nucleico de ADN-TAHO) = 6 dividido por 14 = 42,9 %

Quadro 5

TAHO-ADN	NNNNNNNNNNNN	(Comprimento = 12 nucleótidos)
ADN de Comparação	NNNNLLLVV	(Comprimento = 9 nucleótidos)

% de identidade de sequência de ácido nucleico = (o número de nucleótidos que se correspondem identicamente entre as duas sequências de ácido nucleico como determinado por ALIGN-2) dividido por (o número total de nucleótidos da sequência de ácido nucleico de ADN-TAHO) = 4 dividido por 12 = 33,3 %

II. Composições e Métodos da Invenção

A. Anticorpos anti-TAHO

Numa forma de realização, a presente invenção proporciona anticorpos anti-TAHO para utilização como agentes terapêuticos, como foi apresentado nas reivindicações. Anticorpos exemplares incluem anticorpos policlonais, monoclonais, humanizados, biespecíficos, e heteroconjugados.

1. Anticorpos Policlonais

Os anticorpos policlonais são preferivelmente elevados em animais por meio de diversas injeções subcutâneas (sc) ou intraperitoneais (ip) do antigénio relevante e um adjuvante. Pode ser útil conjugar o antigénio relevante (especialmente ao utilizar-se péptidos sintéticos) a uma proteína que seja imunogénica na espécie a ser imunizada. O antigénio pode ser conjugado, por exemplo, a hemocianina de conchas (KLH), albumina de soro, tiroglobulina bovina ou inibidor de tripsina de soja, utilizando agente bifuncional ou derivatizante, tal como éster maleimidobenzoil sufossuccinimida (conjugação através de resíduos de cisteína), N-hidroxissuccinimida (através de resíduos de lisina), glutaraldeído, anidrido succínico, $SOCl_2$, ou $R^1N=C=NR$, em que R e R^1 são grupos alquilo diferentes.

Os animais são imunizados contra o antigénio, conjugados imunogénicos ou derivados por meio de combinação, por exemplo, de 100 µg ou 5 µg da proteína ou conjugado (para coelhos ou ratinhos, respetivamente) com três volumes de adjuvante completo de Freund e injeção da solução de forma intradérmica em diversos locais. Um mês mais tarde, os animais são incentivados com 1/5 a 1/10 da quantidade original de péptido ou conjugado em adjuvante completo de Freund, por meio de injeção subcutânea em diversos locais. Sete a 14 dias mais tarde, os animais são sangrados e o soro é testado para titulação de anticorpos. Os animais são incentivados até a estabilização do título. Os conjugados podem também ser elaborados em cultivo celular recombinante, na forma de fusões de proteínas. Além disso, agentes agregantes tais como alúmen são adequadamente utilizados para aumentar a reação imunológica.

2. Anticorpos Monoclonais

Anticorpos monoclonais podem ser elaborados utilizando o método de hibridoma descrito em primeiro lugar por Kohler *et al.*, *Nature*, 256: 495 (1975), ou podem ser elaborados por meio de métodos de ADN recombinante (Patente US nº 4.816.567).

No método de hibridoma, ratinho ou outro animal hospedeiro apropriado, tal como hamster, é imunizado conforme descrito acima para gerar linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que se unirão especificamente à proteína utilizada para imunização. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Após a imunização, os linfócitos são isolados e fusionados em seguida com linha de células de mieloma utilizando agente de fusão apropriado, tal como polietileno glicol, para formar célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principies and Practice*, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)).

As células de hibridoma preparadas desta forma são semeadas e cultivadas em meio de cultivo apropriado, que contém preferivelmente uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou a sobrevivência das células de mieloma parentais não fusionadas (também denominadas parceiro de fusão). Caso as células de mieloma parentais, por exemplo, não possuam a enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultivo selecionado para os hibridomas incluirá tipicamente hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT), substâncias que evitam o crescimento de células com deficiência de HGPRT.

Células de mieloma parceiras de fusão preferidas são aquelas que se fundem eficientemente, sustentam a produção

estável em alto nível de anticorpo pelas células produtoras de anticorpos selecionadas e são sensíveis ao meio seletivo que seleciona contra as células parentais não fusionadas. As linhas celulares de mieloma preferidas são linhas de mieloma murino, tais como as derivadas de tumores de ratinhos MOPC-21 e MPC-11 disponíveis por meio do Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Califórnia, Estados Unidos, e SP-2 e derivados, tais como células X63-Ag8-653 disponíveis por meio da Coleção Norte-Americana de Cultivos de Tipos, Manassas, Virgínia, Estados Unidos. Linhas celulares de mieloma humano e heteromieloma humano-de ratinhos também foram descritas para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); e Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1987)).

O meio de cultivo no qual as células de hibridoma estão crescendo é testado para determinar a produção de anticorpos monoclonais dirigidos contra o antigénio. Preferivelmente, a especificidade de ligação de anticorpos monoclonais produzidos por células de hibridoma é determinada por meio de imunoprecipitação ou por teste de ligação *in vitro*, tal como radioimunoensaio (RIA) ou teste imunossorvente ligado por enzimas (ELISA).

A afinidade de ligação do anticorpo monoclonal pode ser determinada, por exemplo, por meio da análise de Scatchard descrita em Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

Após a identificação das células de hibridoma que produzem anticorpos com a especificidade, afinidade e/ou atividade desejada, os clones podem ser subclonados por meio da limitação de procedimentos de diluição e cultivados

por métodos padrão (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principies and Practice,* págs. 59-103 (Academic Press, 1986)). Os meios de cultivo apropriados para este propósito incluem, por exemplo, meio D-MEM ou RPMI-1640. Além disso, as células de hibridoma podem ser cultivadas *in vivo* na forma de tumores de ascite em animal, por exemplo, por meio de injeção intraperitoneal das células em ratinhos.

Os anticorpos monoclonais segregados pelos subclones são adequadamente separados do meio de cultivo, fluido de ascite ou soro por meio de procedimentos convencionais de purificação de anticorpos, tais como cromatografia de afinidade (utilizando, por exemplo, proteína A ou proteína G- Sepharose) ou cromatografia de troca de iões, cromatografia de hidroxilapatita, eletroforese de gel, diálise, etc.

ADN que codifica os anticorpos monoclonais é facilmente isolado e sequenciado utilizando-se procedimentos convencionais (utilizando, por exemplo, sondas de oligonucleótidos que sejam capazes de se ligarem especificamente a genes que codificam as cadeias leve e pesada de anticorpos murinos). As células de hibridoma servem de fonte preferida desse ADN. Uma vez isolado, o ADN pode ser colocado em vetores de expressão, que são transfetados em seguida em células hospedeiras tais como células de *E. coli,* células de COS de símios, células de Ovário de Hamster Chinês (CHO) ou células de mieloma que, de outra forma, não produzem proteína de anticorpo, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. Os artigos de análise sobre a expressão recombinante em bactérias de ADN que codificam o anticorpo incluem Skerra *et al., Curr. Opinion in Immunol.,* 5: 256-262 (1993) e Pliickthun, *Immunol. Revs.* 130: 151-188 (1992).

Numa forma de realização adicional, os anticorpos monoclonais ou fragmentos de anticorpos podem ser isolados a partir de bibliotecas de fagos de anticorpos geradas utilizando as técnicas descritas em McCafferty *et al., Nature,* 348: 552- 554 (1990), Clackson *et al., Nature,* 352: 624-628 (1991) e Marks *et al., J. Mol. Biol.,* 222: 581-597 (1991) descrevem o isolamento de anticorpos humanos e murinos, respetivamente, utilizando bibliotecas de fagos. Publicações subsequentes descrevem a produção de anticorpos humanos de alta afinidade (faixa de nM) por meio de mistura de cadeias (Marks *et al., Bio/Technology,* 10: 779-783 (1992)), bem como infeções combinatórias e recombinação *in vivo,* como estratégia para a construção de bibliotecas de fagos muito grandes (Waterhouse *et al., Nuc. Acids. Res.* 21: 2265-2266 (1993)). Desta forma, estas técnicas são alternativas viáveis para as técnicas de hibridoma de anticorpos monoclonais tradicionais para o isolamento de anticorpos monoclonais.

O ADN que codifica o anticorpo pode ser modificado para produzir polipéptidos de anticorpos de fusão ou quiméricos, por meio de substituição, por exemplo, de sequências de domínio constante de cadeia pesada e cadeia leve (C_H e C_L) pelas sequências murinas homólogas (Patente US n° 4.816.567; e Morrison *et al., Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 81: 6851 (1984)), ou por meio de fusão da sequência de codificação de imunoglobulinas com a sequência de codificação para um polipéptido não de imunoglobulina (polipéptido heterólogo), no todo ou em parte. As sequências de polipéptidos não de imunoglobulina podem substituir os domínios constantes de anticorpo, ou são substituídas pelos domínios variáveis de um local de combinação de antigénios de anticorpo para criar anticorpo bivalente quimérico que compreende um local de combinação de antigénios que possuí especificidade para um antigénio e

outro local de combinação de antigénios que possui especificidade para antigénio diferente.

3. Anticorpos Humanizados e Humanos

Os anticorpos anti-TAHO para utilização de acordo com a presente invenção podem compreender adicionalmente anticorpos humanizados ou anticorpos humanos. Formas "humanizadas" de anticorpos não humanos (tais como murinos) são imunoglobulinas quiméricas, cadeias de imunoglobulina ou seus fragmentos (tais como Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ ou outras subsequências de ligação de antigénios de anticorpos) que contêm sequência mínima derivada de imunoglobulina não humana. Os anticorpos humanizados incluem imunoglobulinas humanas (anticorpo recetor), nas quais os resíduos de uma região de determinação complementar (CDR) do paciente são substituídos por resíduos de CDR de espécie não humana (anticorpo dador), tal como ratinho, rato ou coelho que possui a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Em alguns casos, os resíduos da região de estrutura Fv da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não humanos correspondentes. Os anticorpos humanizados podem também compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo recetor nem nas sequências de estrutura ou CDR importadas. Geralmente, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todos dentre pelo menos um, tipicamente dois domínios variáveis, nos quais todas ou substancialmente todas as regiões CDR correspondem às de imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as regiões FR são as de sequência de consenso de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado também compreenderá idealmente pelo menos uma porção de região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de imunoglobulina humana [Jones *et al.*, *Nature,* 321: 522-525

(1986); Riechmann *et al., Nature,* 332: 323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.,* 2: 593-596 (1992)].

Os métodos de humanização de anticorpos não humanos são bem conhecidos na técnica. Geralmente, anticorpo humanizado contém um ou mais resíduos de aminoácidos nele introduzidos a partir de fonte que não é humana. Estes resíduos de aminoácidos não humanos são frequentemente denominados resíduos "importados", que são tomados tipicamente de domínio variável "importado". A humanização pode ser essencialmente realizada seguindo-se o método de Winter e colaboradores [Jones *et al., Nature,* 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al., Nature,* 332: 323-327 (1988); Verhoeyen *et al., Science,* 239: 1534-1536 (1988)], por meio de substituição de CDRs ou sequências de CDR de roedores pelas sequências correspondentes de anticorpo humano. Consequentemente, esses anticorpos "humanizados" são anticorpos quiméricos (Patente US nº 4.816.567), em que substancialmente menos de um domínio variável humano intato tenha sido substituído pela sequência correspondente de espécie não humana. Na prática, os anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos, em que alguns resíduos de CDR e possivelmente alguns resíduos de FR são substituídos por resíduos de locais análogos em anticorpos de roedores.

A seleção de domínios variáveis humanos, tanto leves quanto pesados, a serem utilizados na elaboração dos anticorpos humanizados é muito importante para reduzir a antigenicidade e reação de HAMA (anticorpo anti-ratinho humano) quando o anticorpo destinar-se a utilização terapêutico humano. De acordo com o chamado método de "melhor adequação", a sequência do domínio variável de anticorpo roedor é selecionada contra toda a biblioteca de sequências de domínio variável humanas conhecidas. A

sequência de domínio V humano que é mais próxima da do roedor é identificada e a sua região de estrutura (FR) humana é aceita para o anticorpo humanizado [Sims *et al.*, *J. Immunol.* 151: 2296 (1993); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)]. Outro método utiliza uma região de estrutura específica derivada da sequência de consenso de todos os anticorpos humanos de um subgrupo específico de cadeias leves ou pesadas. A mesma estrutura pode ser utilizada para vários anticorpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 89: 4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.* 151: 2623 (1993)).

É adicionalmente importante que os anticorpos sejam humanizados com retenção de alta afinidade de ligação para o antigénio e outras propriedades biológicas favoráveis. Para atingir este objetivo, de acordo com método preferido, anticorpos humanizados são preparados por meio de processo de análise das sequências parentais e diversos produtos humanizados conceituais, utilizando modelos tridimensionais das sequências parental e humanizada. Modelos de imunoglobulina tridimensionais são comumente disponíveis e familiares para os peritos na especialidade. Estão disponíveis programas de computador que ilustram e exibem estruturas conformacionais tridimensionais prováveis de possíveis sequências de imunoglobulina selecionadas. A inspeção destas exibições permite a análise do papel provável dos resíduos no funcionamento da possível sequência de imunoglobulina, ou seja, a análise de resíduos que influenciam a capacidade da possível imunoglobulina de unir o seu antigénio. Desta forma, os resíduos de FR podem ser selecionados e combinados a partir das sequências recetora e importada para atingir a característica de anticorpo desejada, tal como maior afinidade para o(s) antigénio(s) alvo. Geralmente, os resíduos da região hipervariável são diretamente e mais substancialmente

envolvidos na influência da ligação de antigénios.

São contempladas diversas formas de anticorpo anti-TAHO humanizado. O anticorpo humanizado pode ser, por exemplo, fragmento de anticorpo, tal como Fab, que é opcionalmente conjugado a um ou mais agentes citotóxicos, a fim de gerar imunoconjugado. Alternativamente, o anticorpo humanizado pode ser anticorpo intato, tal como anticorpo IgG1 intato.

Como alternativa para a humanização, podem ser gerados anticorpos humanos. É agora possível produzir, por exemplo, animais transgénicos (tais como ratinhos) que são capazes, mediante imunização, de produzir repertório completo de anticorpos humanos na ausência da produção de imunoglobulina endógena. Descreveu-se, por exemplo, que a exclusão homozigótica do gene da região de ligação de cadeia pesada de anticorpos (J_H) em ratinhos quiméricos e mutantes de linha germinal resulta na inibição completa da produção de anticorpos endógenos. A transferência do conjunto de genes de imunoglobulina da linha germinal humano nesses ratinhos com mutação da linha germinal resultará na produção de anticorpos humanos mediante desafio com antigénios. Veja-se, por exemplo, Jakobovits *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al., Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al., Yearin Immuno.* 7: 33 (1993); Patentes US n° 5.545.806, 5.569.825, 5.591.669 (todas da GenPharm); 5.545.807; e documento WO 97/17852.

Alternativamente, pode-se utilizar tecnologia de exibição de fagos (McCafferty *et al., Nature* 348: 552-553 [1990]) para produzir anticorpos humanos e fragmentos de anticorpos *in vitro* a partir de repertórios de genes de domínio variável (V) de imunoglobulina de dadores não

imunizados. De acordo com esta técnica, os genes de domínio V de anticorpos são clonados em quadro num gene de proteína de revestimento maior ou menor de bacteriófago filamentoso, tal como M13 ou fd, e exibidos na forma de fragmentos de anticorpos funcionais sobre a superfície da partícula de fago. Como a partícula filamentosa contém uma cópia de ADN de cadeia simples do genoma de fago, as seleções baseadas nas propriedades funcionais do anticorpo também resultam na seleção do gene codificador do anticorpo que exibe essas propriedades. Assim, o fago imita algumas das propriedades da célula B. A exibição de fago pode ser realizada numa série de formatos, analisados, por exemplo, em Johnson, Kevin S. e Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3: 564-571 (1993). Diversas fontes de segmentos de gene V podem ser utilizadas para exibição do fago. Clackson *et al., Nature,* 352: 624-628 (1991) isolaram conjunto diverso de anticorpos anti-oxazolona a partir de pequena biblioteca combinatória aleatória de genes V derivados de baços de ratinhos imunizados. Um repertório de genes V de dadores humanos não imunizados pode ser construído e anticorpos para conjunto diverso de antigénios (incluindo autoantigénios) podem ser isolados seguindo- se essencialmente as técnicas descritas por Marks *et al., J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991), ou Griffith *et al., EMBO J.* 12: 725-734 (1993). Veja-se também as Patentes US nº 5.565.332 e 5.573.905.

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

4. Fragmentos de Anticorpos

Em certas circunstâncias, existem vantagens na utilização de fragmentos de anticorpos, e não anticorpos

inteiros. O menor tamanho dos fragmentos permite libertação rápida e pode gerar maior acesso aos tumores sólidos.

Foram desenvolvidas diversas técnicas de produção de fragmentos de anticorpos. Tradicionalmente, estes fragmentos foram derivados por meio de digestão proteolítica de anticorpos intatos (veja-se, por exemplo, Morimoto *et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117 (1992); e Brennan *et al., Science* 229: 81 (1985)). Entretanto, esses fragmentos podem ser agora produzidos diretamente por células hospedeiras recombinantes. Fragmentos de anticorpos Fab, Fv e ScFv podem todos ser expressos em *E. coli* e dele segregados, de forma a permitir a produção fluente de grandes quantidades desses fragmentos. Os fragmentos de anticorpos podem ser isolados a partir das bibliotecas de fagos de anticorpos discutidas acima. Alternativamente, fragmentos de Fab'-SH podem ser recuperados diretamente de *E. coli e* acoplados quimicamente para formar fragmentos de $F(ab')_2$ (Carter *et al., Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)). De acordo com outra abordagem, fragmentos de $F(ab')_2$ podem ser isolados diretamente a partir do cultivo de células hospedeiras recombinantes. Fragmentos de Fab e $F(ab')_2$ com maior semivida *in vivo* que compreendem resíduos de epítopos de ligação de recetores de recuperação são descritos na Patente US nº 5.869.046. Outras técnicas de produção de fragmentos de anticorpos serão evidentes para os peritos na especialidade. Em outras formas de realização, o anticorpo selecionado é fragmento de Fv de cadeia simples (scFv). Veja-se documento WO 93/16185; Patente US nº 5.571.894; e Patente US nº 5.587.458. Fv e sFv são as únicas espécies com locais de combinação intatos que são desprovidas de regiões constantes; por isso, elas são apropriadas para reduzida ligação não específica durante a utilização *in vivo*. Proteínas de fusão de sFv podem ser construídas para

gerar a fusão de proteína efetora no terminal amino ou carboxi de sFv. Veja-se *Antibody Engineering,* ed. Borrebaeck, acima. O fragmento de anticorpo pode também ser "anticorpo linear", conforme descrito, por exemplo, na Patente US nº 5.641.870. Esses fragmentos de anticorpos lineares podem ser monoespecíficos ou biespecíficos.

5. Anticorpos Biespecíficos

Os anticorpos biespecíficos são anticorpos que possuem especificidades de ligação para pelo menos dois epítopos diferentes. Exemplos de anticorpos biespecíficos podem unir-se a dois epítopos diferentes de proteína TAHO conforme descrito no presente documento. Outros desses anticorpos podem combinar local de ligação a TAHO com local de ligação para outra proteína. Alternativamente, braço anti-TAHO pode ser combinado com braço que se liga a molécula acionadora sobre leucócito, tal como molécula recetora de células T (por exemplo, CD3), ou recetores de Fc para IgG (FcγR), tais como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) e FcγRIII (CD16), de forma a dirigir e localizar mecanismos de defesa celular para a célula que expressa TAHO. Anticorpos biespecíficos podem também ser utilizados para localizar agentes citotóxicos para células que expressem TAHO. Esses anticorpos possuem braço de ligação a TAHO e braço que une o agente citotóxico (tal como saporina, anti-interferão-α, vinca alcaloide, cadeia de ricina A, metotrexato ou hapteno de isótopo radioativo). Os anticorpos biespecíficos podem ser preparados na forma de anticorpos de comprimento total ou fragmentos de anticorpos (tais como anticorpos biespecíficos $F(ab')_2$.

O documento WO 96/16673 descreve um anticorpo anti-ErbB2/anti-FcγRIII biespecífico e a Patente US nº 5.837.234 descreve anticorpo anti-ErbB2/anti-FcγRI biespecífico.

Anticorpo anti-ErbB2/Fc α biespecífico é exibido no documento WO 98/02463. A Patente US nº 5.821.337 ensina um anticorpo anti-ErbB2/anti-CD3 biespecífico.

Os métodos de produção de anticorpos biespecíficos são conhecidos na técnica. A produção tradicional de anticorpos biespecíficos de comprimento total baseia-se na coexpressão de dois pares de cadeia leve e cadeia pesada de imunoglobulina, em que as duas cadeias possuem especificidades diferentes (Millstein *et al.*, *Nature*, 305: 537-539 (1983)). Devido à disposição aleatória de cadeias leve e pesada de imunoglobulina, esses hibridomas (quadromas) produzem mistura potencial de dez moléculas de anticorpos diferentes, das quais apenas uma possui a estrutura biespecífica correta. A purificação da molécula correta, que é normalmente realizada por meio de etapas de cromatografia de afinidade, é um tanto problemática e os rendimentos de produto são baixos. Procedimentos similares são descritos no documento WO 93/08829 e em Traunecker *et al.*, 1991, *EMBO J.* 10: 3655-3659 (1991).

De acordo com abordagem diferente, domínios variáveis de anticorpos com as especificidades de ligação desejadas (locais de combinação de anticorpos e antigénios) são fusionados a sequências de domínio constante de imunoglobulina. Preferivelmente, a fusão efetua-se com domínio constante de cadeia pesada de Ig, que compreende pelo menos parte das regiões de articulação, C_H2 e C_H3. Prefere-se ter a primeira região constante de cadeia pesada (C_H1) contendo o local necessário para ligação de cadeias leves, presentes em pelo menos uma das fusões. Os ADN codificadores das fusões de cadeia pesada de imunoglobulina e, se desejado, a cadeia leve de imunoglobulina são inseridos em vetores de expressão separados e cotransfetados para célula hospedeira apropriada. Isso

proporciona maior flexibilidade de ajuste das proporções mútuas dos três fragmentos de polipéptidos em formas de realização em que razões desiguais das três cadeias de polipéptidos utilizadas na construção proporcionam rendimento ideal do anticorpo biespecífico desejado. É possível, entretanto, inserir as sequências codificadoras de duas ou de todas as três cadeias de polipéptidos num único vetor de expressão, quando a expressão de pelo menos duas cadeias de polipéptidos em razões iguais resultar em altos rendimentos ou quando as razões não apresentarem efeito significativo sobre o rendimento da combinação de cadeia desejada.

Numa forma de realização preferida desta abordagem, os anticorpos biespecíficos são compostos de cadeia pesada de imunoglobulina híbrida com primeira especificidade de ligação num braço e um par de cadeia leve e cadeia pesada de imunoglobulina híbrida (que fornece segunda especificidade de ligação) no outro braço. Concluiu-se que essa estrutura assimétrica possibilita a separação do composto biespecífico desejado de combinações de cadeia de imunoglobulina indesejadas, pois a presença de cadeia leve de imunoglobulina em apenas uma metade da molécula biespecífica proporciona forma fácil de separação. Esta abordagem é descrita no documento WO 94/04690. Para pormenores adicionais de geração de anticorpos biespecíficos, consulte, por exemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acordo com outra abordagem descrita na Patente US nº 5.731.168, a superfície intermediária entre um par de moléculas de anticorpos pode ser construída de forma a maximizar o percentual de heterodimeros que é recuperado do cultivo de células recombinantes. A superfície intermediária preferida compreende pelo menos uma parte do

domínio C_H3. Neste método, uma ou mais cadeias laterais de aminoácidos pequenas da superfície intermediária da primeira molécula de anticorpo são substituídas com cadeias laterais maiores (tais como tirosina ou triptofano). "Cavidades" compensatórias de tamanho idêntico ou similar à(s) cadeia(s) lateral(is) grande(s) são criadas sobre a superfície intermediária da segunda molécula de anticorpo por meio da substituição de cadeias laterais de aminoácidos grandes com menores (por exemplo, alanina ou treonina). Isso proporciona mecanismo de aumento do rendimento do heterodímero sobre outros produtos finais indesejados, tais como homodímeros.

Os anticorpos biespecíficos incluem anticorpos reticulados ou "heteroconjugados". Um dos anticorpos no heteroconjugado pode ser acoplado, por exemplo, a avidina e o outro a biotina. Esses anticorpos foram propostos, por exemplo, para dirigir células do sistema imunológico alvo a células indesejadas (Patente US nº 4.676.980) e para o tratamento de infeções por VIH (documento WO 91/00360, WO 92/200373 e EP 03089). Anticorpos heteroconjugados podem ser fabricados utilizando qualquer método reticulante conveniente. Os agentes reticulantes apropriados são bem conhecidos na técnica e descritos na Patente US nº 4.676.980, juntamente com uma série de técnicas reticulantes.

As técnicas de geração de anticorpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticorpos também foram descritas na literatura. Anticorpos biespecíficos podem ser preparados, por exemplo, utilizando ligações químicas. Brennan *et al.*, *Science,* 229: 81 (1985) descrevem procedimento em que anticorpos intatos são divididos proteoliticamente para gerar fragmentos de $F(ab')_2$. Estes fragmentos são reduzidos na presença do agente formador de

complexo de ditiol arsenito de sódio, para estabilizar ditióis vizinhos e evitar a formação de dissulfeto intermolecular. Os fragmentos de Fab' gerados são convertidos em seguida em derivados de tionitrobenzoato (TNB). Um dos derivados de Fab'-TNB é então novamente convertido no Fab'-tiol por meio de redução com mercaptoetilamina e é misturado com quantidade equimolar do outro derivado de Fab'-TNB para formar o anticorpo biespecífico. Os anticorpos biespecíficos produzidos podem ser utilizados como agentes para a imobilização seletiva de enzimas.

Progressos recentes possibilitaram a recuperação direta de fragmentos de Fab'-SH de *E. coli*, que podem ser acoplados quimicamente para formar anticorpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992) descrevem a produção de molécula $F(ab')_2$ de anticorpo biespecífico totalmente humanizado. Cada fragmento de Fab' foi segregado separadamente de *E. coli* e submetido a acoplamento químico dirigido *in vitro* para formar o anticorpo biespecífico. O anticorpo biespecífico assim formado foi capaz de unir-se a células que sobre-expressam o recetor de ErbB2 e células T humanas normais, bem como acionar a atividade lítica de linfócitos citotóxicos humanos contra alvos de tumor de mama humanos. Diversas técnicas de fabrico e isolamento de fragmentos de anticorpos biespecíficos diretamente a partir de cultivo celular recombinante também foram descritas. Anticorpos biespecíficos foram produzidos, por exemplo, utilizando fechos de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148 (5): 1547-1553 (1992). Os péptidos de fecho de leucina das proteínas Fos e Jun foram ligados às partes Fab' de dois anticorpos diferentes por meio de fusão genética. Os homodímeros de anticorpos foram reduzidos na região de articulação para formar monômeros e, em seguida, novamente

oxidados para formar os heterodímeros de anticorpos. Este método pode também ser utilizado para a produção de homodímeros de anticorpos. A tecnologia de "diacorpos" descrita por Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993) forneceu mecanismo alternativo de fabrico de fragmentos de anticorpos biespecíficos. Os fragmentos compreendem V_H conectado a V_L por ligante que é curto demais para permitir o emparelhamento entre os dois domínios sobre a mesma cadeia. Consequentemente, os domínios V_H e V_L de um fragmento são forçados a emparelhar-se com os domínios V_L e V_H complementares de outro fragmento, de maneira a formar dois locais de ligação de antigénios. Outra estratégia de fabrico de fragmentos de anticorpos biespecíficos utilizando dímeros Fv de cadeia simples (sFv) também foi relatada. Veja-se Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994).

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

6. Anticorpos Heteroconjugados

Os anticorpos heteroconjugados também se encontram dentro do âmbito da presente invenção. Os anticorpos heteroconjugados são compostos de dois anticorpos unidos covalentemente. Esses anticorpos foram propostos, por exemplo, para dirigir células do sistema imunológico a células indesejadas (Patente US nº 4.676.980) e para o tratamento de infeções por VIH (documento WO 91/00360; documento WO 92/200373; documento EP 03089). Contempla-se que os anticorpos podem ser preparados *in vitro*, utilizando métodos conhecidos na química de proteínas sintéticas, incluindo aqueles que envolvem agentes reticulantes. Imunotoxinas, por exemplo, podem ser construídas utilizando

reação de troca de dissulfeto ou por meio da formação de ligação tioéter. Exemplos de reagentes apropriados com este propósito incluem iminotiolato e 4-mercaptobutirimidato de metilo e os descritos, por exemplo, na Patente US nº 4.676.980.

7. Anticorpos Multivalentes

Um anticorpo multivalente pode ser internalizado (e/ou catabolizado) mais rapidamente que anticorpo bivalente por uma célula que expresse antigénio ao qual se unem os anticorpos. Os anticorpos de acordo com a presente invenção podem ser anticorpos multivalentes

(que são diferentes da classe IgM) com três ou mais locais de ligação de antigénios (por exemplo, anticorpos tetravalentes) que podem ser facilmente produzidos por meio de expressão recombinante de ácido nucleico codificador das cadeias de polipéptidos do anticorpo. O anticorpo multivalente pode compreender domínio de dimerização e três ou mais locais de ligação de antigénios. O domínio de dimerização preferido compreende (ou consiste em) região Fc ou região de articulação. Neste cenário, o anticorpo compreenderá uma região Fc e três ou mais locais de ligação de antigénios amino-terminais para a região Fc. O anticorpo multivalente preferido do presente compreende (ou consiste em) três a cerca de oito, mas preferivelmente quatro locais de ligação de antigénios. O anticorpo multivalente compreende pelo menos uma cadeia de polipéptido (e, preferivelmente, duas cadeias de polipéptidos), em que a(s) cadeia(s) de polipéptido(s) compreende(m) dois ou mais domínios variáveis. A(s) cadeia(s) de polipéptido(s) pode(m) compreender, por exemplo, VD1-$(X_1)_n$-VD2-$(X_2)_n$-Fc, em que VD1 é primeiro domínio variável, VD2 é segundo domínio variável, Fc é uma cadeia de polipéptidos de região Fc, X1

e X2 representam aminoácido ou polipéptido e n é 0 ou 1. A(s) cadeia(s) de polipéptido(s) pode(m) compreender, por exemplo: cadeia de VH-CH1-ligação flexível-VH-CH1-região Fc; ou cadeia de VH-CH1-VH-CH1-região Fc. O anticorpo multivalente do presente compreende ainda, preferivelmente, pelo menos dois (de maior preferência, quatro) polipéptidos de domínio variável de cadeia leve. O anticorpo multivalente do presente pode compreender, por exemplo, cerca de dois a cerca de oito polipéptidos de domínio variável de cadeia leve. Os polipéptidos de domínio variável de cadeia leve contemplados no presente compreendem um domínio variável de cadeia leve e, opcionalmente, compreendem ainda um domínio CL.

8. Engenharia de Função Efetora

Pode ser desejável modificar o anticorpo de acordo com a presente invenção com relação à função efetora, por exemplo, de forma a aumentar a citotoxicidade mediada por células dependente de antigénios (ADCC) e/ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC) do anticorpo. Isso pode ser atingido por meio da introdução de uma ou mais substituições de aminoácidos em região Fc do anticorpo. Alternativa ou adicionalmente, resíduo(s) de cisteína pode(m) ser introduzido(s) na região Fc, de forma a permitir a formação de uniões de dissulfeto intercadeias nessa região. O anticorpo homodimérico gerado desta forma pode possuir capacidade de internalização aprimorada e/ou morte celular mediada por complemento aprimorada e citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC). Veja-se Caron *et al., J. Exp. Med.* 176: 1191-1195 (1992) e Shopes, B., *J. Immunol.* 148: 2918-2922 (1992). Anticorpos homodiméricos com atividade antitumoral aprimorada podem também ser preparados utilizando reticulantes heterobifuncionais conforme descrito em Wolff *et al.*,

Cancro Research 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, pode ser elaborado anticorpo que contém regiões Fc duplas e, portanto, pode possuir capacidades de ADCC e lise complementar aprimoradas. Veja-se Stevenson *et al.*, *Anti-Cancer Drug Design* 3: 219-230 (1989). Para aumentar a semivida do anticorpo em soro, pode-se incorporar um epítopo de ligação de recetor de salvados ao anticorpo (especialmente fragmento de anticorpo), conforme descrito, por exemplo, na Patente US nº 5.739.277. Como é usado no presente documento, a expressão "epítopo de ligação de recetor de salvados" designa epítopo da região Fc de molécula de IgG (por exemplo, IgG_1, IgG_2, IgG_3 ou IgG_4) que é responsável pelo aumento da semivida em soro *in vivo* da molécula de IgG.

9. Imunoconjugados

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

Os agentes quimioterápicos úteis na geração desses imunoconjugados foram descritos acima. Toxinas enzimaticamente ativas e seus fragmentos que podem ser utilizados incluem cadeia de difteria A, fragmentos ativos não de ligação da toxina de difteria, cadeia de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa)*, cadeia de ricina A, cadeia de abrina A, cadeia de modeccina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII e PAP-S), inibidor *Momordica charantia*, curcina, crotina, inibidor de

Sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina e os tricotecenos. Uma série de radionuclídeos é disponível para a produção de anticorpos radioconjugados. Exemplos incluem ^{212}Bi, ^{131}I, ^{131}In, ^{90}Y e ^{186}Re. Os conjugados do anticorpo e agente citotóxico são fabricados utilizando uma série de agentes acopladores de proteínas bifuncionais, tais como propionato de N-succinimidil-3-(2- piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como adipimidato de dimetilo HCI), ésteres ativos (tais como suberato de di-succinimidilo), aldeídos (tais como glutaraldeído), compostos bis-azido (tais como bis(p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazônio (tais como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tais como 2,6- diisocianato de tolieno) e compostos de flúor bis-ativo (tais como 1,5-difluoro- 2,4-dinitrobenzeno). Imunotoxina ricina pode ser preparada, por exemplo, conforme descrito em Vitetta *et al., Science* 238: 1098 (1987). Ácido 1- isotiocianatobenzil-3-metildietileno triaminopentaacético marcado por carbono 14 (MX-DTPA) é exemplo de agente quelante para conjugação de radionucleótido ao anticorpo. Veja-se documento WO 94/11026.

Os conjugados de anticorpo e uma ou mais toxinas de moléculas pequenas, tais como caliqueamicina, péptidos de auristatina, tais como monometilauristatina (MMAE) (análogo sintético de dolastatina), maitansinoides, tais como DM1, um tricoteno, e CC1065, e os derivados destas toxinas que têm atividade de toxina, são também contemplados no presente documento.

Maitansina e maitansinoides

Numa forma de realização preferida, um anticorpo anti-

TAHO (comprimento total ou fragmentos) de acordo com a presente invenção é conjugado a uma ou mais moléculas de maitansinoide.

Maitansinoides, tais como DM1, são inibidores mitotóticos que agem por meio da inibição da polimerização de tubulina. Maitansina foi isolada pela primeira vez a partir do arbusto do leste africano *Maytenus serrata* (Patente US nº 3.896.111). Descobriu-se em seguida que certos micróbios também produzem maitansinoides, tais como maitansinol e ésteres C-3 maitansinol (Patente US nº 4.151.042). Maitansinol sintético, seus derivados e análogos são descritos, por exemplo, nas Patentes US nº 4.137.230, 4.248.870, 4.256.746, 4.260.608, 4.265.814, 4.294.757, 4.307.016, 4.308.268, 4,308,269, 4.309.428, 4.313.946, 4.315.929, 4.317.821, 4.322.348, 4.331.598, 4.361.650, 4.364.866, 4.424.219, 4.450.254, 4.362.663 e 4.371.533.

Conjugados de Anticorpo e Maitansinoide

Em tentativa de aumento dos seus índices terapêuticos, maitansina e maitansinoides foram conjugados a anticorpos que se ligam especificamente a antigénios de células tumorais. Imunoconjugados contendo maitansinoides e sua utilização terapêutica são descritos, por exemplo, nas Patentes US nº 5.208.020, 5.416.064 e Patente Europeia nº EP 0.425.235 B1. Liu *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8618-8623 (1993) descreveram imunoconjugados que compreendem maitansinoide denominado DM1 ligado ao anticorpo monoclonal C242 dirigido a cancro colo-retal humano. Concluiu-se que o conjugado é altamente citotóxico com direção a células cancerosas do cólon cultivadas e exibiu atividade antitumoral em teste de crescimento tumoroso *in vivo*. Chari *et al., Cancro Research* 52: 127-131

(1992) descrevem imunoconjugados em que um maitansinoide foi conjugado, por meio de ligação de dissulfeto, ao anticorpo A7 murino que se liga a um antigénio sobre linhas de células de cancro do cólon humano ou a outro anticorpo monoclonal murino TA.1 que une o oncogene HER-2/neu. A citotoxicidade do conjugado de TA.1 e maitansinoide foi testada *in vitro* sobre a linha de células de cancro de mama humano SK-BR-3, que expressa 3 x 10^5 antigénios de superfície HER-2 por célula. O conjugado de fármacos atingiu grau de citotoxicidade similar ao fármaco de maitansinoide livre, que poderá ser aumentada por meio do aumento da quantidade de moléculas de maitansinoide por molécula de anticorpo. O conjugado de A7 e maitansinoide exibiu baixa citotoxicidade sistêmica em ratinhos.

Conjugados de maitansinoide e anticorpo anti-polipéptido TAHO (imunoconjugados)

Os conjugados de maitansinoide e anticorpo anti-TAHO são preparados por meio de ligação química de anticorpo anti-TAHO a molécula de maitansinoide sem reduzir significativamente a atividade biológica do anticorpo ou da molécula de maitansinoide. Em média, três a quatro moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticorpo exibiram eficácia no aumento da citotoxicidade de células alvo sem afetar negativamente a função ou solubilidade do anticorpo, embora se esperasse que até uma molécula de toxina/anticorpo aumentasse a citotoxicidade sobre a utilização de anticorpo bruto. Maitansinoides são bem conhecidos na técnica e podem ser sintetizados por meio de técnicas conhecidas ou isolados a partir de fontes naturais. Maitansinoides apropriados são descritos, por exemplo, na Patente US nº 5.208.020 e nas outras patentes e publicações não patenteadas descritas acima no presente documento. Os maitansinoides preferidos são maitansinol e

análogos de maitansinol modificados no anel aromático ou em outras posições da molécula de maitansinol, tais como diversos ésteres de maitansinol.

Existem vários grupos de ligação conhecidos na técnica para a fabrico de conjugados de anticorpo e maitansinoide, que incluem, por exemplo, os descritos na Patente US nº 5.208.020 ou Patente EP 0.425.235 B1 e Chari *et al.*, *Cancer Research* 52: 127-131 (1992). Os grupos de ligação incluem grupos dissulfeto, grupos tioéter, grupos instáveis ácidos, grupos fotoinstáveis, grupos instáveis de peptidase ou grupos instáveis de esterase, conforme descrito nas patentes identificadas acima, em que grupos de dissulfeto e tioéter são preferidos.

Os conjugados do anticorpo e maitansinoide podem ser fabricados utilizando uma série de agentes acopladores de proteínas bifuncionais, tais como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometilo), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como adipimidato de dimetilo HCI), ésteres ativos (tais como suberato de di-succinimidilo), aldeídos (tais como glutaraldeído), compostos bis-azido (tais como bis(p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados bis-diazónio (tais como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tais como 2,6-diisocianato de tolueno) e compostos de flúor bis-ativo (tais como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Os agentes acopladores particularmente preferidos incluem propionato de N-succinimidil-3-(2-piridiltio) (SPDP) (Carlsson *et al.*, *Biochem. J.* 173: 723-737 [1978]), sulfosuccinimidil maleimidometil ciclohexano carboxilato (SMCC) e pentanoato de N-succinimidil-4-(2-piridiltio) (SPP) para fornecer ligação de dissulfeto. Outros ligantes úteis incluem cis-

MC-vc-PAB (um reagente de ligante de dipéptido valina-citrulina (vc) que tem um componente de maleimida e um componente autoimolador para-aminobenzilcarbamoilo (PAB).

O ligante pode ser ligado à molécula de maitansinoide em diversas posições, dependendo do tipo da ligação. Ligação éster pode ser formada, por exemplo, por meio de reação com grupo hidroxilo, utilizando técnicas convencionais de acoplamento. A reação pode ocorrer na posição C-3 que contém um grupo hidroxilo, na posição C-14 modificada com hidroximetilo, na posição C-15 modificada com grupo hidroxilo e na posição C-20 que contém grupo hidroxilo. Numa forma de realização preferida, a ligação é formada na posição C-3 de maitansinol ou análogo de maitansinol.

Caliqueamicina

Outro imunoconjugado de interesse compreende um anticorpo anti-TAHO conjugado a uma ou mais moléculas de caliqueamicina. A família caliqueamicina de antibióticos é capaz de produzir rupturas de ADN de fita dupla em concentrações subpicomolares. Para a preparação de conjugados da família de caliqueamicina, veja-se as Patentes US nº 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001 e 5.877.296 (todas da American Cyanamid Company). Análogos estruturais de caliqueamicina que podem ser utilizados incluem, mas não são limitados a γ_1^I, α_2^I, α_3^I, N-acetil-γ_1^I, PSAG e θ^I_1 (Hinman *et al., Cancer Research,* 53: 3336-3342 (1993), Lode *et al., Cancer Research,* 58: 2925-2928 (1998) e as Patentes US da American Cyanamid mencionadas acima). Outro fármaco antitumoral ao qual o anticorpo pode ser conjugado é QFA, que é antifolato. Tanto caliqueamicina quanto QFA contêm locais intracelulares de ação e não cruzam facilmente a

membrana de plasma. Portanto, a absorção celular desses agentes por meio de internalização mediada por anticorpos aumenta grandemente os seus efeitos citotóxicos.

Outros Agentes Citotóxicos

Outros agentes antitumorais que podem ser conjugados aos anticorpos anti-TAHO de acordo com a presente invenção incluem BCNU, estreptozoicina, vincristina e 5-fluorouracil, família de agentes conhecida coletivamente como complexo LL-E33288, descrito nas Patentes US n° 5.053.394 e 5.770.710, bem como esperamicinas (Patente US n° 5.877.296).

Toxinas enzimaticamente ativas e seus fragmentos que podem ser utilizados incluem cadeia de difteria A, fragmentos ativos não de ligação da toxina de difteria, cadeia de exotoxina A (de *Pseudomonas aenjginosa*), cadeia ricina A, cadeia de abrina A, cadeia de modecina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii,* proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII e PAP-S), inibidor *Momordica charantia,* curcina, crotina, inibidor *Sapaonaria officinalis,* gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina e os tricotecenos. Veja-se, por exemplo, documento WO 93/21232, publicado em 28 de Outubro de 1993.

A presente invenção contempla ainda imunoconjugado formado entre anticorpo e composto com atividade nucleolítica (por exemplo, ribonuclease ou endonuclease de ADN, tal como desoxirribonuclease; ADNase).

Para destruição seletiva do tumor, o anticorpo pode compreender um átomo altamente radioativo. Uma série de isótopos radioativos é disponível para a produção de

anticorpos anti-TAHO radioconjugados. Exemplos incluem At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} e isótopos radioativos de Lu. Quando o conjugado for utilizado para diagnóstico, ele pode compreender um átomo radioativo para estudos cintigráficos, tal como tc^{99m} ou I^{123}, ou um marcador de centrifugação para formação de imagens por de ressonância magnética nuclear (RMN) (também conhecida como formação de imagens por ressonância magnética, MRI), tal como novamente iodo-123, iodo- 131, índio-111, flúor-19, carbono-13, nitrogénio-15, oxigénio-17, gadolínio, manganês ou ferro.

Os radiomarcadores ou outros podem ser incorporados ao conjugado de formas conhecidas. O péptido pode ser, por exemplo, biossintetizado ou pode ser sintetizado por meio de síntese química de aminoácidos, utilizando precursores de aminoácidos apropriados, envolvendo, por exemplo, flúor-19 no lugar de hidrogénio. Marcadores tais como tc^{99m}, I^{123}, Re^{186}, Re^{188} e In^{111} podem ser ligadas por meio de resíduo de cisteína no péptido. Ítrio-90 pode ser ligado por meio de resíduo de lisina. O método IODOGEN (Fraker *et al.*, (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57) pode ser utilizado para incorporar iodo-123. *Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy* (Chatal, CRC Press, 1989) descreve outros métodos em pormenores.

Os conjugados do anticorpo e agente citotóxico podem ser fabricados utilizando uma série de agentes acopladores de proteínas bifuncionais, tais como 3-(2-piridiltio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometilo), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como adipimidato de dimetilo HCI), ésteres ativos (tais como suberato de di-succinimidilo), aldeídos (tais como glutaraldeído), compostos bis-azido

(tais como bis(p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados bis-diazónio (tais como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tais como 2,6-diisocianato de tolueno) e compostos de flúor bis-ativo (tais como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Imunotoxina ricina pode ser preparada, por exemplo, conforme descrito em Vitetta *et al.*, *Science* 238: 1098 (1987). Ácido 1-isotiocianatobenzil-3- metildietileno triaminopentaacético marcado por carbono 14 (MX-DTPA) é exemplo de agente quelante para conjugação de radionucleótido ao anticorpo. Veja-se documento WO 94/11026. O ligante pode ser "ligante divisível" que possibilita a libertação do fármaco citotóxico na célula. Pode-se utilizar, por exemplo, ligante instável ácido, ligante sensível a peptidase, ligante fotoinstável, ligante de dimetilo ou ligante que contém dissulfeto (Chari *et al.*, *Cancer Research* 52: 127-131 (1992); Patente US nº 5.208.020).

Alternativamente, pode ser fabricada uma proteína de fusão que compreende o anticorpo anti-TAHO e agente citotóxico, por exemplo, por meio de técnicas recombinantes ou síntese de péptidos. O comprimento de ADN pode compreender regiões correspondentes codificadoras das duas partes do conjugado, sejam elas adjacentes entre si ou separadas por região codificadora de péptido de ligação que não destrua as propriedades desejadas do conjugado.

10. Imunolipossomas

Os anticorpos anti-TAHO descritos no presente também podem ser formulados como imunolipossomas. "Lipossoma" é uma pequena vesícula composta de diversos tipos de lípidos, fosfolípidos e/ou tensioativo que é útil para o fornecimento de fármacos a mamíferos. Os componentes do lipossoma são normalmente dispostos em formação bicamadas,

similar à disposição de lípidos de membranas biológicas. Os lipossomas que contêm o anticorpo são preparados por meio de métodos conhecidos na técnica, conforme descrito em Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. *USA* 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); Patentes US nº 4.485.045 e 4.544.545; e documento WO 97/38731 publicado em 23 de Outubro de 1997. Lipossomas com maior tempo de circulação são descritos na Patente US nº 5.013.556.

Lipossomas particularmente úteis podem ser gerados por meio do método de evaporação de fase reversa com composição de lípidos que compreende fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamlna derivada de PEG (PEG-PE). Os lipossomas são extrudados através de filtros com tamanho de poro definido para gerar lipossomas com o diâmetro desejado. Os fragmentos de Fab' do anticorpo úteis na presente invenção podem ser conjugados aos lipossomas descritos em Martin *et al.*, *J. Biol. Chem.* 257: 286- 288 (1982) por meio de reação de intercâmbio de dissulfetos. Um agente quimioterápico é opcionalmente contido no interior do lipossoma. Veja-se Gabizon etal, *J. National Cancro Inst.* 81 (19): 1484 (1989).

B. Oligopéptidos de Ligação a TAHO

Os oligopéptidos de ligação a TAHO são oligopéptidos que se ligam, preferivelmente de forma específica, a polipéptido TAHO conforme descrito no presente documento. Os oligopéptidos de ligação a TAHO podem ser sintetizados quimicamente utilizando metodologia de síntese de oligopéptidos conhecida ou podem ser preparados e purificados utilizando tecnologia recombinante. Os oligopéptidos de ligação a TAHO normalmente possuem pelo menos de cerca de cinco aminoácidos de comprimento,

alternativamente pelo menos de cerca de 6, 7, 8, 9, 10,11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, ou 100 aminoácidos em comprimento ou mais, em que tais oligopéptidos que são capazes de ligação, preferentemente especificamente, a um polipéptido TAHO como descrito no presente documento. Os oligopéptidos de ligação a TAHO podem ser identificados sem experimentação indevida, utilizando técnicas bem conhecidas. Com relação a isso, observa-se que os métodos de seleção de bibliotecas de oligopéptidos em busca de oligopéptidos que sejam capazes de se ligarem especificamente a polipéptido alvo são bem conhecidos na técnica (veja-se, por exemplo, Patente US Nº 5.556.762, 5.750.373, 4.708.871, 4.833.092, 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689, 5.663.143; Publicação PCT Nº WO 84/03506 e WO84/03564; Geysen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984); Geysen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985); Geysen *et al.*, em Synthetic Péptidos como Antigénios, 130-149 (1986); Geysen *et al.*, J. Immunol. Met., 102: 259-274 (1987); Schoofs *et al.*, J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirla, S. E. *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378; Lowman, H.B. *et al.* (1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T. *et al.* (1991) Nature, 352:624; Marks, J. D. *et al.* (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A.S. *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363, e Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668).

Neste particular, exibição de bacteriófagos (fagos) é método bem conhecido que permite a seleção de grandes bibliotecas de oligopéptidos para identificar membro(s)

dessas bibliotecas que seja(m) capaz(es) de unir-se especificamente a polipéptido alvo. Exibição de fagos é método por meio do qual polipéptidos variantes são exibidos na forma de proteínas de fusão para a proteína de revestimento sobre a superfície de partículas de bacteriófagos (Scott, J. K. e Smith, G. P. (1990), *Science* 249: 386). A utilidade de exibição de fagos reside no fato de que grandes bibliotecas de variantes de proteínas aleatorizadas seletivamente (ou cDNAs clonados aleatoriamente) podem ser ordenadas rápida e eficientemente para as sequências que unem molécula alvo com alta afinidade. A exibição de bibliotecas de péptidos (Cwirla, S. E. *et al.* (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 87: 6378) ou de proteínas (Lowman, H. B. *et al.* (1991), *Biochemistry,* 30: 10832; Clackson, T. *et al.* (1991), *Nature,* 352: 624; Marks, J. D. *et al.* (1991), *J. Mol. Biol.*, 222: 581; Kang, A. S. *et al.* (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 88: 8363) sobre fagos vem sendo utilizada para selecionar milhões de polipéptidos ou oligopéptidos para determinar aqueles com propriedades de ligação específicas (Smith, G. P. (1991), *Current Opin. Biotechnol.*, 2: 668). A seleção de bibliotecas de fagos de mutantes aleatórios requer estratégia de construção e propagação de grande quantidade de variantes, procedimento de purificação de afinidade utilizando o recetor alvo e meio de avaliação dos resultados de enriquecimentos de ligação. Patentes US nº 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689 e 5.663.143.

Embora a maior parte dos métodos de exibição de fagos tenha utilizado fago filamentoso, sistemas de exibição de fago lambdoide (documento WO 95/34683; documento US 5.627.024), sistemas de exibição de fagos T4 (Ren *et al.*, Gene, 215: 439 (1998); Zhu *et al.*, Cancer Research, 58(15): 3209-3214 (1998); Jiang *et al.*, Infection & Immunity, 65(11): 4770-4777 (1997); Ren *et al.*, Gene, 195(2):303-311

(1997); Ren, Proteína Sci., 5:1833 (1996); Efimov *et al.*, Virus Genes, 10:173 (1995)) e sistemas de exibição de fagos T7 (Smith e Scott, Methods in Enzymology, 217: 228-257 (1993); documento US 5.766.905) são também conhecidos.

Muitos outros aprimoramentos e variações do conceito básico de exibição de fagos já foram desenvolvidos. Estes aprimoramentos aumentam a capacidade dos sistemas de exibição de selecionar bibliotecas de péptidos para ligação a moléculas alvo selecionadas e exibir proteínas funcionais com o potencial de seleção dessas proteínas em busca de proteínas desejadas. Dispositivos de reação combinatória para reações de exibição de fagos foram desenvolvidos (documento WO 98/14277) e bibliotecas de exibição de fagos foram utilizadas para analisar e controlar interações bimoleculares (documento WO 98/20169; documento WO 98/20159) e propriedades de péptidos helicoidais restritos (documento WO 98/20036). WO 97/35196 descreve método de isolamento de ligante de afinidade no qual biblioteca de exibição de fagos é colocada em contato com solução na qual o ligante unir-se-á a molécula alvo e segunda solução na qual o ligante de afinidade não se unirá à molécula alvo, para isolar seletivamente ligantes de ligação. O documento WO 97/46251 descreve um método de biocombinação de biblioteca de exibição de fagos aleatória com anticorpo purificado por afinidade e isolamento em seguida do fago de ligação, seguido por processo de microcombinação utilizando recipientes de microplacas para isolar fago de ligação com alta afinidade. A utilização de proteína A de *Staphylococcus aureus* como marcador de afinidade também foi relatada (Li *et al.* (1998), *Mol. Biotech., 9: 187)*. O documento WO 97/47314 descreve a utilização de bibliotecas de subtração de substrato para diferenciar especificidades de enzimas utilizando biblioteca combinatória que pode ser biblioteca de exibição de fagos. Método de seleção de

enzimas apropriadas para utilização em detergentes utilizando exibição de fagos é descrito no documento WO 97/09446. Métodos adicionais de seleção de proteínas de ligação específicas são descritos nas Patentes US nº 5.498.538, 5.432.018 e documento WO 98/15833.

Métodos de geração de bibliotecas de péptidos e seleção dessas bibliotecas também são descritos nas Patentes US nº 5.723.286, 5.432.018, 5.580.717, 5.427.908, 5.498.530, 5.770.434, 5.734.018, 5.698.426, 5.763.192 e 5.723.323.

C. Moléculas Orgânicas de Ligação a TAHO

Moléculas orgânicas de ligação a TAHO são moléculas orgânicas diferentes de oligopéptidos ou anticorpos conforme definido no presente que se ligam, preferivelmente de forma específica, a polipéptido TAHO conforme descrito no presente documento. Moléculas orgânicas de ligação a TAHO podem ser identificadas e sintetizadas quimicamente utilizando metodologia conhecida (veja-se, por exemplo, as Publicações PCT nº WO 00/00823 e WO 00/39585). As moléculas orgânicas de ligação a TAHO normalmente possuem tamanho de menos de cerca de 2000 daltons, alternativamente tamanho de menos de cerca de 1500, 750, 500, 250 ou 200 daltons, em que essas moléculas orgânicas que são capazes de ligação, preferivelmente de forma específica, a polipéptido TAHO conforme descrito no presente podem ser identificadas sem experimentação indevida utilizando métodos bem conhecidos. Neste particular, observa-se que os métodos de seleção de bibliotecas de moléculas orgânicas em busca de moléculas que sejam capazes de se ligarem a polipéptido alvo são bem conhecidos na técnica (veja-se, por exemplo, Publicações PCT nº WO 00/00823 e WO 00/39585). As moléculas orgânicas de ligação a TAHO podem ser, por exemplo, aldeídos,

cetonas, oximas, hidrazonas, semicarbazonas, carbazidas, aminas primárias, aminas secundárias, aminas terciárias, hidrazinas N- substituídas, hidrazidas, álcoois, éteres, tióis, tioéteres, dissulfetos, ácidos carboxílicos, ésteres, amidas, ureias, carbamatos, carbonatos, cetais, tiocetais, acetais, tioacetais, haletos de arilo, sulfonatos de arilo, haletos de alquilo, sulfonatos de alquilo, compostos aromáticos, compostos heterocíclicos, anilinas, alquenos, alcinas, dióis, aminoálcoois, oxazolidinas, oxazolinas, tiazolidinas, tiazolinas, enaminas, sulfonamidas, epóxidos, aziridinas, isocianatos, cloretos de sulfonilo, compostos diazo, cloretos ácidos ou similares.

D. Seleção de Anticorpos Anti-TAHO, Oligopéptidos de Ligação a TAHO e Moléculas Orgânicas de Ligação a TAHO com as Propriedades Desejadas

Foram descritos acima métodos de geração de anticorpos, oligopéptidos e moléculas orgânicas que se ligam a polipéptidos TAHO. Pode-se selecionar adicionalmente anticorpos, oligopéptidos ou outras moléculas orgânicas com certas características biológicas, conforme for desejado.

Os efeitos inibidores do crescimento de anticorpo anti-TAHO, oligopéptido ou outra molécula orgânica do pedido podem ser determinados por meio de métodos conhecidos na técnica, utilizando, por exemplo, células que expressem polipéptido TAHO de forma endógena ou após transfeção com o gene TAHO. Linhas de células tumorais e células transfetadas com TAHO apropriadas, por exemplo, podem ser tratadas com anticorpo monoclonal anti-TAHO, oligopéptido ou outra molécula orgânica do pedido em concentrações diversas por alguns (por exemplo, dois a

sete) dias e manchadas com violeta de cristal ou MTT ou analisadas por meio de algum outro teste colorimétrico. Outro método de medição da proliferação seria por meio da comparação da absorção de ^{3}H-timidina pelas células tratadas na presença ou ausência de anticorpo anti-TAHO, oligopéptido de ligação a TAHO ou molécula orgânica de ligação a TAHO do pedido. Após o tratamento, as células são colhidas e a quantidade de radioatividade incorporada no ADN é quantificada em contador de cintilação. Controlos positivos apropriados incluem o tratamento de linha celular selecionada com anticorpo inibidor do crescimento conhecido, para inibir o crescimento daquela linha celular. A inibição do crescimento de células tumorais *in vivo* pode ser determinada de várias formas conhecidas na técnica. Preferivelmente, a célula tumoral é aquela que sobre-expressa polipéptido TAHO. Preferivelmente, o anticorpo anti-TAHO, oligopéptido de ligação a TAHO ou molécula orgânica de ligação a TAHO inibirá a proliferação celular de célula tumoral que expresse TAHO *in vitro* ou *in vivo* em cerca de 25 a 100 %, em comparação com a célula tumoral não tratada, de maior preferência cerca de 30 a 100 % e, de preferência ainda maior, cerca de 50 a 100 % ou 70 a 100 %, numa forma de realização, em concentração de anticorpo de cerca de 0,5 a 30 µg/ml. A inibição do crescimento pode ser medida em concentração de anticorpos de cerca de 0,5 a 30 µg/ml ou cerca de 0,5 nM a 200 nM em cultivo celular, em que a inibição do crescimento é determinada num a dez dias após a exposição das células tumorais ao anticorpo. O anticorpo é inibidor do crescimento *in vivo* caso a administração do anticorpo anti-TAHO a cerca de 1 µg/kg até cerca de 100 mg/kg de peso do corpo resulte na redução do tamanho do tumor ou redução da proliferação de células tumorais em até cerca de cinco dias a três meses a partir da primeira administração do anticorpo, preferivelmente em até cerca de 5 a 30 dias.

Para selecionar anticorpo anti-TAHO, oligopéptido de ligação a TAHO ou molécula orgânica de ligação a TAHO que induza a morte celular, pode-se determinar a perda de integridade da membrana, conforme indicado, por exemplo, pela absorção de iodeto de propídio (PI), azul de tripano ou 7AAD com relação ao controlo. Pode-se realizar teste de absorção de PI na ausência de complemento e células efetoras imunes. As células tumorais que expressam polipéptido TAHO são incubadas com meio isolado ou meio que contenha o anticorpo anti-TAHO apropriado (tal como em cerca de 10 µg/ml), oligopéptido de ligação a TAHO ou molécula orgânica de ligação a TAHO. As células são incubadas por período de três dias. Após cada tratamento, as células são lavadas e divididas em 12 x 75 tubos de 35 mm com tampa de coador (1 ml por tubo, três tubos por grupo de tratamento) para a remoção de massas celulares. Os tubos recebem então PI (10 pg/ml). As amostras podem ser analisadas utilizando citómetro de fluxo FACSCAN® e software FACSCONVERT® CellQuest (Becton Dickinson). Os anticorpos anti-TAHO, oligopéptidos de ligação a TAHO ou moléculas orgânicas de ligação a TAHO que induzem níveis estatisticamente significativos de morte celular, conforme determinado por meio da absorção de PI, podem ser selecionados como anticorpos anti-TAHO, oligopéptidos de ligação a TAHO ou moléculas orgânicas de ligação a TAHO que induzem a morte celular.

Para selecionar anticorpos, oligopéptidos ou outras moléculas orgânicas que se unam a epítopo sobre polipéptido TAHO unido por anticorpo de interesse, pode-se realizar teste bloqueador cruzado de rotina, tal como o descrito em *Antibodies, A Laboratory Manual,* Cold Spring Harbor Laboratory, Ed. Harlow e David Lane (1988). Esse teste pode ser utilizado para determinar se anticorpo de teste, oligopéptido ou outra molécula orgânica une o mesmo local

ou epítopo na forma de anticorpo anti-TAHO conhecido. Alternativa ou adicionalmente, pode-se realizar mapeamento de epítopos por meio de métodos conhecidos na técnica. A sequência de anticorpos pode ser mutagenizada, por exemplo, por meio de varrimento de alanina, para identificar resíduos de contato. O anticorpo mutante é testado inicialmente para ligação com anticorpo policlonal, para garantir dobra apropriada. Em método diferente, péptidos correspondentes a regiões diferentes de polipéptido TAHO podem ser utilizados em ensaios de competição com os anticorpos de teste ou com anticorpo de teste e anticorpo com epítopo conhecido ou caraterizado.

E. Terapêutica de Pró-Fármacos Mediada por Enzimas Dependentes de Anticorpos (ADEPT)

Os anticorpos podem também ser utilizados em ADEPT, por meio de conjugação do anticorpo a uma enzima ativadora de pró-fármacos, que converte pró-fármaco (por exemplo, agente quimioterápico de peptidilo, veja-se documento WO 81/01145) a um fármaco anticancerígeno ativo. Veja-se, por exemplo, documento WO 88/07378 e a Patente US n° 4.975.278.

O componente de enzima do imunoconjugado útil para ADEPT inclui qualquer enzima capaz de agir sobre pró-fármaco, de forma a convertê-la em sua forma citotóxica mais ativa.

Enzimas que são úteis no método de acordo com a presente invenção incluem, mas não são limitados a fosfatase alcalina útil para a conversão de pró-fármacos contendo fosfato em fármacos livres; arilsulfatase útil para a conversão de pró-fármacos contendo sulfato em fármacos livres; citosino deaminase útil para a conversão de 5-fluorocitosina não tóxica no fármaco anticancerígeno,

5-fluorouracil; proteases, tais como serratia protease, termolisina, subtilisina, carboxipeptidases e catepsinas (tais como catepsinas B e L) que são úteis para a conversão de pró-fármacos contendo péptidos em fármacos livres; D-alanilcarboxipeptidases, úteis para a conversão de pró-fármacos que contêm substituintes D-aminoácidos; enzimas divisoras de hidratos de carbono, tais como p-galactosidase e neuraminidase úteis para a conversão de pró-fármacos glicosiladas em fármacos livres; β-lactamase útil para a conversão de fármacos derivados com β-lactamas em fármacos livres; e penicilina amidases; tais como penicilina V amidase ou penicilina G amidase, úteis para a conversão de fármacos derivadas nos seus nitrogénios amina com grupos fenoxiacetilo ou fenilacetilo, respetivamente, em fármacos livres. Alternativamente, anticorpos com atividade enzimática, também conhecidos na técnica como "abzimas", podem ser utilizados para converter os pró-fármacos do pedido em fármacos ativos livres (veja-se, por exemplo, Massey, *Nature* 328: 457- 458 (1987)). Os conjugados de anticorpo-abzima podem ser preparados conforme descrito no presente documento para fornecimento da abzima a uma população de células tumorais.

As enzimas podem ser unidas covalentemente aos anticorpos anti-TAHO por meio de métodos bem conhecidos na técnica, tais como a utilização dos reagentes reticulantes heterobifuncionais discutidos acima. Alternativamente, as proteínas de fusão que compreendem pelo menos a região de ligação de antigénios de um anticorpo do pedido ligado a pelo menos uma parte funcionalmente ativa de uma enzima do pedido, podem ser construídas utilizando métodos de ADN recombinantes bem conhecidos na técnica (veja-se, por exemplo, Neuberger *et al.*, *Nature,* 312: 604- 608 (1984).

F. Polipéptidos TAHO de Comprimento Total

O presente pedido também descreve sequências de nucleótidos recém identificadas e isoladas que codificam polipéptidos indicados no presente pedido como polipéptidos TAHO. Particularmente, ADNc (comprimento parcial e total) que codificam diversos polipéptidos TAHO foram identificados e isolados, conforme descrito em mais pormenores nos Exemplos a seguir.

Conforme descrito nos Exemplos a seguir, diversos clones de ADNc foram depositados na ATCC. As sequências de nucleótidos reais destes clones podem ser facilmente determinadas pelos peritos na especialidade por meio de sequenciamento do clone depositado utilizando métodos rotineiros na técnica. A sequência de aminoácidos prevista pode ser determinada a partir da sequência de nucleótidos utilizando conhecimentos de rotina. Para os polipéptidos TAHO e ácidos nucleicos codificadores descritos no presente documento, em alguns casos, os Depositantes identificaram o que se acredita ser o quadro de leitura mais identificável com as informações de sequências disponíveis no momento.

G. Variantes de Polipéptido TAHO e Anticorpo Anti-TAHO

Além dos anticorpos anti-TAHO e polipéptidos TAHO de sequência nativa e comprimento total descritos no presente documento, contempla-se a preparação de variantes de polipéptido TAHO e anticorpo anti-TAHO. Variantes de polipéptido TAHO e anticorpo anti-TAHO podem ser preparadas por meio da introdução de mudanças de nucleótidos apropriadas no ADN codificador e/ou por meio de síntese do polipéptido ou anticorpo desejado. Os peritos na especialidade apreciarão que as mudanças de aminoácidos podem alterar processos pós-tradução do anticorpo anti-TAHO

ou polipéptido TAHO, tais como a mudança do número ou posição de locais de glicosilação ou alteração das características de ancoramento de membranas.

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

Fragmentos de polipéptidos TAHO e anticorpos anti-TAHO são proporcionados no presente documento. Esses fragmentos podem ser truncados no terminal N ou terminal C, ou podem não conter resíduos internos, por exemplo, em comparação com proteína ou anticorpo nativo de comprimento total. Certos fragmentos não contêm resíduos de aminoácidos que não são essenciais para atividade biológica desejada do anticorpo anti-TAHO ou polipéptido TAHO.

Fragmentos de polipéptidos TAHO e anticorpos anti-TAHO podem ser preparados por meio de qualquer dentre uma série de métodos convencionais. Fragmentos de péptidos desejados podem ser quimicamente sintetizados. Abordagem alternativa envolve a geração de fragmentos de polipéptidos ou anticorpos por meio de digestão enzimática, tal como por meio de tratamento da proteína com enzima conhecida por dividir proteínas em locais definidos por resíduos de aminoácidos específicos, ou por meio de digestão do ADN com enzimas de restrição apropriadas e isolamento do fragmento desejado. Ainda outro método apropriado envolve o isolamento e a amplificação de fragmento de ADN que codifica fragmento de polipéptido ou anticorpo desejado, por meio de reação em cadeia de polimerase (PCR). Oligonucleótidos que definem os terminais desejados do fragmento de ADN são utilizados nos iniciadores 5′ e 3′ na PCR. Preferivelmente, fragmentos de polipéptidos TAHO e anticorpo anti-TAHO compartilham pelo menos uma atividade biológica e/ou imunológica com o polipéptido TAHO ou anticorpo anti-TAHO nativo descrito no presente documento.

Em formas de realização específicas, as substituições conservadoras de interesse são exibidas no Quadro 6 sob o título substituições preferidas. Caso essas substituições resultem em mudança da atividade biológica, mudanças mais substanciais, denominadas "exemplos de substituições" no

Quadro 6 ou conforme descrito adicionalmente abaixo com referência a classes de aminoácidos, são introduzidas e os produtos selecionados.

Quadro 6

Resíduo Original	Substituições Exemplares	Substituições Preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gin; asn	lys
Asn (N)	gin; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gin (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gin; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

Modificações substanciais da função ou identidade imunológica do anticorpo anti-TAHO ou polipéptido TAHO são alcançadas por meio da seleção de substituições que difiram significativamente de efeito sobre a manutenção (a) da estrutura da cadeia principal de polipéptido na área da substituição, tal como na forma de folha ou em conformação helicoidal; (b) da carga ou hidrofobicidade da molécula no local desejado; ou (c) do volume da cadeia lateral. Os resíduos de ocorrência natural são divididos em grupos com

base nas propriedades comuns da cadeia lateral:

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

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

As variações podem ser elaboradas utilizando métodos conhecidos na técnica, tais como mutagénese mediada por oligonucleótidos (dirigida a local), varrimento de alanina e mutagénese de PCR. Mutagénese dirigida a local [Carter *et al., Nucl. Acids Res.,* 13: 4331 (1986); Zoller *et al., Nucl. Acids Res.,* 10: 6487 (1987)], mutagénese de conjunto [Wells *et al., Gene,* 34: 315 (1985)], mutagénese de seleção de restrição [Wells *et al., Philos. Trans. R. Soc. London SerA,* 317: 415 (1986)] ou outros métodos conhecidos podem ser realizados sobre o ADN clonado para produzir o ADN variante de anticorpo anti-TAHO ou polipéptido TAHO.

Pode-se também utilizar análise de aminoácidos de varrimento para identificar um ou mais aminoácidos ao longo de sequência contígua. Dentre os aminoácidos de varrimento preferidos, encontram-se aminoácidos neutros relativamente pequenos. Esses aminoácidos incluem alanina, glicina, serina e cisteína. Alanina é tipicamente aminoácido de

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

Qualquer resíduo de cisteína não envolvido na manutenção da conformação adequada do anticorpo anti-TAHO ou polipéptido TAHO pode também ser substituído, geralmente com serina, para aprimorar a estabilidade oxidativa da molécula e evitar retícula aberrante. Por outro lado, ligação(ões) de cisteína pode(m) ser adicionada(s) ao anticorpo anti-TAHO ou polipéptido TAHO para aumentar a sua estabilidade (particularmente quando o anticorpo for fragmento de anticorpo, tal como fragmento de Fv).

Um tipo particularmente preferido de variante de substituição envolve a substituição de um ou mais resíduos da região hipervariável de anticorpo parental (por exemplo, anticorpo humano ou humanizado). Geralmente, a(s) variante(s) resultante(s) selecionada(s) para desenvolvimento adicional terá(ão) propriedades biológicas aprimoradas com relação ao anticorpo parental do qual é (são) gerado(s). Uma forma conveniente de geração dessas variantes de substituição envolve a maturação por afinidade utilizando exibição de fagos. Resumidamente, vários locais de região hipervariável (tais como seis a sete locais) sofrem mutações para gerar todas as substituições amino possíveis em cada local. As variantes de anticorpos geradas

desta forma são exibidas de maneira monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos na forma de fusões para o produto de gene III de M13 embalado em cada partícula. As variantes exibidas por fago são selecionadas em seguida de acordo com a sua atividade biológica (tal como afinidade de ligação), da forma descrita no presente documento. A fim de identificar possíveis locais de regiões hipervariáveis para modificação, mutagénese de varrimento de alanina pode ser realizada para identificar resíduos de regiões hipervariáveis que contribuem significativamente para a ligação de antigénios. Alternativa ou adicionalmente, pode ser benéfico analisar estrutura de cristal do complexo de antigénio e anticorpo para identificar pontos de contato entre o anticorpo e polipéptido TAHO humano. Esses resíduos de contato e resíduos vizinhos são candidatos para substituição de acordo com as técnicas elaboradas no presente documento. Após a geração dessas variantes, o quadro de variantes é submetido a seleção conforme descrito no presente e os anticorpos com propriedades superiores num ou mais ensaios relevantes podem ser selecionados para desenvolvimento adicional.

Moléculas de ácidos nucleicos que codificam variantes de sequência de aminoácidos do anticorpo anti-TAHO são preparadas por meio de uma série de métodos conhecidos na técnica. Estes métodos incluem, mas não são limitados ao isolamento a partir de fonte natural (no caso de variantes de sequências de aminoácidos de ocorrência natural) ou preparação por meio de mutagénese mediada por oligonucleótido (ou dirigida a local), mutagénese de PCR e mutagénese de conjunto de uma variante preparada anteriormente ou versão não variante do anticorpo anti-TAHO.

H. Modificações de Polipéptidos TAHO e Anticorpos Anti-TAHO

Modificações covalentes de anticorpos anti-TAHO são incluídas dentro do âmbito da desta invenção. Um tipo de modificação covalente inclui a reação de resíduos de aminoácidos desejados de anticorpo anti-TAHO ou polipéptido TAHO com agente derivante orgânico que seja capaz de reagir com cadeias laterais selecionadas ou os resíduos N ou C-terminais do anticorpo anti-TAHO ou polipéptido TAHO. A derivação com agentes bifuncionais é útil, por exemplo, para reticular anticorpo anti-TAHO ou polipéptido TAHO em superfície ou matriz de suporte insolúvel em água para utilização no método de purificação de anticorpos anti-TAHO e vice-versa. Os agentes reticulantes comumente utilizados para fixar incluem, por exemplo, 1,1- bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldeído, ésteres de N-hidroxissuccinimida, tais como ésteres com ácido 4-azidossalicílico, imidoésteres homobifuncionais, incluindo ésteres de dissuccinimidilo tais como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidas bifuncionais, tais como bis-N-maleimido-1,8-octano, e agentes tais como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato.

Outras modificações incluem a desamidação de resíduos glutaminilo e asparaginilo nos resíduos de glutamilo e aspartilo correspondentes, respetivamente, hidroxilação de prolina e lisina, fosforilação de grupos hidroxilo de resíduos serilo ou treonilo, metilação dos grupos examino de cadeias laterais de lisina, arginina e histidina [T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties,* W. H. Freeman & Co., São Francisco, págs. 79-86 (1983)], acetilação da amina N-terminal e amidação de qualquer grupo carboxilo C-terminal.

Outro tipo de modificação covalente do anticorpo anti-

TAHO incluído dentro do âmbito desta invenção compreende a alteração do padrão de glicosilação nativa do anticorpo ou polipéptido. "Alteração do padrão de glicosilação nativa" destina-se, para os propósitos do presente documento, a indicar a exclusão de uma ou mais frações de hidrato de carbono encontradas em polipéptido TAHO ou anticorpo anti-TAHO de sequência nativa (seja por meio de remoção do local de glicosilação subjacente ou de exclusão da glicosilação por meios químicos e/ou enzimáticos) e/ou adição de um ou mais locais de glicosilação que não estejam presentes no polipéptido TAHO ou anticorpo anti-TAHO de sequência nativa. Além disso, a expressão inclui alterações qualitativas na glicosilação das proteínas nativas, que envolvem alteração da natureza e das proporções das diversas frações de hidrato de carbono presentes.

A glicosilação de anticorpos e outros polipéptidos é tipicamente N-ligada ou O-ligada. N-ligado designa a ligação da fração de hidrato de carbono à cadeia lateral de resíduo de asparagina. As sequências de tripéptidos asparagina-X-serina e asparagina-X-treonina, em que X é qualquer aminoácido, com exceção de prolina, são as sequências de reconhecimento para a ligação enzimática da fração de hidrato de carbono à cadeia lateral de asparagina. Desta forma, a presença de qualquer dessas sequências de tripéptidos num polipéptido cria potencial local de glicosilação. Glicosilação O-ligada designa a ligação de um dos açúcares N-acetilgalactosamina, galactose ou xilose a um ácido hidroxiamino, mais comumente serina ou treonina, embora também possam ser utilizadas 5-hidroxiprolina ou 5-hidroxilisina.

A adição de locais de glicosilação ao anticorpo anti-TAHO ou polipéptido TAHO é convenientemente conseguida por meio da alteração da sequência de aminoácidos, de forma que

contenha uma ou mais das sequências de tripéptidos descritas acima (para locais de glicosilação tingados). A alteração pode também ser feita por meio da adição de um ou mais resíduos de serina ou treonina à sequência do anticorpo anti-TAHO ou polipéptido TAHO original, ou substituição por ele (para locais de glicosilação O-ligados). A sequência de aminoácidos do anticorpo anti-TAHO ou polipéptido TAHO pode ser opcionalmente alterada por meio de mudanças em nível de ADN, particularmente por meio de mutação do ADN que codifica o anticorpo anti-TAHO ou polipéptido TAHO em bases previamente selecionadas, de forma que sejam gerados codões que se traduzirão nos aminoácidos desejados.

Outro meio de aumentar a quantidade de frações de hidrato de carbono sobre o anticorpo anti-TAHO ou o polipéptido TAHO é por meio de acoplamento químico ou enzimático de glicosídeos ao polipéptido. Estes métodos são descritos na técnica, tal como no documento WO 87/05330, publicado em 11 de Setembro de 1987, e em Aplin e Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, págs. 259-306 (1981).

A remoção de hidratos de carbono presentes sobre o anticorpo anti-TAHO ou polipéptido TAHO pode ser realizada química ou enzimaticamente, ou por meio de substituição mutacional de codões que codificam resíduos de aminoácidos que servem de alvos para a glicosilação. Métodos de desglicosilação química são conhecidos na técnica e descritos, por exemplo, por Hakimuddin *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 259: 52 (1987) e por Edge *et al.*, *Anal. Biochem.*, 118: 131 (1981). A divisão enzimática de frações de hidrato de carbono sobre polipéptidos pode ser alcançada por meio da utilização de uma série de endo e exo-glicosidases, conforme descrito por Thotakura *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 138: 350 (1987).

Outro tipo de modificação covalente do anticorpo anti-TAHO ou polipéptido TAHO compreende a ligação do anticorpo ou polipéptido a um dentre uma série de polímeros não proteáceos, tais como polietileno glicol (PEG), polipropileno glicol ou polioxialquilenos, da forma descrita nas Patentes US nº 4.640.835, 4.496.689, 4.301.144, 4.670.417, 4.791.192 ou 4.179.337. O anticorpo ou polipéptido pode também ser capturado em microcápsulas preparadas, por exemplo, por meio de técnicas de acumulação ou polimerização interfacial (por exemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulose ou gelatina e microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respetivamente) em sistemas de fornecimento de fármacos coloidais (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas), ou em macroemulsões. Estas técnicas são descritas em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edição, Oslo, A., Ed. (1980).

O anticorpo anti-TAHO útil na presente invenção pode também ser modificado de maneira a formar moléculas quiméricas que compreendem anticorpo anti-TAHO fusionado a outra sequência de aminoácidos ou polipéptido heteróloga.

Numa forma de realização, uma tal molécula quimérica compreende uma fusão do anticorpo anti-TAHO ou polipéptido TAHO com polipéptido de etiqueta que proporciona um epítopo ao qual o anticorpo anti-marcador pode se unir seletivamente. A marcador de epítopo geralmente é colocado no terminal amino ou carboxilo do anticorpo anti-TAHO ou polipéptido TAHO. A presença dessas formas marcadas com epítopo do anticorpo anti-TAHO ou polipéptido TAHO pode ser detetada utilizando um anticorpo contra o polipéptido de etiqueta. Além disso, o fornecimento do marcador de epítopo permite que o anticorpo anti-TAHO ou polipéptido TAHO seja facilmente purificado por meio de purificação de afinidade

utilizando anticorpo anti-marcador ou outro tipo de matriz de afinidade que se una ao marcador de epítopo. Diversos polipéptidos de marcadores e seus anticorpos correspondentes são bem conhecidos na técnica. Exemplos incluem marcadores poli-histidina (poli-his) ou poli-histidina-glicina (poli-his-gli); o polipéptido de etiqueta flu HA e seu anticorpo 12CA5 [Field *et al., Mol. Cell. Biol.,* 8: 2159-2165 (1988)]; a marcador c-mic e seus anticorpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 e 9E10 [Evan *et al., Molecular and Cellular Biology,* 5: 3610-3616 (1985)] e a marcador glicoproteína D (gD) do vírus simplex da herpes e seu anticorpo [Paborsky *et al., Protein Engineering,* 3(6): 547-553 (1990)]. Outros polipéptidos de marcador incluem o péptido Flag [Hopp *et al., BioTechnology,* 6: 1204-1210 (1988)]; o péptido epítopo KT3 [Martin *et al., Science,* 255: 192-194 (1992)]; um péptido epítopo α-tubulina [Skinner *et al., J. Biol. Chem.,* 266: 15163-15166 (1991)]; e o marcador de péptido de proteína 10 de gene T7 [Lutz-Freyermuth *et al., Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 87: 6393-6397 (1990)].

Alternativamente, a molécula quimérica pode compreender fusão do anticorpo anti-TAHO ou polipéptido TAHO com imunoglobulina ou região específica de imunoglobulina. Para forma bivalente da molécula quimérica (também denominada "imunoadesina"), essa fusão poderá ser para a região Fc de molécula IgG. As fusões Ig incluem preferivelmente a substituição de forma solúvel (com domínio transmembrana excluído ou desativado) de anticorpo anti-TAHO ou polipéptido TAHO no lugar de pelo menos uma região variável em molécula Ig. Numa forma de realização particularmente preferida, a fusão de imunoglobulina inclui as regiões de articulação, CH e CH_3 ou de articulação, CH_1, CH_2 e CH_3 de molécula IgG1. Para a produção de fusões de imunoglobulina, veja-se também a Patente US nº 5.428.130,

concedida em 25 de Junho de 1995.

I. Preparação de Polipéptidos TAHO e Anticorpos Anti-TAHO

A descrição a seguir refere-se principalmente à produção de anticorpos anti-TAHO e polipéptidos TAHO por meio do cultivo de células transformadas ou transfetadas com vetor que contém ácido nucleico que codifica anticorpo anti-TAHO e polipéptido TAHO. Contempla-se, naturalmente, que métodos alternativos, que são bem conhecidos na técnica, podem ser utilizados para preparar anticorpos anti-TAHO e polipéptidos TAHO. A sequência de aminoácidos apropriada, ou partes dela, pode ser produzida, por exemplo, por meio de síntese direta de péptidos utilizando métodos de fase sólida [veja-se, por exemplo, Stewart *et al.*, *Solid-Phase Peptide Synthesis,* W. H. Freeman Co., São Francisco CA (1969); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85; 2149-2154 (1963)]. A síntese de proteínas *in vitro* pode ser realizada utilizando métodos manuais ou automaticamente. Pode-se atingir síntese automatizada utilizando, por exemplo, Sintetizador de Péptidos da Applied Biosystems (Foster City CA) utilizando instruções do fabricante. Diversas partes do anticorpo anti-TAHO ou polipéptido TAHO podem ser quimicamente sintetizadas separadamente e combinadas utilizando métodos químicos ou enzimáticos para produzir o anticorpo anti-TAHO ou polipéptido TAHO desejado.

1. Isolamento de ADN que Codifica Polipéptido TAHO ou Anticorpo anti-TAHO

ADN que codifica anticorpo anti-TAHO ou polipéptido TAHO pode ser obtido a partir de biblioteca de ADNc preparada a partir de tecido que se acredita possuir o ARNm de polipéptido TAHO ou anticorpo anti-TAHO e expressa o

mesmo em nível detetável. Consequentemente, ADN de polipéptido TAHO ou anticorpo anti-TAHO humano pode ser convenientemente obtido a partir de biblioteca de ADNc preparada a partir de tecido humano. O gene que codifica polipéptido TAHO ou anticorpo anti-TAHO pode também ser obtido a partir de biblioteca genómica ou por meio de procedimentos sintéticos conhecidos (tais como síntese de ácidos nucleicos automatizada).

Bibliotecas podem ser selecionadas com sondas (tais como oligonucleótidos com pelo menos de cerca de 20-80 bases) projetadas para identificar o gene de interesse ou a proteína por ele codificada. A seleção do ADNc ou biblioteca genómica com a sonda selecionada pode ser conduzida utilizando procedimentos padrão, tais como os descritos em Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Meio alternativo de isolar o gene que codifica anticorpo anti-TAHO ou polipéptido TAHO é a utilização de metodologia PCR [Sambrook *et al.*, acima; Dieffenbach *et al.*, *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Métodos de seleção de biblioteca de ADNc são bem conhecidos na técnica. As sequências de oligonucleótidos selecionadas como sondas deverão possuir comprimento suficiente e ser suficientemente não ambíguas para minimizar falsos positivos. O oligonucleótido é preferivelmente marcado de forma a poder ser detetado mediante hibridação em ADN na biblioteca sendo selecionada. Métodos de marcação são bem conhecidos na técnica e incluem a utilização de radiomarcadores como ATP marcado com ^{32}P, biotinilação ou marcação com enzimas. As condições de hibridação, que incluem restringência moderada e alta restringência, são proporcionadas em Sambrook *et al.*,

acima.

As sequências identificadas nesses métodos de seleção de bibliotecas podem ser comparadas e alinhadas com outras sequências conhecidas depositadas e disponíveis em bancos de dados públicos tais como GenBank e outros bancos de dados de sequências particulares. A identidade de sequências (em nível de aminoácidos ou nucleótidos) em regiões definidas da molécula ou ao longo da sequência de comprimento total pode ser determinada utilizando métodos conhecidos na técnica e conforme descrito no presente documento.

Ácido nucleico que contém sequência de codificação de proteínas pode ser obtido selecionando-se ADNc selecionado ou bibliotecas genómicas, utilizando a sequência de aminoácidos deduzida descrita no presente pela primeira vez e, se necessário, utilizando procedimentos de extensão de iniciadores convencionais conforme descrito em Sambrook *et al.*, acima, para detetar precursores e intermediários de processamento de ARNm que possam não haver sofrido transcrição reversa em ADNc.

2. Seleção e Transformação de Células Hospedeiras

As células hospedeiras são transfetadas ou transformadas com vetores de clonagem ou expressão descritos no presente para a produção de polipéptidos TAHO ou anticorpos anti-TAHO e cultivadas em meios nutrientes convencionais modificados conforme apropriado para a indução de promotores, seleção de transformadores ou amplificação dos genes que codificam as sequências desejadas. As condições de cultivo, tais como meios, temperatura, pH e similares, podem ser selecionadas pelos peritos na especialidade sem experimentação indevida. De

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

Métodos de transfeção de células eucarióticas e transformação de células procarióticas são conhecidos dos peritos ordinários na especialidade, tais como $CaCl_2$, $CaPO_4$, mediada por lipossomas e eletroporação. Dependendo da célula hospedeira utilizada, a transformação é realizada utilizando métodos padrão apropriados para essas células. O tratamento com cálcio utilizando cloreto de cálcio, conforme descrito em Sambrook *et al.*, acima, ou eletroporação, é geralmente utilizado para procariotas. Infeção com *Agrobacterium tumefaciens* é utilizada para a transformação de certas células vegetais, conforme descrito por Shaw *et al.*, *Gene*, 23: 315 5 (1983) e documento WO 89/05859, publicado em 29 de Junho de 1989. Para células de mamíferos sem essas paredes celulares, pode ser utilizado o método de precipitação de fosfato de cálcio de Graham e van der Eb, *Virology*, 52: 456-457 (1978). Aspetos gerais de transfeções de sistemas hospedeiros de células de mamíferos foram descritos na Patente US nº 4.399.216. Transformações em levedura são tipicamente conduzidas de acordo com o método de Van Solingen *et al.*, *J. Bact*, 130: 946 (1977) e Hsiao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76: 3829 (1979). Podem também ser utilizados, entretanto, outros métodos de introdução de ADN em células, tais como por meio de microinjeção nuclear, eletroporação, fusão de protoplastas bacterianos com células intatas, ou policátions, tais como polibreno e poliornitina. Para diversos métodos de transformação de células de mamíferos, veja-se Keown *et al.*, *Methods in Enzymology*, 185: 527-537 (1990) e Mansour *et al.*, *Nature*, 336: 348-352 (1988).

Células hospedeiras apropriadas para clonagem ou expressão do ADN nos vetores do presente documento incluem células procarióticas, de levedura ou eucarióticas superiores. Os procariotas apropriados incluem, mas sem limitar-se a eubactérias, tais como organismos Gram-negativos ou Gram-positivos, como Enterobactérias, tais como *E. coli*. Várias estirpes de *E. coli* estão disponíveis ao público, tais como estirpe K12 de *E. coli* MM294 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); estirpe de *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) e K5 772 (ATCC 53.635). Outras células hospedeiras procarióticas apropriadas incluem enterobactérias tais como *Escherichia*, por exemplo *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por exemplo *Salmonella typhimurium*, *Serraba*, por exemplo *Serraba marcescans*, e *Shigella*, bem como *Bacilli* tais como *B. subtilis* e *B. licheniformis* (por exemplo, *B. licheniformis* 41P descrito em DD 266.710, publicado em 12 de Abril de 1989), *Pseudomonas* tais como *P. aeruginosa* e *Streptomyces*. Estes exemplos são ilustrativos e não limitadores. A estirpe W3110 é hospedeiro parental ou hospedeiro particularmente preferido porque é uma estirpe hospedeira comum para fermentações de produtos de ADN recombinante. Preferivelmente, a célula hospedeira segrega quantidades mínimas de enzimas proteolíticas. A estirpe W3110, por exemplo, pode ser modificada para efetuar mutação genética nos genes que codificam proteínas endógenas para o hospedeiro, com exemplos desses hospedeiros incluindo estirpe 1A2 de *E. coli* W3110, que contém o genótipo completo *tonA;* estirpe 9E4 de *E. coli* W3110, que contém o genótipo completo *tonA ptr3;* estirpe 27C7 de *E. coli* W3110 (ATCC 55.244), que contém o genótipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kah*, estirpe 37D6 de *E. coli* W3110, que contém o genótipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kah*, estirpe 40B4 de *E. coli* W3110, que é a estirpe

37D6 com mutação de exclusão *degP* não resistente a canamicina; e uma estirpe de *E. coli* que contém protease periplasmática mutante descrita na Patente US nº 4.946.783, concedida em 7 de Agosto de 1990. Alternativamente, métodos de clonagem *in vivo* tais como PCR ou outras reações de polimerase de ácido nucleico são apropriados.

Anticorpo de comprimento total, fragmentos de anticorpos e proteínas de fusão de anticorpos podem ser produzidos em bactérias, particularmente quando a função efetora de Fc e glicosilação não forem necessárias, tal como quando o anticorpo terapêutico for conjugado a agente citotóxico (tal como toxina) e o imunoconjugado demonstrar por si próprio eficácia na destruição das células tumorais. Anticorpos de comprimento total apresentam maior semivida em circulação. A produção em *E. coli* é mais rápida e mais eficiente com relação ao custo. Para a expressão de fragmentos de anticorpos e polipéptidos em bactérias, veja-se, por exemplo, documento US 5.648.237 (Carter *et al.*), documento US 5.789.199 (Joly *et al.*) e documento US 5.840.523 (Simmons *et al.*), que descrevem a região de início de tradução (TIR) e sequências de sinal para otimizar a expressão e secreção. Após a expressão, o anticorpo é isolado da pasta de células de *E. coli* em fração solúvel e pode ser purificado, por exemplo, através de coluna de proteína A ou G, dependendo do isotipo. A purificação final pode ser conduzida de forma similar ao processo de purificação de anticorpo expresso, por exemplo, em células de CHO.

Além dos procariotas, micróbios eucarióticos tais como fungos filamentosos ou levedura são hospedeiros de expressão ou clonagem apropriados para vetores codificadores de anticorpos anti-TAHO ou polipéptidos TAHO. *Saccharomyces cerevisiae* é microrganismo hospedeiro

eucariótico inferior comumente utilizado. Outros incluem *Schizosacchanomyces pombe* (Beach e Nurse, *Nature,* 290: 140 (1981); documento EP 139.383, publicado em 2 de Maio de 1985); hospedeiros *Kluyveromyces* (Patente US n° 4.943.529; Fleer *et al., Bio/Technology,* 9: 968-975 (1991)), tais como *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt *et al., J. Bacteriol.,* 154 (2): 737- 742 (1983)), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickeramii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilarum* (ATCC 36.906; Van den Berg *et al., Bio/Technology,* 8: 135 (1990)), *K. thermotolerans* e *K. marxianus, yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070; Sreekrishna *et al., J. Basic Microbiol.,* 28: 265-278 (1988)); *Candida; Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case *et al., Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 76: 5259-5263 (1979)); *Schwanniomyces* tal como *Schwanniomyces occidentalis* (documento EP 394.538, publicado em 31 de Outubro de 1990); e fungos filamentosos, tais como *Neurospora, Penicillium, Tolypocladium* (documento WO 91/00357, publicado em 10 de Janeiro de 1991) e hospedeiros *Aspergillus,* tais como *A. nidulans* (Ballance *et al., Biochem. Biophys. Res. Commun.,* 112: 284-289 [1983]; Tilburn *et al., Gene,* 26: 205-221 [1983]; Yelton *et al., Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 81: 1470-1474 [1984] e *A. niger* (Kelly e Hynes, *EMBO J.,* 4: 475-479 [1985]). Leveduras metilotrópicas são apropriadas no presente e incluem, mas não são limitados a levedura capaz de crescimento sobre metanol selecionada a partir dos géneros que consistem de *Hansenula, Candida, Kloeckera, Pichia, Saccharomyces, Torulopsis e Rhodotorula.* Uma lista de espécies específicas que são exemplos desta classe de leveduras pode ser encontrada em C. Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs,* 269 (1982).

As células hospedeiras apropriadas para a expressão de

anticorpo anti-TAHO ou polipéptido TAHO glicosilado são derivadas de organismos multicelulares. Exemplos de células de invertebrados incluem células de insetos tais como *Drosophila S2* e *Spodoptera Sf9,* bem como células vegetais, tais como cultivos celulares de algodão, milho, batata, soja, petúnia, tomate e fumo. Foram identificadas numerosas linhas bacilovirais, variantes e células hospedeiras de insetos permissivos correspondentes de hospedeiros tais como *Spodoptera frugiperda* (lagarta), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta) e *Bombyx mori.* Uma série de linhas virais para transfeção é disponível ao público, tais como a variante L-1 de *Autographa californica* NPV e a estirpe Bm-5 de *Bombyx mori* NPV e esses vírus podem ser utilizados como o vírus do presente documento, de acordo com o presente pedido, particularmente para transfeção de células de *Spodoptera frugiperda.*

O interesse foi maior, entretanto, em células de vertebrados e a propagação de células de vertebrados no cultivo (cultivo de tecidos) tornou-se procedimento rotineiro. Exemplos de linhas celulares de hospedeiros mamíferos úteis são linha CV1 de rim de macaco transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); linha de rim embriónico humano (células 293 ou 293 subclonadas para crescimento em cultivo em suspensão, Graham *et al., J. Gen. Virol.* 36: 59 (1977)); células de rim de filhote de hamster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovário de hamster chinês ADHFR (CHO, Urlaub *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216 (1980)); células de sertoli de ratinho (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23: 243-251 (1980)); células de rim de macaco (CV1 ATCC CCL 70); células de rim de macaco verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2), células de rim canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de fígado de rato búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células

de pulmão humano (W138, ATCC CCL 75); células de fígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamário de ratinho (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al., Annals N. Y. Acad. Sci.* 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; e linha de hepatoma humano (Hep G2).

As células hospedeiras são transformadas com os vetores de clonagem ou expressão descritos acima para a produção de anticorpos anti-TAHO ou polipéptidos TAHO e cultivadas em meios nutrientes convencionais modificados conforme apropriado para a indução de promotores, seleção de transformadores ou amplificação dos genes que codificam as sequências desejadas.

3. Seleção e utilização de Vetor Reproduzível

O ácido nucleico (tal como ADNc ou ADN genómico) que codifica anticorpo anti-TAHO ou polipéptido TAHO pode ser inserido em vetor reproduzível para clonagem (amplificação do ADN) ou para expressão. Diversos vetores estão disponíveis ao público. O vetor pode estar, por exemplo, na forma de plasmídeo, cosmídeo, partícula viral ou fago. A sequência de ácido nucleico apropriada pode ser inserida no vetor por meio de uma série de procedimentos. De forma geral, ADN é inserido em local(is) de endonuclease de restrição apropriado(s) utilizando métodos conhecidos na técnica. Os componentes de vetor geralmente incluem, mas não são limitados a um ou mais dentre sequência de sinal, origem de reprodução, um ou mais genes marcadores, elemento amplificador, promotor e sequência de término de transcrição. A construção de vetores apropriados que contêm um ou mais destes componentes utiliza técnicas de ligação padrão que são conhecidas dos peritos na especialidade.

O TAHO pode ser produzido de forma recombinante não

apenas diretamente, mas também como polipéptido de fusão com polipéptido heterólogo, que é preferivelmente sequência de sinal ou outro polipéptido que possui local de divisão específico no terminal N do polipéptido ou proteína madura. De forma geral, a sequência de sinal pode ser componente do vetor ou pode ser uma parte do ADN que codifica polipéptido TAHO ou anticorpo anti-TAHO que é inserido no vetor. A sequência de sinal pode ser sequência de sinal procariótico selecionada, por exemplo, a partir do grupo de fosfatase alcalina, penicilinase, Ipp ou líderes de enterotoxina II estáveis ao calor. Para secreção de leveduras, a sequência de sinal pode ser, por exemplo, o líder de invertase de levedura, líder fator alfa (que inclui líderes de fator a de *Saccharomyces* e *Kluyveromyces,* este último descrito na Patente US nº 5.010.182) ou líder de fosfatase ácida, o líder de glucoamilase de C. *albicans* (documento EP 362.179, publicado em 4 de Abril de 1990), ou o sinal descrito no documento WO 90/13646, publicado em quinze de novembro de 1990. Em expressão de células de mamíferos, sequências de sinal de mamíferos podem ser utilizadas para dirigir a secreção da proteína, tais como sequências de sinal de polipéptidos segregados da mesma espécie ou de espécies relacionadas, bem como líderes de secreção viral.

Tanto os vetores de expressão quanto de clonagem contêm uma sequência de ácido nucleico que permite que o vetor se reproduza numa ou mais células hospedeiras selecionadas. Essas sequências são bem conhecidas para uma série de bactérias, levedura e vírus. A origem de reprodução do plasmídeo pBR322 é apropriada para a maior parte das bactérias Gram-negativas, a origem de plasmídeo 2µ é apropriada para levedura e diversas origens virais (SV40, polioma, adenovírus, VSV ou BPV) são úteis para vetores de clonagem em células de mamíferos.

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

Exemplo de marcadores selecionáveis apropriados para células de mamíferos são os que permitem a identificação de células competentes para absorção do ácido nucleico codificador de polipéptido TAHO ou anticorpo anti-TAHO, tal como DHFR ou timidina cinase. Célula hospedeira apropriada, ao utilizar-se DHFR do tipo selvagem, é a linha de células de CHO com deficiência na atividade de DHFR, preparada e propagada conforme descrito por Urlaub *et al., Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 77: 4216 (1980). Gene de seleção apropriado para utilização em levedura é o gene *trp*1 presente no plasmídeo de levedura YRp7 [Stinchcomb *et al., Nature,* 282: 39 (1979); Klingsman *et al., Gene,* 7*:* 141 (1979); Tschemper *et al., Gene,* 10: 157 (1980)]. O gene *trp*1 proporciona marcador de seleção para estirpe mutante de levedura que não possui a capacidade de crescimento em triptofano, tal como ATCC nº 44076 ou PEP4-1 [Jones, *Genetics,* 85: 12 (1977)].

Os vetores de expressão e de clonagem normalmente contêm promotor ligado operativamente à sequência de ácido nucleico codificadora de polipéptido TAHO ou anticorpo anti-TAHO para dirigir a síntese de ARNm. São bem conhecidos promotores reconhecidos por uma série de células hospedeiras potenciais. Promotores apropriados para utilização com hospedeiros procarióticos incluem os

sistemas promotores de β-lactamase e lactose [Chang *et al.*, *Nature,* 275: 615 (1978); Goeddel *et al.*, *Nature,* 281: 544 (1979)], fosfatase alcalina, sistema promotor de triptofano (trp) (Goeddel, *Nucleic Acids Res.,* 8: 4057 (1980); documento EP 36.776) e promotores híbridos tais como o promotor tac [deBoer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 80: 21-25 (1983)]. Os promotores para utilização em sistemas bacterianos também conterão sequência Shine-Dalgarno (S. D.) ligada operativamente ao ADN codificador do anticorpo anti-TAHO ou polipéptido TAHO.

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

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

A transcrição de polipéptido TAHO ou anticorpo anti-TAHO a partir de vetores em células hospedeiras de mamíferos é controlada, por exemplo, por promotores obtidos a partir dos genomas de vírus tais como vírus de polioma, vírus da varíola aviária (documento UK 2.211.504 publicado em 5 de Julho de 1989), adenovírus (tal como Adenovírus 2), vírus de papiloma bovino, vírus de sarcoma aviário, citomegalovírus, retrovírus, vírus da hepatite B e Vírus Símio 40 (SV40), de promotores de mamíferos heterólogos, tais como o promotor de actina ou promotor de imunoglobulina, e de promotores de choque de calor, desde que esses promotores sejam compatíveis com os sistemas de células hospedeiras.

A transcrição de ADN codificador do anticorpo anti-TAHO ou polipéptido TAHO por eucariotas superiores pode ser aumentada por meio da inserção de sequência amplificadora no vetor. Os amplificadores são elementos de ADN com ação cis, normalmente cerca de 10 a 300 bp, que agem sobre promotor para aumentar a sua transcrição. Muitas sequências amplificadoras são agora conhecidas a partir de genes de mamíferos (globina, elastase, albumina, α-fetoproteína e insulina). Tipicamente, entretanto, utilizar-se-á amplificador de vírus de célula eucariótica. Exemplos incluem o amplificador SV40 do lado posterior da origem de reprodução (bp 100-270), o amplificador promotor precoce de citomegalovírus, o amplificador de polioma do lado posterior da origem de reprodução e amplificadores de adenovírus. O amplificador pode ser dividido no vetor em posição 5' ou 3' para a sequência codificadora de polipéptido TAHO ou anticorpo anti-TAHO, mas encontra-se localizado preferivelmente em local a 5' do promotor.

Os vetores de expressão utilizados em células hospedeiras eucarióticas (células de leveduras, fungos,

insetos, plantas, animais, seres humanos ou nucleadas de outros organismos multicelulares) também conterão as sequências necessárias para o término da transcrição e estabilização do ARNm. Essas sequências são normalmente disponíveis a partir das regiões não traduzidas 5' e, ocasionalmente, 3' dos ADN ou ADNc virais ou eucarióticos. Estas regiões contêm segmentos de nucleótidos transcritos na forma de fragmentos poliadenilados na parte não traduzida do ARNm codificador de anticorpo anti-TAHO ou polipéptido TAHO.

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

4. Cultivo das Células Hospedeiras

As células hospedeiras utilizadas para a produção do anticorpo anti-TAHO ou polipéptido TAHO desta invenção podem ser cultivadas numa série de meios. Meios disponíveis comercialmente, tais como F10 de Ham (Sigma), Meio Essencial Mínimo (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma) e Meio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma) são apropriados para o cultivo das células hospedeiras. Além disso, qualquer dos meios descritos em Ham *et al.*, *Meth. Enz.* 58: 44 (1979), Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.* 102: 255 (1980), Patentes US nº 4.767.704, 4.657.866, 4.927.762, 4.560.655 ou 5.122.469; documento WO 90/03430; documento WO 87/00195; ou Patente US Ref. 30.985 podem ser utilizados como meios de cultivo para as células hospedeiras. Qualquer desses meios pode ser suplementado conforme o necessário com hormonas e/ou outros fatores de crescimento (tais como

insulina, transferrina ou fator de crescimento epidérmico), sais (tais como cloreto de sódio, cálcio, magnésio e fosfato), tampões (tais como HEPES), nucleótidos (tais como adenosina e timidina), antibióticos (tais como fármaco GENTAMYCIN™), elementos de traço (definidos como compostos inorgânicos normalmente presentes em concentrações finais na faixa micromolar) e glicose ou fonte de energia equivalente. Qualquer outro suplemento necessário pode também ser incluído em concentrações apropriadas que seriam conhecidas dos peritos na especialidade. As condições de cultivo, tais como temperatura, pH e similares, são as utilizadas anteriormente com a célula hospedeira selecionada para expressão e serão evidentes para os peritos ordinários na especialidade.

5. Deteção da Expressão/Amplificacão Genética

A expressão e/ou amplificação genética pode ser medida em amostra diretamente, por exemplo, por meio de Southern Blot, Northern Blot convencional para quantificar a transcrição de ARNm [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 5201-5205 (1980)]), dot blot (análise de ADN) ou hibridação *in situ,* utilizando sonda adequadamente marcada, com base nas sequências proporcionadas no presente documento. Alternativamente, podem ser utilizados anticorpos que podem reconhecer duplex específicos, incluindo duplex de ADN, duplex de ARN e duplex híbridos de ADN-ARN ou duplex de ADN e proteína. Os anticorpos, por sua vez, podem ser marcados e o ensaio pode ser conduzido com o duplex unido a superfície, de forma que, mediante a formação de duplex sobre a superfície, a presença de anticorpo unido ao duplex pode ser detetada.

A expressão genética, alternativamente, pode ser medida por meio de métodos imunológicos, tais como manchas

imunohistoquímicas de células ou seções de tecidos e ensaio de cultivo celular ou fluidos do corpo, para quantificar diretamente a expressão de produto genético. Os anticorpos úteis para manchas imunohistoquímicas e/ou ensaio de fluidos de amostra podem ser monoclonais ou policlonais e podem ser preparados em qualquer mamífero. Convenientemente, os anticorpos podem ser preparados contra polipéptido TAHO de sequência nativa ou contra péptido sintético com base nas sequências de ADN proporcionadas no presente ou contra sequência exógena fusionada a ADN de TAHO e que codifica epítopo de anticorpo específico.

6. Purificação de Anticorpo Anti-TAHO e Polipéptido TAHO

Formas de anticorpo anti-TAHO e polipéptido TAHO podem ser recuperadas de meio de cultivo ou de lisatos de células hospedeiras. Se unido por membrana, ele pode ser libertado da membrana utilizando solução de detergente apropriado (tal como Triton-X 100) ou por meio de divisão enzimática. Células utilizadas na expressão de anticorpo anti-TAHO e polipéptido TAHO podem ser rompidas por vários meios físicos ou químicos, tais como ciclo de congelamento e descongelamento, sonicação, rompimento mecânico ou agentes de lise celulares.

Pode-se desejar purificar anticorpo anti-TAHO e polipéptido TAHO a partir de proteínas de células recombinantes ou polipéptidos. Os procedimentos a seguir são exemplos de procedimentos de purificação apropriados: fracionamento sobre coluna de permuta de iões; precipitação em etanol; HPLC de fase reversa; cromatografia sobre sílica ou sobre resina de permuta de catiões, tal como DEAE; cromatoconcentração; SDS-PAGE, precipitação de sulfato de amónio; filtragem de gel utilizando, por exemplo, Sephadex G-75; colunas de proteína A Sepharose para remover

contaminantes tais como IgG; e colunas quelantes metálicas para unir formas marcadas por epítopo do anticorpo anti-TAHO e polipéptido TAHO. Vários métodos de purificação de proteínas podem ser utilizados e esses métodos são conhecidos na técnica e descritos, por exemplo, em Deutscher, *Methods in Enzymology,* 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principies and Practice,* Springer-Verlag, Nova Iorque (1982). A(s) etapa(s) de purificação selecionada(s) dependerá(ão), por exemplo, da natureza do processo de produção utilizado e do anticorpo anti-TAHO ou polipéptido TAHO específico produzido.

Ao utilizar-se técnicas recombinantes, o anticorpo pode ser produzido de forma intracelular, no espaço periplasmático ou segregado diretamente para o meio. Caso o anticorpo seja produzido de forma intracelular, como primeira etapa, os fragmentos particulados, sejam eles células hospedeiras ou fragmentos lisados, são removidos, por exemplo, por meio de centrifugação ou ultrafiltragem. Carter *et al., Bio/Technology* 10: 163-167 (1992) descrevem procedimento de isolamento de anticorpos que são segregados para o espaço periplasmático de *E. coli.* Resumidamente, a pasta celular é derretida na presença de acetato de sódio (pH 3,5), EDTA e fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) ao longo de cerca de trinta minutos. Fragmentos celulares podem ser removidos por meio de centrifugação. Quando o anticorpo for segregado para o meio, sobrenadantes desses sistemas de expressão são geralmente concentrados em primeiro lugar utilizando filtro de concentração de proteínas disponível comercialmente, tal como unidade de ultrafiltragem Amicon ou Millipore Pellicon. Inibidor de protease, tal como PMSF, pode ser incluído em qualquer das etapas acima para inibir a proteólise e podem ser incluídos antibióticos para evitar o crescimento de contaminantes imprevistos.

A composição de anticorpo preparada a partir das células pode ser purificada utilizando, por exemplo, cromatografia de hidroxilapatita, eletroforese de gel, diálise e cromatografia de afinidade, em que cromatografia de afinidade é a técnica de purificação preferida. A adequação da proteína A como ligante de afinidade depende da espécie e do isotipo de qualquer domínio Fc de imunoglobulina que esteja presente no anticorpo. A Proteína A pode ser utilizada para purificar anticorpos que se baseiem em cadeias pesadas γ1, γ2 ou γ4 humanas (Lindmark *et al., J. Immunol. Meth.* 62: 1-13 (1983)). Recomenda-se Proteína G para todos os isotipos de ratinhos e para γ3 humano (Guss *et al., EMBO J.* 5: 1567-1575 (1986)). A matriz à qual é ligado o ligante de afinidade é mais frequentemente agarose, mas outras matrizes estão disponíveis. Matrizes mecanicamente estáveis, tais como vidro de poros controlados ou poli(estirenodivinil)benzeno, permitem velocidades de fluxo mais altas e tempos de processamento mais curtos que o que pode ser atingido com agarose. Quando o anticorpo compreender domínio C_H3, a resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg NJ) é útil para purificação. Outras técnicas de purificação de proteínas, tais como o fracionamento sobre coluna de permuta de iões, precipitação em etanol, HPLC de Fase Reversa, cromatografia sobre sílica, cromatografia sobre heparina SEPHAROSE™, cromatografia sobre resina de permuta de aniões ou catiões (tal como coluna de ácido poliaspártico), cromatoconcentração, SDS-PAGE e precipitação de sulfato de amónia, também estão disponíveis, dependendo do anticorpo a ser recuperado.

Após qual(is)quer etapa(s) de purificação preliminar(es), a mistura que compreende o anticorpo de interesse e contaminantes pode ser submetida a cromatografia de interação hidrofóbica de baixo pH,

utilizando tampão de eluição sob pH de cerca de 2,5 a 4,5, preferivelmente realizada sob baixas concentrações de sais (por exemplo, cerca de 0 a 0,25 M de sal).

J. Formulações Farmacêuticas

Formulações terapêuticas dos anticorpos anti-TAHO, utilizados de acordo com a presente invenção são preparadas para armazenagem por meio da mistura de anticorpo, que possui o grau desejado de pureza com veículos, excipientes ou estabilizantes farmaceuticamente aceitáveis opcionais (*Remington's Pharmaceutical Sciences,* 16ª edição, Osol, A. Ed. (1980)), na forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Veículos, excipientes ou estabilizantes aceitáveis são não tóxicos para pacientes nas dosagens e concentrações utilizadas e incluem tampões tais como acetato, Tris, fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos, antioxidantes que incluem ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de octadecildimetilbenzil amónia, cloreto de hexametónio, cloreto de benzalcónio, cloreto de benzetónio; álcool fenólico, butílico ou benzílico; alquil parabéns tais como metil ou propil paraben; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; e m- cresol); polipéptidos com baixo peso molecular (menos de cerca de dez resíduos); proteínas, tais como albumina de soro, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros hidratos de carbono que incluem glicose, manose ou dextrinas; agentes quelantes, tais como EDTA; tonificantes, tais como trehalose e cloreto de sódio; açúcares, tais como sacarose, manitol, trehalose ou sorbitol; tensioativo, tal como polissorbato; contraiões formadores de sais, tais como sódio; complexos metálicos (tais como complexos de Zn e

proteína); e/ou tensioativos não iónicos, tais como TWEEN®, PLURONICS® ou polietileno glicol (PEG). O anticorpo compreende preferivelmente o anticorpo em concentração de 5 a 200 mg/ml, preferivelmente 10 a 100 mg/ml.

As formulações do presente podem também conter mais de um composto ativo, conforme o necessário para a indicação específica a ser tratada, preferivelmente aqueles com atividades complementares que não se prejudiquem entre si. Além de anticorpo anti-TAHO, , por exemplo, pode ser desejável incluir na formulação um anticorpo adicional, tal como um segundo anticorpo anti-TAHO que une epítopo diferente sobre o polipéptido ou anticorpo para algum outro alvo, tal como fator de crescimento que afete o crescimento do *cancro* específico. Alternativa ou adicionalmente, a composição pode compreender ainda agente quimioterápico, agente citotóxico, citocina, agente de inibição do crescimento, agente anti-hormonal e/ou cardioprotetor. Essas moléculas encontram-se adequadamente presentes em combinação, em quantidades que são eficazes para o propósito pretendido.

Os ingredientes ativos podem também *ser* capturados em microcápsulas preparadas, por exemplo, por métodos de aglutinação ou por polimerização interfacial, tais como microcápsulas de hidroximetilcelulose ou gelatina e microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respetivamente, em sistemas de fornecimento de fármacos coloidais (tais como lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Estas técnicas são descritas em *Remington's Pharmaceutical Sciences,* 16ª edição, Oslo, A., Ed. (1980).

Podem ser fabricadas preparações de libertação prolongada. Exemplos apropriados de preparações de

libertação prolongada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos que contenham o anticorpo, que se encontram na forma de artigos moldados, tais como filmes ou microcápsulas. Exemplos de matrizes com libertação prolongada incluem poliésteres, hidrogéis (tais como poli(2-hidroxietilmetacrilato) ou álcool (poli)vinílico, polilátidos (Patente US nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e L-glutamato de γ-etilo, etileno vinil acetato não degradável, copolímeros degradáveis de ácido láctico e ácido glicólico, tais como LUPRON DEPOT® (microesferas injetáveis compostas de copolímero de ácido láctico e ácido glicólico e acetato de leuprolida) e ácido poli-D-(-)-3- hidroxibutírico.

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

K. Tratamento com Anticorpos Anti-TAHO, Oligopéptidos de Ligação a TAHO e Moléculas Orgânicas de Ligação a TAHO

Para determinar a expressão de TAHO no cancro, estão disponíveis diversos ensaios de deteção. Numa forma de realização, a sobre-expressão de polipéptido TAHO pode ser analisada por meio de imunohistoquímica (IHC). Seções de tecidos embutidas em parafina de biópsia de tumor podem ser submetidas ao ensaio de IHC de acordo com os critérios de intensidade de manchas de proteína TAHO a seguir:

Pontuação 0 - não se observa nenhuma coloração ou a coloração de membranas é observada em menos de 10 % das células tumorais.
Pontuação 1+ - é detetada coloração de membrana fraca/pouco percetível em mais de 10 % das células

tumorais. As células somente são coradas em parte da sua membrana.
Pontuação 2+ - é observada coloração de membrana completa fraca a moderada em mais de 10 % das células tumorais.
Pontuação 3+ - é observada coloração de membrana completa moderada a forte em mais de 10 % das células tumorais.

Os tumores com pontuações 0 ou 1+ para expressão de polipéptido TAHO podem ser caraterizados como não sobre-expressando TAHO, enquanto os tumores com pontuações 2+ ou 3+ podem ser caraterizados como sobre-expressando TAHO.

Alternativa ou adicionalmente, ensaios FISH tais como INFORM® (vendido pela Ventana, Arizona) ou PATHVISION® (Vysis, Illinois) podem ser conduzidos sobre tecido tumoral embutido em parafina e fixo por formalina, para determinar a extensão (se houver) da sobre-expressão de TAHO no tumor.

A amplificação ou sobre-expressão de TAHO pode ser avaliada utilizando ensaio de deteção *in vivo*, por exemplo, por meio da administração de molécula (tal como anticorpo, oligopéptido ou molécula orgânica) que una a molécula a ser detetada e seja marcada com marcador detetável (tal como isótopo radioativo ou marcador fluorescente) e varrimento externo do paciente para localização do marcador.

Conforme descrito acima, os anticorpos anti-TAHO, oligopéptidos e moléculas orgânicas possuem diversas aplicações não terapêuticas. Os anticorpos anti-TAHO, oligopéptidos e moléculas orgânicas podem ser úteis para a avaliação de cancros que expressam polipéptido TAHO (tal como em formação de radioimagens). Os anticorpos, oligopéptidos e moléculas orgânicas também são úteis para a

purificação ou imunoprecipitação de polipéptido TAHO de células, para deteção e quantificação de polipéptido TAHO *in vitro*, por exemplo em ELISA ou Western Blot, para matar e eliminar células que expressam TAHO a partir de população de mistura de células como etapa na purificação de outras células.

Atualmente, dependendo do estágio do cancro, o tratamento do cancro envolve uma ou uma combinação das terapias a seguir: cirurgia para remover o tecido canceroso, terapêutica de radiação e quimioterapia. A terapêutica com anticorpos anti-TAHO, oligopéptidos ou moléculas orgânicas pode ser especialmente desejável em pacientes mais idosos que não tolerem a toxicidade e os efeitos secundários da quimioterapia e em doenças metastáticas em que a terapêutica de radiação apresente utilidade limitada. Os anticorpos anti-TAHO direcionadores de tumores úteis na invenção são úteis para reduzir cancros que expressem TAHO mediante diagnóstico inicial da doença ou durante reincidência. Para aplicações terapêuticas, o anticorpo anti-TAHO pode ser utilizado isoladamente ou em terapêutica de combinação, por exemplo, com hormonas, antiangiogenes ou compostos radiomarcados, ou com cirurgia, crioterapia e/ou radioterapia. Pode-se administrar tratamento com anticorpos anti-TAHO em conjunto com outras formas convencionais de terapêutica, seja consecutivamente com a terapêutica convencional, antes ou depois desta. Fármacos quimioterápicos tais como TAXOTERE® (docetaxel), TAXOL® (paclitaxel), estramustina e mitoxantrona são utilizadas no tratamento de cancro, particularmente em pacientes com bons riscos. Na presente utilização da invenção para o tratamento ou redução de cancro, pode-se administrar anticorpo anti-TAHO ao paciente com cancro em conjunto com tratamento com um ou mais dos agentes quimioterápicos acima. Contempla-se, particularmente,

terapêutica de combinação com paclitaxel e derivados modificados (veja-se, por exemplo, documento EP 0600517). O anticorpo anti-TAHO será administrado com uma dose terapeuticamente eficaz do agente quimioterápico. Noutra forma de realização, o anticorpo anti-TAHO é administrado em conjunto com quimioterapia, para aumentar a atividade e eficácia do agente quimioterápico, tal como paclitaxel. *Physician's Desk Reference* (PDR) descreve dosagens desses agentes que foram utilizadas no tratamento de diversos cancros. O regime de dosagem e as dosagens desses fármacos quimioterápicas mencionadas acima que são terapeuticamente eficazes dependerão do cancro específico a ser tratado, da extensão da doença e de outros fatores familiares para o médico especializado e podem ser determinados pelo médico.

Numa forma de realização particular, é administrado ao paciente um conjugado que compreende anticorpo anti-TAHO conjugado com um agente citotóxico. O imunoconjugado unido à proteína TAHO é internalizado pela célula, resultando em maior eficácia terapêutica do imunoconjugado para matar a célula cancerosa à qual se une. Numa forma de realização preferida, o agente citotóxico dirige-se ou interfere com o ácido nucleico na célula cancerosa. Exemplos desses agentes citotóxícos são descritos acima e incluem maitansinoides, caliqueamicinas, ribonucleases e endonucleases de ADN.

Os anticorpos anti-TAHO são administrados a um paciente humano, de acordo com métodos conhecidos, tais como administração intravenosa, por exemplo, na forma de mistura ou de infusão contínua ao longo de período de tempo, por via intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinhal, subcutânea, intraarticular, intrassinovial, intratecal, oral, tópica ou inalatória. Prefere-se administração intravenosa ou subcutânea do anticorpo.

Outros regimes terapêuticos podem ser combinados com a administração do anticorpo anti-TAHO. A administração combinada inclui coadministração, utilizando formulações separadas ou uma única formulação farmacêutica, e administração consecutiva em qualquer ordem, em que há preferivelmente um período de tempo em que ambos (ou todos) os agentes ativos exercem simultaneamente suas atividades biológicas. Preferivelmente, essa terapêutica combinada resulta em efeito terapêutico sinérgico.

Pode também ser desejável combinar a administração do(s) anticorpo(s) anti-TAHO com a administração de anticorpo dirigido a outro antigénio tumoroso associado ao cancro específico.

Noutra forma de realização, a utilização em métodos de tratamento terapêutico da presente invenção envolve a administração combinada de anticorpo (ou anticorpos) anti-TAHO e um ou mais agentes quimioterápicos ou agentes de inibição do crescimento, incluindo a coadministração de coquetéis de agentes quimioterápicos diferentes. Os agentes quimioterápicos incluem fosfato de estramustina, prednimustina, cisplatina, 5-fluoroacil, melfalan, ciclofosfamida, hidroxiureia e hidroxiureia taxanos (tais como paclitaxel e doxetaxel) e/ou antibióticos de antraciclina. Cronogramas de preparação e dosagem para esses agentes quimioterápicos podem ser utilizados de acordo com as instruções dos fabricantes ou conforme determinado empiricamente pelos peritos na especialidade. Cronogramas de preparação e dosagem para essa quimioterapia também são descritos em *Chemotherapy Service,* Ed. M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore MD (1992).

O anticorpo pode ser combinado com composto anti-hormonal; por exemplo, composto anti-estrogénios tal como

tamoxifen; anti-progesterona tal como onapristona (veja-se documento EP 616.812); ou anti-androgénio, tal como flutamida, em dosagens conhecidas para essas moléculas. Quando o cancro a ser tratado for cancro independente de androgénios, o paciente pode haver sido submetido anteriormente a terapêutica anti-androgénios e, depois que o cancro tornar-se independente de androgénios, o anticorpo anti-TAHO (e, opcionalmente, outros agentes, conforme descrito no presente) pode ser administrado ao paciente.

Às vezes, pode ser benéfico também coadministrar um cardioprotetor (para evitar ou reduzir distúrbios miocardianas associadas à terapêutica) ou uma ou mais citocinas ao paciente. Além dos regimes terapêuticos acima, o paciente pode ser submetido à remoção cirúrgica de células cancerosas e/ou terapêutica de radiação antes, simultaneamente com ou depois da terapêutica com anticorpos. Dosagens apropriadas para qualquer dos agentes coadministrados acima são as utilizadas no presente e podem ser reduzidas devido à ação combinada (sinergia) do agente e anticorpo anti-TAHO.

Para a prevenção ou tratamento de doenças, a dosagem e o modo de administração serão selecionados pelos médicos de acordo com critérios conhecidos. A dosagem apropriada de anticorpo dependerá do tipo de doença a ser tratado, conforme definido acima, severidade e curso da doença, se o anticorpo é administrado para fins preventivos ou terapêuticos, terapêutica anterior, histórico clínico do paciente e reação ao anticorpo e critério do médico atendente. O anticorpo é administrado adequadamente ao paciente uma vez ou ao longo de uma série de tratamentos. Preferivelmente, o anticorpo é administrado por meio de infusão intravenosa ou de injeções subcutâneas. Dependendo do tipo e da severidade da doença, cerca de 1 µg/kg a cerca

de 50 mg/kg de peso do corpo (por exemplo, cerca de 0,1 a 15 mg/kg/dose) de anticorpo pode ser dosagem inicial possível para administração ao paciente, seja, por exemplo, por meio de uma ou mais administrações separadas ou de infusão contínua. Regime de dosagem pode compreender a administração de dose de carregamento inicial de cerca de 4 mg/kg, seguida por dose de manutenção semanal de cerca de 2 mg/kg do anticorpo anti-TAHO. Entretanto, outros regimes de dosagem podem ser úteis. Dosagem diária típica pode variar de cerca de µg/kg a 100 mg/kg ou mais, dependendo dos fatores mencionados acima. Para administrações repetidas ao longo de vários dias ou mais, dependendo da condição, o tratamento é mantido até que ocorra supressão desejada de sintomas da doença. O progresso dessa terapêutica pode ser facilmente monitorado por meio de ensaios e métodos convencionais, com base em critérios conhecidos do médico ou outros peritos na especialidade.

Além da administração da proteína de anticorpo ao paciente, o presente pedido contempla a administração do anticorpo por meio de terapêutica genética. Essa administração de ácido nucleico codificador do anticorpo é abrangida pela expressão "administração de quantidade terapeuticamente eficaz de anticorpo". Veja-se, por exemplo, documento WO 96/07321 publicado em 14 de Março de 1996, referente à utilização de terapêutica genética, para gerar anticorpos intracelulares.

Existem duas abordagens principais para a colocação do ácido nucleico (opcionalmente contido num vetor) nas células do paciente: *in vivo* e *ex vivo*. Para fornecimento *in vivo*, o ácido nucleico é injetado diretamente no paciente, normalmente no local em que é necessário o anticorpo. Para tratamento *ex vivo*, as células do paciente são removidas, o ácido nucleico é introduzido nessas

células isoladas e as células modificadas são administradas ao paciente diretamente ou, por exemplo, encapsuladas em membranas porosas que são implantadas no paciente (veja-se, por exemplo, Patentes US nº 4.892.538 e 5.238.187). Existe uma série de técnicas disponíveis para a introdução de ácidos nucleicos em células viáveis. As técnicas variam dependendo da transferência ou não do ácido nucleico para células cultivadas *in vitro* ou *in vivo* nas células do hospedeiro desejado. Técnicas apropriadas de transferência de ácido nucleico para células de mamíferos *in vitro* incluem a utilização de lipossomas, eletroporação, microinjeção, fusão celular, DEAE-dextrano, método de precipitação de fosfato de cálcio etc. Vetor comumente utilizado para fornecimento ex *vivo* do gene é vetor retroviral.

As técnicas de transferência de ácido nucleico *in vivo* atualmente preferidas incluem transfeção com vetores virais (tais como adenovírus, vírus I simples da Herpes ou vírus adenoassociado) e sistemas com base em lípidos (lípidos úteis para transferência mediada por lípidos do gene são, por exemplo, DOTMA, DOPE e DC-Chol). Para análise dos protocolos de terapêutica genética e marcação genética atualmente conhecidos, veja-se Anderson *et al.*, *Science* 256: 808-813 (1992). Veja-se também documento WO 93/25673 e as referências mencionadas no mesmo.

Os anticorpos anti-TAHO de acordo com a presente invenção podem apresentar-se nas diferentes formas abrangidas pela definição de "anticorpo" do presente documento. Portanto, os anticorpos incluem anticorpo intato ou de comprimento total, fragmentos de anticorpos, anticorpos de sequência nativa ou variantes de aminoácidos, anticorpos de fusão, quiméricos ou humanizados, imunoconjugados e seus fragmentos funcionais. Em anticorpos

de fusão, sequência de anticorpo é fusionada a sequência de polipéptidos heterólogos. Os anticorpos podem ser modificados na região Fc para fornecer funções efetoras desejadas. Conforme discutido em mais pormenores nas seções a seguir, com as regiões Fc apropriadas, o anticorpo original unido sobre a superfície celular pode induzir a citotoxicidade, por exemplo, por meio de citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) ou por meio do recrutamento de complemento em citotoxicidade dependente de complemento ou algum outro mecanismo. Alternativamente, quando for desejável eliminar ou reduzir a função efetora, de forma a minimizar os efeitos secundários ou complicações terapêuticas, podem ser utilizadas outras regiões de Fc.

Numa forma de realização, o anticorpo concorre para unir-se ou unir-se substancialmente ao mesmo epítopo dos anticorpos de acordo com a presente invenção. Também são contemplados anticorpos que possuem as características biológicas dos anticorpos anti-TAHO de acordo com a presente invenção, incluindo especificamente o direcionamento de tumores *in vivo* e qualquer inibição da proliferação celular ou características citotóxicas.

Os métodos de produção dos anticorpos acima são descritos em pormenores no presente documento.

Os anticorpos anti-TAHO são úteis para o tratamento de cancro que expresse TAHO ou redução de um ou mais sintomas do cancro num mamífero. Tal cancro inclui, mas não é limitado a, cancros hematopoiéticos ou cancros relacionados com o sangue, tais como linfoma, leucemia, mieloma ou malignidades linfoides, mas também cancros do baço e cancros dos gânglios linfáticos. Exemplos mais particulares de tais cancros associados a célula B, incluindo, por exemplo, linfomas de grau alto, intermediário e baixo

(incluindo linfomas de célula B tais como, por exemplo, linfoma de célula B de tecido linfoide associado a mucosa e linfoma não-Hodgkin, linfoma de célula de manto, linfoma de Burkitt, linfoma linfocítico pequeno, linfoma de zona marginal, linfoma de célula grande difusa, linfoma folicular, e linfoma de Hodgkin e linfomas de célula T) e leucemias (incluindo leucemia secundária, leucemia linfocítica crónica, tais como leucemia de célula B (linfócitos B CD5+), leucemia mieloide, tais como leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoide, tais como leucemia linfoblástica aguda e mielodisplasia), mieloma múltiplo, tais como malignidade de célula plasmática, e outros cancros associados a célula T ou célula B e/ou hematológicos. Os cancros abrangem cancros metastáticos de acordo com qualquer dos anteriores. As presentes reivindicações referem-se ao tratamento de linfoma folicular, linfoma de célula de manto ou linfoma de célula grande difusa. O anticorpo é capaz de unir-se a pelo menos uma parte das células cancerosas que expressam polipéptido TAHO no mamífero. Numa forma de realização preferida, o anticorpo é eficaz para destruir ou matar células tumorais que expressem TAHO ou inibir o crescimento dessas células tumorais, *in vitro* ou *in vivo*, mediante ligação a polipéptido TAHO sobre a célula. Os anticorpos originais que apresentam propriedades citotóxicas ou de inibição do crescimento celular podem ser adicionalmente armados com agente citotóxico para torná-los ainda mais potentes na destruição das células tumorais. Podem ser conferidas propriedades citotóxicas a anticorpo anti-TAHO, por exemplo, por meio de conjugação do anticorpo com agente citotóxico, para formar imunoconjugado conforme descrito no presente documento. O agente citotóxico ou agente de inibição do crescimento é preferivelmente molécula pequena. São preferíveis toxinas, tais como caliqueamicina ou maitansinoide e seus análogos ou derivados.

Composições que compreendem anticorpo anti-TAHO e um veículo são apropriadas para o tratamento. Para os propósitos do tratamento de cancro, podem ser administradas composições ao paciente em necessidade desse tratamento, em que a composição pode compreender um ou mais anticorpos anti-TAHO presentes na forma de. Numa forma de realização adicional, as composições podem compreender esses anticorpos em combinação com outros agentes terapêuticos, tais como agentes citotóxicos ou inibidores do crescimento, incluindo agentes quimioterápicos. Também se descrevem no presente documento formulações que compreendem anticorpo anti-TAHO e um veículo. Numa forma de realização, a formulação é uma formulação terapêutica que compreende um veículo farmaceuticamente aceitável.

Também se descrevem no presente documento ácidos nucleicos isolados que codificam os anticorpos anti-TAHO. São abrangidos os ácidos nucleicos que codificam ambas as cadeias H e L e especialmente os resíduos de região hipervariável, cadeias que codificam o anticorpo de sequência nativa, bem como variantes, modificações e versões humanizadas do anticorpo.

Também se descrevem no presente documento métodos úteis de tratamento de cancro que expresse polipéptido TAHO ou redução de um ou mais sintomas do cancro em mamíferos, que compreende a administração de quantidade terapeuticamente eficaz de anticorpo anti-TAHO, oligopéptido ou molécula orgânica ao mamífero. As composições terapêuticas de anticorpos, oligopéptidos ou moléculas orgânicas podem ser administradas a curto prazo (agudas), crónicas ou intermitentes, conforme receitado pelo médico. Também são proporcionados métodos de inibição do crescimento e morte de célula que expresse TAHO.

Também se descrevem no presente documento kits e artigos industrializados que compreendem pelo menos um anticorpo anti-TAHO, oligopéptido ou molécula orgânica. Kits que contêm anticorpos anti-TAHO, oligopéptidos ou moléculas orgânicas apresentam utilização, por exemplo, para ensaios de morte celular de TAHO, purificação ou imunoprecipitação de polipéptido TAHO das células. Para isolamento e purificação de TAHO, por exemplo, o kit pode conter anticorpo anti-TAHO, oligopéptido ou molécula orgânica acoplada a esferas (tais como esferas de sepharose). Podem ser proporcionados kits que contêm os anticorpos, oligopéptidos ou moléculas orgânicas para deteção e quantificação de TAHO *in vitro*, por exemplo em ELISA ou Western Blot. Esse anticorpo, oligopéptido ou molécula orgânica útil para deteção pode receber marcador, tal como fluorescente ou radiomarcador.

L. Artigos Industrializados e Kits

Também se descreve um artigo industrializado que contém materiais úteis para o tratamento de cancro que expressa anti-TAHO. O artigo industrializado compreende um recipiente e rótulo ou bula sobre o recipiente ou a ele associado. Os recipientes apropriados incluem, por exemplo, garrafas, ampolas, seringas etc. Os recipientes podem ser formados a partir de uma série de materiais tais como vidro ou plástico. O recipiente contém composição que é eficaz para o tratamento da condição cancerosa e pode ter porta de acesso estéril (o recipiente pode ser, por exemplo, saco de solução intravenosa ou ampola que contém tampa perfurável por agulha de injeção hipodérmica). Pelo menos um agente ativo na composição é um anticorpo anti-TAHO, oligopéptido ou molécula orgânica do pedido.. O rótulo ou bula indica que a composição é utilizada para o tratamento de cancro. O rótulo ou bula compreenderá adicionalmente instruções de

administração da composição de anticorpo, oligopéptido ou molécula orgânica ao paciente com cancro. Além disso, o artigo industrializado pode compreender adicionalmente segundo recipiente que compreende tampão farmaceuticamente aceitável, tal como água bacteriostática para injeção (BWFI), solução salina tamponada com fosfato, solução de Ringer e solução de dextrose. Ele pode ainda incluir outros materiais desejáveis do ponto de vista comercial e do usuário, que incluem outros tampões, diluentes, filtros, agulhas e seringas.

Também são proporcionados kits que são úteis para diversos propósitos, tais como para ensaios de morte de células que expressam TAHO, purificação ou imunoprecipitação de polipéptido TAHO a partir de células. Para isolamento e purificação de polipéptido TAHO, por exemplo, o kit pode conter anticorpo anti-TAHO, oligopéptido ou molécula orgânica acoplada a esferas (tais como esferas de sepharose). Podem ser proporcionados kits que contêm os anticorpos, oligopéptidos ou moléculas orgânicas para deteção e quantificação de polipéptido TAHO *in vitro*, por exemplo, em ELISA ou Western Blot. Da mesma forma que com o artigo industrializado, o kit compreende recipiente e rótulo ou bula sobre o recipiente ou a ele associado. O recipiente contém composição que compreende pelo menos um anticorpo anti-TAHO, oligopéptido ou molécula orgânica do pedido. Podem ser incluídos recipientes adicionais que contenham, por exemplo, diluentes, tampões e anticorpos controlo. O rótulo ou bula pode fornecer descrição da composição, bem como instruções para a utilização *in vitro* ou em deteção desejado.

M. Utilizações para Polipéptidos TAHO e Ácidos Nucleicos que Codificam Polipéptidos TAHO

Sequências de nucleótidos (ou seu complemento) que codificam polipéptidos TAHO possuem diversas aplicações na técnica de biologia molecular, incluindo utilizações como sondas de hibridação, em mapeamento genético e cromossómico e na geração de sondas de ARN e ADN antissense. Ácido nucleico codificador de TAHO também será útil para a preparação de polipéptidos TAHO por meio dos métodos recombinantes descritos no presente documento, em que esses polipéptidos TAHO podem encontrar utilização, por exemplo, na preparação de anticorpos anti-TAHO conforme descrito no presente documento.

O gene TAHO de sequência nativa de comprimento total, ou suas partes, pode ser utilizado como sonda de hibridação para que biblioteca de ADNc isole o ADNc de TAHO de comprimento total ou isole ainda outros ADNc (tais como os que codificam variantes de TAHO de ocorrência natural ou TAHO de outras espécies) que possuem identidade de sequências desejada para a sequência de TAHO nativa descrita no presente documento. Opcionalmente, o comprimento das sondas será de cerca de vinte a cerca de cinquenta bases. As sondas de hibridação podem ser derivadas de regiões ao menos parcialmente inovadoras da sequência de nucleótidos nativa de comprimento total, em que essas regiões podem ser determinadas sem experimentação indevida ou a partir de sequências genómicas que incluem promotores, elementos amplificadores e intrões de TAHO de sequência nativa. Como forma de exemplo, método de seleção compreenderá o isolamento da região de codificação do gene TAHO utilizando a sequência de ADN conhecida para sintetizar sonda selecionada de cerca de quarenta bases. Sondas de hibridação podem ser marcadas por uma série de

marcadores, que incluem radionucleótidos tais como ^{32}P ou ^{32}S, ou marcadores enzimáticos tais como fosfatase alcalina acoplada à sonda por meio de sistemas de acoplamento de avidina/biotina. Sondas marcadas que possuem sequência complementar à do gene TAHO do presente pedido podem ser utilizadas para selecionar bibliotecas de ADNc humano, ADN genómico ou ARNm para determinar a quais membros dessas bibliotecas a sonda se hibrida. Métodos de hibridação são descritos com mais pormenores nos Exemplos a seguir. Quaisquer sequências de EST descritas no presente pedido podem ser utilizadas de forma similar como sondas, utilizando os métodos descritos no presente documento.

Outros fragmentos úteis dos ácidos nucleicos codificadores de TAHO incluem oligonucleótidos sense ou antissense que compreendem sequência de ácido nucleico de fita simples (ARN ou ADN) capaz de unir-se a sequências de ARNm de TAHO alvo (sense) ou ADN de TAHO (antissense). Oligonucleótidos sense ou antissense, de acordo com o presente pedido, compreendem um fragmento da região de codificação de ADN de TAHO. Esse fragmento geralmente compreende pelo menos de cerca de 14 nucleótidos, preferivelmente cerca de 14 a 30 nucleótidos. A capacidade de derivação de oligonucleótido sense ou antissense, com base em sequência de ADNc codificadora de uma dada proteína é descrita, por exemplo, em Stein e Cohen (*Cancer Res.* 48: 2659, 1988) e van der Krol *et al.* (*BioTechniques 6*: 958, 1988).

A ligação de oligonucleótidos sense ou antissense a sequências de ácido nucleico alvo resulta na formação de duplex que bloqueia a transcrição de bloco ou tradução da sequência alvo por um dentre vários meios, que incluem maior degradação dos duplex, término prematuro da transcrição ou tradução ou por outros meios. Esses métodos

são descritos no presente pedido. Os oligonucleótidos antissense podem ser utilizados, portanto, para bloquear a expressão de proteínas TAHO, em que essas proteínas TAHO podem desempenhar papel na indução de cancro em mamíferos. Oligonucleótidos sense ou antissense compreendem adicionalmente oligonucleótidos que possuem cadeias principais de açúcar- fosfodiéster modificadas (ou outras ligações de açúcar, tais como as descritas no documento WO 91/06629) e em que essas ligações de açúcar são resistentes a nucleases endógenas. Esses oligonucleótidos com ligações de açúcar resistentes são estáveis *in vivo* (ou seja, capazes de resistir à degradação enzimática), mas retêm especificidade de sequências para que sejam capazes de se unirem a sequências de nucleótidos alvo.

Locais intragénicos preferidos para ligação antissense incluem a região que incorpora o codão de início/início de tradução (5'-AUG/5'-ATG) ou codão de parada/término (5-UAA, 5-UAG e 5-UGA/5-TAA, 5'-TAG e 5'-TGA) da grelha de leitura aberta (ORF) do gene. Estas regiões designam parte do ARNm ou gene que abrange cerca de 25 a cerca de 50 nucleótidos contíguos em qualquer direção (ou seja, 5' ou 3') a partir de codão de início ou término de tradução. Outras regiões preferidas para ligação antissense incluem: intrões; exões; junções de intrão e exão; grelha de leitura aberta (ORF) ou "região de codificação", que é a região entre o codão de início de tradução e o codão de término de tradução; a tampa 5' de ARNm que compreende resíduo de guanosina N7-metilado unido ao resíduo mais 5' do ARNm por meio de ligação de 5-5' trifosfato e inclui a própria estrutura de tampa 5', bem como os cinquenta primeiros nucleótidos ao lado da tampa; a região não traduzida 5' (5' UTR), a parte de ARNm na direção 5' a partir do codão de início de tradução e, desta forma, que inclui nucleótidos entre o local de tampa 5' e o codão de início de tradução de ARNm

ou nucleótidos correspondentes sobre o gene; e a região não traduzida 3′ (3'UTR), a parte de ARNm na direção 3' a partir do codão de término de tradução e, desta forma, que inclui nucleótidos entre o codão de término de tradução e a extremidade 3′ de ARNm ou nucleótidos correspondentes sobre o gene.

Exemplos específicos de compostos antissense preferidos úteis para inibir a expressão de proteínas TAHO incluem oligonucleótidos que contenham cadeias principais modificadas ou ligações internucleótidos não naturais. Oligonucleótidos que contêm cadeias principais modificadas incluem aqueles que retêm um átomo de fósforo na cadeia principal e os que não contêm átomo de fósforo na cadeia principal. Para os fins da presente memória descritiva e conforme indicado às vezes na técnica, oligonucleótidos modificados que não possuem átomo de fósforo na sua cadeia principal internucleótidos podem também ser considerados oligonucleótidos. Cadeias principais de oligonucleótidos modificados preferidas incluem, por exemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirais, fosforaditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosfonatos de metilo e outros alquilo que incluem fosfonatos de 3′-alquileno, fosfonatos de 5′-alquileno e fosfonatos quirais, fosfinatos, fosforamidatos incluindo 3′-amino fosforamidato e aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, selenofosfatos e boranofosfatos que contêm ligações 3′-5′ normais, seus análogos 2′-5′ ligados e os que possuem polaridade invertida, em que uma ou mais ligações internucleótidos é ligação 3′ a 3′, 5′ a 5′ ou 2' a 2′. Oligonucleótidos preferidos que possuem polaridade invertida compreendem uma única ligação 3′ a 3′ na ligação internucleótidos mais 3′, ou seja, um único resíduo de nucleótido invertido que pode ser abásico (está a faltar a

nucleobase ou contém grupo hidroxilo no seu lugar). Também são incluídas vários sais, sais misturados e formas de ácido livre. Patentes US representativas que ensinam a preparação de ligações que contêm fósforo incluem, mas não são limitados às Patentes US nº 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; 5.194.599; 5.565.555; 5.527.899; 5.721.218; 5.672.697 e 5.625.050.

Cadeias principais de oligonucleótidos modificadas preparadas que não incluem átomo de fósforo no seu interior possuem cadeias principais que são formadas por ligações internucleótidos alquilo ou ciclóalquilo de cadeia curta, ligações internucleótidos de heteroátomos e alquilo ou cicloalquilo misturadas ou uma ou mais ligações internucleótidos heteroatómicas ou heterocíclicas de cadeia curta. Estas incluem as que possuem ligações morfolino (formadas em parte a partir da fração de açúcar de nucleótido); cadeias principais de siloxano; cadeias principais de sulfeto, sulfóxido e sulfona; cadeias principais de formacetilo e tioformacetilo; cadeias principais de metileno formacetilo e tioformacetilo; cadeias principais de riboacetilo; cadeias principais que contêm alceno; cadeias principais de sulfamato; cadeias principais de metilenoimino e metileno hidrazino; cadeias principais de sulfonato e sulfonamida; cadeias principais de amida; e outas que contêm partes componentes de N, O, S e CH_2 misturadas. Patentes US representativas que ensinam a preparação desses oligonucleótidos incluem, mas não são limitados às Patentes US nº 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967;

5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; 5.792.608; 5.646.269 e 5.677.439.

Em outros oligonucleótidos antissense preferidos, tanto a ligação de açúcar quanto a internucleótidos, ou seja a cadeia principal, das unidades de nucleótidos são substituídas com grupos inovadores. As unidades de base são mantidas para hibridação com composto alvo de ácido nucleico apropriado. Um desses compostos oligoméricos, mimético de oligonucleótido que se demonstrou possuir excelentes propriedades de hibridação, é denominado ácido nucleico de péptido (PNA). Em compostos de PNA, a cadeia principal de açúcar de oligonucleótido é substituída com cadeia principal que contém amida, particularmente cadeia principal de aminoetilglicina. As nucleobases são retidas e unidas direta ou indiretamente a átomos de nitrogénio aza da fração de amida da cadeia principal. Patentes US representativas que ensinam a preparação de compostos de PNA incluem, mas não são limitados às Patentes US nº 5.539.082; 5.714.331 e 5.719.262. Ensinamentos adicionais de compostos de PNA podem ser encontrados em Nielsen *et al., Science,* 1991, 254, 1497-1500.

Oligonucleótidos antissense preferidos incoporam cadeias principais de fosforotioato e/ou cadeias principais de heteroátomos, particularmente $-CH_2-NH-O-CH_2-$, $-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-$ (conhecida como cadeia principal de metileno (metilimino) ou MMI), $-CH_2-O-N(CH_3)-CH_2-$, $-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-CH_2-$ e $-O-N(CH_3)-CH_2-CH_2-$ (em que a cadeia principal de fosfodiéster nativa é representada como $-O-P-O-CH_2-$), descritas na Patente US nº 5.489.677 indicada acima, e as cadeias principais de amida da Patente US nº 5.602.240 indicada acima. Também são preferidos oligonucleótidos

antissense que contêm estruturas de cadeia principal de morfolino da Patente US nº 5.034.506 mencionada acima.

Oligonucleótidos modificados podem também conter uma ou mais frações de açúcar substituídas. Oligonucleótidos preferidos compreendem um dentre os seguintes na posição 2': OH; F; O-alquilo, S- alquilo ou N-alquilo; O-alquenilo, S-alquenilo ou N-alquenilo; O-alquinilo, S-alquinilo ou N-alquinilo; ou O-alquil-O-alquilo, em que o alquilo, alquenilo e alquinilo podem ser alquilo C_1 a C_{10} substituído ou não substituído ou alquenilo C_2 a C_{10} e alquinilo. São particularmente preferidos $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$, $O(CH_2)_nOCH_3$, $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nONH_2$ e $O(CH_2)_nON[(CH_2)nCH_3)]_2$, em que nem são de 1 a cerca de 10. Outros oligonucleótidos antissense preferidos compreendem um dos seguintes na posição 2': alquilo inferior C_1 a C_{10}, alquenilo, alquinilo, alcarilo, aralquilo, O- alcarilo ou O-aralquilo, SH, SCH_3, OCN, Cl, Br, CN, CF_3, OCF_3, $SOCH_3$, SO_2 CH_3, ONO_2, NO_2, N_3, NH_2, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo substituído, grupo divisor de ARN, grupo relator, intercalante, grupo para aprimorar as propriedades farmacocinéticas de oligonucleótido ou grupo para aprimorar as propriedades farmacodinâmicas de oligonucleótido, bem como outros substituintes que possuem propriedades similares. Modificação preferida inclui 2'-metoxietóxi (2'-O-$CH_2CH_2OCH_3$, também conhecido como 2'-O-(2-metoxietilo) ou 2-MOE) (Martin *et al., Helv. Chim. Acta,* 1995, 78, 486-504), ou seja, grupo alcoxialcoxi. Modificação preferida adicional inclui 2'-dimetilaminooxietóxi, ou seja, grupo $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$, também conhecido como 2'-DMAOE, conforme descrito nos exemplos a seguir, e 2'-dimetilaminoetoxietóxi (também conhecido na técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo ou 2'-DMAEOE), ou seja, 2'-O-CH_2-O-CH_2-N(CH_2).

Uma modificação preferida adicional inclui Ácidos Nucleicos Travados (LNAs), nos quais o grupo 2'-hidroxilo é ligado ao átomo de carbono 3' ou 4' do anel de açúcar, de maneira a formar uma fração de açúcar bicíclica. A ligação é preferivelmente grupo metileno $(-CH_2-)_n$ que une o átomo de oxigénio 2' e o átomo de carbono 4', em que n é 1 ou 2. LNAs e sua preparação são descritos no documento WO 98/39352 e no documento WO 99/14226.

Outras modificações preferidas incluem 2'-metóxi (2'-$O-CH_3$), 2-aminopropóxi (2'-$OCH_2CH_2CH_2$ NH_2), 2'-alilo (2'-$CH_2-CH=CH_2$); 2'-O-alilo (2'-O-$CH_2-CH=CH_2$) e 2'-fluoro (2-F). A modificação 2' pode estar na posição arabino (superior) ou na posição ribo (inferior). Modificação 2'-arabino preferida é 2'-F. Modificações similares podem também ser realizadas em outras posições sobre o oligonucleótido, particularmente a posição 3' do açúcar sobre o nucleótido 3-terminal ou em oligonucleótidos 2'-5' ligados e a posição 5' do nucleótido 5' terminal. Os oligonucleótidos podem também possuir imitações de açúcar tais como frações ciclobutilo no lugar de açúcar pentofuranosilo. Patentes US representativas que ensinam a preparação dessas estruturas de açúcar modificadas incluem, mas sem limitar- se às Patentes US nº 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; 5.792.747; e 5.700.920.

Os oligonucleótidos podem também incluir substituições ou modificações de nucleobases (frequentemente indicados na técnica simplesmente como "bases"). Como é usado no presente documento, nucleobases "não modificadas" ou "naturais" incluem as bases de purina adenina (A) e guanina (G) e as bases de pirimidina timina (T), citosina (C) e

uracil (U). Nucleobases modificadas incluem outras nucleobases naturais e sintéticas, tais como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, derivados 6-metilo e outros alquilo de adenina e guanina, derivados 2-propilo e outros alquilo de adenina e guanina, 2-tiouracil, 2- tiotimina e 2-tiocitosina, 5-halouracil e citosina, 5-propinilo (-C-≡C-CH_3 or -CH_2-C≡H) uracil e citosina e outros derivados alquimia de bases de pirimidina, 6- azo uracil, citosina e timina, 5-uracil (pseudouracil), 4-tíouracil, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo e outras adeninas e guaninas 8-substituídas, 5- halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometil e outros uracilos e citosinas 5-substituídos, 7-metilguanina e 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina e 8-azaadenina, 7-deazaguanina, 7-deazaadenina, 3- deazaguanina e 3-deazaadenina. Nucleobases modificadas adicionais incluem pirimidinas tricíclicas, tais como fenoxazino citidino (1H-pirimido[5,4- b][1,4]benzoxazin-2 (3H)-ona), fenotiazino citidina (1H-pirimido[5,4- b][1,4]benzotiazin-2 (3H)-ona), grampos G tais como fenoxazino citidina substituída (por exemplo, 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2 (3H)-ona), carbazol citidino (2H-pirimido[4,5-b]indol-2-ona), piridoindol citidino (H-pirido[3^1,2':4,5]pirrolo[2,3-d]pirimidin-2-ona). Nucleobases modificadas podem também incluir aquelas em que a base purina ou pirimidina é substituída com outros heterociclos, tais como 7-deaza-adenina, 7- deazaguanosina, 2-aminopiridina e 2-piridona. Nucleobases adicionais incluem as descritas na Patente US nº 3.687.808, as descritas em *The Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering,* págs. 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990, e as descritas por Englisch *et al., Angewandte Chemie,* Edição Internacional, 1991, 30, 613. Certas destas nucleobases são particularmente úteis para aumentar a afinidade de ligação

dos compostos oligoméricos do pedido. Estas incluem pirimidinas 5-substituídas, 6-azapirimidinas e purinas N-2, N-6 e O-6 substituídas, que incluem 2-aminopropiladenína, 5-propiniluracil e 5- propinilcitosina. Demonstrou-se que substituições de 5-metilcitosina aumentam a estabilidade de duplex de ácido nucleico em 0,6 a 1,2 °C (Sanghvi *et al.*, *Antisense Research and Applications,* CRC Press, Boca Raton, 1993, págs. 276-278) e são substituições de bases preferidas, ainda mais especificamente quando combinadas com modificações de açúcar 2-O-metoxietilo. Patentes US representativas que ensinam a preparação dessas nucleobases modificadas incluem, mas não são limitados a: Patente US nº 3.687.808, bem como Patentes US nº 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121, 5.596.091; 5.614.617; 5.645.985; 5.830.653; 5.763.588; 6.005.096; 5.681.941 e 5.750.692.

Outra modificação de oligonucleótidos antissense que ligam quimicamente ao oligonucleótido uma ou mais frações ou conjugados que aumentam a atividade, distribuição celular ou absorção celular do oligonucleótido. Os compostos do pedido podem incluir grupos conjugados unidos covalentemente a grupos funcionais tais como grupos hidroxilo primários ou secundários. Os grupos conjugados do pedido incluem intercaladores, moléculas relatoras, poliaminas, poliamidas, polietileno glicóis, poliéteres, grupos que aumentam as propriedades farmacodinâmicas de oligómeros e grupos que aumentam as propriedades farmacocinéticas de oligómeros. Grupos conjugados típicos incluem colesteróis, lípidos, lípidos de catiões, fosfolípidos, fosfolípidos catiónicos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, coumarinas e tinturas. Grupos que melhoram as propriedades farmacodinâmicas, no contexto

deste pedido, incluem grupos que aumentam a absorção de oligómeros, aumentam a resistência de oligómeros à degradação e/ou fortalecem a hibridação específica de sequências com ARN. Os grupos que melhoram as propriedades farmacocinéticas, no contexto deste pedido, incluem grupos que aumentam a absorção, distribuição, metabolismo ou excreção de oligómeros. Frações conjugadas incluem, mas não são limitados a frações de lípidos, tais como fração de colesterol (Letsinger *et al., Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 1989, 89, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan *et al., Bioorg. Med. Chem. Let.*, 1994, 4, 1053-1060), tioéter, tal como hexil-S-tritiltiol (Manoharan *et al., Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1992, 660, 306-309; Manoharan *et al., Bioorg. Med. Chem. Let,* 1993, 3, 2765-2770), tiocolesterol (Oberhauser *et al., Nucl. Acids Res.,* 1992, 20, 533-538), cadeia alifática, tal como dodecandiol ou resíduos undecilo (Saison-Behmoaras *et al., EMBOJ.,* 1991, 10, 1111-1118; Kabanov *et al., FEBS Lett.,* 1990, 259, 327-330; Svinarchuk *et al., Biochlmie,* 1993, 75, 49-54), fosfolípido, tal como di-hexadecil-rac-glicerol ou 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietil-amónio (Manoharan *et al., Tetrahedron Lett.,* 1995, 36, 3651-3654; Shea *et al., Nucl. Acids Res.,* 1990, 18, 3777-3783), poliamina ou cadeia de polietileno glicol (Manoharan *et al., Nucleosides & Nucleotides,* 1995, 14, 969-973) ou adamantano ácido acético (Manoharan *et al., Tetrahedron Lett.,* 1995, 36, 3651-3654), fração palmitilo (Mishra *et al., Biochim. Biophys. Acta,* 1995, 1264, 229-237) ou fração octadecilamina ou hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Os oligonucleótidos do pedido podem também ser conjugados a substâncias de fármacos ativas, tais como aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofen, suprofen, fenbufen, cetoprofen, (S)-(+)-pranoprofen, carprofen, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triiodobenzóico, ácido flufenámico, ácido folínico, benzotiadiazida, clorotiazida, diazepina, indometicina,

barbiturato, cefalosporina, fármaco sulfa, antidiabético, antibacteriano ou antibiótico. Os conjugados de oligonucleótido e fármaco e sua preparação são descritos no pedido de patente US com número de série 09/334.130 (depositado em 15 de Junho de 1999) e as Patentes US nº 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717, 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241, 5.391.723; 5.416.203, 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 e 5.688.941, cada uma das quais é incorporada no presente documento por referência.

Não é necessário que todas as posições num dado composto sejam modificadas uniformemente e, de fato, mais de uma das modificações mencionadas acima pode ser incorporada num único composto ou mesmo num único nucleosídeo num oligonucleótido. O presente pedido também descreve compostos antissense que são compostos quiméricos. Compostos antissense "quiméricos" ou "quimeras", no contexto deste pedido, são compostos antissense, particularmente oligonucleótidos, que contêm duas ou mais regiões quimicamente distintas, cada qual composta de pelo menos uma unidade monomérica, ou seja, nucleótido no caso de composto de oligonucleótido. Estes oligonucleótidos contêm tipicamente pelo menos uma região em que o oligonucleótido é modificado de forma a conferir ao oligonucleótido maior resistência à degradação por nuclease, maior absorção celular e/ou maior afinidade de

ligação para o ácido nucleico alvo. Região adicional do oligonucleótido pode servir de substrato para enzimas capazes de dividir híbridos de ARN:ADN ou ARN:ARN. Como forma de exemplo, ARnase H é endonuclease celular que divide o cordão de ARN de duplex ARN:ADN. A ativação de ARnase H resulta, portanto, na divisão do ARN alvo, de forma a aumentar grandemente a eficiência da inibição de oligonucleótidos de expressão genética. Consequentemente, resultados comparáveis podem frequentemente ser obtidos com oligonucleótidos mais curtos ao utilizar-se oligonucleótidos quiméricos, em comparação com desoxioligonucleótidos de fosforotioato que se hibridam na mesma região alvo. Os compostos antissense quiméricos podem ser formados como estruturas compostas de dois ou mais oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos e/ou análogos de oligonucleótidos, conforme descrito acima. Os oligonucleótidos antissense quiméricos preferidos incorporam pelo menos um açúcar modificado 2' (preferivelmente 2'-O-$(CH_2)_2$-O-CH_3) no terminal 3' para conferir resistência a nuclease e região com pelo menos quatro açúcares 2'-H contíguos para conferir atividade de ARnase H. Esses compostos também foram denominados na técnica híbridos ou gapmeros. Os gapmeros preferidos contêm uma região de açúcares modificados 2' (preferivelmente 2'-O-$(CH_2)_2$-O-CH_3) no terminal 3' e no terminal 5' separados por pelo menos uma região que contém pelo menos quatro açúcares 2'-H contíguos e preferivelmente incorporam ligações de cadeia principal de fosforotioato. Patentes US representativas que ensinam a preparação dessas estruturas híbridas incluem, mas não são limitados às Patentes US nº 5.013.830; 5.149.797; 5.220.007; 5.256.775; 5.366.878; 5.403.711; 5.491.133; 5.565.350; 5.623.065; 5.652.355; 5.652.356 e 5.700.922.

Os compostos antissense podem ser convenientemente e

rotineiramente fabricados por meio do método bem conhecido de síntese de fases sólidas. Equipamento para essas sínteses é vendido por diversos fornecedores que incluem, por exemplo, Applied Biosystems (Foster City, Califórnia). Quaisquer outros meios para essa síntese conhecidos na técnica podem ser adicionalmente ou alternativamente utilizados. Sabe-se bem como utilizar métodos similares para preparar oligonucleótidos tais como os fosforotioatos e derivados alquilados. Os compostos podem também ser misturados, encapsulados, conjugados ou associados de outra forma com outras moléculas, estruturas moleculares ou misturas de compostos, tais como lipossomas, moléculas dirigidas a recetores, formulações orais, retais, locais ou outras, para assistir na tomada, distribuição e/ou absorção. Patentes US representativas que ensinam a preparação dessas formulações que assistem na tomada, distribuição e/ou absorção incluem, mas sem limitar- se às Patentes US nº 5.108.921; 5.354.844; 5.416.016; 5.459.127; 5.521.291; 5.543.158; 5.547.932; 5.583.020; 5.591.721; 4.426.330; 4.534.899; 5.013.556; 5.108.921; 5.213.804; 5.227.170; 5.264.221; 5.356.633; 5.395.619; 5.416.016; 5.417.978; 5.462.854; 5.469.854; 5.512.295; 5.527.528; 5.534.259; 5.543.152; 5.556.948; 5.580.575; e 5.595.756.

Outros exemplos de oligonucleótidos sense ou antissense incluem os oligonucleótidos que são ligados covalentemente a frações orgânicas, tais como as descritas no documento WO 90/10048 e outras frações que aumentam a afinidade do oligonucleótido para sequência de ácido nucleico alvo, tal como poli-(L-lisina). Adicionalmente, agentes intercalantes, tais como elipticina, e agentes alquilantes ou complexos metálicos podem ser ligados a oligonucleótidos sense ou antissense para modificar as especificidades de ligação do oligonucleótido sense ou antissense para a sequência de nucleótidos alvo.

Oligonucleótidos sense ou antissense podem ser introduzidos em célula que contém a sequência de ácido nucleico alvo por meio de qualquer método de transferência genética, incluindo, por exemplo, transfeção de ADN mediada por $CaPO_4$, eletroporação ou utilizando vetores de transferência genética tais como vírus Epstein-Barr. Em procedimento preferido, oligonucleótido sense ou antissense é inserido em vetor retroviral apropriado. Célula que contém a sequência de ácido nucleico alvo é colocada em contato com o vetor retroviral recombinante, seja *in vivo* ou ex *vivo*. Vetores retrovirais apropriados incluem, mas não são limitados aos derivados do retrovírus murino M-MuLV, N2 (retrovírus derivado de M-MuLV), ou os vetores de cópia dupla denominados DCT5A, DCT5B e DCT5C (veja-se documento WO 90/13641).

Os oligonucleótidos sense ou antissense podem também ser introduzidos em célula que contém a sequência de nucleótidos alvo por meio de formação de conjugado com molécula de ligação de ligante, conforme descrito no documento WO 91/04753. As moléculas de ligação de ligantes apropriadas incluem, mas não são limitados a recetores da superfície celular, fatores de crescimento, outras citocinas ou outros ligantes que se ligam a recetores da superfície celular. Preferivelmente, a conjugação da molécula de ligação de ligante não interfere substancialmente com a capacidade da molécula de ligação de ligantes de unir-se à sua molécula ou recetor correspondente, ou bloquear a entrada do oligonucleótido sense ou antissense ou sua versão conjugada na célula.

Alternativamente, o oligonucleótido sense ou antissense pode ser introduzido em célula que contém a sequência de ácido nucleico alvo por meio da formação de complexo de oligonucleótido e lípido, conforme descrito no

documento WO 90/10448. O complexo de lípido e oligonucleótido sense ou antissense é preferivelmente dissociado na célula por lipase endógena.

As moléculas de ADN ou ARN sense ou antissense geralmente possuem menos de cerca de cinco nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos de cerca de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180,185, 190,95, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 10, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, ou 1000 nucleótidos em comprimento, em que neste contexto o termo "cerca de" significa o comprimento de sequência de nucleótidos de referência mais ou menos 10 % desse comprimento de referência.

As sondas podem também ser utilizadas em métodos de PCR para gerar conjunto de sequências para identificação de sequências de codificação de TAHO relacionadas intimamente.

Sequências de nucleótidos que codificam TAHO podem também ser utilizadas para construir sondas de hibridação para mapeamento do gene que codifica aquele TAHO e para a análise genética de indivíduos com distúrbios genéticas. As sequências de nucleótidos proporcionadas no presente podem ser mapeadas para cromossoma e regiões específicas de cromossoma utilizando métodos conhecidos, tais como hibridação *in situ*, análise de ligações contra marcadores

cromossómicos conhecidos e seleção de hibridação com bibliotecas.

Quando as sequências de codificação para TAHO codificarem proteína que se liga a outra proteína (tal como quando o TAHO for recetor), TAHO pode ser utilizado em ensaios para identificar as outras proteínas ou moléculas envolvidas na interação de ligação. Por meio destes métodos, podem ser identificados inibidores da interação de ligação de ligante e recetor. As proteínas envolvidas nessas interações de ligação podem também ser utilizadas para selecionar inibidores de moléculas pequenas ou péptidos ou agonistas da interação de ligação. Além disso, o TAHO recetor pode ser utilizado para isolar ligante(s) correlativo(s). Ensaios de seleção podem ser projetados para encontrar compostos de chumbo que imitem a atividade biológica de TAHO nativo ou recetor para TAHO. Esses ensaios de seleção incluirão ensaios apropriados para seleção de alto rendimento de bibliotecas químicas, tornando-as particularmente apropriadas para a identificação de possíveis fármacos de moléculas pequenas. As moléculas pequenas contempladas incluem compostos orgânicos ou inorgânicos sintéticos. Os ensaios podem ser realizados numa série de formatos, que incluem ensaios de ligação entre proteínas, ensaios de seleção bioquímica, imunoensaios e ensaios com base em células, que são bem caraterizados na técnica.

Ácidos nucleicos que codificam TAHO ou suas formas modificadas podem também ser utilizados para gerar animais transgénicos ou animais "knock out" que, por sua vez, são úteis no desenvolvimento e seleção de reagentes terapeuticamente úteis. Animal transgénico (tal como ratinho ou rato) é um animal que possui células que contêm transgene, que foi introduzido no animal ou ancestral do

animal em estado pré-natal, tal como embrionário. Um transgene é um ADN que é integrado no genoma de uma célula da qual se desenvolve um animal transgénico. Numa forma de realização, ADNc que codifica TAHO pode ser utilizado para clonar ADN genómico que codifica TAHO de acordo com métodos estabelecidos e as sequências genómicas utilizadas para gerar animais transgénicos que contêm células que expressam ADN que codifica TAHO. Métodos de geração de animais transgénicos, particularmente animais tais como ratinhos ou ratos, tornaram-se convencionais na técnica e são descritos, por exemplo, nas Patentes US nº 4.736.866 e 4.870.009. Tipicamente, células específicas seriam dirigidas para incorporação de transgene TAHO com amplificadores específicos de tecido. Animais transgénicos que incluem uma cópia de transgene que codifica TAHO introduzido na linha germinal do animal em estágio embrionário podem ser utilizados para examinar o efeito da maior expressão de ADN que codifica TAHO. Esses animais podem ser utilizados como animais de teste para reagentes que se acredita conferirem proteção, por exemplo, contra condições patológicas associadas à sua sobre-expressão. Um animal é tratado com o reagente e incidência reduzida da condição patológica, em comparação com animais não tratados que possuem o transgene, indicaria potencial intervenção terapêutica para a condição patológica.

Alternativamente, podem ser construídos homólogos de TAHO não humanos para construir um animal "knock out" que contém um gene alterado ou defeituoso que codifica TAHO como resultado da recombinação homóloga entre o gene endógeno que codifica TAHO e ADN genómico alterado que codifica TAHO introduzido em célula estaminal embriónica do animal. ADNc que codifica TAHO pode ser utilizado, por exemplo, para clonar ADN genómico que codifica TAHO de acordo com métodos estabelecidos. Uma fração do ADN

genómico que codifica TAHO pode ser excluída ou substituída com outro gene, tal como gene que codifica marcador selecionável que pode ser utilizado para monitorar a integração. Tipicamente, várias quilobases de ADN lateral inalterado (nas duas extremidades 5' e 3') são incluídas no vetor (veja-se, por exemplo, Thomas e Capecchi, *Cell,* 51: 503 (1987) para descrição de vetores de recombinação homólogos). O vetor é introduzido numa linha de células haste embriónicas (tal como por meio de eletroporação) e são selecionadas as células em que o ADN introduzido recombinou-se de forma homóloga com o ADN endógeno (veja-se, por exemplo, Li *et al., Cell,* 69: 915 (1992)). As células selecionadas são injetadas em seguida num blastocisto de animal (tal como ratinho ou rato) para formar quimeras de agregação (veja-se, por exemplo, Bradley, *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach,* E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), págs. 113-152). Pode ser implantado em seguida embrião quimérico em feto de animal fêmea pseudoprenha e o embrião é trazido a termo para criar animal knock out. A prole que abriga o ADN recombinado de forma homóloga nas suas células gérmen pode ser identificada por meio de técnicas padrão e utilizada para criar animais em que todas as células do animal contêm o ADN recombinado de forma homóloga. Os animais knockout podem ser caraterizados, por exemplo, pela sua capacidade de defesa contra certas condições patológicas e pelo seu desenvolvimento de condições patológicas devido à ausência do polipéptido TAHO.

O ácido nucleico que codifica os polipéptidos TAHO pode também ser utilizado em terapêutica genética. Em aplicações de terapêutica genética, genes são introduzidos em células a fim de atingir a síntese *in vivo* de produto genético terapeuticamente eficaz, tal como para

substituição de gene defeituoso. "Terapêutica genética" inclui tanto terapêutica genética convencional, na qual se atinge efeito duradouro com um único tratamento, quanto a administração de agentes terapêuticos genéticos, que envolve a administração única ou repetida de ARNm ou ADN terapeuticamente eficaz. ADN e ARN antissense podem ser utilizados como agentes terapêuticos para bloquear a expressão de certos genes *in vivo*. Já se observou que oligonucleótidos antissense curtos podem ser importados em células onde agem como inibidores, apesar das suas baixas concentrações intracelulares causadas pela sua absorção restrita pela membrana celular. (Zamecnik *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4143-4146 [1986]). Os oligonucleótidos podem ser modificados para aumentar a sua absorção, tal como por meio de substituição dos seus grupos fosfodiéster carregados negativamente por grupos não carregados.

Existe uma série de métodos disponíveis para a introdução de ácidos nucleicos em células viáveis. As técnicas variam dependendo da transferência ou não do ácido nucleico para células cultivadas *in vitro* ou *in vivo* nas células do hospedeiro desejado. Técnicas apropriadas de transferência de ácido nucleico para células de mamíferos *in vitro* incluem a utilização de lipossomas, eletroporação, microinjeção, fusão celular, DEAE-dextrano, método de precipitação de fosfato de cálcio etc. Os métodos de transferência genética *in vivo* atualmente preferidos incluem a transfeção com vetores virais (tipicamente retrovirais) e transfeção mediada por lipossomas e proteínas de revestimento viral (Dzau *et al., Trends in Biotechnology* 11, 205-210 [1993]). Em algumas situações, é desejável fornecer à fonte de ácido nucleico um agente que se dirija às células alvo, tal como anticorpo específico para proteína de membrana da superfície celular ou a célula

alvo, ligante para recetor sobre a célula alvo etc. Ao utilizar-se lipossomas, proteínas que se ligam a proteína de membrana da superfície celular associada a endocitose podem ser utilizadas para dirigir e/ou facilitar a absorção, por exemplo, de proteínas de capsídeo ou seus fragmentos trópicos para um tipo de célula específico, anticorpos para proteínas que sofrem internalização na ciclização e proteínas que dirigem localização intracelular e aumentam a semivida intracelular. O método de endocitose mediada por recetor é descrito, por exemplo, por Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 262, 4429-4432 (1987); e Wagner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. *USA* 87, 3410-3414 (1990). Para análise de protocolos de terapêutica genética e marcação de genes, veja-se Anderson *et al.*, *Science* 256, 808-813 (1992).

As moléculas de ácido nucleico que codificam os polipéptidos TAHO ou seus fragmentos descritos no presente documento são úteis para a identificação de cromossomas. Neste particular, existe necessidade contínua de identificação de novos marcadores de cromossomas, pois relativamente poucos reagentes marcadores de cromossomas, com base nos dados de sequência real, estão disponíveis atualmente. Cada molécula de ácido nucleico de TAHO de acordo com a presente invenção pode ser utilizada como marcador de cromossomas.

Os polipéptidos TAHO e moléculas de ácido nucleico do presente pedido podem também ser utilizados em diagnóstico para tipificação de tecidos, em que os polipéptidos TAHO do presente pedido podem ser expressos de forma diferente num tecido em comparação com outro, preferivelmente em tecido doente em comparação com tecido normal do mesmo tipo de tecido. Moléculas de ácido nucleico de TAHO encontrarão utilização para a geração de sondas para PCR, análise

Northern, análise Southern e análise Western.

Este pedido descreve métodos de seleção de compostos para identificar os que imitam o polipéptido TAHO (agonistas) ou evitam o efeito do polipéptido TAHO (antagonistas). Ensaios de seleção para possíveis fármacos antagonistas são projetados para identificar compostos que se unam ou formem complexo com polipéptidos TAHO codificados pelos genes identificados no presente ou interfiram de outra forma com a interação dos polipéptidos codificados com outras proteínas celulares, incluindo, por exemplo, a inibição da expressão de polipéptido TAHO de células. Esses ensaios de seleção incluirão ensaios apropriados para seleção de alto rendimento de bibliotecas químicas, tornando-as particularmente apropriadas para a identificação de possíveis fármacos de moléculas pequenas.

Os ensaios podem ser realizados numa série de formatos, que incluem ensaios de ligação entre proteínas, ensaios de seleção bioquímica, imunoensaios e ensaios com base em células, que são bem caraterizados na técnica.

Todos os ensaios para antagonistas são comuns pelo fato de que convocam o contato do possível fármaco com polipéptido TAHO codificado por ácido nucleico identificado no presente sob condições e por tempo suficiente para permitir a interação entre esses dois componentes.

Nos ensaios de ligação, a interação é ligação e o complexo formado pode ser isolado ou detetado na mistura de reação. Em realização específica, o polipéptido TAHO codificado pelo gene identificado no presente ou a possível fármaco é imobilizada sobre fase sólida, tal como placa de microtítulos, por meio de ligações covalentes ou não covalentes. A ligação não covalente geralmente é realizada

por meio de revestimento da superfície sólida com solução do polipéptido TAHO e secagem. Alternativamente, anticorpo imobilizado, tal como anticorpo monoclonal, específico para o polipéptido TAHO a ser imobilizado, pode ser utilizado para ancorá-lo a superfície sólida. O teste é realizado por meio da adição do componente não imobilizado, que pode ser marcado por marcador detetável, ao componente imobilizado, tal como a superfície revestida que contém o componente ancorado. Após o término da reação, os componentes não reagidos são removidos, tal como por meio de lavagem, e os complexos ancorados sobre a superfície sólida são detetados. Quando o componente originalmente não imobilizado conduzir marcador detetável, a deteção de marcador imobilizada sobre a superfície indica que ocorreu a formação de complexos. Quando o componente originalmente não imobilizado não conduzir marcador, a formação de complexos pode ser detetada, por exemplo, utilizando anticorpo marcado que une especificamente o complexo imobilizado.

Caso o possível composto interaja com polipéptido TAHO específico codificado por gene identificado no presente mas não se una a ele, a sua interação com aquele polipéptido pode ser testada por meio de métodos bem conhecidos de deteção de interações entre proteínas. Esses ensaios incluem abordagens tradicionais, tais como retícula, coimunoprecipitação e copurificação por meio de gradientes ou colunas cromatográficas. Além disso, interações entre proteínas podem ser monitoradas utilizando sistema genético com base em leveduras descrito por Fields e colaboradores (Fields e Song, *Nature (London)* 340: 245-246 (1989); Chien *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. *USA* 88: 9578-9582 (1991)), conforme descrito por Chevray e Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5789-5793 (1991). Muitos ativadores de transcrição, tais como GAL4 de levedura, consistem de dois

domínios modulares fisicamente discretos, um que age como domínio de ligação de ADN e o outro que funciona como domínio de ativação de transcrição. O sistema de expressão de levedura descrito nas publicações acima (geralmente denominado "sistema bi-híbrido") utiliza esta propriedade e utiliza duas proteínas híbridas, uma em que a proteína alvo é fusionada ao domínio de ligação de ADN de GAL4 e outra em que as possíveis proteínas ativadoras são fusionadas ao domínio de ativação. A expressão de gene relator GAL1-/acZ sob o controlo de promotor ativado por GAL4 depende da reconstituição da atividade de GAL4 por meio de interação entre proteínas. As colonias que contêm polipéptidos em interação são detetadas com substrato cromogénico para β-galactosidase. Kit completo (MATCHMAKER™) para a identificação de interações entre proteínas entre duas proteínas específicas utilizando o método bi-híbrido é disponível comercialmente por meio da Clontech. Este sistema pode também ser estendido para mapear domínios de proteínas envolvidos em interações de proteínas específicas, bem como para indicar resíduos de aminoácidos que são fundamentais para estas interações.

Os compostos que interferem com a interação de gene que codifica polipéptido TAHO identificado no presente e outros componentes intra ou extracelulares podem ser testados como se segue: normalmente é preparada mistura de reação que contém o produto do gene e o componente intra ou extracelular sob condições e por tempo que permitam a interação e a ligação dos dois produtos. Para testar a capacidade de possível composto de inibir a ligação, a reação é conduzida na ausência e na presença do composto de teste. Além disso, pode-se adicionar placebo a terceira mistura de reação, para que sirva de controlo positivo. A ligação (formação de complexos) entre o composto de teste e o componente intra ou extracelular presente na mistura é

monitorada conforme descrito acima. A formação de complexo na(s) reação(ões) de controlo, mas não na mistura de reação que contém o composto de teste, indica que o composto de teste interfere com a interação do composto de teste e do seu parceiro de ligação.

Para ensaiar antagonistas, o polipéptido TAHO pode ser adicionado à célula junto com o composto a ser selecionado em busca de atividade específica e a capacidade do composto de inibir a atividade de interesse na presença do polipéptido TAHO indica que o composto é antagonista para o polipéptido TAHO. Alternativamente, os antagonistas podem ser detetados combinando-se o polipéptido TAHO e antagonista potencial com recetores de polipéptidos TAHO unidos por membrana ou recetores recombinantes sob condições apropriadas para ensaio de inibição competitiva. O polipéptido TAHO pode ser marcado, tal como por meio de radioatividade, de tal forma que a quantidade de moléculas de polipéptido TAHO unidas ao recetor possa ser utilizada para determinar a eficácia do potencial antagonista. O gene que codifica o recetor pode ser identificado por meio de numerosos métodos conhecidos dos peritos na especialidade, tais como extração de ligante e ordenamento de FACS. Coligan *et al.*, *Current Protocols in Immun.*, 1 (2): Capítulo 5 (1991). Preferivelmente, utiliza-se clonagem de expressão em que ARN poliadenilado é preparado a partir de célula que reage ao polipéptido TAHO e biblioteca de ADNc criada a partir desse ARN é dividida em conjuntos e utilizada para a transfeção de células COS ou outras células que não reagem ao polipéptido TAHO. Células transfetadas que são cultivadas sobre lâminas de vidro são expostas a polipéptido TAHO marcado. O polipéptido TAHO pode ser marcado por uma série de meios, que inclui a iodização ou inclusão de local de reconhecimento para cinase de proteína específica de local. Após a fixação e a

incubação, as lâminas são submetidas a análise auto-radiográfica. Conjuntos positivos são identificados e subconjuntos são preparados e novamente transfetados utilizando processo de re-seleção e formação de subconjuntos interativo, gerando eventualmente um único clone que codifica o recetor putativo.

Como uma abordagem alternativa para a identificação de recetores, o polipéptido TAHO marcado pode ser ligado por fotoafinidade com membrana celular ou preparações de extrato que expressam a molécula recetora. Material reticulado é resolvido por PAGE e exposto a filme de raio X. O complexo marcado que contém o recetor pode ser extirpado, resolvido em fragmentos de péptidos e submetido a microssequenciamento de proteínas. A sequência de aminoácidos obtida por meio do microssequenciamento seria utilizada para projetar um conjunto de sondas de oligonucleótidos degeneradas para selecionar biblioteca de ADNc para identificar o gene que codifica o recetor putativo.

Em outro ensaio de antagonistas, as células de mamíferos ou preparação de membrana que expressa o recetor seriam incubadas com polipéptido TAHO marcado na presença do possível composto. A capacidade do composto de aumentar ou bloquear esta interação poderá então ser medida.

Exemplos mais específicos de potenciais antagonistas incluem um oligonucleótido que se liga às fusões de imunoglobulina com polipéptido TAHO e, particularmente, anticorpos que incluem, sem limitação, anticorpos poli e monoclonais e fragmentos de anticorpos, anticorpos de cadeia simples, anticorpos anti-idiotípicos e versões quiméricas ou humanizadas desses anticorpos ou fragmentos, bem como anticorpos humanos e fragmentos de anticorpos.

Alternativamente, antagonista potencial pode ser proteína relacionada de perto, tal como forma do polipéptido TAHO que sofreu mutação e reconhece o recetor mas não proporciona nenhum efeito, de forma a inibir competitivamente a ação do polipéptido TAHO.

Outro antagonista de TAHO potencial é uma construção de ADN ou ARN antissense preparada utilizando tecnologia antissense, em que, por exemplo, molécula de ADN ou ARN antissense age para bloquear diretamente a tradução de ARNm por meio de hibridação em ARNm alvo e evitar a tradução de proteína. A tecnologia antissense pode ser utilizada para controlar a expressão genética por meio de formação de hélice tripla ou ARN ou ADN antissense, em que os dois métodos se baseiam na ligação de polinucleótido a ADN ou ARN. A parte de codificação 5' da sequência de polinucleótidos que codifica os polipéptidos TAHO maduros do presente é utilizada, por exemplo, para projetar oligonucleótido de ARN antissense com comprimento de cerca de dez a quarenta pares de bases. Oligonucleótido de ADN é projetado para ser complementar a região do gene envolvida na transcrição (hélice tripla – veja-se Lee *et al., Nucl. Acids Res.,* 6: 3073 (1979); Cooney *et al., Science,* 241: 456 (1988); Dervan *et al., Science,* 251: 1360 (1991)), de forma a evitar a transcrição e a produção do polipéptido TAHO. O oligonucleótido de ARN antissense hibrida-se no ARNm *in vivo* e bloqueia a tradução da molécula de ARNm no polipéptido TAHO (antissense – Okano, *Neurochem.,* 56: 560 (1991); *Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression* (CRC Press: Boca Raton FL, 1988). Os oligonucleótidos descritos acima podem também ser proporcionados para células de tal forma que o ARN ou ADN antissense possa ser expresso *in vivo* para inibir a produção do polipéptido TAHO. Ao utilizar-se ADN antissense, oligodesoxirribonucleótidos derivados do local

de início de tradução, tal como cerca de -10 a +10 posições da sequência de nucleótidos do gene alvo, são preferidos.

Potenciais antagonistas incluem moléculas pequenas que se ligam ao local ativo, ao local de ligação do recetor, fator de crescimento ou outro local de ligação relevante do polipéptido TAHO, de forma a bloquear a atividade biológica normal do polipéptido TAHO. Exemplos de moléculas pequenas incluem, mas não são limitados a péptidos pequenos ou moléculas similares a péptidos, preferivelmente péptidos solúveis, e compostos orgânicos ou inorgânicos não de peptidilo sintéticos.

Ribozimas são moléculas de ARN enzimáticas capazes de catalisar a divisão específica de ARN. Ribozimas agem por meio de hibridação específica de sequências para o ARN alvo complementar, seguida por divisão endonucleolítica. Locais de divisão de ribozima específicos dentro de alvo de ARN potencial podem ser identificados por meio de métodos conhecidos. Para pormenores adicionais, veja-se, por exemplo, Rossi, *Current Biology 4:* 469-471 (1994) e a Publicação PCT n° WO 97/33551 (publicada em 18 de Setembro de 1997).

Moléculas de ácido nucleico em formação de hélice tripla utilizadas para inibir a transcrição deverão possuir cadeia simples e ser compostas de desoxinucleótidos. A composição base desses oligonucleótidos é projetada de forma a promover a formação de hélice tripla por meio de regras de emparelhamento de bases Hoogsteen, que geralmente necessitam de estiramentos dimensionáveis de purinas ou pirimidinas numa fita de duplex. Para mais pormenores, veja-se, por exemplo, a Publicação PCT n° WO 97/33551, acima.

Estas moléculas pequenas podem ser identificadas por qualquer um ou mais dos ensaios de seleção discutidos acima e/ou por qualquer outro método de seleção bem conhecido dos peritos na especialidade.

Ácido nucleico codificador de polipéptido TAHO isolado pode ser utilizado no presente documento para a produção recombinante de polipéptido TAHO utilizando métodos bem conhecidos na técnica e conforme descrito no presente documento. Por sua vez, os polipéptidos TAHO produzidos podem ser utilizados para gerar anticorpos anti-TAHO utilizando métodos bem conhecidos na técnica e conforme descrito no presente documento.

Os anticorpos que unem especificamente polipéptido TAHO identificado no presente documento, bem como outras moléculas identificadas pelos ensaios de seleção descritos acima, podem ser administrados para o tratamento de vários distúrbios, incluindo cancro, na forma de composições farmacêuticas.

Caso o polipéptido TAHO seja intracelular e anticorpos inteiros sejam utilizados como inibidores, são preferidos anticorpos internalizantes. Entretanto, lipofeções ou lipossomas também podem ser utilizados para fornecer o anticorpo, ou fragmento de anticorpo, para células. Ao utilizar-se fragmentos de anticorpos, o menor fragmento inibidor que se liga especificamente ao domínio de ligação da proteína alvo é preferido. Com base nas sequências de região variável de anticorpo, por exemplo, podem ser projetadas moléculas de péptidos que retenham a capacidade de ligação da sequência de proteínas alvo. Esses péptidos podem ser sintetizados quimicamente e/ou produzidos por meio de tecnologia de ADN recombinante. Veja-se, por exemplo, Marasco *et al., Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 90:

7889-7893 (1993).

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

Os exemplos a seguir são proporcionados unicamente para fins de ilustração e não se destinam a limitar o âmbito da presente invenção de nenhuma maneira.

EXEMPLOS E EXEMPLOS COMPARATIVOS

Os reagentes disponíveis comercialmente indicados nos exemplos foram utilizados de acordo com as instruções do fabricante, a não ser que indicado de outro modo. Os anticorpos usados nos exemplos são anticorpos comercialmente disponíveis e incluem, mas não são limitados a, anti-CD180 (eBioscience MRH73-11, BD Pharmingen G28-8) e Serotec MHR73), anti-CD20 (Ancell 2H7 e BD Pharmingen 2H7), anti-CD72 (BD Pharmingen J4-117), anti-CXCR5 (R&D Sistemas 51505), anti-CD22 (Ancell RFB4, DAKO To15, Diatec 157, Sigma HIB-22 e Monosan BL-BC34), anti-CD22 (Leinco RFB-4 e NeoMarkers 22C04), anti-CD21 (ATCC HB-135 e ATCC HB5), anti-HLA-DOB (BD Pharmingen DOB.L1), anti-CD79a (Caltag ZL7-4 e Serotec ZL7-4), anti-CD79b (Biomeda SN8 e BD Pharmingen CB-3), anti-CD19 (Biomeda CB-19),anti-FCER2 (Ancell BU38 e Serotec D3,6 e BD Pharmingen M-L233). A fonte daquelas células identificadas nos seguintes

exemplos, e ao longo da memória descritiva, por meio de números de acesso da ATCC é a Coleção Americana de Culturas Celulares, Manassas, VA.

EXEMPLO 1: Análise de Dados de Microarranjo de Expressão de TAHO

Dados de microarranjo envolve a análise de expressão de TAHO por meio da performance de análise de microarranjo de ADN numa ampla variedade de amostras de ARN de tecidos e células cultivadas. As amostras incluem tecido humano normal e canceroso e vários tipos de células imunes purificadas ambos em repouso e em seguida à estimulação externa. Estas amostras de ARN podem ser analisadas de acordo com protocolos de microarranjo regulares em microarranjos Agilent.

Nesta experiência, o ARN foi isolado a partir de células e sondas de ARNc marcadas com cianina-3 e cianina-5 foram geradas por meio de transcrição *in vitro* usando o Kit de Amplificação Linear Fluorescente de ARN de Baixa Entrada Agilent (Agilent). Cianina-5 foi usada para marcar as amostras a serem testadas para expressão do polipéptido PRO, por exemplo, as células de mieloma e plasmáticas, e cianina-3 foi usada para marcar a referência universal (o grupo de linha celular Stratagene) com o qual a expressão das amostras de teste foi comparada. 0,1 µg - 0,2 mg de sonda de ARNc marcada com cianina-3 e cianina-5 foi hibridado a chips de arranjo de oligonucleótido de 60-mer Agilent usando o Kit de Hibridação *In Situ* Plus (Agilent). Estas sondas foram hibridadas a microarranjos. Para a análise de mieloma múltiplo, as sondas foram hibridadas a microarranjos de oligonucleótido de Genoma Humano Completo Agilent usando condições e tampões Agilent padrão (Agilent) recomendados.

As sondas de ARNc são hibridadas aos microarranjos a 60 °C durante 17 horas num rotador de hibridação ajustado a 4 RPM. Após a lavagem, os microarranjos são examinados com o scanner de microarranjo Agilent que é capaz de excitar e detetar a fluorescência das moléculas fluorescentes de cianina-3 e cianina-5 (linhas de laser de 532 e 633 nm). Os dados para cada gene no arranjo de oligonucleótido de 60-mer foi extraído da imagem de microarranjo examinada usando software de extração de característica Agilent que é responsável pelo reconhecimento de característica, subtração de fundo e normalização e os dados resultantes foram carregados no pacote de software conhecido como o Sistema de Análise de Dados de Expressão Genética Rosetta Resolver (Rosetta Inpharmatics, Inc.). Rosetta Resolver inclui uma base de dados relacional e numerosas ferramentas analíticas para armazenar, recuperar e analisar grandes quantidades de dados de expressão de razão de gene ou intensidade.

Neste exemplo, as células B e células T (controlo) foram obtidas para análise de microarranjo. Para o isolamento de células B naïve e de memória e células plasmáticas, células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) foram separadas de leukopack proporcionado por quatro dadores masculinos saudáveis ou de sangue completo de diversos dadores normais. As células plasmáticas CD138+ foram isoladas a partir de PBMC usando o sistema de classificação celular magnético MACS (Miltenyi Biotec) e esferas anti-CD138. Alternativamente, células B CD19+ totais foram selecionadas com esferas anti-CD19 e classificação de MACS. Após o enriquecimento de CD19+ (pureza ao redor de 90 %), a classificação de FACS (Moflo) foi realizada para separar células B naïve e de memória. As células classificadas foram colhidas por meio da submissão das amostras a centrifugação. As células classificadas

foram imediatamente lisadas em tampão LTR e homogeneizadas com coluna de rotação QIAshredder (Qiagen) e seguido por mini kit RNeasy para a purificação de ARN. O rendimento de ARN foi variável de 0,4-10 mg e dependente dos números de células.

Como um controlo, as células T foram isoladas para análise de microarranjo. As células CD8 de sangue periférico foram isoladas a partir de leukopacks por meio da seleção negativa usando o kit de isolamento de célula CD8 Stem Cell Technologies (Rosette Separation) e purificadas posteriormente pelo sistema de classificação celular magnético MACS usando kit de isolamento de célula CD8 e microesferas de CD45RO foram adicionadas para remover células CD45RO (Miltenyi Biotec). As células T CD8 foram divididas em 3 amostras com cada amostra submetida à estimulação como se segue: (1) anti-CD3 e anti-CD28, mais IL-12 e anticorpo anti-IL4, (2) anti-CD3 e anti-CD29 sem adicionar citocinas ou anticorpos de neutralização e (3) anti-CD3 e anti-CD28, mais IL-4, anticorpo anti-IL12 e anticorpo anti-IFN-γ. 48 horas após a estimulação, o ARN foi colhido. Após 72 horas, as células foram expandidas por meio da adição de diluição de 8 vezes com meios frescos. 7 dias após o ARN ter sido colhido, as células CD8 foram colhidas, lavadas e reestimuladas por anti-CD3 e anti-CD28. 16 horas depois, uma segunda colheita de ARN foi feita. 48 horas após reestimulação, uma terceira colheita de ARN foi feita. O ARN foi colhido usando preps Qiagen Midi conforme as instruções no manual com a adição de uma digestão de ADNase em coluna I após a primeira etapa de lavagem RW1. O ARN foi eluído em água livre de ARNase e subsequentemente concentrado por meio de precipitação com etanol. O ARN precipitado foi absorvido em água livre de nuclease a uma concentração mínima final de 0,5 µg/µl.

Microarranjos adicionais de controlo foram realizados em ARN isolado a partir de células T auxiliares CD4+ T, células assassinas naturais (NK), neutrófilos (N'phil), monócitos CD14+, CD16+ e CD16- e células dendríticas (DC).

Microarranjos adicionais foram realizados em ARN isolado a partir de tecido canceroso, tais como Linfoma Não-Hodgkin (NHL), linfoma folicular (FL) e mieloma múltiplo (MM). Microarranjos adicionais foram realizados em ARN isolado a partir de células normais, tais como nódulo linfático normal (NLN), células B normais, tais como células B de centroblastos, centrócitos e manto folicular, células B de memória, e células plasmáticas normais (PC), que são da linhagem de célula B e são contrapartes normais da célula de mieloma, tais como células plasmáticas da tonsila, células plasmáticas de medula óssea (BM PC), células plasmáticas CD19+ (CD19+ PC), células plasmáticas CD19- (CD19- PC). Microarranjos adicionais foram realizados em tecido normal, tais como cerebelo, coração, próstata, adrenal, bexiga, intestino delgado (intestino d.), cólon, fígado fetal, útero, rim, placenta, pulmão, pâncreas, músculo, cérebro, salivar, medula óssea (medula), sangue, timo, tonsila, baço, testículos, e glândula mamária.

As moléculas listadas a seguir foram identificadas como sendo significativamente expressas em células B em comparação com células não B. Especificamente, as moléculas são diferentemente expressas em células B naïve, células B de memória que são IgGA+ ou IgM+ e células plasmáticas de PBMC ou medula óssea, em comparação com células não B, por exemplo, células T. Consequentemente, estas moléculas representam alvos excelentes para a terapêutica de tumores em mamíferos.

Molécula	expressão específica em:	em comparação com:
DNA1052b0 (TAHO1)	células B	células não B
DNA150004 (TAHO2)	células B	células não B
DNA182432 (TAH03)	células B	células não B
DNA225785 (TAHO4)	células B	células não B
DNA225786 (TAHO5)	células B	células não B
DNA225875 (TAHO6)	células B	células não B
DNA226179 (TAHO7)	células B	células não B
DNA226239 (TAHO8)	células B	células não B
DNA226394 (TAH09)	células B	células não B
DNA226423 (TAHO10)	células B	células não B
DNA227781 (TAHO11)	células B	células não B
DNA227879 (TAHO12)	células B	células não B
DNA256363 (TAHO13)	células B	células não B
DNA332467 (TAHO14)	células B	células não B
DNA58721 (TAH015)	células B	células não B
DNA335924 (TAHO16)	células B	células não B
DNA340394 (TAHO17)	células B	células não B
DNA56041 (TAH018)	células B	células não B
DNA59607 (TAHO19)	células B	células não B
DNA257955 (TAHO20)	células B	células não B
DNA329863 (TAHO21)	células B	células não B
DNA346528 (TAHO22)	células B	células não B
DNA212930 (TAHO23)	células B	células não B
DNA335918 (TAH024)	células B	células não B
DNA225820 (TAH025)	células B	células não B
DNA88116 (TAHO26)	células B	células não B
DNA227752 (TAH027)	células B	células não B
DNA 119476 (TAH028)	células B	células não B
DNA254890 (TAHO29)	células B	células não B
DNA219240 (TAHO30)	células B	células não B
DNA37151 (TAH031)	células B	células não B
DNA210233 (TAHO32)	células B	células não B

DNA35918 (TAHO33)	células B	células não B
DNA260038 (TAH034)	células B	células não B
DNA334818 (TAHO35)	células B	células não B
DNA257501 (TAH036)	células B	células não B

Sumário

A expressão significativa de ARNm foi geralmente indicada como um valor de razão de mais de 2. Qualquer expressão aparente em células não B, tais como em próstata, baço, etc. pode representar um artefacto, infiltração de tecido normal por linfócitos ou perda de integridade da amostra pelo vendedor.

(1) TAHO1 (também denominado no presente documento como LY64 e CD180) foi significativamente expresso em amostras de linfoma não-hodgkin (NHL) e células B normais (NB).
(2) TAHO2 (também denominado no presente documento como MS4A1 e CD20) foi significativamente expresso em linfoma não-hodgkin (NHL), linfoma folicular (FL), nódulo linfático normal (NLN) e células B normais (NB). Além disso, TAHO2 foi significativamente expresso em tonsila e baço normais.
(3) TAHO3 (também denominado no presente documento como SPAP1 e FcRH2) foi significativamente expresso em linfoma não-hodgkin (NHL) e linfoma folicular (FL) e células B de memória (mem B). Além disso, TAHO3 foi significativamente expresso no sangue e baço. No entanto, como indicado acima, qualquer expressão aparente em células não B, tal como na próstata, baço, sangue, etc. pode representar um artefacto, infiltração de tecido normal por linfócitos ou perda de integridade da amostra pelo vendedor.
(4) TAHO4 (também denominado no presente documento como CD79a) foi significativamente expresso em amostras de linfoma não-hodgkin (NHL), mieloma múltiplo (MM) e

cerebelo normal e sangue normal. Além disso, TAHO4 foi significativamente expresso em cerebelo, sangue e baço. No entanto, como indicado acima, qualquer expressão aparente em células não B, tal como na próstata, baço, sangue, etc. pode representar um artefacto, infiltração de tecido normal por linfócitos ou perda de integridade da amostra pelo vendedor.

(5) TAHO5 (também denominado no presente documento como CD79b) foi significativamente expresso em linfoma não-hodgkin (NHL) (Figura 77).

(6) TAHO6 (também denominado no presente documento como CR2 e CD21) foi significativamente expresso em linfoma não-hodgkin (NHL) e nódulo linfático normal (NLN). Além disso, TAHO6 foi significativamente expresso no baço.

(7) TAHO8 (também denominado no presente documento como CD72) foi significativamente expresso em linfoma não-hodgkin (NHL), mieloma múltiplo (MM) e linfoma folicular (FL) e tonsila normal. No entanto, como indicado acima, qualquer expressão aparente em células não B, tal como na próstata, baço, sangue, tonsila, etc. pode representar um artefacto, infiltração de tecido normal por linfócitos ou perda de integridade da amostra pelo vendedor.

(8) TAHO9 (também denominado no presente documento como P2RX5) foi significativamente expresso em células B normais (células B derivadas da circulação ou de nódulos linfáticos) e não significativamente expresso em células não B. Além disso, TAHO9 foi significativamente expresso em células plasmáticas normais e em mieloma múltiplo. Em tecidos normais, a expressão de TAHO9 é relativamente baixa, mas com expressão significativa em órgãos linfoides, tais como baço e timo.

(9) TAHO10 (também denominado no presente documento como HLA-DOB) foi significativamente expresso em mieloma múltiplo (MM), linfoma não-hodgkin (NHL).

(10) TAHO11 (também denominado no presente documento como

CXCR5 e BLR1) foi significativamente expresso em linfoma não-hodgkin (NHL), linfoma folicular (FL), nódulo linfático normal (NLN), células B normais (NB), centroblastos e células do manto folicular e baço normal e tonsila normal. No entanto, como indicado acima, qualquer expressão aparente em células não B, tal como na próstata, baço, sangue, tonsila, etc. pode representar um artefacto, infiltração de tecido normal por linfócitos ou perda de integridade da amostra pelo vendedor.

(11) TAHO12 (também denominado no presente documento como FCER2) foi significativamente expresso em células B normais (NB), mieloma múltiplo (MM) e próstata. No entanto, como indicado acima, qualquer expressão aparente em células não B, tal como na próstata, baço, sangue, tonsila, etc. pode representar um artefacto, infiltração de tecido normal por linfócitos ou perda de integridade da amostra pelo vendedor.

(12) TAHO13 (também denominado no presente documento como GPR2) foi significativamente expresso em mieloma múltiplo (MM) e sangue normal.

(13) TAHO15 (também denominado no presente documento como LRRC4 e NAG 14) foi significativamente expresso em linfoma não-hodgkin (NHL) PRO1111 (TAHO15) foi significativamente expresso e sobre-regulado em células plasmáticas da medula óssea e mieloma múltiplo, em comparação à baixa expressão em células não B, encluindo neutrófilos, células T e células assasinas naturais (NK). PRO1111 é também significativamente expresso em algumas células de linfoma não-hodgkin.

(14) TAHO17 (também denominado no presente documento como FcRH1) foi significativamente expresso em células B normais (NB) e células B de memória.

(15) TAHO18 (também denominado no presente documento como IRTA2) foi significativamente expresso em linfoma não-hodgkin (NHL).

(16) TAHO20 (também denominado no presente documento como FcRH3) foi significativamente expresso em células B normais (NB) e mieloma múltiplo (MM). Além disso, TAHO20 foi detetado em expressão no cólon, placenta, pulmão e baço. No entanto, como indicado acima, qualquer expressão aparente em células não B, tal como na próstata, baço, sangue, tonsila, etc. pode representar um artefacto, infiltração de tecido normal por linfócitos ou perda de integridade da amostra pelo vendedor.
(17) TAHO21 (também denominado no presente documento como IRTA1) foi significativamente expresso em linfoma não-hodgkin (NHL), centrócitos e células B de memória.
(18) TAHO25 (também denominado no presente documento como CD19) foi significativamente expresso em linfoma não-hodgkin (NHL), nódulo linfático normal (NLN), linfoma folicular (FL), centroblastos, centrócitos, células B de memória e células de manto foliculares. Além disso, TAHO25 foi significativamente expresso em tonsila e baço. No entanto, como indicado acima, qualquer expressão aparente em células não B, tal como na próstata, baço, sangue, tonsila, etc. pode representar um artefacto, infiltração de tecido normal por linfócitos ou perda de integridade da amostra pelo vendedor.
(19) TAHO26 (também denominado no presente documento como CD22) foi significativamente expresso em células B normais (NB).
(20) TAHO27 (também denominado no presente documento como CXCR23) foi significativamente expresso em células de mieloma múltiplo.
(21) TAHO28 (também denominado no presente documento como SILV1) foi significativamente expresso em células plasmáticas normais, e mais significativamente expresso em células de mieloma múltiplo.
(22) TAHO29 (também denominado no presente documento como KCNK4) foi significativamente expresso em células

plasmáticas normais e em células de mieloma múltiplo. Em tecidos normais, a expressão de TAHO29 é significativamente expressa em testículos normais.

(23) TAHO30 (também denominado no presente documento como CXorf1) foi significativamente expresso em células plasmáticas normais, e mais significativamente expresso em células de mieloma múltiplo. Em tecidos normais, a expressão de TAHO30 é significativamente expressa em testículos normais.

(24) TAHO31 (também denominado no presente documento como LRRN5) foi significativamente expresso em células plasmáticas normais, e mais significativamente expresso em células de mieloma múltiplo. Em tecidos normais, a expressão de TAH031 é significativamente expressa no cerebelo.

(25) TAHO32 (também denominado no presente documento como UNQ9308) foi significativamente expresso em células plasmáticas normais, e mais significativamente expresso em células de mieloma múltiplo. TAH032 foi também significativamente expresso na próstata normal.

(26) TAH33 (também denominado no presente documento como IGSF4B) foi significativamente expresso em células de mieloma múltiplo.

(27) TAHO34 (também denominado no presente documento como UNQ13267) foi significativamente expresso em células plasmáticas normais, e mais significativamente expresso em células de mieloma múltiplo. TAH034 foi também significativamente expresso no sangue normal.

(28) TAHO35 (também denominado neste documento como FLJ 12681) foi significativamente expresso em células plasmáticas normais, e mais significativamente expresso em células de mieloma múltiplo.

(29) TAHO36 (também denominado no presente documento como UNQ12376) foi significativamente expresso em células plasmáticas normais, e mais significativamente expresso

em células de mieloma múltiplo.

Como TAHO1-36 têm sido identificados como sendo significativamente expressos em células B e em amostras de doenças associadas a célula B, tais como Linfoma Não-Hodgkin, linfoma folicular e mieloma múltiplo em comparação com células não B como detetado por análise de microarranjo, as moléculas são excelentes alvos para a terapêutica de tumores em mamíferos, incluindo cancros associados a célula B, tais como linfomas, leucemias, mielomas e outros cancros de células hematopoiéticas.

EXEMPLO 2: Análise Quantitativa de Expressão de ARNm de TAHO

Neste ensaio, um ensaio de nuclease 5' (por exemplo, TaqMan®) e PCR quantitativo em tempo real (por exemplo, Sistema PCR em Tempo Real Mx3000P™ (Stratagene, La Jolla, CA)), foram usados para encontrar genes que são significativamente sobre-expressos num tipo de tecido específico, tais como células B, como em comparação com um tipo de célula diferente, tal como outros tipos de célula sanguínea branca primária, e que pode ainda ser sobre-expressos em células cancerosas do tipo de tecido específico em comparação com células cancerosas não do tipo de tecido específico. A reação de ensaio de nuclease 5' é uma técnica à base de PCR fluorescente que utiliza a atividade de exonuclease 5' de enzima Taq ADN polimerase para monitorizar a expressão genética em tempo real. Dois iniciadores de oligonucleótidos (cujas sequências são baseadas no gene ou sequência de EST de interesse) são utilizados para gerar amplicão típico de reação de PCR. Terceiro oligonucleótido, ou sonda, é projetado para detetar sequência de nucleótidos localizada entre os dois iniciadores de PCR. A sonda não é extensível por enzima de

ADN polimerase de Taq e é marcada com corante fluorescente repórter e corante fluorescente de extinção. Qualquer emissão induzida por laser da corante repórter é arrefecida pelo corante de extinção quando as duas tinturas estiverem em posição próxima quando sobre a sonda. Durante a reação de amplificação de PCR, a enzima ADN polimerase de Taq divide a sonda de maneira dependente de modelo. Os fragmentos de sonda resultantes dissociam-se em solução e o sinal da corante repórter libertada é livre do efeito de resfriamento do segundo fluoróforo. Uma molécula de corante repórter é libertada para cada nova molécula sintetizada e a deteção da corante repórter não arrefecida proporciona a base de interpretação quantitativa dos dados.

O procedimento de nuclease 5' é executado num dispositivo de PCR quantitativo em tempo real tal como o Sistema de PCR em Tempo Real Mx3000™. O sistema consiste num termociclador, uma lâmpada de tungsténio-quartzo, um tubo fotomultiplicador (TFM) para a deteção e um computador. O sistema amplifica amostras em formato de 96 cavidades sobre termociclador. Durante a amplificação, o sinal fluorescente induzido por laser é recolhido em tempo real por meio de cabos de fibra ótica para todas as 96 cavidades e detetado no TFM. O sistema inclui software para condução do instrumento e para análise dos dados. O material de partida para o rastreio foi ARNm (50 ng/poço executado em duplicata) isolado a partir de uma variedade de tipos de células sanguíneas brancas diferentes (Neutrófilo (Neutr), Células assassinas naturais (NK), Células dendríticas (Dend.), Monócitos (Mono), células T (subconjuntos de CD4+ e CD8+), células estaminais (CD34+) bem como 20 dadores de célula B separados (Ids de dador 310, 330, 357, 362, 597, 635, 816, 1012, 1013, 1020, 1072, 1074, 1075, 1076, 1077, 1086, 1096, 1098, 1109, 1112) para testar para a variabilidade de dador. Todo o ARN foi

comprado comercialmente (AllCells, LLC, Berkeley, CA) e a concentração de cada um foi medida precisamente por meio de recibo. O ARNm é precisamente quantificado, por exemplo, fluorometricamente.

Dados de teste de 5' nuclease são inicialmente expressos como Ct, ou o ciclo limite. Este é definido como o ciclo no qual o sinal relator acumula-se acima do nível de fundo de fluorescência. Os valores ACt são utilizados como medida quantitativa do número relativo de cópias iniciais de sequência alvo específica em amostra de ácido nucleico. Como uma unidade Ct corresponde a um ciclo PCR ou aumento relativo de cerca de duas vezes com relação ao normal, duas unidades correspondem a aumento relativo de quatro vezes, três unidades correspondem a aumento relativo de oito vezes e assim por diante, pode-se medir quantitativamente o aumento dobrado relativo da expressão de ARNm entre dois ou mais tecidos diferentes. Quanto menor o valor de Ct numa amostra, maior o número de cópias de partida desse gene particular. Se uma curva padrão for incluída no ensaio, a quantidade relativa de cada alvo pode ser extrapolada e facilita a visualização dos dados uma vez que números de cópias maiores também têm quantidades relativas (em oposição a números de cópias maiores têm valores de Ct mais baixos) e também corregido para qualquer variação do 1 Ct generalizado iguala uma regra de aumento de 2 vezes. Utilizando este método, as moléculas relacionadas abaixo foram identificadas como sendo significativamente sobre-expressas (isto é, pelo menos 2 vezes) num único (ou número limitado) de tipos específicos de tecido ou célula como em comparação com um tipo diferente de tecido ou célula (de ambos os mesmos dadores de tecido e dadores diferentes) com algumas também sendo identificados como sendo significativamente sobre-expressas (isto é, pelo menos 2 vezes) em células cancerosas quando

em comparação com células normais do tipo particular de tecido ou célula, e assim, representam excelentes polipéptidos alvos para a terapêutica de cancro em mamíferos.

Molécula	expressão específica em::	em comparação com:
DNA105250 (TAHO1)	células B	células não B
DNA150004 (TAHO2)	células B	células não B
DNA182432 (TAHO3)	células B	células não B
DNA225785 (TAHO4)	células B	células não B
DNA225786 (TAHO5)	células B/células CD34+	células não B
DNA225875 (TAHO6)	células B	células não B
DNA226239 (TAHO8)	células B	células não B
DNA226394 (TAHO9)	células B	células não B
DNA226423 (TAH010)	células B	células não B
DNA227781 (TAH011)	células B	células não B
DNA227879 (TAHO12)	células B	células não B
DNA260953 (TAHO13)	células B	células não B
DNA335924 (TAHO16)	células B	células não B
DNA340394 (TAH017)	células B	células não B
DNA225820 (TAHO25)	células B	células não B
DNA88116 (TAHO26)	células B	células não B

Sumário

Os níveis de expressão TAHO1-TAHO6, TAHO8-TAHO13, TAHO16-TAHO17 e TAH025-TAH026 em ARN total isolado a partir de células B purificadas ou de células B de 20 dadores de célula B (310-1112) (AllCells) e feita a média (Avg. B) foram significativamente maiores que respetivos níveis de expressão de TAHO1-TAHO6, TAHO8-TAHO13, TAHO16-17 e TAH025-TAH026 em ARN total isolado a partir de diversos tipos de célula sanguínea branca, neutrófilos (Neutr), células

assassinas naturais (NK) (um subconjunto de célula T), células dendríticas (Dend), monócitos (Mono), células T CD4+, células T CD8+, células estaminais de CD34+ (dados não mostrado).

Consequentemente, como TAHO1-TAHO6, TAHO8-TAHO13, TAHO16-TAHO17 e TAH025-TAH026 são significativamente expressos em células B em comparação com células não B como detetado por análise TaqMan, as moléculas são excelentes alvos para a terapêutica de tumores em mamíferos, incluindo cancros associados a célula B, tais como linfomas (isto é, Linfoma Não-Hodgkin), leucemias (isto é, leucemia linfocítica crónica), mielomas (isto é, mieloma múltiplo) e outros cancros de células hematopoiéticas.

EXEMPLO 3: Hibridação *in situ*

A hibridação *in situ* é uma poderosa e versátil técnica para a deteção e localização de sequências de ácidos nucleicos dentro de preparações de células ou tecidos. Pode ser útil, por exemplo, para identificar locais de expressão de genes, analizar a distribuição de transcrição nos tecidos, identificar e localizar infeção viral, seguir alterações na síntese de ARNm específica e ajudar no mapeamento de cromossomas.

A hibridação *in situ* foi realizada seguindo uma versão otimizada do protocolo por Lu e Gillett, Cell Vision 1:169-176 (1994), utilizando ribossondas marcadas com ^{33}P geradas por PCR. Resumidamente, tecidos humanos fixados em formalina e embebidos em parafina foram seccionados, desparafinizados, desproteinizados em proteinase K (20 g/ml) durante 15 min a 37 °C e ainda processados para hibridação *in situ* como descrito por Lu e Gillett, acima. Uma ribosonda antisense marcada com UTP [^{33}-P] foi gerada a

partir de um produto de PCR e hibridizada a 55 °C durante a noite. As lâminas foram mergulhadas em emulsão nuclear Kodak NTB2 e expostas durante 4 semanas

Síntese de Ribossonda ^{33}P

6,0 ml (125 mCi) de ^{33}P-UTP (Amersham BF 1002, SA<2000 Ci/mmol) foram secos num sistema de speed vac. A cada tubo contendo ^{33}P-UTP seco, os seguintes ingredientes foram adicionados:

2,0 µl 5x de tampão de transcrição
1,0 µl de DTT (100 mM)
2,0 µl de mistura de NTP (2,5 mM : 10 µ; cada de GTP a 10 mM, CTP & ATP + 10 µl de H_2O)
1,0 µl de UTP (50 mM)
1,0 µl Rnasin
1,0 µl de modelo de ADN (1 µg)
1,0 µl de H_2O
1,0 µl ARN polimerase (para produtos de PCR T3 = AS, T7 = S, normalmente)

Os tubos foram incubados a 37 °C durante uma hora. 1,0 µl de RQ1 DNase foi adicionado, seguido por incubação a 37 °C durante 15 minutos. 90 µl de TE (Tris a 10 mM pH 7,6/ EDTA a 1mM pH 8,0) foram adicionados e a mistura foi pipetada em papel DE81. A solução restante foi carregada numa unidade de ultrafiltração Microcon-50 e rotou utilizando o programa 10 (6 minutos). A unidade de filtração foi invertida sobre um segundo tubo e rotou utilizando o programa 2 (3 minutos). Após a rotação de recuperação final, 100 µl de TE foram adicionados. 1 µl do produto final foi pipetado em papel DE81 e contado em 6 ml de Biofluor II.

A sonda foi corrida num gel de TBE/ureia. 1-3 µl da sonda ou 5 µl de ARN Mrk III foram adicionados a 3 µl de tampão de carga. Após aquecimento num bloco térmico a 95 °C durante três minutos, a sonda foi imediatamente colocada em gelo. Os poços de gel foram enxaguados, a amostra carregada e corrida a 180-250 volts durante 45 minutos. O gel foi envolvido em invólucro de saran e exposto a película XAR com um ecrã de intensificação num congelador a -70 °C uma hora à noite. Hibridação de ^{33}P.

A. Pré-tratamento de secções congeladas

As lâminas foram removidas do congelador, colocadas em bandejas de alumínio e descongeladas à temperatura ambiente durante 5 minutos. As bandejas foram colocadas numa incubadora a 55 °C durante cinco minutos para reduzir a condensação. As lâminas foram fixas durnate 10 minutos em paraformaldeído a 4 % em gelo na câmara exaustora de fumos, e lavadas em 0,5 x SSC durante 5 minutos, à temperatura ambiente (25 ml de 20 x SSC + 975 ml de H_2O SQ). Após a desproteinização em proteinase K a 0,5 µl/ml durante 10 minutos a 37 °C (12,5 µl de base a 10 mg/ml em tampão de RNAse livre de RNAse pré-aquecido), as secções foram lavadas em 0,5 x SSC durante 10 minutos à temperatura ambiente. As secções foram desidratadas em etalnol a 70 %, 90 %, 100 %, 2 minutos cada.

B. Pré-tratramento de secções embebidas em parafina

As lâminas foram desparafinizadas, colocadas em H_2O SQ, e enxaguadas duas vezes em 2x SSC à temperatura ambiente, durante 5 minutos cada vez. As secções foram desproteinizadas em proteinase K a 20 µg/ml (500 µl de 10 mg/ml em 250 ml de tampão de RNase livre de RNase; 37°C, 15 minutos) - embrião humano, ou proteinase K 8 x (100 µl em

250 ml de Tampão de RNase, 37 °C, 30 minutos) - tecidos em formalina. Subsequentes enxaguamentos em 0,5 x SSC e desidratação foram realizados como descrito anteriormente.

C. Pré-hibridação

As lâminas foram dispostas numa caixa plástica revestida com tampão de caixa (4 x SSC, formamida a 50 %) - papel de filtro saturado.

D. Hibridação

Sonda de 1,0 x 10^6 cpm e 1,0 µl de ARNt (base a 50 mg/ml) por lâmina foram aquecidos a 95 °C durante 3 minutos. As lâminas foram arrefecidas em gelo, e 48 µl de tampão de hibridação foram adicionados por lâmina. Após agitação, 50 µl de mistura de ^{33}P foram adicionados a 50 µl de pré-hibridação na lâmina. As lâminas foram incubadas durante a noite a 55 °C.

E. Lavagem

A lavagem foi feita 2 x 10 minutos com 2x SSC, EDTA à temperatura ambiente (400 ml de 20 x SSC + 16 ml de EDTA a 0,25 M, V_f = 4 l), seguida por tratamento com RNaseA a 37 °C durante 30 minutos (500 µl de 10 mg/ml em 250 ml de tampão RNase = 20 µg/ml). As lâminas foram lavadas 2 x 10 minutos com 2 x SSC, EDTA à temperatura ambiente. O rigor das condições de lavagem foi como segue: 2 horas a 55 °C, 0,1 x SSC, EDTA (20 ml de 20 x SSC + 16 ml de EDTA, V_f = 4 l).

F. Oligonucleótidos

A análise *in situ* foi realizada numa variedade de

sequências de ADN divulgadas no presente documento. Os oligonucleótidos utilizados para estas análises foram obtidos de modo a serem complementares dos ácidos nucleicos (ou dos complementos destes) como mostrado nas figuras anexas.

(1) DNA225785 (TAHO4)

p1 5'-GGGCACCAAGAACCGAATCAT-3' (SEQ ID NO: 72)

p2 5'-CCTAGAGGCAGCGATTAAGGG-3' (SEQ ID NO: 73)

(2) DNA257955 (TAHO20)

p1 5'-TCAGCACGTGGATTCGAGTCA-3' (SEQ ID NO: 74)

p2 5'-GTGAGGACGGGGCGAGAC-3' (SEQ ID NO: 75)

G. Resultados

A análise *in situ* foi realizada numa variedade de sequências de ADN divulgadas no presente documento. Os resultados destas análises são como segue.

(1) DNA225785 (TAHO4)

Expressão foi observada em células linfóides. Especificamente, em tecidos normais, a expressão foi observada no baço, nódulos linfáticos e coincide com áreas de células B, tais como centros germinais, manto e zonas marginais. Expressão significativa foi também observada em secções de tecidos de uma variedade de linfomas malignos, incluindo linfoma de Hodgkin, linfoma folicular, linfoma de célula grande difusa, linfoma linfocítico pequeno e linfoma não-Hodgkin. Este dado é consistente com o potencial papel desta molécula em tumores hematopoiéticos, especificamente em tumores de células B.

(2) DNA257955 (TAHO2Q)

Expressão foi observada em células linfóides benignas e neoplásticas. Especificamente, em tecidos normais,

expressão foi observada em áreas de células B, tais como centros germinais, manto e zonas marginais, e em tecidos de polpa branca do baço. Este dado é consistente com o potencial papel desta molécula em tumores hematopoiéticos, especificamente em tumores de células B.

EXEMPLO 4: Utilização de TAHO como uma sonda de hibridação

O seguinte método descreve a utilização de uma sequência de nucleótidos que codifica TAHO como uma sonda de hibridação para, isto é, a deteção da presença de TAHO num mamífero.

O ADN que compreende a sequência codificante de comprimento total ou TAHO maduro como é revelado no presente documento pode também ser utilizado como uma sonda para a seleção de ADN homólogos (tais como os codificadores de variantes de TAHO de ocorrência natural) em bibliotecas de ADNc de tecido humano ou bibliotecas genómicas de tecido humano.

A hibridação e lavagem de filtros que contêm ADN de qualquer biblioteca é realizada sob as condições de alta restringência a seguir. A hibridação de sondas derivadas de TAHO radiomarcadas para os filtros é realizada em solução de 50 % formamida, 5x SSC, 0,1 % SDS, 0,1 % pirofosfato de sódio, 50 mM de fosfato de sódio, pH 6,8, 2x solução de Denhardt e 10 % sulfato de dextrano a 42 °C por vinte horas. A lavagem dos filtros é realizada em solução aquosa de 0,1x SSC e 0,1 % SDS a 42 °C.

ADN que possuem identidade de sequências desejada com o ADN que codifica TAHO de sequência nativa de comprimento total podem ser identificados em seguida utilizando métodos padrão na técnica.

EXEMPLO 5: Expressão de TAHO em *E. coli*

Este exemplo ilustra a preparação de forma não glicosilada de TAHO por meio de expressão recombinante em *E. coli*.

A sequência de ADN que codifica TAHO é inicialmente amplificada utilizando iniciadores de PCR selecionados. Os iniciadores deverão conter locais de enzimas de restrição que correspondem aos locais de enzimas de restrição sobre o vetor de expressão selecionado. Pode-se utilizar uma série de vetores de expressão. Exemplo de vetor apropriado é pBR322 (derivado de *E. coli*; veja-se Bolivar *et al.*, *Gene*, 2: 95 (1977)), que contém genes para resistência à ampicilina e tetraciclina. O vetor é digerido com enzima de restrição e desfosforilado. As sequências amplificadas por PCR são ligadas em seguida ao vetor. O vetor incluirá preferivelmente sequências que codificam gene de resistência a antibióticos, promotor trp, líder poli-his (que inclui os seis primeiros codões STII, sequência poli-his e local de divisão de enterocinase), a região de codificação de TAHO, terminal de transcrição lambda e gene argU.

A mistura de ligação é utilizada em seguida para transformar linha de *E. coli* selecionada utilizando os métodos descritos em Sambrook *et al.*, acima. Transformadores são identificados pela sua capacidade de crescimento sobre placas LB e são selecionadas em seguida colônias resistentes a antibióticos. ADN de plasmídeo pode ser isolado e confirmado por meio de análise de restrição e sequenciamento de ADN.

Clones selecionados podem ser cultivados durante a noite em meio de cultivo líquido tal como caldo LB

suplementado com antibióticos. O cultivo durante a noite pode ser utilizado em seguida para inocular cultura em maior escala. As células são cultivadas em seguida até densidade ótica desejada, durante o qual é ligado o promotor de expressão.

Após o cultivo das células por mais várias horas, as células podem ser colhidas por meio de centrifugação. A pelota celular obtida por meio da centrifugação pode ser solubilizada utilizando vários agentes conhecidos na técnica e a proteína TAHO solubilizada pode ser purificada em seguida utilizando coluna quelante metálica sob condições que permitam a firme ligação da proteína.

TAHO pode ser expresso em *E. coli* em forma marcada por poli-His, utilizando o procedimento a seguir. A sequência de ADN que codifica TAHO é inicialmente amplificada utilizando iniciadores de PCR selecionados. Os iniciadores conterão locais de enzimas de restrição que correspondem aos locais de enzimas de restrição sobre o vetor de expressão selecionado e outras sequências úteis que fornecem início de tradução confiável e eficiente, rápida purificação sobre coluna de quelação metálica e remoção proteolítica com enterocinase. As sequências marcadas com poli-His e amplificadas por PCR são ligadas em seguida a vetor de expressão, que é utilizado para transformar hospedeiro *E. coli* com base na linha 52 (W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts (htpRts) clpP (laclq). Os transformadores são cultivados em primeiro lugar em LB contendo 50 mg/ml de carbenicilina a 30 °C com agitação até atingir-se OD 600 de 3 a 5. Os cultivos são diluídos em seguida por cinquenta a cem vezes em meios CRAP (preparados por meio de mistura de 3,57 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,71 g de citrato de sódio•2H20, 1,07 g de KCl, 5,36 g de extrato de levedura Difco, 5,36 g de hicase Sheffield SF em 500 ml de água, bem como 110 mM de

MPOS, pH 7,3, 0,55 % (p/v) glicose e 7 mM de $MgSO_4$) e cultivados por cerca de vinte a trinta horas a 30 °C com agitação. Amostras são removidas para verificar a expressão por meio de análise de SDS-PAGE e o cultivo a granel é centrifugado para peletizar as células. As pelotas celulares são congeladas até purificação e redobra.

Pasta de *E. coli* de 0,5 a 1 l de fermentações (pelotas de 6 a 10 g) é novamente suspensa em dez volumes (p/v) em 7 M de guanidina, 20 mM de Tris, tampão a pH 8. Adiciona-se sulfito de sódio sólido e tetrationato de sódio para fabricar concentrações finais de 0,1 M e 0,02 M, respetivamente, e a solução é agitada durante a noite a 4 °C. Esta etapa resulta em proteína desnaturada com todos os resíduos de cisteína bloqueados por meio de sulfitolização. A solução é centrifugada a 40.000 rpm em Ultracentrifugador Beckman por trinta minutos. O sobrenadante é diluído com três a cinco volumes de tampão de coluna de quelato metálico (6 M de guanidina, 20 mM de Tris, pH 7,4) e filtrado através de filtros de 0,22 mícron para clarificação. O extrato clarificado é carregado sobre coluna de 5 ml de quelato metálico Qiagen Ni-NTA equilibrada no tampão de coluna de quelato metálico. A coluna é lavada com tampão adicional contendo 50 mM de imidazol (Calbiochem, grau Ultrol), pH 7,4. A proteína é eluída com tampão contendo 250 mM de imidazol. Frações que contêm a proteína desejada são reunidas e armazenadas a 4 °C. Estimou-se a concentração de proteína por meio da sua absorção a 280 nm, utilizando o coeficiente de extinção calculado com base na sua sequência de aminoácidos.

As proteínas são redobradas por meio de lenta diluição da amostra em tampão de redobra recém preparado, que consiste em: 20 mM de Tris, pH 8,6, 0,3 M de NaCl, 2,5 M de ureia, 5 mM de cisteína, 20 mM de glicina e 1 mM de EDTA.

Os volumes de redobra são selecionados de forma que a concentração final de proteína seja de 50 a 100 microgramas/ml. A solução de redobra é suavemente agitada a 4 °C por 12 a 36 horas. A reação de redobra é arrefecida por meio da adição de TFA até concentração final de 0,4 % (pH de cerca de 3). Antes da purificação adicional da proteína, a solução é filtrada através de filtro de 0,22 mícron e acetonitrilo é adicionada até concentração final de 2 a 10 %. A proteína redobrada é submetida a cromatografia numa coluna de fase reversa Poros R1/H, utilizando tampão móvel de TFA a 0,1 % com eluição com grau de acetonitrilo de 10 a 80 %. Parcelas de frações com absorção de A280 são analisadas sobre géis de SDS poliacrilamida e são reunidas frações contendo proteína redobrada homogénea. Geralmente, as espécies adequadamente redobradas da maior parte das proteínas são eluídas sob concentrações mais baixas de acetonitrilo, pois essas espécies são as mais compactas com seus interiores hidrofóbicos protegidos da interação com a resina de fase reversa. As espécies agregadas são normalmente eluídas sob concentrações mais altas de acetonitrilo. Além da resolução de formas mal dobradas de proteínas a partir da forma desejada, a etapa de fase reversa também remove endotoxina das amostras.

Frações que contêm o polipéptido TAHO dobrado desejado são reunidas e a acetonitrilo é removida utilizando suave fluxo de nitrogénio dirigido à solução. As proteínas são formuladas em 20 mM de Hepes, pH 6,8 com 0,14 M de cloreto de sódio e manitol a 4 % por meio de diálise ou de filtragem de géis, utilizando resinas G25 Superfine (Pharmacia) equilibradas no tampão de formulação e filtradas estéreis.

Certos polipéptidos TAHO descritos no presente foram

expressos e purificados com sucesso utilizando esta(s) técnica(s).

EXEMPLO 6: Expressão de TAHO em células de mamíferos

Este exemplo ilustra a preparação de forma potencialmente glicosilada de TAHO por meio de expressão recombinante em células de mamíferos.

O vetor, pRK5 (veja-se documento EP 307.247, publicado em 15 de Março de 1989), é utilizado como vetor de expressão. Opcionalmente, o ADN de TAHO é ligado a pRK5 com enzimas de restrição selecionadas para permitir a inserção do ADN de TAHO utilizando métodos de ligação tais como os descritos em Sambrook *et al.*, acima. O vetor resultante é denominado pRK5-TAHO.

Numa forma de realização, as células hospedeiras selecionadas podem ser células 293. Células 293 humanas (ATCC CCL 1573) são cultivadas até a confluência em placas de cultivo de tecidos em meio tal como DMEM suplementado com soro de feto de bezerro e, opcionalmente, comonentes nutrientes e/ou antibióticos. Cerca de 10 µg de ADN de pRK5-TAHO são misturados com cerca de 1 µg de ADN que codifica o gene VA ARN (Thimmappaya *et al.*, *Cell*, 31: 543 (1982)) e dissolvidos em 500 µl de 1 mM de Tris-HCl, 0,1 mM de EDTA, 0,227 M de $CaCl_2$. A esta mistura adiciona-se, em gotas, 500 pl de 50 mM de HEPES (pH 7,35), 280 mM de NaCl, 1,5 mM de $NaPO_4$ e permite-se a formação de precipitado durante dez minutos a 25 °C. O precipitado é suspenso e adicionado às células 293 e mantido em deposição por cerca de quatro horas a 37 °C. O meio de cultivo é retirado por meio de aspiração e são adicionados 2 ml de glicerol a 20 % em PBS por trinta segundos. As células 293 são lavadas em seguida com meio livre de soro, adiciona-se meio novo e as

células são incubadas por cerca de 5 dias.

Cerca de 24 horas após as transfeções, o meio de cultivo é removido e substituído com meio de cultivo (isolado) ou meio de cultivo que contém 200 µCi/ml de ^{35}S-cisteína e 200 µCi/ml de ^{35}S-metionina. Após incubação por doze horas, o meio condicionado é recolhido, concentrado sobre filtro de centrifugação e carregado sobre gel de SDS a 15 %. O gel processado pode ser seco e exposto a filme por período de tempo selecionado para revelar a presença de polipéptido TAHO. Os cultivos que contêm células transfetadas podem sofrer incubação adicional (em meio livre de soro) e o meio é testado em bioensaios selecionados.

Numa técnica alternativa, TAHO pode ser introduzido em células 293 transitoriamente utilizando o método de sulfato de dextrano descrito por Somparyrac *et al., Proc. Natl. Acad. Sci.*, 12: 7275 (1981). As células 293 são cultivadas até densidade máxima em frasco centrifugador e adiciona-se 700 pg de pRK5-TAHO ADN. As células são concentradas em primeiro lugar a partir do frasco centrifugador por meio de centrifugação e lavadas com PBS. O precipitado de ADN e dextrano é incubado sobre a pelota celular por quatro horas. As células são tratadas com glicerol a 20 % por noventa segundos, lavadas com meio de cultivo de tecidos e reintroduzidas no frasco centrifugador que contém meio de cultivo de tecidos, 5 µg/ml de insulina bovina e 0,1 µg/ml de transferrina bovina. Após cerca de quatro dias, os meios condicionados são centrifugados e filtrados para remover células e fragmentos. A amostra que contém TAHO expresso pode ser concentrada e purificada em seguida por meio de qualquer método selecionado, tal como diálise e/ou cromatografia de coluna.

Em outra forma de realização, TAHO pode ser expresso em células CHO. O pRK5-TAHO pode ser transfetado em células CHO utilizando reagentes conhecidos tais como $CaPO_4$ ou DEAE-dextrano. Conforme descrito acima, os cultivos celulares podem ser incubados e o meio substituído com meio de cultivo (isolado) ou meio que contém radiomarca, tal como ^{35}S-metionina. Após a determinação da presença de polipéptido TAHO, o meio de cultivo pode ser substituído com meio livre de soro. Preferivelmente, os cultivos são incubados por cerca de seis dias e, em seguida, o meio condicionado é colhido. O meio que contém o TAHO expresso pode ser concentrado em seguida e purificado por meio de qualquer método selecionado.

TAHO marcado com epítopos pode também ser expresso em células CHO hospedeiras. O TAHO pode ser subclonado fora do vetor pRK5. O inserto de subclone pode sofrer PCR para fusão em quadro com marcador de epítopo selecionada tal como marcador poli-his em vetor de expressão de bacilovírus. O inserto de TAHO marcado com poli-his pode ser subclonado em seguida em vetor dirigido por SV40 que contém marcador de seleção tal como DHFR para a seleção de clones estáveis. Por fim, as células CHO podem ser transfetadas (conforme descrito acima) com o vetor dirigido por SV40. Pode-se realizar a marcação, conforme descrito acima, para verificar a expressão. O meio de cultivo que contém o TAHO poli-His marcado expresso pode ser concentrado em seguida e purificado por meio de qualquer método selecionado, tal como por meio de cromatografia de afinidade de quelato de Ni^{2+}.

TAHO pode também ser expresso em células CHO e/ou COS por meio de procedimento de expressão transitória ou em células CHO por meio de outro procedimento de expressão estável.

A expressão estável em células de CHO é realizada utilizando o procedimento a seguir. As proteínas são expressas na forma de construção de IgG (imunoadesina), em que as sequências de codificação para as formas solúveis (tais como os domínios extracelulares) das proteínas correspondentes são fusionadas a sequência de região constante de IgG1 que contém os domínios de articulação, CH2 e CH2 e/ou é forma poli-His marcada.

Após a amplificação por PCR, os ADN correspondentes são subclonados em vetor de expressão de CHO utilizando métodos padrão conforme descrito em Ausubel *et al.*, *Current Protocols of Molecular Biology*, Unidade 3.16, John Wiley and Sons (1997). Vetores de expressão de CHO são construídos de forma a conterem locais de restrição compatíveis 5' e 3' do ADN de interesse para permitir o impulsionamento conveniente de ADNc. O vetor utilizado na expressão em células CHO é descrito em Lucas *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 24: 9 (1774-1779 (1996)) e utiliza o promotor/amplificador precoce SV40 para dirigir a expressão do ADNc de interesse e di-hidrofolato reductase (DHFR). A expressão de DHFR permite a seleção para manutenção estável do plasmídeo após a transfeção.

Doze microgramas do ADN de plasmídeo desejado são introduzidos em cerca de 10 milhões de células de CHO utilizando reagentes de transfeção disponíveis comercialmente Superfect® (Quiagen), Dosper® ou Fugene® (Boehringer Mannheim). As células são cultivadas conforme descrito em Lucas *et al.*, acima. Cerca de 3 x 10^7 células são congeladas em ampola para crescimento e produção adicional, conforme descrito a seguir.

As ampolas que contêm o ADN de plasmídeo são descongeladas por meio de colocação em banho de água e

misturadas por turbilhonamento. O conteúdo é pipetado em tubo de centrifugação que contém 10 ml de meios e centrifugado a 1000 rpm por cinco minutos. O sobrenadante é aspirado e as células são novamente suspensas em 10 ml de meios seletivos (0,2 µm de PS20 filtrado com soro de feto bovino diafiltrado de 0,2 µm a 5 %). As células são parceladas em seguida em centrifugador de 100 ml que contém 90 ml de meios seletivos. Após um a dois dias, as células são transferidas para centrifugador de 250 ml cheio com 150 ml de meio de cultivo seletivo e incubadas a 37 °C. Após mais dois a três dias, centrifugadoras de 250 ml, 500 ml e 2000 ml são semeadas com 3 x 10^5 células/ml. O meio celular é trocado com meio novo por centrifugação e re-suspensão em meio de produção. Embora qualquer meio de CHO apropriado possa ser utilizado, meio de produção descrito na Patente US n° 5.122.469, concedida em 16 de Junho de 1992, pode realmente ser utilizado. Centrifugador de produção de três litros é semeado a 1,2 x 10^6 células/ml. No dia 0, é determinado o número de pH das células. No dia 1, o centrifugador é amostrado e inicia-se a aspersão com ar filtrado. No dia 2, o centrifugador é amostrado, a temperatura alterou-se para 33 °C e são tomados 30 ml de 500 g/l de glicose e 0,6 ml de 10 % antiespumante (tal como emulsão de polidimetilsiloxano a 35 %, Emulsão Grau Médico Dow Corning 365). Ao longo de toda a produção, o pH é ajustado conforme o necessário para mantê-lo em cerca de 7,2. Após dez dias, ou até a queda da viabilidade abaixo de 70 %, o cultivo celular é colhido por meio de centrifugação e filtragem através de filtro de 0,22 pm. O filtrado foi armazenado a 4 °C ou carregado imediatamente sobre colunas para purificação.

Para as construções marcadas com poli-His, as proteínas são purificadas utilizando coluna Ni-NTA (Qiagen). Antes da purificação, adicionase imidazol aos

meios condicionados até concentração de 5 mM. O meio condicionado é bombeado a uma coluna de 6 ml de Ni-NTA equilibrada em 20 mM de Hepes, pH 7,4, tampão contendo 0,3 M de NaCl e 5 mM de imidazol em velocidade de fluxo de 4 a 5 ml/min a 4 °C. Após o carregamento, a coluna é lavada com tampão de equilíbrio adicional e a proteína eluída com tampão de equilíbrio que contém 0,25 M de imidazol. A proteína altamente purificada é subsequentemente dessalinizada em tampão de armazenagem que contém 10 mM de Hepes, 0,14 M de NaCl e manitol a 4 %, pH 6,8, com coluna de 25 ml de G25 Superfine (Pharmacia) e armazenada a -80 °C.

Construções de imunoadesina (que contém Fc) são purificadas a partir dos meios condicionados como se segue. O meio condicionado é bombeado sobre coluna de 5 ml de Proteína A (Pharmacia) que havia sido equilibrada em 20 mM de tampão fosfato de Na, pH 6,8. Após o carregamento, a coluna é extensivamente lavada com tampão de equilíbrio antes da eluição com 100 mM de ácido cítrico, pH 3,5. A proteína eluída é imediatamente neutralizada recolhendo-se frações de 1 ml em tubos que contêm 275 µl de 1 M tampão Tris, pH 9. A proteína altamente purificada é subsequentemente dessalinizada em tampão de armazenagem conforme descrito acima para as proteínas marcadas com poli-His. A homogeneidade é determinada por géis de SDS poliacrilamida e por sequenciamento de aminoácidos N-terminais por meio de degradação de Edman.

Certos polipéptidos TAHO descritos no presente foram expressos e purificados com sucesso utilizando esta(s) técnica(s).

EXEMPLO 7: Expressão de TAHO em Levedura

O método a seguir descreve a expressão recombinante de TAHO em levedura.

Em primeiro lugar, vetores de expressão de leveduras são construídos para a produção intracelular ou secreção de TAHO a partir do promotor ADH2/GAPDH. ADN que codifica TAHO e o promotor é inserido em locais de enzimas de restrição apropriados no plasmídeo selecionado para dirigir a expressão intracelular de TAHO. Para secreção, ADN que codifica TAHO pode ser clonado no plasmídeo selecionado, junto com ADN que codifica o promotor ADH2/GAPDH, péptido de sinal TAHO nativo ou outro péptido de sinal de mamífero ou, por exemplo, fator alfa de levedura ou sequência líder/sinal de secreção de invertase e sequências ligantes (se for necessário) para a expressão de TAHO.

Células de leveduras, tais como linha de levedura AB110, podem ser transformadas em seguida com os plasmídeos de expressão descritos acima e cultivados em meios de fermentação selecionados. Os sobrenadantes de levedura transformados podem ser analisados por meio de precipitação com ácido tricloroacético a 10 % e separação por SDS-PAGE, seguidos por manchas dos géis com manchas de Azul de Coomassie.

TAHO recombinante pode ser isolado em seguida e purificado por meio de remoção das células de leveduras do meio de fermentação por meio de centrifugação e concentração do meio em seguida utilizando filtros de cartucho selecionados. O concentrado que contém TAHO pode ser adicionalmente purificado utilizando resinas de cromatografia de coluna selecionadas.

Certos polipéptidos TAHO descritos no presente foram expressos e purificados com sucesso utilizando esta(s) técnica(s).

EXEMPLO 8: Expressão de TAHO em Células de Insetos Infetadas com Baculovírus

O método a seguir descreve a expressão recombinante de TAHO em células de insetos infetadas com Baculovírus.

A codificação de sequências para TAHO é fusionada a montante de um marcador de epítopo contido dentro de um vetor de expressão de baculovírus. Esses marcadores de epítopos incluem marcadores poli-his e marcadores de imunoglobulina (como regiões Fc de IgG). Pode-se utilizar uma série de plasmídeos, que incluem plasmídeos derivados de plasmídeos disponíveis comercialmente tais como pVL1393 (Novagen). Resumidamente, a sequência que codifica TAHO ou a parte desejada da sequência de codificação de TAHO tal como a sequência que codifica domínio extracelular de proteína transmembrana ou a sequência que codifica a proteína madura caso a proteína seja extracelular é amplificada por PCR com iniciadores complementares às regiões 5' e 3'. O iniciador 5' pode incorporar locais de enzimas de restrição ladeadores (selecionados). O produto é digerido em seguida com as enzimas de restrição selecionadas e subclonado no vetor de expressão.

Baculovírus recombinante é gerado por meio de cotransfeção do plasmídeo acima e ADN de vírus BaculoGold™ (Pharmingen) em células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC CRL 1711) utilizando lipofectina (disponíveis comercialmente a partir de GIBCO-BRL). Após quatro a cinco dias de incubação a 28 °C, os vírus libertados são colhidos e utilizados para amplificações adicionais. Expressão de

proteínas e infeções virais são realizadas conforme descrito por O'Reilley *et al., Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual,* Oxford: Oxford University Press (1994).

TAHO marcado com poli-his expresso pode ser purificado em seguida, por exemplo, por meio de cromatografia de afinidade de quelato de Ni^{2+} como se segue. Extratos são preparados a partir de células Sf9 infetadas por vírus recombinante conforme descrito por Rupert *et al., Nature,* 362: 175-179 (1993). Resumidamente, as células Sf9 são lavadas, novamente suspensas em tampão de sonicação (25 ml de Hepes, pH 7,9; 12,5 mM de $MgCl_2$; 0,1 mM de EDTA; 10 % glicerol; 0,1 % NP-40; 0,4 M de KCI) e sonicados por duas vezes por vinte segundos sobre gelo. Os sonicados são libertados por meio de centrifugação e o sobrenadante é diluido por cinquenta vezes em tampão de carregamento (50 mM de fosfato, 300 mM de NaCl, 10 % de glicerol, pH 7,8) e filtrados através de filtro de 0,45 pm. Coluna de Ni^{2+}-NTA agarose (disponível comercialmente por meio da Qiagen) é preparada com volume de leito de 5 ml, lavada com 25 ml de água e equilibrada com 25 ml de tampão de carregamento. O extrato celular filtrado é carregado sobre a coluna a 0,5 mi por minuto. A coluna é lavada até a linha base A_28o com tampão de carga, ponto em que se inicia a coleta de frações. Em seguida, a coluna é lavada com tampão de lavagem secundário (50 mM de fosfato; 300 mM de NaCl, 10 % de glicerol, pH 6,0), que elui proteína unida não especificamente. Após atingir-se novamente a linha base A_{280}, a coluna é desenvolvida com gradiente de 0 a 500 mM de imidazol no tampão de lavagem secundário. Frações de 1 ml são recolhidas e analisadas por meio de SDS-PAGE e manchas de prata ou Western Blot com Ni^{2+}-NTA conjugado a fosfatase alcalina (Qiagen). Frações que contêm o TAHO marcado com His_{10} eluído são reunidas e dialisadas contra tampão de

carregamento.

Alternativamente, a purificação do TAHO marcado com IgG (ou marcado com Fc) pode ser realizada utilizando técnicas de cromatografia conhecidas, que incluem, por exemplo, cromatografia de coluna de Proteína A ou Proteína G.

Certos polipéptidos TAHO descritos no presente foram expressos e purificados com sucesso utilizando esta(s) técnica(s).

EXEMPLO 9: Preparação de Anticorpos que se ligam a TAHO

Este exemplo ilustra a preparação de anticorpos monoclonais que podem se ligar especificamente a TAHO.

As técnicas de produção dos anticorpos monoclonais são conhecidas na especialidade e são descritas, por exemplo, em Goding, acima. Imunogenes que podem ser utilizados incluem TAHO purificado, proteínas de fusão que contêm TAHO e células que expressam TAHO recombinante sobre a superfície celular. A seleção do imunogene pode ser realizada pelos peritos na especialidade sem experimentação indevida.

Ratinhos, tais como Balb/c, são imunizados com o imunogene TAHO emulsificado em adjuvante de Freund completo e injetados por via subcutânea ou intraperitoneal em quantidade de 1 a 100 microgramas. Alternativamente, o imunogene é emulsificado em adjuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton MT) e injetado nas almofadas das patas traseiras do animal. Os ratinhos imunizados são incentivados em seguida após dez a doze dias com imunogene adicional emulsificado no adjuvante

selecionado. Em seguida, por várias semanas, os ratinhos podem também ser incentivados com injeções de imunização adicionais. Amostras de soro podem ser obtidas periodicamente dos ratinhos por meio de sangramento retroorbital para teste em ensaios ELISA para detetar anticorpos anti-TAHO.

Após a deteção de título de anticorpo apropriado, os animais "positivos" para anticorpos podem ser injetados com injeção intravenosa final de TAHO. Três a quatro dias mais tarde, os ratinhos são sacrificados e as células do baço são colhidas. As células do baço são fusionadas em seguida (utilizando polietileno glicol a 35 %) a uma linha de células de mieloma murino selecionadas tal como P3X63AgU.1, disponível por meio da ATCC, nº CRL 1597. As fusões geram células de hibridoma que podem ser colocadas em placas em seguida em placas de cultivo de tecidos com 96 cavidades que contêm meio HAT (hipoxantina, aminopterina e timidina) para inibir a proliferação de células não fusionadas, híbridos de mieloma e híbridos de células do baço.

As células de hibridoma serão selecionadas em ELISA para determinar a reatividade contra imunogénio. A determinação de células de hibridoma "positivas" que segregam os anticorpos monoclonais desejados contra imunogénio encontra-se dentro do conhecimento da técnica.

As células de hibridoma positivas podem ser injetadas por via intraperitoneal em ratinhos Balb/c singenéticos para produzir ascite que contém os anticorpos monoclonais anti-imunogénio. Alternativamente, as células de hibridoma podem ser cultivadas em frascos de cultivo de tecidos ou garrafas cilíndricas. A purificação dos anticorpos monoclonais produzidos na ascite pode ser realizada utilizando precipitação com sulfato de amónio, seguida por

cromatografia de exclusão de géis. Alternativamente, pode-se utilizar cromatografia de afinidade com base na ligação de anticorpo a proteína A ou proteína G.

Anticorpos dirigidos contra alguns dos polipéptidos TAHO descritos no presente documento podem ser produzidos com sucesso utilizando esta(s) técnica(s). Mais especificamente, anticorpos monoclonais funcionais que são capazes de reconhecer e unir-se a proteína TAHO (conforme medido por meio de ELISA padrão, análise de seleção de FACS e/ou análise imunohistoquímica) podem ser gerados com sucesso contra as proteínas TAHO a seguir conforme descrito no presente documento: TAHO1 (DNA105250), TAHO2 (DNA150004), TAHO3 (DNA182432), TAHO4 (DNA225785), TAHO5 (DNA225786), TAHO6 (DNA225875), TAHO7 (DNA226179), TAHO8 (DNA226239), TAHO9 (DNA226239), TAHO10 (DNA226423), TAHO11 (DNA227781), TAHO12 (DNA227879), TAHO13 (DNA256363), TAHO14 (DNA332467), TAHO15 (DNA58721), TAHO16 (DNA335924), TAHO17 (DNA340394), TAHO18 (DNA56041), TAHO19 (DNA59607), TAHO20 (DNA257955), TAHO21 (DNA329863), TAHO22 (DNA346528), TAHO23 (DNA212930) e TAHO24 (DNA335918), TAHO 25 (DNA225820), TAHO26 (DNA88116), e TAHO27 (DNA227752), TAHO28 (DNA119476), TAHO29 (DNA254890), TAHO30 (DNA219240), TAHO31 (DNA37151), TAHO32 (DNA210233), TAHO33 (DNA35918), TAHO34 (DNA260038), TAHO35 (DNA334818) e TAHO36 (DNA257501).

Além da preparação de anticorpos monoclonais dirigidos contra os polipéptidos TAHO descritos no presente documento, muitos destes anticorpos monoclonais estão a ser conjugados com sucesso a uma toxina celular para utilização no direcionamento da toxina celular a uma célula (ou tecido) que expressa polipéptido TAHO de interesse *(in vitro* e *in vivo)*. Os anticorpos monoclonais derivados de toxinas (tais como DM1), por exemplo, podem ser gerados com sucesso para os polipéptidos TAHO a seguir conforme

descrito no presente documento: TAHO1 (DNA105250), TAHO2 (DNA150004), TAHO3 (DNA 182432), TAHO4 (DNA225785), TAHO5 (DNA225786), TAHO6 (DNA225875), TAHO7 (DNA226179), TAHO8 (DNA226239), TAHO9 (DNA226239), TAHO10 (DNA226423), TAHO11 (DNA227781), TAHO12 (DNA227879), TAHO13 (DNA256363), TAHO14 (DNA332467), TAHO15 (DNA58721), TAHO16 (DNA335924), TAHO17 (DNA340394), TAHO18 (DNA56041), TAHO19 (DNA59607), TAHO20 (DNA257955), TAHO21 (DNA329863), TAHO22 (DNA346528), TAHO23 (DNA212930) e TAHO24 (DNA335918), TAHO 25 (DNA225820), TAHO26 (DNA88116), TAHO27 (DNA227752), TAHO28 (DNA119476), TAHO29 (DNA254890), TAHO30 (DNA219240), TAHO31 (DNA37151), TAHO32 (DNA210233), TAHO33 (DNA35918), TAHO34 (DNA260038), TAHO35 (DNA334818) e TAHO36 (DNA257501).

EXEMPLO 10: Purificação de Polipéptidos TAHO Utilizando Anticorpos Específicos

Polipéptidos TAHO nativos ou recombinantes podem ser purificados por meio de uma série de métodos padrão na técnica de purificação de proteínas. Polipéptido pro-TAHO, polipéptido TAHO maduro ou polipéptido pré-TAHO, por exemplo, é purificado por meio de cromatografia de imunoafinidade utilizando anticorpos específicos para o polipéptido TAHO de interesse. De forma geral, coluna de imunoafinidade é construída por meio de acoplamento covalente do anticorpo anti-polipéptido TAHO a resina cromatográfica ativada.

Imunoglobulinas policlonais são preparadas a partir de soro imune por meio de precipitação com sulfato de amónio ou por meio de purificação sobre Proteína A imobilizada (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway NJ). De forma similar, anticorpos monoclonais são preparados a partir de fluido de ascite de ratinho por meio de precipitação com sulfato de amónio ou cromatografia sobre Proteína A

imobilizada. Imunoglobulina parcialmente purificada é ligada covalentemente a resina cromatográfica tal como SEPHAROSE™ ativada por CnBr (Pharmacia LKB Biotechnology). O anticorpo é acoplado à resina, a resina é bloqueada e a resina derivada é lavada de acordo com as instruções do fabricante.

Essa coluna de imunoafinidade é utilizada na purificação de polipéptido TAHO por meio da preparação de fração de células que contêm polipéptido TAHO em forma solúvel. Esta preparação é derivada por meio de solubilização da célula inteira ou de fração subcelular obtida por meio de centrifugação diferencial por adição de detergente ou outros métodos bem conhecidos na técnica. Alternativamente, polipéptido TAHO solúvel que contém sequência de sinal pode ser segregado em quantidade útil para o meio no qual as células são cultivadas.

Preparação que contém polipéptido TAHO solúvel é passada sobre a coluna de imunoafinidade e a coluna é lavada sob condições que permitem a absorção preferencial de polipéptido TAHO (tal como tampões com alta resistência iónica na presença de detergente). Em seguida, a coluna é eluída sob condições que rompem a ligação de anticorpo e polipéptido TAHO (tal como tampão com baixo pH como cerca de pH 2 a 3 ou alta concentração de caotropo tal como ureia ou ião de tiocianato) e é recolhido polipéptido TAHO.

EXEMPLO 11: Ensaio de Destruição de Células Tumorais *In Vitro*

As células de mamíferos que expressam o polipéptido TAHO de interesse podem ser obtidas utilizando métodos de clonagem e vetor de expressão padrão. Alternativamente, muitas linhas de células de tumores que expressam

polipéptidos TAHO de interesse estão disponíveis ao público, por exemplo, por meio da ATCC e podem ser identificadas rotineiramente utilizando análise ELISA ou FACS padrão. Anticorpos monoclonais anti-polipéptido TAHO (e seus derivados conjugados de toxina) podem ser utilizados em seguida em ensaios para determinar a capacidade do anticorpo de matar células que expressam polipéptido TAHO *in vitro*.

As células que expressam o polipéptido TAHO de interesse, por exemplo, são obtidas conforme descrito acima e colocadas em placas com 96 cavidades. Numa análise, o conjugado de anticorpo e toxina (ou anticorpo bruto) é incluído ao longo de toda a incubação celular por período de quatro dias. Em segunda análise independente, as células são incubadas por uma hora com o conjugado de anticorpo e toxina (ou anticorpo bruto) e lavadas e incubadas em seguida na ausência de conjugado de anticorpo e toxina por período de quatro dias. A viabilidade celular é medida em seguida utilizando o Teste de Viabilidade de Células Luminescentes CellTiter-Glo da Promega (Cat. N° G7571). As células não tratadas servem de controlo negativo.

As linhas de célula B (ARH-77, BJAB, Daudi, DOHH-2, Su-DHL-4, Raji e Ramos) foram preparadas a 5000 células/poço em placas tratadas com cultura de tecido em 96 poços de fundo redondo estéreis separadas (Cellstar 650185). As células foram ensaiadas em meios (RPMI 1460, 1 % de L-Glutamina, 10 % de soro bovino fetal (FBS; de Hyclone) e 10 mM de HEPES). As células foram imediatamente colocadas num incubador a 37 °C durante a noite. Os conjugados de fármaco-anticorpo (usando comercialmente disponível anti-CD19, anti-CD20, anti-CD21, anti-CD79A, anti-CD79B) foram diluídos a 2 x 10 µg/ml em meio de ensaio. Os conjugados foram ligados com reticulantes SMCC

ou ligante de dissulfeto SPP a toxina DM1. Além disso, os conjugados podem ser ligados com Vc-PAB a toxina MMAE. Conjugados à base de herceptina (SMCC-DM1 ou SPP-DM1) foram usados como controlos negativos. L-DM1 livre equivalente à dose de carga de conjugado foi usado como um controlo positivo. As amostras foram submetidas a vortex para assegurar que a mistura esteja homogénea antes da diluição. Os conjugados de fármaco-anticorpo foram diluídos ainda em série 1:3. As linhas celulares foram carregadas 50 µl de cada amostra por fila usando um sistema de automação Rapidplate® 96/384 Zymark. Quando toda a placa foi carregada, as placas foram incubadas de novo durante 3 dias para permitir que as toxinas produzam efeito. As reações foram interrompidas por meio da aplicação de 100 µl/poço de Célula Glo (Promega, Cat. #G7571/2/3) a todos os poços durante 10 minutos. Os 100 µl do poço interrompido foram transferidos em placas tratadas com cultura de tecido branco de 96 poços, fundo claro (Costar 3610) e a luminescência foi lida e relatada como unidades relativas de luz (RLU). Os anticorpos TAHO para esta experiência incluiram anticorpos comercialmente disponíveis, incluindo anti-TAH04/CD79a (Caltag ZL7-4), anti-TAHO5/CD79b (Biomeda SN8), anti-TAH06/CD21 (ATCC HB5), anti-TAH026/CD22 (Leinco RFB-4) e anti-TAHO25/CD19 (Biomeda CB-19).

Sumário

(1) Anticorpo anti-TAHO26/CD22 conjugado a toxina DM1 (CD22-SPP-DM1 e CD22-SMCC-DM1) mostrou destruição significativa de célula tumoral quando em comparação com anticorpo anti-TAHO26/CD22 em separado ou controlo negativo anti-HER2 conjugado a toxina DM1 (anti-HER2-SMCC-DM 1) em células RAJI ou RAMOS. Além disso, uma maior destruição de célula tumoral foi observada com CD22-SPP-DM1 em comparação com CD22-SMCC-DM1.

(2) Anticorpo anti-TAH025/CD19 conjugado a toxina DM1 (CD19-SPP-DM1 e CD19-SMCC-DM1) mostrou destruição significativa de célula tumoral quando em comparação com anticorpo anti-TAH025/CD19 em separado ou controlo negativo anti-HER2 conjugado a toxina DM1 (anti-HER2-SMCC-DM1) em células RAJI ou RAMOS. Alem disso, uma maior destruição de célula tumoral foi observada com CD19-SMCC-DM1 em comparação com CD19-SPP-DM1.

(3) Anticorpo anti-TAH06/CD21 conjugado a toxina DM1 (CD21-SPP-DM1 e CD21-SMCC-DM1) mostrou fraca destruição de célula tumoral quando em comparação com anticorpo anti-TAH06/CD21 em separado ou controlo negativo anti-HER2 conjugado a toxina DM1 (anti-HER2-SMCC-DM1) em células RAJI ou RAMOS. Alem disso, uma maior destruição de célula tumoral foi observada com CD21-SPP-DM1 em comparação com CD21-SMCC-DM1.

(4) Anticorpo anti-TAH04/CD79A conjugado a toxina DM1 (CD79A-SMCC-DM1) mostrou destruição significativa de célula tumoral quando em comparação com anticorpo anti-TAH04/CD79A em separado ou controlo negativo anti-HER2 conjugado a toxina DM1 (anti-HER2-SMCC-DM1) em células RAMOS.

(5) Anticorpo anti-TAH05/CD79B conjugado a toxina DM1 (CD79B-SMCC-DM1) mostrou destruição significativa de célula tumoral quando em comparação com anticorpo anti-TAH05/CD79B em separado ou controlo negativo anti-HER2 conjugado a toxina DM1 (anti-HER2-SMCC-DM1) em células RAJI ou RAMOS.

Anticorpos monoclonais anti-polipéptido TAHO são úteis para reduzir crescimento tumoral *in vitro* de tumores, incluindo cancros associados a célula B, tais como linfomas (isto é, Linfoma Não-Hodgkin), leucemias (isto é, leucemia linfocítica crónica), mielomas (isto é, mieloma múltiplo) e outros cancros de células hematopoiéticas.

EXEMPLO 12: Ensaio de Destruição de Célula Tumoral *In Vivo*

Para testar a eficácia de anticorpos monoclonais anti-polipéptido THAO conjugados ou não conjugados, foi analisado o efeito de anticorpo anti-TAHO em tumores em ratinhos. Ratinhos CB17 ICR SCID fêmeas (6-8 semanas de idade de Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) foram inoculados por via subcutânea com 5 X 10^6 células RAJI ou 2 X 10^7 células BJAB-luciferase. O volume do tumor foi calculado com base em duas dimensões, medido utilizando calibres, e foi expresso em mm^3 de acordo com a fórmula: V= 0,5a X b^2, onde a e b são os diâmetros maior e menor do tumor, respetivamente. Os dados recolhidos de cada grupo experimental foram expressos como média ± DP. Ratinhos foram separados em grupos de 8-10 ratinhos com um volume tumoral médio entre 100-200 mm^3, ponto no qual começou o tratamento intravenoso (i.v.) na dose de anticorpo de 5 mg/kg semanalmente durante duas a três semanas. Os tumores foram medidos uma ou duas vezes por semana durante toda a experiência. Os ratinhos foram eutanaziados antes dos volumes dos tumores alcançarem 3000 mm^3 ou quando os tumores mostraram sinais de ulceração iminente. Todos protocolos animais foram aprovados por um Comité Institucional de Cuidado e Utilização Animal (IACUC). Os ligantes entre o anticorpo e a toxina que foram utilizados foram SPP, SMCC ou reagente de ligante de dipéptido cys-MC-vc-PAB (uma valina-citrulina (vc) com um componente maleimida e um componente autoimolador de para-aminobenzilcarbamoilo (PAB). As toxinas utilizadas foram DM1 ou MMAE. Anticorpos TAHO para esta experiência incluiram anticorpos comercialmente disponíveis, incluindo anti-TAH04/CD79a (Caltag ZL7-4), anti-TAH05/CD79b (Biomeda SN8), anti-TAH06/CD21 (ATCC HB135) e anti-TAH025/CD19 (Biomeda CB-19).

Sumário

(1) Anticorpo anti-TAH06/CD21 conjugado com toxina DM1 (anti-CD21-SPP-DM1) mostrou inibição do crescimento tumoral em ratinhos SCID com tumores RAJI quando tratados semanalmente com 5 mg/kg de anticorpo em comparação com anticorpos anti-CD21 e anticorpor herceotina conjugados a toxina DM1 (anti-Herceptina-SMCC-DM1 e anti-Herceptina-SPP-DM1). Especificamente, ao dia 19, 8 de 8 ratinhos tratados com anti-CD21-SPP-DM mostraram regressão completa de tumores. Ao dia 19, 8 de 8 ratinhos tratados com anti-CD21, anti-herceptina-SPP-DM1, anti-herceptina-SMCC-DM1 ou anti-CD21-SMCC-DM1 mostraram incidência de tumores. Ao dia 19, 7 de 8 ratinhos tratados com anticorpo anti-CD20-SMCC-DM mostraram incidência de tumores.

(2) Anticorpo anti-TAH06/CD21 conjugado com toxina MMAE (anti-CD21-cys-Mc-vc-PAB-MMAE) mostrou inibição de crescimento tumoral em ratinhos SCID com tumores RAJI quando tratados com 5 mg/kg de anticorpo em comparação com controlo negativo anticorpo anti-CD1 ou anticorpo anti-herceptina. Especificamente, ao dia 14, 5 de 9 ratinhos tratados com anti-CD21-cys-MC-vc-PAB-MMAE mostraram regressão parcial de tumores e 4 de 9 ratinhos tratados com anti-CD21-cys-MC-vc-PAB-MMAE mostraram regressão completa de tumores. Ao dia 14, 10 de 10 ratinhos tratados com anticorpo anti-herceptina ou anti-CD21 mostraram incidência de tumores.

(3) Anticorpo anti-TAH025/CD19 conjugado com toxina DM1 (anti-CD19-SPP-DM1) mostrou inibição de crescimento tumoral em ratinhos SCID com tumores RAJI quando tratados com 5 mg/kg de anticorpo em comparação com controlo negativo anticorpo anti-CD19 conjugado a DM1 (anti-CD19-SMCC-DM1), anticorpo anti-CD22 conjugado a DM1 (anti-CD22-SMCC-DM1) e anticorpo anti-herceptina

conjugado a DM1 (anti-herceptina-smcc-DM1 ou anti-herceptina-spp-DM1). Especificamente, ao dia 14, 2 de 6 ratinhos tratados com anti-CD19-SPP-DM1 mostraram regressão parcial de tumores e 3 de 6 ratinhos tratados com anti-CD19-SPP-DM1 mostraram regressão completa de tumores. Ao dia 14, 8 de 8 ratinhos tratados com anti-herceptina-SPP-DM1, anti-herceptina-SMCC-DM1, anti-CD19-SMCC-DM1 ou anti-CD22-SMCC-DM1 mostraram incidência de tumores.

(4) Anticorpo anti-TAH04/CD79A conjugado com DM1 (anti-CD79A-SMCC-DM1) mostrou inibição de crscimento tumoral em ratinhos SCID com tumores RAMOS em compração com controlo negativo, anti-herceptina-SMCC-DM1.

(5) Anticorpo anti-TAH05/CD79B conjugado com DM1 (anti-CD79B-SMCC-DM1) mostrou inibição de crescimento tumoral em ratinhos SCID com tumores RAMOS em compração com controlo negativo, anti-herceptina-SMCC-DMA. Anticorpo anti-TAH05/CD79B conjugado com DM1 (anti-CD79B-SMCC-DM1) mostrou inibição de crescimento tumoral em ratinhos SCID com tumores BJAB-luciferase em comparação com controlo negativo, anticorpo anti-herceptina-SMCC-DM1 ou anti-herceptina. O nível de inibição por anticorpos anti-CD79B-SMCC-DM foi semelhante ao nível de inibição por anticorpos anti-CD20. Especificamente, ao dia 15, 1 de 10 ratinhos tratados com anti-CD79B-SMCC-DM1 mostrou regressão parcial de tumores e 9 de 10 ratihos tratados com anti-CD79B-SMCC-DM1 mostrou regressão completa de tumores. Ao dia 15, 10 de 10 ratinhos tratados com anticorpo anti-herceptina-SMCC-DM1, anti-herceptina mostraram incidência tumoral. Ao dia 15, 5 de 10 ratinhos tratados com anticorpos anti-CD20 mostraram regressão parcial de tumores.

Anticorpos monoclonais anti-polipéptido TAHO são úteis para reduzir crecimento tumoral *in vivo* de tumores em

mamíferos, incluindo cancros asscociados a células B, tais como linfomas (isto é, Linfoma Não-Hodgkin), leucemias (isto é, leucemia linfocítica crónica), mielomas (isto é, mieloma múltiplo) e outros cancros de células hematopoiéticas.

EXEMPLO 13: Imunohistoquímica

Para determinar a expressão tecidual de polipéptido TAHO e para confirmar os resultados de microarranjo do Exemplo 1, a deteção imunohistoquímica de expressão de polipéptido TAHO foi examinada em tecidos linfoides incrustados em parafina e fixos em formalina (FFPE) congelados instantaneamente, incluindo tonsila palatina, baço, nódulo linfático e placas de Peyer do Banco de Tecido Humano de Genentech.

A prevalência de expressão de TAHO alvo foi avaliada em microarranjos de tecido de linfoma FFPE (Cybrdi) e um painel de 24 espécimes de linfoma humano congelado. Espécimes de tecido congelado foram secionados a 5 mm, secos ao ar e fixos em acetona durante 5 minutos antes da imunocoloração. Os tecidos incrustados em parafina foram secionados a 5 mm e montados em lâminas de microscópio SuperFrost Plus (VWR).

Para as seções congeladas, as lâminas foram colocadas em TEST, 1 % de BSA e 10 % de soro de cavalo normal contendo 0,05 % de azida de sódio durante 30 minutos, então incubadas com reagentes de kit de bloqueio de Avidina/Biotina (Vetor) antes da adição de anticorpo primário. Anticorpos monoclonais primários de ratinho (comercialmente disponíveis) foram detetados com IgG anti-ratinho biotinilado de cavalo (Vetor), seguido por incubação em complexo de peroxidase de Avidina-Biotina (ABC

Elite, Vetor) e tetracloridrato de diaminobenzidina aprimorado com metal (DAB, Pierce). Seções de controlo foram incubadas com anticorpo monoclonal irrelevante correspondido com isotipo de ratinho (Pharmingen) em concentração equivalente. Em seguida à aplicação do reagente ABC-HRP, as seções foram incubadas com biotinil-tiramida (Perkin Elmer) em diluente de amplificação durante 5-10 minutos, lavado, e incubadas de novo com reagente ABC-HRP. A deteção foi feita usando DAB como descrito acima.

As seções de tecido humano FFPE foram desparafinizadas em água destilada, tratadas com Solução de Recuperação de Alvo (Dako) num banho de água em ebulição durante 20 minutos, seguido por um período de arrefecimento de 20 minutos. A atividade endógena de peroxidase residual foi bloqueada usando 1X Solução de Bloqueio (KPL) durante 4 minutos. As seções foram incubadas com reagentes de bloqueio Avidina/Biotina e Tampão de Bloqueio contendo 10 % de soro de cavalo normal antes da adição dos anticorpos monoclonais, diluídas até 0,5-5,0 µg/ml em Tampão de Bloqueio. As seções foram então incubadas sequencialmente com anticorpo secundário anti-ratinho biotinilado, seguido por ABC-HRP e deteção cromogénica com DAB. Amplificação de Sinal de Tiramida, descrita acima, foi usada para aumentar a sensibilidade da coloração para um número de alvos de TAHO (CD21, CD22, HLA-DOB).

Sumário

(1) TAHO26 (CD22) mostrou forte marcação de células B da zona do manto e marcação mais fraca, mas significativa de centros germinais conforme detetado com clone de anticorpo primário RFB-4 (Leinco) em tecido congelado de tonsila humana e clone 22C04 (Neomarkers) em tecido de tonsila humana FFPE (dados não mostrados).

(2) TAHO10 (HLA-DOB) mostrou padrão de marcação pontual, possivelmente devido à marcação de TAHO10 em vesículas intracelulares como detetado com clone DOB.L1 (BD/Pharmingen) em tecido de tonsila humana FFPE (dados não mostrados).
(3) TAHO8 (CD72) mostrou padrão de marcação pontual, possivelmente devido à marcação de TAHO8 em vesículas intracelulares como detetado com clone J4-117 (BD/Pharmingen) em tecido de tonsila humano congelado (dados não mostrados).
(4) TAHO1 (CD180) mostrou padrão de marcação pontual, possivelmente devido à marcação de TAHO1 em vesículas intrecelulares como detetado com clone MHR73 (Serotec) em tecido de tonsila humano congelado (dados não mostrados).
(5) TAHO6 (CD21) mostrou forte marcação de células dentríticas foliculares em centros germinais e células B maduras dentro da zona do manto como detetado com clone HB-135 (ATCC) em tecido de tonsila humano FFPE e utilizando amplificação de sinal tiramida (TSA) (dados não mostrados).
(6) TAHO11 (CXCR5) mostrou marcação significativa tanto na zona do manto como nos centros germinais como detetado com clone 51505 (R&D Systems) e utilizando um anticorpo anti-rato conjugado com Cy3 (R&D Systems) em tonsila humana congelada.

Consequentemente, em vista do padrão de expressão de TAHO1, TAHO6, TAHO8, TAHO10, TAHO11 e TAHO26 como avaliado por meio de imunohistoquímica em amostras de tonsila, um órgão linfoide onde se desenvolvem as células B, as moléculas são excelentes alvos para a terapêutica de tumores em mamíferos, incluindo cancros associados a célula B, tais como linfomas (isto é, Linfoma Não-Hodgkin), leucemias (isto é, leucemia linfocítica crónica), mielomas (isto é, mieloma múltiplo) e outros cancros de células

hematopoiéticas.

EXEMPLO 14: Citometria de Fluxo

Para determinar a expressão de moléculas de TAHO, análise FACS foi realizada usando uma variedade de células, incluindo células normais e células doentes, tais como células de leucemia linfocítica crónica (CLL).

A. Células Normais: TAHO2 (CD20), TAHO (CD180), TAHO26 (CD22), TAHO4 (CD79A), TAHO5 (CD79B), TAHO8 (CD72), TAHO11 (CXCR5)

Para subtipos de célula B de tonsila, a tonsila fresca foi picada em HBSS frio e passada através de um filtrador de células de 70um. As células foram lavadas uma vez e contadas. As células B CD19+ foram enriquecidas usando o AutoMACS (Miltenyi). De maneira resumida, as células de tonsila foram bloqueadas com IgG humana, incubadas com microesferas anti-CD19, e lavadas antes da seleção positiva no AutoMACS. Uma fração de células B CD19+ foi guardada para a análise citométrica de fluxo de células plasmáticas. As células CD19+ restantes foram coradas com FITC-CD77, PE-IgD, e APC-CD38 para a classificação de subpopulações de célula B. O enriquecimento de CD19+ foi analisado usando PE-Cy5-CD19, e a pureza variou de 94-98 % de CD19+. As subpopulações de tonsila B foram classificadas no MoFlo por Michael Hamilton na taxa de fluxo 18.000-20.000 células/segundo. Células foliculares do manto foram colhidas como a fração IgD+/CD38-, as células B de memória foram IgD-/CD38-, os centrócitos foram IgD-/CD38+/CD77-, e os centroblastos foram IgD-/CD38+/CD77+. As células foram armazenadas em 50 % de soro durante a noite, ou coradas e fixas com 2 % de paraformaldeído. Para a análise de célula plasmática, células B totais de tonsila foram coradas com

CD138-PE, CD20-FITC, e o anticorpo biotinilado ao alvo de interesse foi detetado com estreptavidina-PE-Cy5. As subpopulações de tonsila B foram coradas com anticorpo biotinilado ao alvo de interesse, detetadas com estreptavidina-PE-Cy5. A análise de fluxo foi feita no BD FACSCaliber, e os dados foram analisados posteriormente usando software FlowJo v 4.5.2 (TreeStar). Anticorpos conjugados com biotina que estavam comercialmente disponíveis tais como TAHO2/CD20 (2H7 de Ancell), TAHO1/CD180 (MHR73-11 de eBioscience), TAHO8/CD72 (JF-117 de BD Pharmingen), TAHO26/CD22 (RFB4 de Ancell), TAHO11/CXCR5 (51505 de R&D Systems), TAHO4/CD79A (ZL7-4 de Serotec) e TAHO5/CD79B (CB-3 de BD Pharmingen), foram usados na citometria de fluxo.

Sumário de TAHO2 (CD20), TAHO (CD180), TAHO26 (CD22), TAHO4 (CD79A), TAHO5 (CD79B), TAHO8 (CD72), TAHO11 (CXCR5) em Células Normais

O padrão de expressão em subtipos classificados de tonsila-B foi realizado usando anticorpo monoclonal específico ao polipéptido TAHO de interesse. TAHO2 (CD20) (usando anti-CD20, 2H7 de BD Pharmingen), TAHO26 (CD22) (usando anti-CD22, RFB4 de Ancell), TAHO4 (CD79A) (usando anti-CD79A), TAHO5 (CD79B) (usando anti-CD79B), TAHO8 (CD72) (usando anti-CD72), TAHO1 (CD180) (usando anti-CD180, MHR73-11 de eBioscience) e TAHO11 (usando anti-CXCR5, 51505 de R&D Systems) mostraram expressão significativa em células B de memória, células foliculares do manto, centroblastos e centrócitos (dados não mostrados).

O padrão de expressão em células plasmáticas da tonsila foi realizado usando anticorpo monoclonal específico ao polipéptido TAHO de interesse. TAHO26 (CD22)

(usando anti-CD22, RFB4 de Ancell), TAHO4 (CD79A) (usando anti-CD79A), TAHO5 (CD79B) (usando anti-CD79B), TAHO1 (CD180) (usando anti-CD180, MHR73-11 de eBioscience) e TAHO8 (CD72) (usando anti-CD72)) mostraram expressão significativa em células plasmáticas (dados não mostrados).

Consequentemente, em vista do padrão de expressão de TAHO2, TAHO1, TAH026, TAHO4, TAHO5, TAHO8 e TAHO11 em subtipos de tonsila-B como avaliado por FACS, as moléculas são excelentes alvos para a terapêutica de tumores em mamíferos, incluindo cancros associados a célula B, tais como linfomas (isto é, Linfoma Não-Hodgkin), leucemias (isto é, leucemia linfocítica crónica), mielomas (isto é, mieloma múltiplo) e outros cancros de células hematopoiéticas.

B. Células CLL: TAHO11 (CXCR5), TAHO4 (CD79A), TAHO5 (CD79B), TAHO26 (CD22), TAHO12 (CD23/FCER2), TAHO1 (CD180)

Os seguintes mAbs purificados ou conjugados com fluorocromo foram usados para a citometria de fluxo de amostras de CLL: CD5-PE, CD 19-PerCP Cy5,5, CD20-FITC, CD20-APC (comercialmente disponíveis de BD Pharmingen). Além disso, anticorpos biotinilados comercialmente disponíveis contra CD22 (RFB4 de Ancell), CD23 (M-L233 de BD Pharmingen), CD79A (ZL7-4 de Serotec), CD79B (CB-3 de BD Pharmingen), CD180 (MHR73-11 de eBioscience), CXCR5 (51505 de R&D Systems) foram usados para a citometria de fluxo. Os anticorpos CD5, CD19 e CD20 foram usados para ligar a células CLL e a coloração PI foi realizada para verificar a viabilidade celular.

As células (10^6 células em 100 ml de volume) foram primeiro incubadas com 1 mg de cada um dos anticorpos CD5, CD19 e CD20 e 10 mg cada uma das gama globulina humana e de

ratinho (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) para bloquear a ligação não específica, então incubadas com concentrações ótimas de mAbs durante 30 minutos no escuro a 4 °C. Quando anticorpos biotinilados foram usados, estreptavidina-PE ou estreptavidina-APC (Jackson ImunoResearch Laboratories) foram então adicionados de acordo com instruções de fabricante. A citometria de fluxo foi realizada num FACS calibur (BD Biosciences, San Jose, CA). Os sinais dispersão direta (FSC) e dispersão lateral (SSC) foram registados em modo linear, os sinais de fluorescência em modo logarítmico. As células mortas e restos de células foram retirados por ligação usando as propriedades de dispersão das células. Os dados foram analisados usando CellQuest Pro software (BD Biosciences) e FlowJo (Tree Star Inc.).

Sumário de TAHO11 (CXCR5), TAHO4 (CD79A), TAHO5 (CD79B), TAHO26 (CD22), TAHO12 (CD23/FCER2), TAHO1 (CD180) em Amostras de CLL

O padrão de expressão em amostras de CLL foi realizado usando anticorpo monoclonal específico ao polipéptido TAHO de interesse. TAHO11 (CXCR5), TAHO4 (CD79A), TAHO5 (CD79B), TAHO26 (CD22), TAHO12 (CD23/FCER2), TAHO1 (CD180) mostraram expressão significativa em amostras de CLL (dados não mostrados).

Consequentemente, em vista do padrão de expressão de TAHO11, TAHO4, TAHO5, TAHO26, TAHO12 e TAHO1 em amostras de leucemia linfocítica crónica (CLL) conforme avaliado por FACS, as moléculas são excelentes alvos para a terapêutica de tumores em mamíferos, incluindo cancros associados a célula B, tais como linfomas (isto é, Linfoma Não-Hodgkin), leucemias (isto é, leucemia linfocítica crónica), mielomas (isto é, mieloma múltiplo) e outros cancros de células

hematopoiéticas.

Exemplo 15: Internalização de TAHO

A internalização dos anticorpos de TAHO em linhas de célula B foi avaliada em linhas de célula Raji, Ramos, Daudi e outras linhas de célula B, incluindo linhas de célula ARH77, SuDHL4, U698M, huB e BJAB.

Um disco pronto para dividir de 15 cm de células B (~ 50 x 10^6 células) com células para utilização em até 20 reações foi usado. As células estavam abaixo da passagem 25 (menos de 8 semanas de idade) e a crescer saudavelmente sem qualquer micoplasma.

Num tubo Falcon tapado frouxamente de 15 ml adiciona-se 1 µg/ml de anticorpo anti-TAHO de ratinho a 2,5 x 10^6 células em 2 ml de meio de crescimento normal (por exemplo, RPMI/10 % de FBS/1 % de glutamina) contendo 1:10 bloco FcR (kit MACS, dialisado para remover azida), 1 % de pen/estrep, 5 µM de pepstatina A, 10 µg/ml de leupeptina (inibidores de protease lisossómica) e 25 µg/ml de Alexa488-transferrina (que marcaram a via de reciclagem e indicaram quais células estavam vivas; alternativamente marcador de fase de fluido de dextrano Ax488 pode ser usado para marcar todas as vias) durante 24 horas num incubador de CO_2 a 5 % a 37 °C. Para internalizar rapidamente anticorpos, pontos de tempo a cada 5 minutos foram tomados. Para os pontos de tempo tomados em menos de 1 hora, 1 ml de meio completo livre de carbonato (Gibco 18045-088 +10 % de FBS, 1 % de glutamina, 1 % de pen/strop, 10 mM de HEPES pH 7,4) foi usado e as reações foram realizadas num banho de água a 37 °C ao invés do incubador de CO_2.

Após completar o curso do tempo, as células foram

colhidas por centrifugação (1500 rpm a 4 °C durante 5 minutos em G6-SR ou 2500 rpm durante 3 minutos em centrífuga eppendorf de bancada a 4 °C), lavado uma vez em 1,5 ml meio livre de carbonato (em Eppendorfs) ou 10 ml de meio para tubos Falcon de 15 ml. As células foram submetidas a uma segunda centrifugação e ressuspensas em 0,5 ml de paraformaldeído a 3 % (EMS) em PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir a fixação das células.

Todas as etapas seguintes são seguidas por uma colheita das células via centrifugação. As células foram lavadas em PBS e então extintas durante 10 minutos em 0,5 ml de NH_4Cl a 50 mM (Sigma) em PBS e permeabilizadas com 0,5 ml de Triton-X-100 a 0,1 % em PBS durante 4 minutos durante uma rotação de centrifugação de 4 minutos. As células foram lavadas em PBS e submetidas a centrifugação. 1 µg/ml de Cy3-anti ratinho (ou 1° anticorpo anti-espécie foi) foi adicionado para detetar absorção do anticorpo em 200 µl meio completo livre de carbonato durante 20 minutos a temperatura ambiente. As células foram lavadas duas vezes em meio livre de carbonato e ressuspensas em 25 µl de meio livre de carbonato e as células foram deixadas para que assentassem como uma gota num poço de uma lâmina LabtekII revestida com polilisina de 8 poços durante pelo menos uma hora (ou durante a noite em frigorífico). Quaisquer células não ligadas foram aspiradas e as lâminas foram montadas com uma gota por poço de Vetashield contendo DAPI sob uma lamela cobre-objetos de 50x24 mm. As células foram examinadas sob objetivo de 100x para a internalização dos anticorpos.

Sumário

(1) TAHO25/CD19 (conforme detetado usando anticorpo anti-

CD19 Biomeda CB-19) foi internalizado em 20 minutos em células Ramos e Daudi, chegando em lisossomas por 1 hora. Em células Raji e ARH77, a internalização de TAHO25/CD19 não foi detetável em 20 horas.

(2) Internalização significativa de TAHO6/CR2 (conforme detetado usando anticorpo anti-CR2 ATCC HB-135) não foi detetável em células Raji e em células Daudi em 20 horas.

(3) TAHO26/CD22 (conforme detetado usando anticorpo anti-CD22 Leinco RFB4) foi internalizado em 5 minutos em células Raji, em 5 minutos em células Ramos, em 5 minutos em células Daudi, e em 5 minutos em células ARH77 e foi administrado aos lisossomas em 1 hora. TAHO26/CD22 (conforme detetado usando anticorpos anti-CD22, DAKO To15, Diatec 157, Sigma HIB-22 ou Monosan BL-BC34) foi internalizado em 5 minutos em células Raji e foi administrado aos lisossomas em 1 hora.

(4) Internalização significativa de TAHO12/FCER2 (conforme detetado usando anticorpo anti-FCER2 Ancell BU38 ou Serotec D3.6) não foi detetável em células ARH77 em 20 horas.

(5) Internalização significativa de TAHO8/CD72 (conforme detetado usando anticorpo anti-CD72 BD Pharmingen J4-117) não foi detetável em 20 horas em células SuDHL4.

(6) TAHO4/CD79a (conforme detetado usando anticorpo anti-CD79a Serotec ZL7-4) foi internalizado em 1 hora em células Ramos, em 1 hora em células Daudi e em 1 hoora em céluals SuDHL4, e foi distribuído a lisossomas em 3 horas.

(7) TAHO I/CD180 (conforme detetado usando anticorpo anti-CD180 BD Pharmingen G28-8) foi internalizado em 5 minutos em células SuDHL4 e foi distrubuído a lisossomas em 20 horas.

(8) Internalização significativa de TAHO11/CXCR5 (conforme detetado usando anticorpo anti-CXCR5 R&D Systems 51505) não foi detetável em 20 horas em céluals

U698M.

(9) TAHO5/CD79b (conforme detetado usando anticorpo anti-CD79b Ancell SN8) internaliza em 20 minutes em células Ramos, Daudi e SuDHL4 e é distrubuído a lisossomas em 1 hora.

Consequentemente, em vista da internalização de TAHO25, TAHO26, TAHO4, TAHO1 e TAHO5 em linhas de célula B conforme avaliado por immunofluorescência usando respetivos anticorpos anti-TAHO, as moléculas são excelentes alvos para a terapêutica de tumores em mamíferos, incluindo cancros associados a célula B, tais como linfomas (isto é, Linfoma Não-Hodgkin), leucemias (isto é, leucemia linfocítica crónica), mielomas (isto é, mieloma múltiplo) e outros cancros de células hematopoiéticas.

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- US 4275149 A **[0064]**
- US 4816567 A **[0077] [0078] [0113] [0123] [0125]**
- US 5641870 A **[0080] [0133]**
- EP 404097 A **[0085]**
- WO 9311161 A **[0085]**
- US 5556762 A **[0088] [0168]**
- US 5750373 A **[0088] [0168]**
- US 4708871 A **[0088] [0168]**
- US 4833092 A **[0088] [0168]**
- US 5223409 A **[0088] [0168] [0169]**
- US 5403484 A **[0088] [0168] [0169]**
- US 5571689 A **[0088] [0168] [0169]**
- US 5663143 A **[0088] [0168] [0169]**
- WO 8403506 A **[0088] [0168]**
- WO 8403564 A **[0088] [0168]**
- WO 0000823 A **[0089] [0173]**
- WO 0039585 A **[0089] [0173]**
- US 5500362 A **[0094]**
- US 5821337 A **[0094] [0135]**
- WO 9845479 A **[0102]**
- US 4933294 A **[0102]**
- WO 9105264 A **[0102]**
- US 5401638 A **[0102]**
- US 5545806 A **[0129]**

- US 5569825 A **[0129]**
- US 5591669 A **[0129]**
- US 5545807 A **[0129]**
- WO 9717852 A **[0129]**
- US 5565332 A **[0130]**
- US 5573905 A **[0130]**
- US 5567610 A **[0131]**
- US 5229275 A **[0131]**
- US 5869046 A **[0133]**
- WO 9316185 A **[0133]**
- US 5571894 A **[0133]**
- US 5587458 A **[0133]**
- WO 9616673 A **[0135]**
- US 5837234 A **[0135]**
- WO 9802463 A **[0135]**
- WO 9308829 A **[0136]**
- WO 9404690 A **[0138]**
- US 5731168 A **[0139]**
- US 4676980 A **[0140] [0144]**
- WO 9100360 A **[0140] [0144]**
- WO 92200373 A **[0140] [0144]**
- EP 03089 A **[0140] [0144]**
- US 5739277 A **[0147]**
- WO 9411026 A **[0149] [0164]**
- US 3896111 A **[0152]**
- US 4151042 A **[0152]**
- US 4137230 A **[0152]**
- US 4248870 A **[0152]**
- US 4256746 A **[0152]**
- US 4260608 A **[0152]**
- US 4265814 A **[0152]**
- US 4294757 A **[0152]**
- US 4307016 A **[0152]**
- US 4308268 A **[0152]**
- US 4308269 A **[0152]**

- US 4309428 A **[0152]**
- US 4313946 A **[0152]**
- US 4315929 A **[0152]**
- US 4317821 A **[0152]**
- US 4322348 A **[0152]**
- US 4331598 A **[0152]**
- US 4361650 A **[0152]**
- US 4364866 A **[0152]**
- US 4424219 A **[0152]**
- US 4450254 A **[0152]**
- US 4362663 A **[0152]**
- US 4371533 A **[0152]**
- US 5208020 A **[0153] [0154] [0155] [0164]**
- US 5416064 A **[0153]**
- EP 0425235 B1 **[0153] [0155]**
- US 5712374 A **[0158]**
- US 5714586 A **[0158]**
- US 5739116 A **[0158]**
- US 5767285 A **[0158]**
- US 5770701 A **[0158]**
- US 5770710 A **[0158] [0159]**
- US 5773001 A **[0158]**
- US 5877296 A **[0158] [0159]**
- US 5053394 A **[0159]**
- WO 9321232 A **[0160]**
- US 4485045 A **[0166]**
- US 4544545 A **[0166]**
- WO 9738731 A **[0166]**
- US 5013556 A **[0166] [0288]**
- WO 9534683 A **[0170]**
- US 5627024 A **[0170]**
- US 5766905 A **[0170]**
- WO 9814277 A **[0171]**
- WO 9820169 A **[0171]**
- WO 9820159 A **[0171]**

- WO 9820036 A **[0171]**
- WO 9735196 A **[0171]**
- WO 9746251 A **[0171]**
- WO 9747314 A **[0171]**
- WO 9709446 A **[0171]**
- US 5498538 A **[0171]**
- US 5432018 A **[0171] [0172]**
- WO 9815833 A **[0171]**
- US 5723286 A **[0172]**
- US 5580717 A **[0172]**
- US 5427908 A **[0172]**
- US 5498530 A **[0172]**
- US 5770434 A **[0172]**
- US 5734018 A **[0172]**
- US 5698426 A **[0172]**
- US 5763192 A **[0172]**
- US 5723323 A **[0172]**
- WO 8101145 A **[0178]**
- WO 8807378 A **[0178]**
- US 4975278 A **[0178]**
- US 5364934 A **[0185]**
- WO 8705330 A **[0201]**
- US 4640835 A **[0203]**
- US 4496689 A **[0203]**
- US 4301144 A **[0203]**
- US 4670417 A **[0203]**
- US 4791192 A **[0203]**
- US 4179337 A **[0203]**
- US 5428130 A **[0206]**
- WO 8905859 A **[0214]**
- US 4399216 A **[0214]**
- DD 266710 **[0215]**
- US 4946783 A **[0215]**
- US 5648237 A, Carter **[0216]**
- US 5789199 A, Joly **[0216]**

- US 5840523 A, Simmons **[0216]**
- EP 139383 A **[0217]**
- US 4943529 A **[0217]**
- EP 402226 A **[0217]**
- EP 183070 A **[0217]**
- EP 244234 A **[0217]**
- EP 394538 A **[0217]**
- WO 9100357 A **[0217]**
- US 5010182 A **[0222]**
- EP 362179 A **[0222]**
- WO 9013646 A **[0222]**
- EP 36776 A **[0226]**
- EP 73657 A **[0228]**
- GB 2211504 A **[0229]**
- EP 117060 A **[0232]**
- EP 117058 A **[0232]**
- US 4767704 A **[0233]**
- US 4657866 A **[0233]**
- US 4927762 A **[0233]**
- US 4560655 A **[0233]**
- US 5122469 A **[0233]** **[0380]**
- WO 9003430 A **[0233]**
- WO 8700195 A **[0233]**
- US RE30985 E **[0233]**
- US 3773919 A **[0244]**
- EP 0600517 A **[0251]**
- EP 616812 A **[0257]**
- WO 9607321 A **[0260]**
- US 4892538 A **[0261]**
- US 5283187 A **[0261]**
- WO 9325673 A **[0262]**
- WO 9106629 A **[0276]**
- US 3687808 A **[0278]** **[0285]**
- US 4469863 A **[0278]**
- US 4476301 A **[0278]**

- US 5023243 A **[0278]**
- US 5177196 A **[0278]**
- US 5188897 A **[0278]**
- US 5264423 A **[0278]**
- US 5276019 A **[0278]**
- US 5278302 A **[0278]**
- US 5286717 A **[0278]**
- US 5321131 A **[0278]**
- US 5399676 A **[0278]**
- US 5405939 A **[0278]**
- US 5453496 A **[0278]**
- US 5455233 A **[0278]**
- US 5466677 A **[0278] [0279]**
- US 5476925 A **[0278]**
- US 5519126 A **[0278]**
- US 5536821 A **[0278]**
- US 5541306 A **[0278]**
- US 5550111 A **[0278]**
- US 5563253 A **[0278]**
- US 5571799 A **[0278]**
- US 5587361 A **[0278]**
- US 5194599 A **[0278]**
- US 5565555 A **[0278]**
- US 5527899 A **[0278]**
- US 5721218 A **[0278]**
- US 5672697 A **[0278]**
- US 5625050 A **[0278]**
- US 5034506 A **[0279] [0281]**
- US 5166315 A **[0279]**
- US 5185444 A **[0279]**
- US 5214134 A **[0279]**
- US 5216141 A **[0279]**
- US 5235033 A **[0279]**
- US 5264562 A **[0279]**
- US 5264564 A **[0279]**

- US 5405938 A **[0279]**
- US 5434257 A **[0279]**
- US 5470967 A **[0279]**
- US 5489677 A **[0279] [0281]**
- US 5541307 A **[0279]**
- US 5561225 A **[0279]**
- US 5596086 A **[0279]**
- US 5602240 A **[0279] [0281]**
- US 5610289 A **[0279]**
- US 5608046 A **[0279] [0286]**
- US 5618704 A **[0279]**
- US 5623070 A **[0279]**
- US 5663312 A **[0279]**
- US 5633360 A **[0279]**
- US 5677437 A **[0279]**
- US 5792608 A **[0279]**
- US 5646269 A **[0279]**
- US 5677439 A **[0279]**
- US 5539082 A **[0280]**
- US 5714331 A **[0280]**
- US 5719262 A **[0280]**
- WO 9839352 A **[0283]**
- WO 9914226 A **[0283]**
- US 4981957 A **[0284]**
- US 5118800 A **[0284]**
- US 5319080 A **[0284]**
- US 5359044 A **[0284]**
- US 5393878 A **[0284]**
- US 5446137 A **[0284]**
- US 5466786 A **[0284]**
- US 5514785 A **[0284] [0286]**
- US 5519134 A **[0284]**
- US 5567811 A **[0284]**
- US 5576427 A **[0284]**
- US 5591722 A **[0284]**

- US 5597909 A **[0284]**
- US 5610300 A **[0284]**
- US 5627053 A **[0284]**
- US 5639873 A **[0284]**
- US 5646265 A **[0284]**
- US 5658873 A **[0284]**
- US 5670633 A **[0284]**
- US 5792747 A **[0284]**
- US 5700920 A **[0284]**
- US 4845205 A **[0285]**
- US 5130302 A **[0285]**
- US 5134066 A **[0285]**
- US 5175273 A **[0285]**
- US 5367066 A **[0285]**
- US 5432272 A **[0285]**
- US 5457187 A **[0285]**
- US 5459255 A **[0285]**
- US 5484908 A **[0285]**
- US 5502177 A **[0285]**
- US 5525711 A **[0285]**
- US 5552540 A **[0285]**
- US 5587469 A **[0285]**
- US 5594121 A **[0285]**
- US 5596091 A **[0285]**
- US 5614617 A **[0285]**
- US 5645985 A **[0285]**
- US 5830653 A **[0285]**
- US 5763588 A **[0285]**
- US 6005096 A **[0285]**
- US 5681941 A **[0285]**
- US 5750692 A **[0285]**
- US 33413099 A **[0286]**
- US 4828979 A **[0286]**
- US 4948882 A **[0286]**
- US 5218105 A **[0286]**

- US 5525465 A **[0286]**
- US 5541313 A **[0286]**
- US 5545730 A **[0286]**
- US 5552538 A **[0286]**
- US 5578717 A **[0286]**
- US 5580731 A **[0286]**
- US 5591584 A **[0286]**
- US 5109124 A **[0286]**
- US 5118802 A **[0286]**
- US 5138045 A **[0286]**
- US 5414077 A **[0286]**
- US 5486603 A **[0286]**
- US 5512439 A **[0286]**
- US 5578718 A **[0286]**
- US 4587044 A **[0286]**
- US 4605735 A **[0286]**
- US 4667025 A **[0286]**
- US 4762779 A **[0286]**
- US 4789737 A **[0286]**
- US 4824941 A **[0286]**
- US 4835263 A **[0286]**
- US 4876335 A **[0286]**
- US 4904582 A **[0286]**
- US 4958013 A **[0286]**
- US 5082830 A **[0286]**
- US 5112963 A **[0286]**
- US 5214136 A **[0286]**
- US 5245022 A **[0286]**
- US 5254469 A **[0286]**
- US 5258506 A **[0286]**
- US 5262536 A **[0286]**
- US 5272250 A **[0286]**
- US 5292873 A **[0286]**
- US 5317098 A **[0286]**
- US 5371241 A **[0286]**

- US 5391723 A **[0286]**
- US 5416203 A **[0286]**
- US 5451463 A **[0286]**
- US 5510475 A **[0286]**
- US 5512667 A **[0286]**
- US 5565552 A **[0286]**
- US 5567810 A **[0286]**
- US 5574142 A **[0286]**
- US 5585481 A **[0286]**
- US 5587371 A **[0286]**
- US 5595726 A **[0286]**
- US 5597696 A **[0286]**
- US 5599923 A **[0286]**
- US 5599928 A **[0286]**
- US 5688941 A **[0286]**
- US 5013830 A **[0287]**
- US 5149797 A **[0287]**
- US 5220007 A **[0287]**
- US 5256775 A **[0287]**
- US 5366878 A **[0287]**
- US 5403711 A **[0287]**
- US 5491133 A **[0287]**
- US 5565350 A **[0287]**
- US 5623065 A **[0287]**
- US 5652355 A **[0287]**
- US 5652356 A **[0287]**
- US 5700922 A **[0287]**
- US 5108921 A **[0288]**
- US 5354844 A **[0288]**
- US 5416016 A **[0288]**
- US 5459127 A **[0288]**
- US 5521291 A **[0288]**
- US 5543158 A **[0288]**
- US 5547932 A **[0288]**
- US 5583020 A **[0288]**

- US 5591721 A **[0288]**
- US 4426330 A **[0288]**
- US 4534899 A **[0288]**
- US 5213804 A **[0288]**
- US 5227170 A **[0288]**
- US 5264221 A **[0288]**
- US 5356633 A **[0288]**
- US 5395619 A **[0288]**
- US 5417978 A **[0288]**
- US 5462854 A **[0288]**
- US 5469854 A **[0288]**
- US 5512295 A **[0288]**
- US 5527528 A **[0288]**
- US 5534259 A **[0288]**
- US 5543152 A **[0288]**
- US 5556948 A **[0288]**
- US 5580575 A **[0288]**
- US 5595756 A **[0288]**
- WO 9010048 A **[0289]**
- WO 9013641 A **[0290]**
- WO 9104753 A **[0291]**
- WO 9010448 A **[0292]**
- US 4736866 A **[0297]**
- US 4870009 A **[0297]**
- WO 9733551 A **[0315] [0316]**
- EP 307247 A **[0370]**

Documentos de não patente citados na descrição

- **BORING et al.** *CA Cancel J. Clin.*, 1993, vol. 43, 7 **[0002]**
- **NIELSEN et al.** *Prot. Eng.*, 1997, vol. 10, 1-6 **[0036]**
- **VON HEINJE et al.** *Nucl. Acids. Res.*, 1986, vol. 14, 4683-4690 **[0036]**
- **SAMBROOK et al.** Molecular Cloning: A Laboratory

Manual. Cold Spring Harbor Press, 1989 **[0052]**

- Basic and Clinical Immunology. Appleton & Lange, 1994, 71 **[0073]**
- **KABAT et al.** Sequences of Proteins of Immunological Interest. Public Health Service, National Institutes of Health, 1991 **[0075] [0076]**
- **CHOTHIA.** *J. Mol. Biol.,* 1987, vol. 196, 901-917 **[0076]**
- **KOHLER et al.** *Nature,* 1975, vol. 256, 495 **[0077] [0113]**
- **CLACKSON et al.** *Nature,* 1991, vol. 352, 624-628 **[0077] [0122] [0130]**
- **MARKS et al.** *J. Mol. Biol.,* 1991, vol. 222, 581-597 **[0077] [0122] [0130]**
- **MORRISON et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1984, vol. 81, 6851-6855 **[0078]**
- **ZAPATA et al.** *Protein Eng.,* 1995, vol. 8 (10), 1057-1062, Protein Eng. **[0080]**
- **PLUCKTHUN.** The Pharmacology of Monoclonal Antibodies. Springer-Verlag, 1994, vol. 113, 269-315 **[0084]**
- **HOLLINGER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1993, vol. 90, 6444-6448 **[0085] [0142]**
- **JONES et al.** *Nature,* 1986, vol. 321, 522-525 **[0086] [0124] [0125]**
- **RIECHMANN et al.** *Nature,* 1988, vol. 332, 323-329 **[0086] [0124]**
- **PRESTA.** *Curr. Op. Struct. Biol.,* 1992, vol. 2, 593-596 **[0086] [0124]**
- **GEYSEN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* 1984, vol. 81, 3998-4002 **[0088] [0168]**
- **GEYSEN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* 1985, vol. 82, 178-182 **[0088] [0168]**
- **GEYSEN et al.** *Synthetic Peptides as Antigens,* 1986, 130-149 **[0088] [0168]**
- **GEYSEN et al.** *J. Immunol. Meth.,* 1987, vol. 102, 259-274 **[0088] [0168]**

- **SCHOOFS et al.** *J. Immunol.,* 1988, vol. 140, 611-616 **[0088] [0168]**
- **CWIRLA, S. E. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1990, vol. 87, 6378 **[0088] [0168] [0169]**
- **LOWMAN, H.B. et al.** *Biochemistry,* 1991, vol. 30, 10832 **[0088] [0168] [0169]**
- **CLACKSON, T. et al.** *Nature,* 1991, vol. 352, 624 **[0088] [0168] [0169]**
- **MARKS, J. D. et al.** *J. Mol. Biol.,* 1991, vol. 222, 581 **[0088] [0168] [0169]**
- **KANG, A.S. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1991, vol. 88, 8363 **[0088] [0168] [0169]**
- **SMITH, G. P.** *Current Opin. Biotechnol.,* 1991, vol. 2, 668 **[0088] [0168] [0169]**
- **RAVETCH ; KINET.** *Annu. Rev. Immunol.,* 1991, vol. 9, 457-92 **[0094]**
- **M.** *Daëron, Annu. Rev. Immunol.,* 1997, vol. 15, 203-234 **[0095]**
- **RAVETCH ; KINET.** *Annu. Rev. Immunol.,* 1991, vol. 9, 457-492 **[0095]**
- **CAPEL et al.** *Immunomethods,* 1994, vol. 4, 25-34 **[0095]**
- **DE HAAS et al.** *J. Lab. Clin. Med.,* 1995, vol. 126, 330-41 **[0095]**
- **GUYER et al.** *J. Immunol.,* 1976, vol. 117, 587 **[0095]**
- **KIM et al.** *J. Immunol.,* 1994, vol. 24, 249 **[0095]**
- **GAZZANO-SANTORO et al.** *Immunol. Methods,* 1996, vol. 202, 163 **[0097]**
- **MOORE et al.** *Cytotechnology,* 1995, vol. 17, 1-11 **[0101]**
- **SIAS et al.** *J. Immunol. Methods,* 1990, vol. 132, 73-80 **[0102]**
- Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs. **MURAKAMI et al.** The Molecular Basis of Cancer. WB Saunders, 1995, 13 **[0106]**
- Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and

Practice. Academic Press, 1986, 59-103 **[0114]**

- **KOZBOR.** *J. Immunol.,* 1984, vol. 133, 3001 **[0116]**
- **BRODEUR et al.** Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications. Marcel Dekker, Inc, 1987, 51-63 **[0116]**
- **MUNSON et al.** *Anal. Biochem.,* 1980, vol. 107, 220 **[0118]**
- **GODING.** Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Academic Press, 1986, 59-103 **[0119]**
- **SKERRA et al.** *Curr. Opinion in Immunol.,* 1993, vol. 5, 256-262 **[0121]**
- **PLIICKTHUN.** *Immunol. Revs.,* 1992, vol. 130, 151-188 **[0121]**
- **MCCAFFERTY et al.** *Nature,* 1990, vol. 348, 552-554 **[0122]**
- **MARKS et al.** *Bio/Technology,* 1992, vol. 10, 779-783 **[0122]**
- **WATERHOUSE et al.** *Nuc. Acids. Res.,* 1993, vol. 21, 2265-2266 **[0122]**
- **MORRISON et al.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA,* 1984, vol. 81, 6851 **[0123]**
- **RIECHMANN et al.** *Nature,* 1988, vol. 332, 323-327 **[0125]**
- **VERHOEYEN et al.** *Science,* 1988, vol. 239, 1534-1536 **[0125]**
- **SIMS et al.** *J. Immunol.,* 1993, vol. 151, 2296 **[0126]**
- **CHOTHIA et al.** *J. Mol. Biol.,* 1987, vol. 196, 901 **[0126]**
- **CARTER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1992, vol. 89, 4285 **[0126]**
- **PRESTA et al.** *J. Immunol.,* 1993, vol. 151, 2623 **[0126]**
- **JAKOBOVITS et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1993, vol. 90, 2551 **[0129]**
- **JAKOBOVITS et al.** *Nature,* 1993, vol. 362, 255-258 **[0129]**

- **BRUGGEMANN et al.** *Year in Immuno.,* 1993, vol. 7, 33 **[0129]**
- **MCCAFFERTY et al.** *Nature,* 1990, vol. 348, 552-553 **[0130]**
- **JOHNSON, KEVIN S. ; CHISWELL, DAVID J.** *Current Opinion in Structural Biology,* 1993, vol. 3, 564-571 **[0130]**
- **GRIFFITH et al.** *EMBO J.,* 1993, vol. 12, 725-734 **[0130]**
- **MORIMOTO et al.** *Journal of Biochemical and Bioohysical Methods,* 1992, vol. 24, 107-117 **[0133]**
- **BRENNAN et al.** *Science,* 1985, vol. 229, 81 **[0133] [0141]**
- **CARTER et al.** *Bio/Technology,* 1992, vol. 10, 163-167 **[0133]**
- Antibody Engineering **[0133]**
- **MILLSTEIN et al.** *Nature,* 1983, vol. 305, 537-539 **[0136]**
- **TRAUNECKER et al.** *EMBO J.,* 1991, vol. 10, 3655-3659 **[0136]**
- **SURESH et al.** *Methods in Enzymology,* 1986, vol. 121, 210 **[0138]**
- **SHALABY et al.** *J. Exp. Med.,* 1992, vol. 175, 217-225 **[0142]**
- **KOSTELNY et al.** *J. Immunol.,* 1992, vol. 148 (5), 1547-1553 **[0142]**
- **GRUBER et al.** *J. Immunol.,* 1994, vol. 152, 5368 **[0142]**
- **TUTT et al.** *J. Immunol.,* 1991, vol. 147, 60 **[0143]**
- **CARON et al.** *J. Exp Med.,* 1992, vol. 176, 1191-1195 **[0147]**
- **SHOPES, B.** *J. Immunol.,* 1992, vol. 148, 2918-2922 **[0147]**
- **WOLFF et al.** *Cancer Research,* 1993, vol. 53, 2560-2565 **[0147]**
- **STEVENSON et al.** *Anti-Cancer Drag Design,* 1989, vol. 3, 219-230 **[0147]**
- **VITETTA et al.** *Science,* 1987, vol. 238, 1098 **[0149]**

[0164]

- **LIU et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1996, vol. 93, 8618-8623 **[0153]**
- **CHARI et al.** *Cancer Research,* 1992, vol. 52, 127-131 **[0153] [0155] [0164]**
- **CARLSSON et al.** *Biochem. J.,* 1978, vol. 173, 723-737 **[0156]**
- **HINMAN et al.** *Cancer Research,* 1993, vol. 53, 3336-3342 **[0158]**
- **LODE et al.** *Cancer Research,* 1998, vol. 58, 2925-2928 **[0158]**
- **FRAKER et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* 1978, vol. 80, 49-57 **[0163]**
- Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy. Chatal,CRC Press, 1989 **[0163]**
- **EPSTEIN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1985, vol. 82, 3688 **[0166]**
- **HWANG et al.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA,* 1980, vol. 77, 4030 **[0166]**
- **MARTIN et al.** *J. Biol. Chem.,* 1982, vol. 257, 286-288 **[0167]**
- **GABIZON et al.** *J. National Cancer Inst.,* 1989, vol. 81 (19), 1484 **[0167]**
- **SCOTT, J.K. ; SMITH, G. P.** *Science,* 1990, vol. 249, 386 **[0169]**
- **REN et al.** *Gene,* 1998, vol. 215, 439 **[0170]**
- **ZHU et al.** *Cancer Research,* 1998, vol. 58 (15), 3209-3214 **[0170]**
- **JIANG et al.** *Infection & Immunity,* 1997, vol. 65 (11), 4770-4777 **[0170]**
- **REN et al.** *Gene,* 1997, vol. 195 (2), 303-311 **[0170]**
- **REN.** *Protein Sci.,* 1996, vol. 5, 1833 **[0170]**
- **EFIMOV et al.** *Virus Genes,* 1995, vol. 10, 173 **[0170]**
- **SMITH; SCOTT.** *Methods in Enzymology,* 1993, vol. 217, 228-257 **[0170]**

- **LI et al.** *Mol Biotech.,* 1998, vol. 9, 187 **[0171]**
- **ED HARLOW ; DAVID LANE.** Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 **[0177]**
- **MASSEY.** *Nature,* 1987, vol. 328, 457-458 **[0180]**
- **NEUBERGER et al.** *Nature,* 1984, vol. 312, 604-608 **[0181]**
- **CARTER et al.** *Nucl. Acids Res.,* 1986, vol. 13, 4331 **[0191]**
- **ZOLLER et al.** *Nucl. Acids Res.,* 1987, vol. 10, 6487 **[0191]**
- **WELLS et al.** *Gene,* 1985, vol. 34, 315 **[0191]**
- **WELLS et al.** *Philos. Trans. R. Soc. London SerA,* 1986, vol. 317, 415 **[0191]**
- **CUNNINGHAM ; WELLS.** *Science,* 1989, vol. 244, 1081-1085 **[0192]**
- **CREIGHTON.** The Proteins. W.H. Freeman & Co, **[0192]**
- **CHOTHIA.** *J. Mol. Biol.,* 1976, vol. 150, 1 **[0192]**
- **T.E. CREIGHTON.** Proteins: Structure and Molecular Properties. W.H. Freeman & Co, 1983, 79-86 **[0197]**
- **APLIN; WRISTON.** *CRC Crit. Rev. Biochem.,* 1981, 259-306 **[0201]**
- **HAKIMUDDIN et al.** *Arch. Biochem. Biophys.,* 1987, vol. 259, 52 **[0202]**
- **EDGE et al.** *Anal. Biochem.,* 1981, vol. 118, 131 **[0202]**
- **THOTAKURA et al.** *Meth. Enzymol.,* 1987, vol. 138, 350 **[0202]**
- Remington's Pharmaceutical Sciences. 1980 **[0203] [0243]**
- **FIELD et al.** *Mol. Cell. Biol.,* 1988, vol. 8, 2159-2165 **[0205]**
- **EVAN et al.** *Molecular and Cellular Biology,* 1985, vol. 5, 3610-3616 **[0205]**
- **PABORSKY et al.** *Protein Engineering,* 1990, vol. 3 (6), 547-553 **[0205]**
- **HOPP et al.** *BioTechnology,* 1988, vol. 6, 1204-1210

[0205]

- **MARTIN et al.** *Science,* 1992, vol. 255, 192-194 **[0205]**
- **SKINNER et al.** *J. Biol. Chem.,* 1991, vol. 266, 15163-15166 **[0205]**
- **LUTZ-FREYERMUTH et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1990, vol. 87, 6393-6397 **[0205]**
- **STEWART et al.** Solid-Phase Peptide Synthesis. W.H. Freeman Co, 1969 **[0207]**
- **MERRIFIELD.** *J. Am. Chem. Soc.,* 1963, vol. 85, 2149-2154 **[0207]**
- **SAMBROOK et al.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 **[0209]**
- **DIEFFENBACH et al.** PCR Primer: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995 **[0209]**
- Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach. IRL Press, 1991 **[0213]**
- **SHAW et al.** *Gene,* 1983, vol. 23, 315-5 **[0214]**
- **GRAHAM ; VAN DER EB.** *Virology,* 1978, vol. 52, 456-457 **[0214]**
- **VAN SOLINGEN et al.** *J. Bact.,* 1977, vol. 130, 946 **[0214]**
- **HSIAO et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA,* 1979, vol. 76, 3829 **[0214]**
- **KEOWN et al.** *Methods in Enzymology,* 1990, vol. 185, 527-537 **[0214]**
- **MANSOUR et al.** *Nature,* 1988, vol. 336, 348-352 **[0214]**
- **BEACH ; NURSE.** *Nature,* 1981, vol. 290, 140 **[0217]**
- **FLEER et al.** *Bio/Technology,* vol. 9, 968-975 **[0217]**
- **LOUVENCOURT et al.** *J. Bacteriol.,* 1983, vol. 154 (2), 737-742 **[0217]**
- **VAN DEN BERG et al.** *Bio/Technolosy,* 1990, vol. 8, 135 **[0217]**
- **SREEKRISHNA et al.** *J. Basic Microbiol.,* 1988, vol. 28, 265-278 **[0217]**

- **CASE et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1979, vol. 76, 5259-5263 **[0217]**
- **BALLANCE et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* 1983, vol. 112, 284-289 **[0217]**
- **TILBURN et al.** *Gene,* 1983, vol. 26, 205-221 **[0217]**
- **YELTON et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1984, vol. 81, 1470-1474 **[0217]**
- **KELLY; HYNES.** *EMBO J.,* 1985, vol. 4, 475-479 **[0217]**
- **C. ANTHONY.** *The Biochemistry of Methylotrophs,* 1982, 269 **[0217]**
- **GRAHAM et al.** *J. Gen Virol.,* 1977, vol. 36, 59 **[0219]**
- **URLAUB et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1980, vol. 77, 4216 **[0219] [0225]**
- **MATHER.** *Biol. Reared.,* 1980, vol. 23, 243-251 **[0219]**
- **MATHER et al.** Annals N.Y. Acad. Sci. 1982, vol. 383, 44-68 **[0219]**
- **STINCHCOMB et al.** *Nature,* 1979, vol. 282, 39 **[0225]**
- **KINGSMAN et al.** *Gene,* 1979, vol. 7, 141 **[0225]**
- **TSCHEMPER et al.** *Gene,* 1980, vol. 10, 157 **[0225]**
- **JONES.** *Genetics,* 1977, vol. 85, 12 **[0225]**
- **CHANG et al.** *Nature,* 1978, vol. 275, 615 **[0226]**
- **GOEDDEL et al.** *Nature,* 1979, vol. 281, 544 **[0226]**
- **GOEDDEL.** *Nucleic Acids Res.,* 1980, vol. 8, 4057 **[0226]**
- **DEBOER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1983, vol. 80, 21-25 **[0226]**
- **HITZEMAN et al.** *J. Biol. Chem.,* 1980, vol. 255, 2073 **[0227]**
- **HESS et al.** *J. Adv. Enzyme Reg.,* 1968, vol. 7, 149 **[0227]**
- **HOLLAND.** *Biochemistry,* 1978, vol. 17, 4900 **[0227]**
- **GETHING et al.** *Nature,* 1981, vol. 293, 620-625 **[0232]**
- **MANTEI et al.** *Nature,* 1979, vol. 281, 40-46 **[0232]**
- **HAM et al.** *Meth. Enz.,* 1979, vol. 58, 44 **[0233]**
- **BARNES et al.** *Anal. Biochem.,* 1980, vol. 102, 255 **[0233]**

- **THOMAS.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1980, vol. 77, 5201-5205 **[0234]**
- **DEUTSCHER.** *Methods in Enzymology,* 1990, vol. 182 **[0237]**
- Scopes Protein Purification: Principles and Practice. Springer-Verlag, 1982 **[0237]**
- **CARTER et al.** *Bio/ Technology,* 1992, vol. 10, 163-167 **[0238]**
- **LINDMARK et al.** *J. Immunol. Meth.,* 1983, vol. 62, 1-13 **[0239]**
- **GUSS et al.** *EMBO J.,* 1986, vol. 5, 15671575 **[0239]**
- **M.C. PERRY.** Chemotherapy Service. Williams & Wilkins, 1992 **[0256]**
- **ANDERSON et al.** *Science,* 1992, vol. 256, 808-813 **[0262] [0300]**
- **STEIN; COHEN.** *Cancer Res.,* 1988, vol. 48, 2659 **[0275]**
- **VAN DER KROL et al.** *BioTechnigues,* 1988, vol. 6, 958 **[0275]**
- **NIELSEN et al.** *Science,* 1991, vol. 254, 1497-1500 **[0280]**
- **MARTIN et al.** *Helv. Chim. Acta,* 1995, vol. 78, 486-504 **[0282]**
- The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering. John Wiley & Sons, 1990, 858-859 **[0285]**
- **ENGLISCH et al.** *Angewandte Chemie, International Edition,* 1991, vol. 30, 613 **[0285]**
- **SANGHVI et al.** Antisense Research and Applications. CRC Press, 1993, 276-278 **[0285]**
- **LETSINGER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1989, vol. 86, 6553-6556 **[0286]**
- **MANOHARAN et al.** *Bioorg. Med. Chem. Let.,* 1994, vol. 4, 1053-1060 **[0286]**
- **MANOHARAN et al.** *Ann. N.Y. Acad. Sci.,* 1992, vol. 660, 306-309 **[0286]**
- **MANOHARAN et al.** *Bioorg. Med. Chem. Let.,* 1993, vol.

3, 2765-2770 **[0286]**

- **OBERHAUSER et al.** *Nucl. Acids Res.,* 1992, vol. 20, 533-538 **[0286]**
- **SAISON-BEHMOARAS et al.** *EMBO J.,* 1991, vol. 10, 1111-1118 **[0286]**
- **KABANOV et al.** *FEBS Lett.,* 1990, vol. 259, 327-330 **[0286]**
- **SVINARCHUK et al.** *Biochimie,* 1993, vol. 75, 49-54 **[0286]**
- **MANOHARAN et al.** *Tetrahedron Lett.,* 1995, vol. 36, 3651-3654 **[0286]**
- **SHEA et al.** *Nucl. Acids Res.,* vol. 18, 3777-3783 **[0286]**
- **MANOHARAN et al.** *Nucleosides & Nucleotides,* 1995, vol. 14, 969-973 **[0286]**
- **MISHRA et al.** *Biochim. Biophys. Acta,* 1995, vol. 1264, 229-237 **[0286]**
- **THOMAS; CAPECCHI.** *Cell,* 1987, vol. 51, 503 **[0298]**
- **LI et al.** *Cell,* vol. 69, 915 **[0298]**
- **BRADLEY.** Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach. IRL, 1987, 113-152 **[0298]**
- **ZAMECNIK et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1986, vol. 83, 4143-4146 **[0299]**
- **DZAU et al.** *Trends in Biotechnology,* 1993, vol. 11, 205-210 **[0300]**
- **WU et al.** *J. Biol. Chem.,* 1987, vol. 262, 4429-4432 **[0300]**
- **WAGNER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1990, vol. 87, 3410-3414 **[0300]**
- **FIELDS; SONG.** *Nature,* 1989, vol. 340, 245-246 **[0307]**
- **CHIEN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1991, vol. 88, 9578-9582 **[0307]**
- **CHEVRAY ; NATHANS.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1991, vol. 89, 5789-5793 **[0307]**
- **COLIGAN et al.** Current Protocols in Immun. 1991, vol.

1 **[0309]**

- **LEE et al.** *Nud. Acids Res.*, 1979, vol. 6, 3073 **[0313]**
- **COONEY et al.** *Science*, 1988, vol. 241, 456 **[0313]**
- **DERVAN et al.** *Science*, 1991, vol. 251, 1360 **[0313]**
- **OKANO.** *Neurochem.*, 1991, vol. 56, 560 **[0313]**
- Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression. CRC Press, 1988 **[0313]**
- **ROSSI.** *Current Biology*, 1994, vol. 4, 469-471 **[0315]**
- **MARASCO et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 7889-7893 **[0320]**
- **LU; GILLETT.** *Cell Vision*, 1994, vol. 1, 169-176 **[0340]**
- **BOLIVAR et al.** *Gene*, 1977, vol. 2, 95 **[0360]**
- **THIMMAPPAYA et al.** *Cell*, 1982, vol. 31, 543 **[0371]**
- **SOMPARYRAC et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1981, vol. 12, 7575 **[0373]**
- **AUSUBEL et al.** Current Protocols of Molecular Biology. John Wiley and Sons, 1997 **[0378]**
- **LUCAS et al.** *Nucl. Acids Res.*, 1996, vol. 24 (9), 1774-1779 **[0378]**
- **O'REILLEY et al.** Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual. Oxford University Press, 1994 **[0391]**
- **RUPERT et al.** *Nature*, 1993, vol. 362, 175-179 **[0392]**

Lisboa,13 de Agosto de 2014

REIVINDICAÇÕES

1. Um anticorpo que se liga a um polipéptido que tem a sequência de aminoácidos da Figura 10, com ou sem seu péptido sinal associado, para utilização num método para o tratamento de linfoma folicular, linfoma de célula de manto ou linfoma de célula grande difusa, em que dito anticorpo é conjugado a um agente de inibição do crescimento ou agente citotóxico e é internalizado por e inibe o crescimento de uma célula de linfoma folicular, célula de linfoma de célula de manto ou célula de linfoma de célula grande difusa que expressa dito polipéptido.

2. Utilização de um anticorpo que se liga a um polipéptido que tem a sequência de aminoácidos da Figura 10, com ou sem seu péptido sinal associado, para o fabrico de um medicamento para o tratamento de linfoma folicular, linfoma de célula de manto ou linfoma de célula grande difusa, em que dito anticorpo é conjugado a um agente de inibição do crescimento ou agente citotóxico e é internalizado por e inibe o crescimento de uma célula de linfoma folicular, célula de linfoma de célula de manto ou célula de linfoma de célula grande difusa que expressa dito polipéptido.

3. O anticorpo para a utilização, de acordo com a reivindicação 1, ou a utilização de acordo com a reivindicação 2, em que o anticorpo é conjugado ao agente de inibição do crescimento ou agente citotóxico via um ligante.

4. A utilização, ou o anticorpo para a utilização, de acordo com a reivindicação 3, em que o ligante é um ligante sensível à peptidase.

5. A utilização, ou o anticorpo para a utilização, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que dito

anticorpo é um anticorpo monoclonal, ou é um fragmento de anticorpo, ou é um anticorpo quimérico ou um humanizado.

6. A utilização, ou o anticorpo para a utilização, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o anticorpo é conjugado a um agente de inibição do crescimento

7. A utilização, ou o anticorpo para a utilização, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o anticorpo é conjugado a um agente citotóxico.

8. A utilização, ou o anticorpo para a utilização, de acordo com a reivindicação 7, em que o agente citotóxico é selecionado a partir do grupo que consiste em toxinas, antibióticos, isótopos radioativos e enzimas nucleolíticas.

9. A utilização, ou o anticorpo para a utilização, de acordo com a reivindicação 8, em que a toxina é selecionada a partir do grupo que consiste em monometilauristatina (MMAE), maitansinoide e caliqueamicina.

10. A utilização, ou o anticorpo para a utilização, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, que é produzido em bactéria ou que é produzido em células CHO.

11. A utilização, ou o anticorpo para a utilização, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que dito tratamento compreende ainda dita célula sendo exposta a tratamento de radiação ou a um agente quimioterápico.

12. A utilização, ou o anticorpo para a utilização, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o tratamento provoca a morte da célula de linfoma folicular, célula de linfoma de célula de manto ou célula de linfoma de célula grande difusa.

13. A utilização, ou o anticorpo para a utilização, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a proteína tem a sequência de aminoácidos mostrada na Figura 10, com ou sem a sua sequência sinal.

14. A utilização, ou o anticorpo para a utilização, de acordo com a reivindicação 3, em que o anticorpo é conjugado a um maitansinoide e em que o ligante é selecionado a partir do grupo que consiste em sulfosuccinimidilo maleimidometilo ciclohexano carboxilato (SMCC) e N-succinimidil-4-(2-piridiltio) pentanoato (SPP).

15. A utilização, ou o anticorpo para a utilização, de acordo com a reivindicação 14, em que o ligante é SMCC.

16. A utilização, ou o anticorpo para a utilização de acordo com a reivindicação 14, em que o ligante é SPP.

17. A utilização, ou o anticorpo para a utilização, de acordo com a reivindicação 4, em que o anticorpo é conjugado com um maitansinoide e em que o ligante sensível à peptidase compreende um reagente de ligante de dipéptido valina-citrulina (vc) com um componente maleimida e um componente autoimolador paraaminobenzilcarbamoil (PAB) (MC-vc-PAB).

18. A utilização, ou o anticorpo para a utilização, de acordo com a reivindicação 3, em que o anticorpo é conjugado a monometillauristatina (MMAE) via vc-PAB.

Lisboa,13 de Agosto de 2014

FIGURA 9

DNA225786

CAGGGGACAGGCTGCAGCCGGTGCAGTTACACGTTTTCCTCCAAGGAGCCTCGGACGTTG
TCACGGGTTTGGGGTCGGGGACAGAGCAGTGACCATGGCCAGGCTGGCGTTGTCTCCTGT
GCCCAGCCACTGGATGGTGGCGTTGCTGCTGCTGCTCTCAGCTGAGCCAGTACCAGCAGC
CAGATCGGAGGACCGGTACCGGAATCCCAAAGGTAGTGCTTGTTCGCGGATCTGGCAGAG
CCCACGTTTCATAGCCAGGAAACGGGGCTTCACGGTGAAAATGCACTGCTACATGAACAG
CGCCTCCGGCAATGTGAGCTGGCTCTGGAAGCAGGAGATGGACGAGAATCCCCAGCAGCT
GAAGCTGGAAAAGGGCCGCATGGAAGAGTCCCAGAACGAATCTCTCGCCACCCTCACCAT
CCAAGGCATCCGGTTTGAGGACAATGGCATCTACTTCTGTCAGCAGAAGTGCAACAACAC
CTCGGAGGTCTACCAGGGCTGCGGCACAGAGCTGCGAGTCATGGGATTCAGCACCTTGGC
ACAGCTGAAGCAGAGGAACACGCTGAAGGATGGTATCATCATGATCCAGACGCTGCTGAT
CATCCTCTTCATCATCGTGCCTATCTTCCTGCTGCTGGACAAGGATGACAGCAAGGCTGG
CATGGAGGAAGATCACACCTACGAGGGCCTGGACATTGACCAGACAGCCACCTATGAGGA
CATAGTGACGCTGCGGACAGGGGAAGTGAAGTGGTCTGTAGGTGAGCACCCAGGCCAGGA
GTGAGAGCCAGGTCGCCCCATGACCTGGGTGCAGGCTCCCTGGCCTCAGTGACTGCTTCG
GAGCTGCCTGGCTCATGGCCCAACCCCTTTCCTGGACCCCCCAGCTGGCCTCTGAAGCTG
GCCCACCAGAGCTGCCATTTGTCTCCAGCCCCTGGTCCCCAGCTCTTGCCAAAGGGCCTG
GAGTAGAAGGACAACAGGGCAGCAACTTGGAGGGAGTTCTCTGGGGATGGACGGGACCCA
GCCTTCTGGGGGTGCTATGAGGTGATCCGTCCCCACACATGGGATGGGGGAGGCAGAGAC
TGGTCCAGAGCCCGCAAATGGACTCGGAGCCGAGGGCCTCCCAGCAGAGCTTGGGAAGGG
CCATGGACCCAACTGGGCCCCAGAAGAGCCACAGGAACATCATTCCTCTCCCGCAACCAC
TCCCACCCCAGGGAGGCCCTGGCCTCCAGTGCCTTCCCCCGTGGAATAAACGGTGTGTCC
TGAGAAACCA

FIGURA 10

DNA225786

></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA225786
>< subunidade 1 de 1, 229 aa, 1 parada
>< PM: 26048, pI: 5.86, NX(S/T): 4

MARLALSPVPSHWMVALLLLLSAEPVPAARSEDRYRNPKGSACSRIWQSPRFIARKRGFT
VKMHCYMNSASGNVSWLWKQEMDENPQQLKLEKGRMEESQNESLATLTIQGIRFEDNGIY
FCQQKCNNTSEVYQGCGTELRVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLL
LDKDDSKAGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE

Sequência de sinal.
aminoácidos 1-28.

Domínio transmembrana.
aminoácidos 5-25, 159-179.

Domínio de imunoglobulina
aminoácidos 58-124.

Motivo de activação imunoreceptor baseado em tirosina.
aminoácidos 193-213.

Local de N-glicolisação.
aminoácidos 73-76, 101-104, 127-130, 128-131.

Local de fosforilação de proteína cinase C.
aminoácidos 49-51, 60-62, 156-158, 212-214.

Local de fosforilação de caseína cinase II.
aminoácidos 99-102, 156-159, 206-209, 221-224.

Local de fosforilação de tirosina cinase.
aminoácidos 113-120.

Local de N-miristoilação.
aminoácidos 40-45, 118-123.

FIGURA 77A

TAHO5/DNA225786/CD79B

CD79B

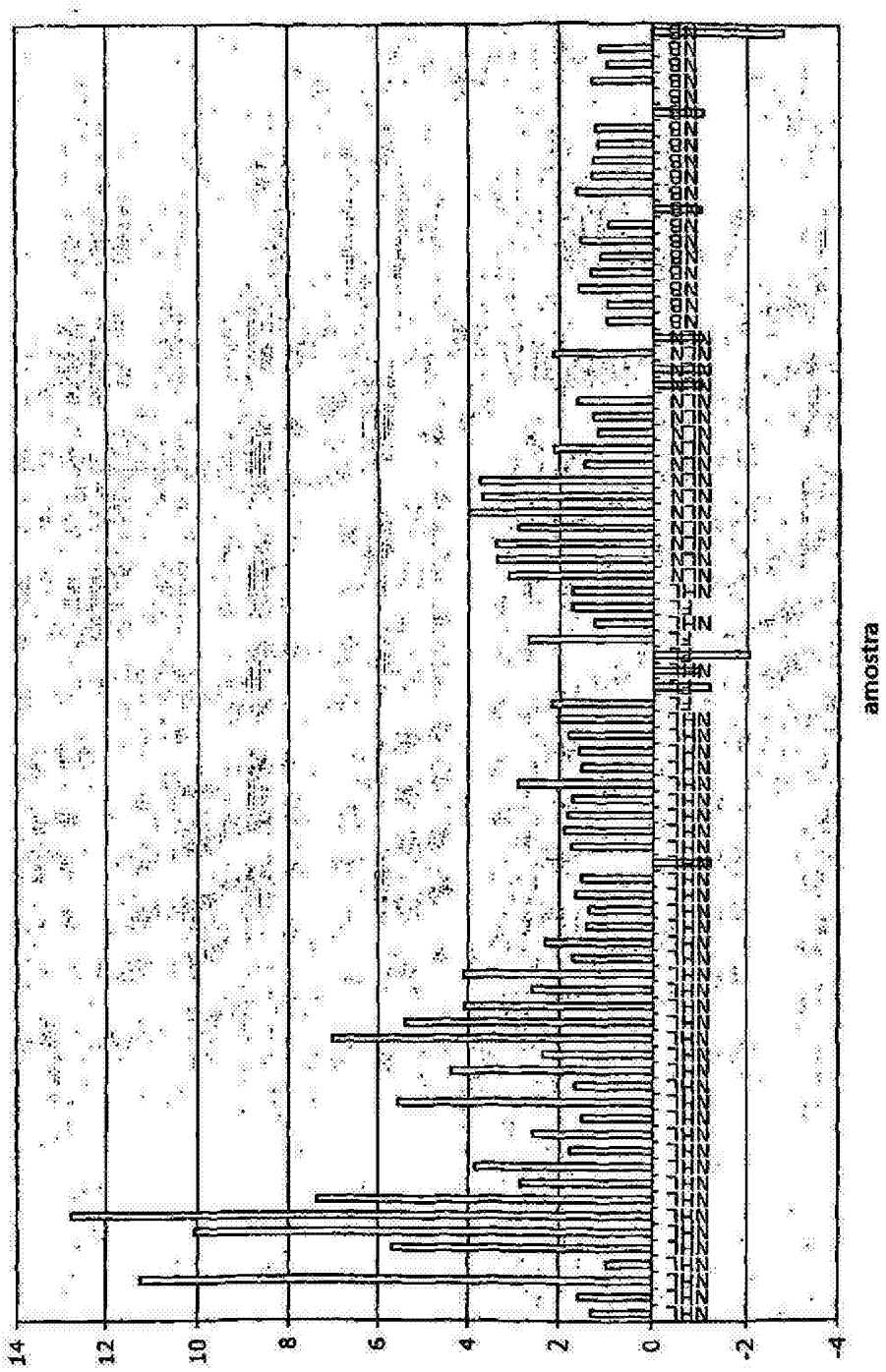


FIGURA 77B

CD79B

TAHO5/DNA225786/CD79B

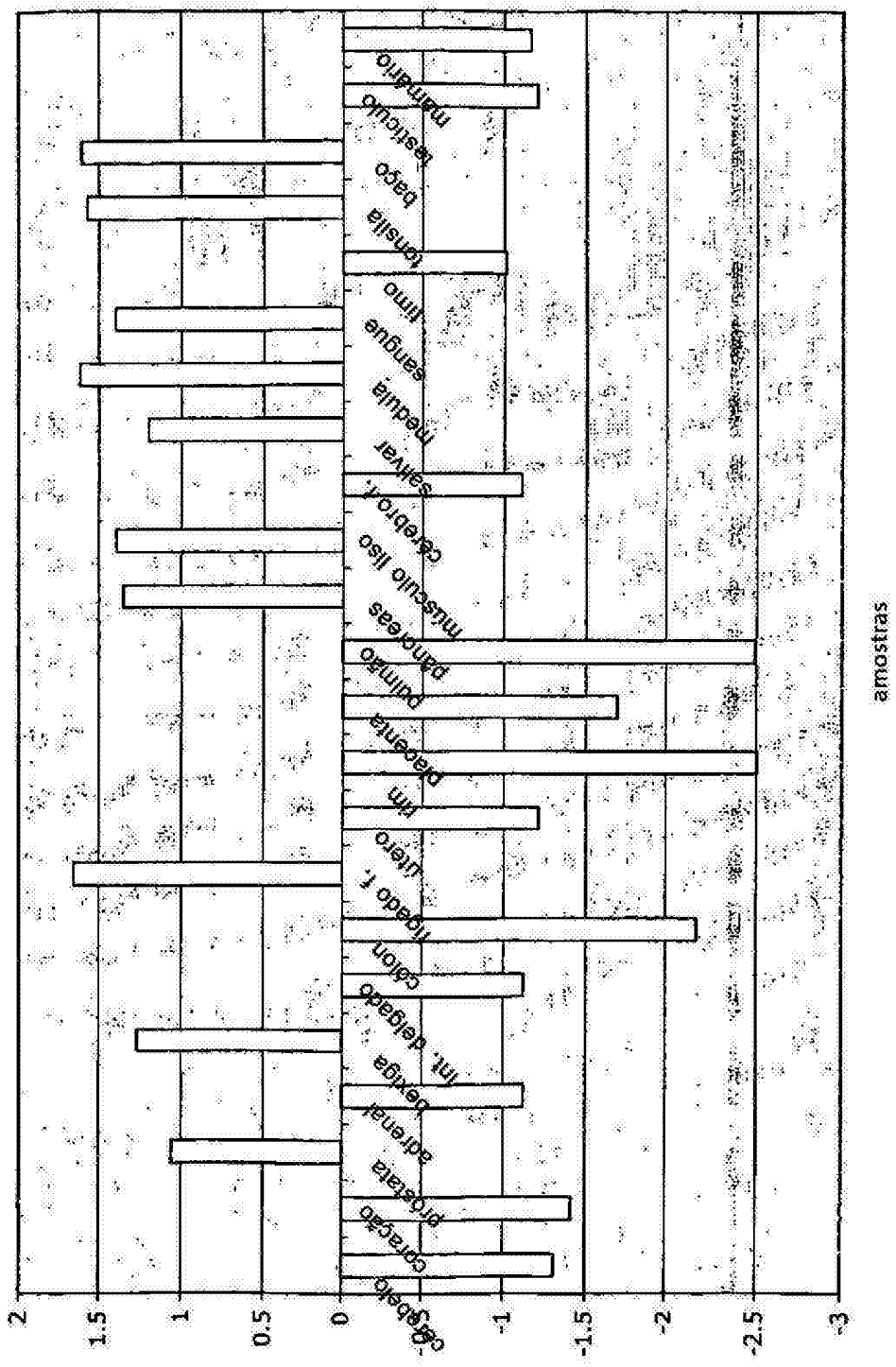


FIGURA 77C

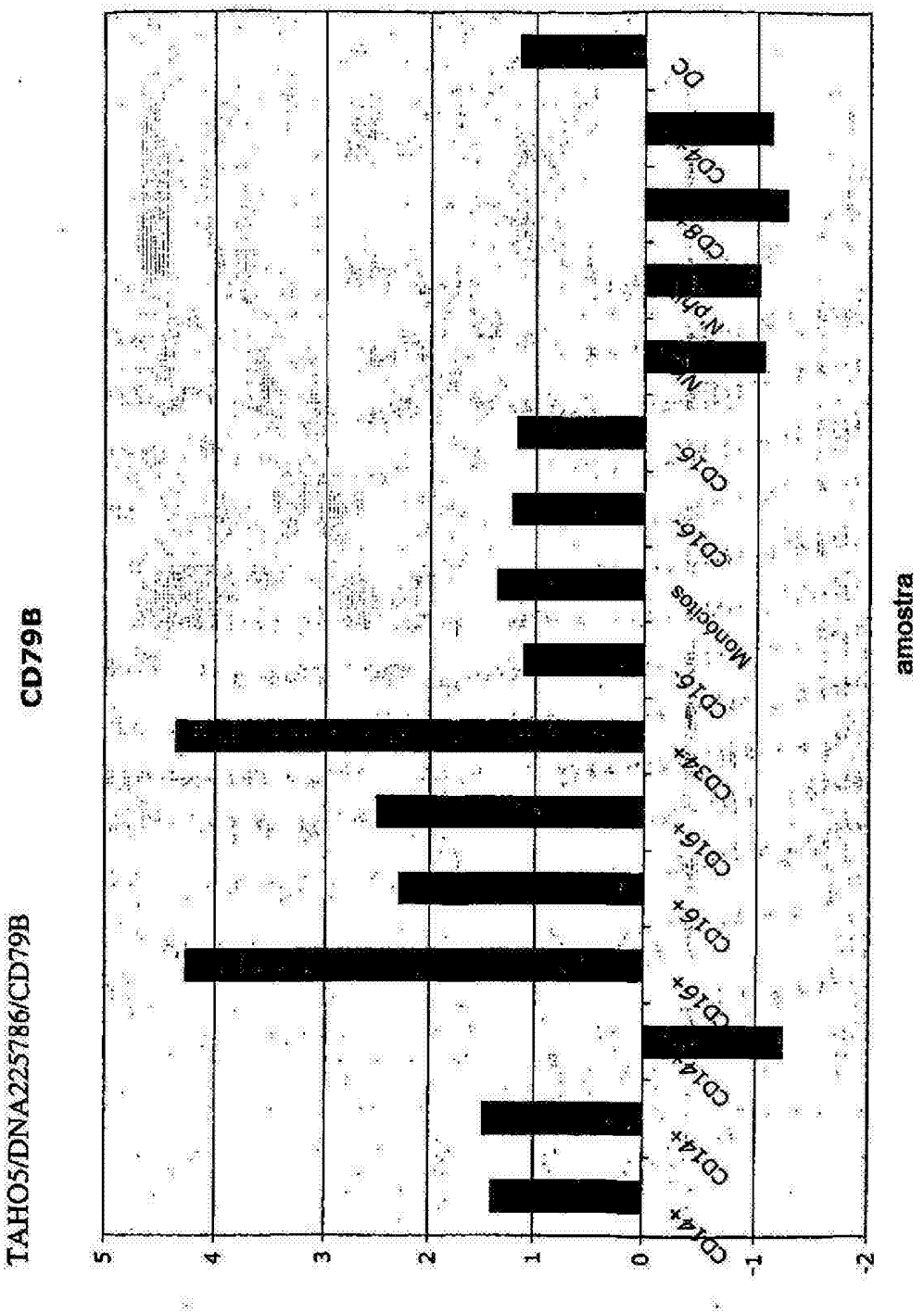

TAHO5/DNA225786/CD79B
CD79B
amostra
5
4
3
2
1
0
-1
-2
DC
CD4+
CD8+
N.Ph
M
CD16-
CD16-
Monócitos
CD16-
CD34+
CD16+
CD16+
CD16+
CD14+
CD14+
CD14+

FIGURE 77D

TAHO5/DNA225786/CD79B

CD79B

