

(11) Número de Publicação: **PT 1897945 E**

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

(51) Classificação Internacional:

**C12N 15/12** (2011.01) **C07K 14/715** (2011.01)  
**C07K 14/54** (2011.01) **C12N 15/62** (2011.01)  
**C07K 16/24** (2011.01) **C07K 16/28** (2011.01)  
**A61K 31/70** (2011.01) **A61K 38/17** (2011.01)  
**A61K 38/20** (2011.01) **A61K 39/395** (2011.01)  
**G01N 33/566** (2011.01)

(22) Data de pedido: **2000.12.20**

(30) Prioridade(s): **1999.12.23 US 172096 P**  
**1999.12.30 WO**  
**PCT/US99/31274 2000.01.11 US 175481 P**  
**2000.02.18 WO**  
**PCT/US00/04341 2000.03.02 WO**  
**PCT/US00/05841**

(43) Data de publicação do pedido: **2008.03.12**

(45) Data e BPI da concessão: **2012.01.18**  
**063/2012**

(73) Titular(es):

**GENENTECH, INC.**  
**1 DNA WAY SOUTH SAN FRANCISCO CA**  
**94080-4990**

**US**

(72) Inventor(es):  
**PAUL J. GODOWSKI**  
**RICHARD L. VANDLEN**  
**SHERMAN FONG**  
**KENNETH J. HILLAN**  
**JIAN CHEN**

**US**

**US**

**US**

**US**

**US**

(74) Mandatário:  
**ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA**  
**RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA**

**PT**

(54) Epígrafe: **POLIPÉPTIDOS HOMÓLOGOS DE IL-17 E SUAS UTILIZAÇÕES TERAPÊUTICAS**

(57) Resumo:

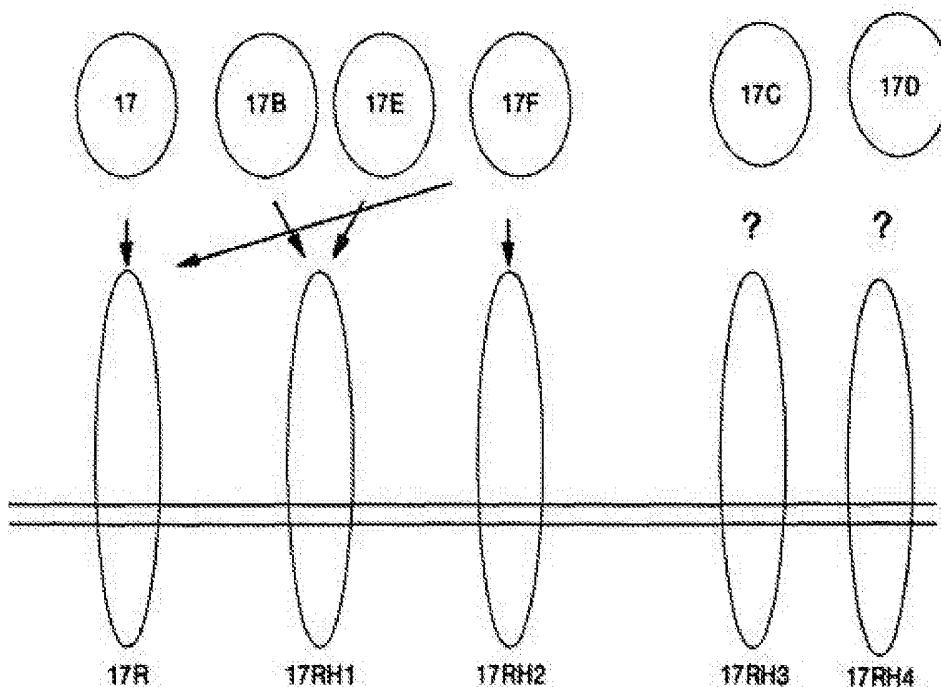
A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A NOVOS POLIPÉPTIDOS E A MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO QUE CODIFICAM ESSES POLIPÉPTIDOS. SÃO AQUI TAMBÉM PROPORCIONADOS VECTORES E CÉLULAS HOSPEDEIRAS COMPREENDENDO ESSAS SEQUÊNCIAS DE ÁCIDO NUCLEICO, MOLÉCULAS DE POLIPÉPTIDOS QUIMÉRICAS COMPREENDENDO OS POLIPÉPTIDOS DA PRESENTE INVENÇÃO FUNDIDOS COM SEQUÊNCIAS POLIPEPTÍDICAS HETERÓLOGAS, ANTICORPOS QUE SE LIGAM AOS POLIPÉPTIDOS DA PRESENTE INVENÇÃO E A MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DOS POLIPÉPTIDOS DA PRESENTE INVENÇÃO.

RESUMO

**"Polipéptidos homólogos de IL-17 e suas utilizações terapêuticas"**

A presente invenção refere-se a novos polipéptidos e a moléculas de ácido nucleico que codificam esses polipéptidos. São aqui também proporcionados vectores e células hospedeiras compreendendo essas sequências de ácido nucleico, moléculas de polipéptidos quiméricas compreendendo os polipéptidos da presente invenção fundidos com sequências polipeptídicas heterólogas, anticorpos que se ligam aos polipéptidos da presente invenção e a métodos para a produção dos polipéptidos da presente invenção.

**A FAMÍLIA DE CITOQUINAS DA IL-17 POSSUI UM PADRÃO COMPLEXO DE ESPECIFICIDADES RECEPTOR-LIGANDO SOBREPOSTAS**



DESCRIÇÃO

**"Polipéptidos homólogos de IL-17 e suas utilizações terapêuticas"**

**CAMPO DA INVENÇÃO**

A presente invenção refere-se genericamente à identificação e isolamento de ADN novo e à produção recombinante de novos polipéptidos possuindo similaridade de sequência com interleucina-17 e com proteína receptora de interleucina-17, aqui designada por polipéptidos "PRO".

**ANTERIORIDADE DA INVENÇÃO**

As proteínas extracelulares desempenham importantes papéis, entre outras coisas, na formação, diferenciação e manutenção de organismos multicelulares. O destino de muitas células individuais, e.g., proliferação, migração, diferenciação ou interacção com outras células, é tipicamente governado por informação recebida de outras células e/ou do ambiente imediato. Esta informação é frequentemente transmitida por polipéptidos segregados (por exemplo, factores mitogénicos, factores de sobrevivência, factores citotóxicos, factores de diferenciação, neuropéptidos e hormonas) que são, por sua vez, recebidos e interpretados por diversos receptores celulares ou proteínas ligadas a membranas. Estes polipéptidos segregados ou moléculas de sinalização normalmente passam através da via secretória celular para atingir o seu local de acção no ambiente extracelular.

As proteínas segregadas têm várias aplicações industriais, incluindo como produtos farmacêuticos, de diagnóstico, biosensores e biorreactores. A maioria dos fármacos proteínicos disponíveis presentemente, tais como agentes trombolíticos, interferões, interleucinas, eritropoietinas, factores estimulantes de colónias e várias outras citoquinas, são proteínas secretórias. Os seus receptores, que são proteínas membranares, também têm potencial como agentes terapêuticos ou de diagnóstico.

As proteínas e receptores ligados a membranas podem desempenhar importantes papéis, entre outras coisas, na formação, diferenciação e manutenção de organismos multicelulares. O destino de muitas células individuais, e.g., proliferação, migração, diferenciação ou interacção com outras células, é tipicamente governado por informação recebida de outras células e/ou do ambiente imediato. Esta informação é frequentemente transmitida por polipéptidos segregados (por exemplo, factores mitogénicos, factores de sobrevivência, factores citotóxicos, factores de diferenciação, neuropéptidos e hormonas) que são, por sua vez, recebidos e interpretados por diversos receptores celulares ou proteínas ligadas a membranas. Estas proteínas ligadas a membranas e receptores celulares incluem, mas não se lhes limitam, receptores de citoquinas, quinases receptoras, fosfatases receptoras, receptores envolvidos em interacções célula-célula e moléculas de adesina celular como selectinas e integrinas. Por exemplo, a transdução de sinais que regula o crescimento e a diferenciação celulares é regulada em parte por fosforilação de várias proteínas celulares. As proteína-tirosina-quinases, enzimas que catalisam esse processo, podem também actuar como receptores de factores de crescimento. Os exemplos incluem receptor do factor de crescimento de fibroblastos e receptor do factor de crescimento de nervos.

Similarmente às proteínas segregadas, as proteínas ligadas a membranas e as moléculas receptoras têm várias aplicações industriais, incluindo como agentes farmacêuticos e de diagnóstico. As imunoadesinas receptoras, por exemplo, podem ser empregues como agentes terapêuticos para bloquear interacções receptor-ligando. As proteínas ligadas a membranas podem também ser empregues para o rastreio de inibidores potenciais peptídicos ou de molécula pequenas da interacção receptor/ligando relevante.

Estão a decorrer esforços tanto industriais como académicos para identificar novas, proteínas segregadas nativas e receptores ou proteínas ligadas a membranas nativos. Muitos esforços estão focados no rastreio de bibliotecas de ADN recombinante de mamífero para identificar as sequências de codificação para novas proteínas segregadas. Estão descritos na literatura exemplos de métodos e técnicas de rastreio

[veja-se, por exemplo, Klein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 93:7108-7113 (1996); Patente U.S. 5,536,637)].

A este respeito, a presente invenção refere-se à identificação de novos polipéptidos segregados e receptores da família da interleucina-17 (IL-17) que se mostrou estarem relacionados com doença imunomediada e inflamatória. As doenças imuno-relacionadas e inflamatórias são a manifestação ou consequência de vias biológicas bastante complexas, frequentemente múltiplas e interligadas, que na fisiologia normal são críticas para responder a insultos ou lesões, iniciar a reparação a partir de insultos ou lesões e montar a defesa inata e adquirida contra organismos estranhos. A doença ou patologia ocorre quando estas vias fisiológicas normais causam insultos ou lesões adicionais, tanto directamente relacionados com a intensidade da resposta, como em consequência de regulação anómala ou estimulação excessiva, como na forma de uma reacção ao "próprio" ou uma combinação destes.

Embora a génese destas doenças frequentemente envolva vias de múltiplos passos e frequentemente múltiplos diferentes sistemas/vias biológicos, a intervenção em pontos críticos numa ou mais destas vias pode ter um efeito de melhoria ou terapêutico. A intervenção terapêutica pode ocorrer quer por antagonismo de um processo/via prejudiciais quer por estimulação de um processo/via benéficos.

São conhecidas muitas doenças imuno-relacionadas e foram extensamente estudadas. Estas doenças incluem doenças inflamatórias imunomediadas (tais como artrite reumatóide, doença renal imunomediada, doenças hepatobiliares, doença inflamatória do intestino (DII), psoriase e asma), doenças inflamatórias não imunomediadas, doenças infecciosas, doenças de imunodeficiência, neoplasia, etc.

Os linfócitos T (células T) são uma componente importante da resposta imunitária do mamífero. As células T reconhecem抗ígenos que estão associados com uma molécula própria codificada por genes no interior do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). O抗ígeno pode ser exibido juntamente com moléculas do MHC na superfície de células

apresentadoras de抗énio, células infectadas por vírus, células cancerosas, enxertos, etc. O sistema de células T elimina estas células alteradas que constituem uma ameaça à saúde do mamífero hospedeiro. As células T incluem células T auxiliares e células T citotóxicas. As células T auxiliares proliferam extensamente após o reconhecimento de um complexo抗énio-MHC numa célula apresentadora de抗énio. As células T auxiliares também segregam uma variedade de citoquinas, *i.e.*, linfoquinas, que desempenham um papel central na activação de células B, células T citotóxicas e uma variedade de outras células que participam na resposta imunitária.

Um evento central em ambas as respostas imunitárias, humoral e mediada por células, é a activação e a expansão clonal de células T auxiliares. A activação de células T auxiliares é iniciada pela interacção do complexo receptor de células T (TCR) - CD3 com um抗énio-MHC na superfície de uma célula apresentadora de抗énio. Esta interacção medeia uma cascata de eventos bioquímicos que induz a célula T auxiliar quiescente a entrar num ciclo celular (a transição G0 para G1) e resulta na expressão de um receptor de levada afinidade para IL-2 e por vezes IL-4. A célula T activada progride através do ciclo proliferando e diferenciando-se em células de memória ou células efectoras.

Em adição aos sinais mediados através do TCR, a activação de células T envolve uma co-estimulação adicional induzida por citoquinas libertadas pela célula apresentadora de抗énio ou através de interacções com moléculas ligadas a membranas na célula apresentadora de抗énio e na célula T. mostrou-se que as citoquinas IL-1 e IL-6 proporcionam um sinal co-estimulador. Também, a interacção entre a molécula de B7 expressa na superfície de uma célula apresentadora de抗énio e moléculas de CD28 e CTLA-4 expressas na superfície de células T efectuam a activação de células T. As células T activadas expressam um número aumentado de moléculas de adesão celular, tais como ICAM-1, integrinas, VLA-4, LFA-1, CD56, etc.

A proliferação de células T numa cultura mista de linfócitos ou reacção mista de linfócitos (MLR) é uma

indicação estabelecida da capacidade de um composto para estimular o sistema imunitário. Em muitas respostas imunitárias, as células inflamatórias infiltram-se no local da lesão ou infecção. As células migrantes podem ser neutrofílicas, eosinofílicas, monocíticas ou linfocíticas como pode ser determinado por exame histológico dos tecidos afectados. Current Protocols in Immunology, ed. John E. Coligan, 1994, John Wiley & Sons, Inc.

As doenças imuno-relacionadas podem ser tratadas por supressão da resposta imunitária. A utilização de anticorpos neutralizantes que inibem moléculas possuindo actividade imunoestimulante poderia ser benéfica no tratamento de doenças imunomediadas e inflamatórias. As moléculas que inibem a resposta imunitária podem ser utilizadas (proteínas directamente ou por via da utilização de agonistas de anticorpos) para inibir a resposta imunitária e assim melhorar doenças imuno-relacionadas.

A interleucina-17 (IL-17) foi identificada como um ortólogo celular de uma proteína codificada pelo T vírus Saimiri de Herpes linfotrópico (HSV) [veja-se, Rouvier *et al.*, J. Immunol., 150(12): 5445-5456 (1993); Yao *et al.*, J. Immunol., 122(12):5483-5486 (1995) e Yao *et al.*, Immunity, 3(6):811-821 (1995)]. A subsequente caracterização mostrou que esta proteína é uma potente citoquina que actua para induzir respostas pró-inflamatórias numa ampla variedade de tecidos periféricos. A IL-17 é uma citoquina homodimérica de cerca de 32 kDa que é sintetizada e segregada apenas por células T de memória activadas por CD4<sup>+</sup> (revisto em Fossiez *et al.*, Int. Rev. Immunol., 16: 541-551 [1998]).

Apesar da sua restrita distribuição pelos tecidos, a IL-17 exibe actividades biológicas pleiotrópicas em vários tipos de células. Verificou-se que a IL-17 estimula a produção de muitas citóquinas. Induz a secreção de IL-6, IL-8, prostaglandina E2, MCP-1 e G-CSF por células aderentes como fibroblastos, queratinócitos, células epiteliais e endoteliais. A IL-17 também tem a capacidade de induzir a expressão de superfície de ICAM-1, a proliferação de células T e o crescimento e a diferenciação de progenitores humanos de CD34<sup>+</sup> em neutrófilos. A IL-17 foi também implicada no

metabolismo ósseo, e foi sugerido que desempenha um papel importante em condições patológicas caracterizadas pela presença de células T activadas e pela produção de TNF- $\alpha$  tais como artrite reumatóide e perda de implantes ósseos (Van Bezooven et al., *J. Bone Miner. Res.*, 14: 1513-1521 [1999]). Verificou-se que células T activadas de tecido sinovial derivadas de pacientes de artrite reumatóide segregam maiores quantidades de IL-17 do que as derivadas de indivíduos normais ou pacientes de osteoartrite (Chabaud et al., *Artrite Rheum.*, 42: 963-970 [1999]). Foi sugerido que esta citoquina pro-inflamatória contribui activamente para a inflamação sinovial na artrite reumatóide. Para além do seu papel pro-inflamatório, a IL-17 parece contribuir para a patologia da artrite reumatóide por ainda outro mecanismo. Por exemplo, mostrou-se que a IL-17 induz a expressão de ARNm do factor de diferenciação de osteoclastos (ODF) em osteoblastos (Kotake et al., *J. Clin. Invest.*, 103: 1345-1352 [1999]). O ODF estimula a diferenciação de células progenitoras em osteoclastos, as células envolvidas em ressorção óssea. Como o nível de IL-17 é significativamente aumentado em fluido sinovial de pacientes de artrite reumatóide, parece que a IL-17 que induz a formação de osteoclastos desempenha um papel crucial na ressorção óssea na artrite reumatóide. Crê-se também que a IL-17 desempenha um papel chave em determinadas outras desordens auto-imunes tais como esclerose múltipla (Matusevicius et al., *Mult. Scler.*, 5: 101-104 [1999]). Foi ainda mostrado, por sinalização intracelular, que a IL-17 estimula o influxo de  $Ca^{2+}$  e uma redução na [AMPc], em macrófagos humanos (Jovanovic et al., *J. Immunol.*, 160:3513 [1998]). Os fibroblastos tratados com IL-17 induzem a activação de NP- $\kappa$ B, [Yao et al., *Immunity*, 3:811 (1995), Jovanovic et al., *supra*], enquanto macrófagos tratados com ela activam NF- $\kappa$ B e proteína-quinases activadas por mitogénio (Shalom-Barek et al., *J. Biol. Chem.*, 273:27467 [1998]).

Adicionalmente, a IL-17 também partilha similaridade de sequência com factor 7 semelhante a citoquina de mamífero que está envolvido no crescimento do osso e da cartilagem. Outras proteínas com as quais polipéptidos de IL-17 partilham similaridade de sequência são o factor relacionado com interleucina derivado de embrião humano (EDMF) e interleucina-20.

Consistentemente com a ampla gama de efeitos da IL-17, verificou-se que o receptor da superfície celular para IL-17 é amplamente expresso em muitos tecidos e tipos de células (Yao et al., *Cytokine*, 9:794 [1997]). Embora a sequência de aminoácidos do receptor de IL-17 humano (IL-R) (866 aminoácidos) preveja uma proteína com um único domínio transmembranar e um domínio intracelular longo, de 525 aminoácidos, a sequência do receptor é única e não é semelhante à de nenhum dos receptores da família de receptores de citoquinas/factores de crescimento. Isto juntamente com a ausência de similaridade da própria IL-17 com outras proteínas conhecidas indica que a IL-17 e o seu receptor podem fazer parte de uma nova família de proteínas e receptores de sinalização. Foi demonstrado que a actividade da IL-17 é mediada através da ligação ao seu receptor da superfície celular único, em que estudos prévios mostraram que o contacto de células T com uma forma solúvel do polipéptido receptor de IL-17 inibiu a proliferação de células T e a produção de IL-2 induzida por PHA, concanavalina A e anticorpo monoclonal anti-TCR (Yao et al., *J. Immunol.*, 155:5483-5486 [1995]). Como tal, há um interesse significativo na identificação e caracterização de novos polipéptidos possuindo homologia com receptores de citoquinas conhecidos, especificamente receptores de IL-17.

Recentemente, identificámos duas novas proteínas denominadas IL-17B e IL-17C, que estão claramente relacionadas com a IL-17, estabelecendo que existe uma família de moléculas semelhantes a IL-17 (Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 97(2):773-778 [2000]). De forma interessante, não parecem ser ligandos para o receptor de IL-17, sugerindo que existem outras moléculas que servem como receptores cognatos para estes factores. O interesse nesta família de moléculas aumentou à medida que ficou evidente que a IL-17 pode contribuir para várias condições médicas importantes relacionadas com a função imunitária: incluindo artrite reumatóide, doença renal imunomediada, doenças hepatobiliares, doença inflamatória do intestino, psoriase, asma, esclerose múltipla, aterosclerose, promoção de crescimento tumoral ou doença degenerativa das articulações. WO 99/61617 descreve proteínas humanas designadas interleucina-21 (IL-21) e

interleucina-22 (IL-22). Dado o potencial das moléculas relacionadas com IL-17 para ocuparem importantes papéis no controlo da função imunitária, existe um interesse na identificação de outros membros desta família e dos receptores que dirigem as acções destas moléculas através de populações particulares de células alvo. A este respeito, a presente invenção descreve a clonagem e a caracterização de novas proteínas (designadas aqui por polipéptidos "PRO") que são similares em sequência de aminoácidos à IL-17, e activam suas variantes, assim como novas moléculas receptoras de interleucinas que se mostrou interactuarem com os novos ligandos de proteína IL-17.

### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Num primeiro aspecto, a invenção proporciona um método *in vitro* de detecção de sobre-expressão de um polipéptido PRO21175 ou um ácido nucleico que codifica o referido polipéptido no tecido tumoral em comparação com um tecido normal do mesmo tipo, em que o referido polipéptido PRO21175 possui pelo menos 80% de identidade com a sequência de aminoácidos do polipéptido apresentado na Figura 8 (SEQ ID NO:8).

A referida sobre-expressão pode ser detectada utilizando uma sonda de ácido nucleico ou utilizando um anticorpo que se liga especificamente ao referido polipéptido PRO21175. O anticorpo pode ser um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um fragmento de anticorpo ou um anticorpo de cadeia simples.

Noutro aspecto, a invenção refere-se à utilização de um anticorpo que se liga especificamente a um polipéptido PRO21175 num ensaio de diagnóstico *in vitro*, para detecção de sobre-expressão do referido polipéptido PRO21175 em tumores da mama, do cólon ou do pulmão em comparação com tecido normal do mesmo tipo, em que o referido polipéptido PRO21175 possui pelo menos 80% de identidade com a sequência de aminoácidos do polipéptido apresentado na Figura 8 (SEQ ID NO:8).

O anticorpo pode ser um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um fragmento de anticorpo ou um anticorpo de cadeia simples.

Noutro aspecto, a invenção refere-se a um anticorpo que se liga especificamente a um polipéptido PRO21175 para utilização num método de tratamento de uma tumor canceroso da mama, do cólon ou do pulmão, em que o referido polipéptido PRO21175 possui pelo menos 80% de identidade com a sequência de aminoácidos do polipéptido apresentado na Figura 8 (SEQ ID NO:8).

O anticorpo pode ser um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um fragmento de anticorpo ou um anticorpo de cadeia simples, e/ou pode estar conjugado com um agente citotóxico ou com um receptor para pré-direcccionamento ao tumor.

## **B. Informação adicional**

Descreve-se também aqui uma molécula isolada de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido PRO.

A molécula isolada de ácido nucleico pode compreender uma sequência de nucleótidos possuindo pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 81% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 82% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 83% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 84% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 85% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 86% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 87% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 88% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 89% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 90% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente

pelo menos cerca de 91% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 92% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 93% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 94% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 95% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 96% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 97% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 98% de identidade de sequência de ácido nucleico e alternativamente pelo menos cerca de 99% de identidade de sequência de ácido nucleico com (a) uma molécula de ADN que codifica um polipéptido PRO possuindo uma sequência de aminoácidos de comprimento completo como aqui divulgado, uma sequência de aminoácidos a que falta o péptido de sinal como aqui divulgado, um domínio extracelular de uma proteína transmembranar, com ou sem o péptido de sinal, como aqui divulgado ou qualquer outro fragmento especificamente definido da sequência de aminoácidos de comprimento completo como aqui divulgado, ou (b) o complemento da molécula de ADN de (a).

A molécula isolada de ácido nucleico pode compreender uma sequência de nucleótidos possuindo pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 81% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 82% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 83% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 84% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 85% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 86% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 87% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 88% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 89% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 90% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 91% de

nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 92% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 93% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 94% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 95% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 96% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 97% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 98% de identidade de sequência de ácido nucleico e alternativamente pelo menos cerca de 99% de identidade de sequência de ácido nucleico com (a) uma molécula de ADN compreendendo a sequência de codificação de um ADNc de um polipéptido PRO de comprimento completo como aqui divulgado, a sequência de codificação de um polipéptido PRO a que falta o péptido de sinal como aqui divulgado, a sequência de codificação de um domínio extracelular de um polipéptido PRO transmembranar, com ou sem o péptido de sinal, como aqui divulgado, ou a sequência de codificação de qualquer outro fragmento especificamente definido da sequência de aminoácidos de comprimento completo como aqui divulgado, ou (b) o complemento da molécula de ADN de (a).

Descreve-se aqui também uma molécula isolada de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleótidos possuindo pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 81% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 82% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 83% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 84% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 85% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 86% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 87% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 88% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 89% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 90% de identidade de sequência de ácido

nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 91% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 92% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 93% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 94% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 95% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 96% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 97% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 98% de identidade de sequência de ácido nucleico e alternativamente pelo menos cerca de 99% de identidade de sequência de ácido nucleico com (a) uma molécula de ADN que codifica o mesmo polipéptido maduro codificado por qualquer dos ADNc de proteína humana depositado na ATCC como aqui divulgado, ou (b) o complemento da molécula de ADN de (a).

Descreve-se aqui também uma molécula isolada de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido PRO que tem eliminado o domínio transmembranar ou tem inativado o domínio transmembranar, ou é complementar a uma tal sequência de nucleótidos de codificação, em que o(s) domínio(s) transmembranar(es) deste polipéptido está(ão) aqui divulgado(s). Portanto, estão contemplados os domínios extracelulares solúveis dos polipéptidos PRO aqui descritos.

São também descritos fragmentos de uma sequência de codificação de um polipéptido PRO, ou o seu complemento, que podem ser úteis como, por exemplo, sondas de hibridação, para codificação de fragmentos de um polipéptido PRO que pode opcionalmente codificar um polipéptido compreendendo um local de ligação para um anticorpo anti-PRO ou como sondas oligonucleotídicas anti-sentido. Estes fragmentos de ácido nucleico têm usualmente pelo menos cerca de 20 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 30 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 40 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 50 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 60 nucleótidos de comprimento,

alternativamente pelo menos cerca de 70 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 80 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 90 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 100 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 110 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 120 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 130 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 140 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 150 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 160 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 170 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 180 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 190 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 200 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 250 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 300 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 350 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 400 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 450 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 500 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 600 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 700 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 800 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 900 nucleótidos de comprimento e alternativamente pelo menos cerca de 1000 nucleótidos de comprimento, em que, neste contexto, o termo "cerca de" significa o comprimento de sequência de nucleótidos referenciado mais ou menos 10% desse comprimento referenciado. Note-se que podem ser determinados novos fragmentos de uma sequência de nucleótidos de codificação de polipeptídeo PRO de uma forma rotineira através do alinhamento da sequência de nucleótidos que codifica o polipeptídeo PRO com outras sequências de nucleótidos conhecidas utilizando qualquer um de vários programas de alinhamento de sequências bem conhecidos e da determinação de qual (ou quais) o(s) fragmento(s) da sequência de nucleótidos que codifica o polipeptídeo PRO é

(são) novo(s). Todas estas sequências de nucleótidos que codificam um polipéptido PRO estão aqui contempladas. Estão também contemplados os fragmentos de polipéptido PRO codificados por estes fragmentos de moléculas nucleotídicas, preferivelmente os fragmentos de polipéptido PRO que compreendem um local de lig o para um anticorpo anti-PRO.

Descreve-se também um polipéptido PRO isolado codificado por quaisquer das sequências de ácido nucleico isoladas acima identificadas.

Descreve-se aqui um polipéptido PRO isolado, compreendendo uma sequência de aminoácidos possuindo pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 81% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 82% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 83% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 84% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 85% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 86% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 87% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 88% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 89% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 90% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 91% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 92% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 93% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 94% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 95% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 96% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 97% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 98% de identidade de sequência de aminoácidos e alternativamente pelo menos cerca de 99% de identidade de

sequência de aminoácidos, com um polipéptido PRO possuindo uma sequência de aminoácidos de comprimento completo como aqui divulgado, uma sequência de aminoácidos a que falta o péptido de sinal como aqui divulgado, um domínio extracelular de uma proteína transmembranar, com ou sem o péptido de sinal, como aqui divulgado, ou qualquer outro fragmento especificamente definido da sequência de aminoácidos de comprimento completo como aqui divulgado.

Descreve-se aqui também um polipéptido PRO isolado compreendendo uma sequência de aminoácidos possuindo pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 81% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 82% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 83% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 84% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 85% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 86% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 87% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 88% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 89% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 90% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 91% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 92% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 93% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 94% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 95% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 96% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 97% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 98% de identidade de sequência de aminoácidos e alternativamente pelo menos cerca de 99% de identidade de sequência de aminoácidos, com uma sequência de aminoácidos

codificada por qualquer dos ADNC de proteínas humanas depositados na ATCC como aqui divulgado.

Descreve-se aqui também um polipéptido PRO isolado compreendendo uma sequência de aminoácidos que origina pelo menos cerca de 80% de positivos, alternativamente pelo menos cerca de 81% de positivos, alternativamente pelo menos cerca de 82% de positivos, alternativamente pelo menos cerca de 83% de positivos, alternativamente pelo menos cerca de 84% de positivos, alternativamente pelo menos cerca de 85% de positivos, alternativamente pelo menos cerca de 86% de positivos, alternativamente pelo menos cerca de 87% de positivos, alternativamente pelo menos cerca de 88% de positivos, alternativamente pelo menos cerca de 89% de positivos, alternativamente pelo menos cerca de 90% de positivos, alternativamente pelo menos cerca de 91% de positivos, alternativamente pelo menos cerca de 92% de positivos, alternativamente pelo menos cerca de 93% de positivos, alternativamente pelo menos cerca de 94% de positivos, alternativamente pelo menos cerca de 95% de positivos, alternativamente pelo menos cerca de 96% de positivos, alternativamente pelo menos cerca de 97% de positivos, alternativamente pelo menos cerca de 98% de positivos e alternativamente pelo menos cerca de 99% de positivos quando comparada com a sequência de aminoácidos de um polipéptido PRO possuindo uma sequência de aminoácidos de comprimento completo como aqui divulgado, uma sequência de aminoácidos a que falta o péptido de sinal como aqui divulgado, um domínio extracelular de uma proteína transmembranar, com ou sem o péptido de sinal, como aqui divulgado, ou qualquer outro outro fragmento especificamente definido da sequência de aminoácidos de comprimento completo como aqui divulgado.

Num aspecto específico, o pedido de patente descreve um polipéptido PRO isolado sem a sequência de sinal N-terminal e/ou a metionina de iniciação e está codificado por uma sequência de nucleótidos que codifica uma tal sequência de aminoácidos como acima descrito. São também aqui descritos processos para a produção dos mesmos, em que esses processos compreendem a cultura de uma célula hospedeira compreendendo um vector que compreende a molécula de ácido nucleico de

codificação apropriada sob condições adequadas para a expressão do polipéptido PRO e a recuperação do polipéptido PRO a partir da cultura celular.

Descreve-se também um polipéptido PRO isolado que tem eliminado o domínio transmembranar ou tem inactivado o domínio transmembranar. São igualmente aqui descritos processos para a produção dos mesmos, em que esses processos compreendem a cultura de uma célula hospedeira compreendendo um vector que compreende a molécula de ácido nucleico de codificação apropriada sob condições adequadas para a expressão do polipéptido PRO e a recuperação do polipéptido PRO a partir da cultura celular.

O pedido de patente descreve igualmente agonistas e antagonistas de um polipéptido PRO nativo como aqui definido. Numa concretização particular, o agonista ou antagonista é um anticorpo anti-PRO ou uma molécula pequena.

Descreve-se aqui um método de identificação de agonistas ou antagonistas de um polipéptido PRO que compreende o contacto do polipéptido PRO com uma molécula candidata e a monitoração de uma actividade biológica mediada pelo referido polipéptido PRO. Preferivelmente, o polipéptido PRO é um polipéptido PRO nativo.

O pedido descreve igualmente uma composição de matéria compreendendo um polipéptido PRO, ou um agonista ou antagonista de um polipéptido PRO como aqui descrito, ou um anticorpo anti-PRO, em combinação com um transportador. Opcionalmente, o transportador é um transportador farmaceuticamente aceitável.

O pedido de patente descreve igualmente a utilização de um polipéptido PRO, ou um seu agonista ou antagonista como aqui descrito, ou um anticorpo anti-PRO, para a preparação de um medicamento útil no tratamento de uma condição que é responsiva ao polipéptido PRO, um seu agonista ou antagonista ou um anticorpo anti-PRO.

Descrevem-se igualmente vectores compreendendo ADN que codifica quaisquer dos polipéptidos aqui descritos. São também

proporcionadas células hospedeiras compreendendo quaisquer destes vectores. A título de exemplo, as células hospedeiras podem ser células de CHO, *E. coli*, levedura ou células de insecto infectadas por baculovírus. É ainda proporcionado um processo para a produção de qualquer dos polipéptidos aqui descritos e compreende a cultura de células hospedeiras sob condições adequadas para a expressão do polipéptido desejado e a recuperação do polipéptido desejado a partir da cultura celular.

O pedido de patente descreve igualmente moléculas quiméricas compreendendo quaisquer dos polipéptidos aqui descritos fundidos com um polipéptido ou uma sequência de aminoácidos heterólogos. Um exemplo destas moléculas quiméricas compreende quaisquer dos polipéptidos aqui descritos fundidos com uma sequência marcadora epitópica ou uma região Fc de uma imunoglobulina.

O pedido de patente descreve igualmente um anticorpo que se liga especificamente a quaisquer dos polipéptidos descritos acima e adiante. Opcionalmente, o anticorpo é um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um fragmento de anticorpo ou anticorpo de cadeia simples.

Adicionalmente, o pedido de patente descreve sondas oligonucleotídicas úteis para o isolamento de sequências de nucleótidos genómicas e de ADNc ou como sondas anti-sentido, em que essas sondas podem ser derivadas de quaisquer das sequências de nucleótidos descritas acima e adiante.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DOS ESQUEMAS**

A Figura 1 mostra uma sequência de nucleótidos (SEQ ID NO:1) de um ADNc de PRO1031 de sequência nativa, em que SEQ ID NO:1 é um clone aqui designado por "DNA59294-1381-1".

A Figura 2 mostra a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:2) derivada da sequência de codificação de SEQ ID NO:1 mostrada na Figura 1.

A Figura 3 mostra uma sequência de nucleótidos (SEQ ID NO:3) de um ADNc de PRO1122 de sequência nativa, em que SEQ ID NO:3 é um clone aqui designado por "DNA62377-1381-1".

A Figura 4 mostra a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:4) derivada da sequência de codificação de SEQ ID NO:3 mostrada na Figura 3.

A Figura 5 mostra uma sequência de nucleótidos (SEQ ID NO:5) de um ADNc de PRO10272 de sequência nativa, em que SEQ ID NO:5 é um clone aqui designado por "DNA147531-2821".

A Figura 6 mostra a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:6) derivada da sequência de codificação de SEQ ID NO:5 mostrada na Figura 5.

A Figura 7 mostra uma sequência de nucleótidos (SEQ ID NO:7) de um ADNc de PRO21175 de sequência nativa, em que SEQ ID NO:7 é um clone aqui designado por "DNA173894-2947".

A Figura 8 mostra a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:8) derivada da sequência de codificação de SEQ ID NO:7 mostrada na Figura 7.

A Figura 9 mostra uma sequência de nucleótidos (SEQ ID NO:9) de um ADNc de PRO20110 de sequência nativa, em que SEQ ID NO:9 é um clone aqui designado por "DNA166819".

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

A Figura 11 mostra uma sequência de nucleótidos (SEQ ID NO:11) de um ADNc de PRO5801 de sequência nativa, em que SEQ ID NO:11 é um clone aqui designado por "DNA115291-2681".

A Figura 12 mostra a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:12) derivada da sequência de codificação de SEQ ID NO:11 mostrada na Figura 11.

A Figura 13 mostra uma sequência de nucleótidos (SEQ ID NO:13) de um ADNc de PRO20040 de sequência nativa, em que SEQ ID NO:13 é um clone aqui designado por "DNA164625-2890".

A Figura 14 mostra a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:14) derivada da sequência de codificação de SEQ ID NO:13 mostrada na Figura 13.

A Figura 15 mostra uma sequência de nucleótidos (SEQ ID NO:15) de um ADNc de PRO9877 de sequência nativa, em que SEQ ID NO:15 é um clone aqui designado por "DNA119502-2789".

A Figura 16 mostra a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:16) derivada da sequência de codificação de SEQ ID NO:15 mostrada na Figura 15.

A Figura 17 mostra uma sequência de nucleótidos (SEQ ID NO:17) de um ADNc de PRO20026 de sequência nativa, em que SEQ ID NO:17 é um clone aqui designado por "DNA154095-2998".

A Figura 18 mostra a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:18) derivada da sequência de codificação de SEQ ID NO:17 mostrada na Figura 17.

A Figura 19 mostra o alinhamento dos membros da família da IL-17 humana: h-IL17 [SEQ ID NO:40]; h-IL17B [PRO1031; SEQ ID NO:2]; h-IL17C [PRO1122; SEQ ID NO:4]; h-IL17D [PRO21175; SEQ ID NO:8]; h-ILE [PRO10272; SEQ ID NO:6]; e h-IL17F [PRO20110; SEQ ID NO:10].

A Figura 20 mostra a distribuição da expressão relativa nos tecidos do ligando IL-17B (PRO1031).

A Figura 21 mostra a distribuição da expressão relativa nos tecidos do ligando IL-17C (PRO1122).

A Figura 22 mostra a distribuição da expressão relativa nos tecidos do ligando IL-17D (PRO21175).

A Figura 23 mostra a expressão de ARNm de IL-17E (PRO10272) por análise RT-PCR. O ARN dos tecidos indicados foi submetido a RT-PCR com iniciadores que foram desenhados para

amplificar a totalidade da sequência de codificação de IL-17E. O produto da PCR foi resolvido por electroforese em gel de agarose, transferido para membrana de nylon e sondado com uma sonda de ADNc de IL-17E marcada com  $^{32}\text{P}$ .

A Figura 24 mostra a distribuição da expressão relativa nos tecidos do ligando IL-17F (PRO20110).

A Figura 25 mostra a distribuição da expressão relativa nos tecidos do receptor IL-17RH1 (PRO5801).

A Figura 26 mostra a distribuição da expressão relativa nos tecidos do receptor IL-17RH2 (PRO20040).

A Figura 27 mostra a distribuição da expressão relativa nos tecidos do receptor IL-17RH3 (PRO9877).

A Figura 28 mostra a distribuição da expressão relativa nos tecidos do receptor IL-17RH4 (PRO20026).

A Figura 29 mostra a imunoprecipitação do domínio extracelular (ECD) de IL-17R com IL-17, IL-17B (PRO1031) e IL-17C (PRO1122). O ECD de IL-17R marcado com His foi expresso em células 293 e marcado metabolicamente com  $^{35}\text{S}$  como descrito no EXEMPLO 21. O sobrenadante foi recuperado e utilizaram-se contas de Ni-NTA para precipitar por afinidade o ECD de IL-17R marcado com His no sobrenadante (pista 1). Na parte A., IL-17, IL-17B.Fc e IL-17C.Fc, ou proteínas de fusão com Fc de controlo foram incubados com o sobrenadante e adicionaram-se contas de proteína-A-agarose para precipitar as proteínas de fusão de Fc. Para a reacção de imunoprecipitação de IL-17, incluíram-se anticorpos anti-IL17. A Parte B. mostra os resultados de uma experiência de ligação competitiva, em que a imunoprecipitação de ECD de IL-17R por IL-17 foi realizada na presença de um excesso de cinco vezes de IL-17B. Proteínas marcadas com His e de controlo que precipitam tanto na parte A. como na B. foram analisadas por electroforese em géis NuPAGE (Bis-Tris a 4-12%). Os marcadores de peso molecular estão indicados à esquerda de cada painel.

A Figura 30 mostra o alinhamento dos membros da família da IL-17 humana (h-IL17; h-IL17B; h-IL17C; e h-ILE). As

sequências de sinal previstas estão sublinhadas. As cisteínas conservadas estão indicadas por um círculo negro, e os potenciais locais de glicosilação ligada a N estão em caixas.

A Figura 31 mostra a expressão de ARNm de receptor IL-17RH1 (PRO5801). A Figura 31A mostra a análise *Northern blot* de receptor IL-17RH1 em tecidos seleccionados. A Figura 31B mostra a análise PCR quantitativa da expressão de ARNm de IL-17RH1 em tecidos seleccionados.

A Figura 32 mostra a ligação do ligando IL-17E (PRO10272) ao receptor IL-17RH1 (PRO5801). A Figura 32A mostra uma comparação da ligação de ligando IL-17 e IL-17E (PRO10272) ao receptor IL-17R (aqui designado PRO1) e ao receptor IL-17RH1 (PRO5801). As células 293 foram co-transflectadas transientemente com vectores de expressão para proteína verde fluorescente (GFP) e receptores IL-17R ou IL-17RH1 como indicado. As células foram incubadas com proteína IL-17-Fc ou IL-17E-Fc como indicado e a ligação foi divulgada com conjugado de PE de anticorpo anti-Fc humano. As curvas de FACS mostram a coloração de PE no interior da população de células positivas para GFP co-transflectadas. Na Figura 32B, o domínio extracelular do receptor IL-17RH1 marcado com epítopo-His foi incubado com proteína de fusão ligando-Fc para os membros da família da IL-17 humana representados como se segue: pista 1, carga directa de IL-17RH1-His; pista 2, IL-17; pista 3, IL-17B (PRO1031); pista 4, IL-17C (PRO1122); e pista 5, IL-17E (PRO10272). As imunoadesinas de ligando foram imunoprecipitadas com contas de Proteína A e ligadas ao receptor IL-17RH1 foi analisado por análise *Western Blot* com anticorpo contra o marcador epítópico His. As posições dos marcadores de peso molecular (kDa) estão indicadas à esquerda.

A Figura 33 mostra a indução de NF-κB por IL-17E (PRO10272). A Figura 33 (parte A) mostra os resultados de células TK-10 e 293 humanas transientemente transfectadas e com o repórter de luciferase responsivo a NF-κB pGL3.ELAM.tk e o vector de expressão para IL-17E como indicado. A actividade de luciferase foi determinada como indicado no EXEMPLO 22. A Figura 33 (parte B) representa a titulação de indução de NF-κB por IL-17E. As células 293 humanas foram transfectadas com o

repórter de luciferase responsável a NF-κB pGL3.ELAM.tk e o vector de expressão indicado para IL-17E como indicado.

A Figura 34 mostra o efeito de IL-17E (PRO10272) sobre a produção de IL-8. Linhas de células derivadas de rim humano TK-10 foram incubadas por Elisa. Está mostrado o nível de IL-8 medida menos o nível de produção de IL-8 observado na ausência de adição de citoquina. As experiências foram repetidas várias vezes com resultados similares.

A Figura 35 representa a família de citoquinas da IL-17 e o padrão complexo de especificidades sobrepostas receptor-ligando. Da esquerda para a direita, a Figura 35 demonstra que o ligando IL-17 se liga ao receptor de IL-17 (IL-17R; aqui designado PRO1); o ligando IL-17B (PRO1031) se liga ao receptor IL-17RH1 (PRO5801); o ligando IL-17E (PRO10272) se liga ao receptor IL-17RH1 (PRO5801); o ligando IL-17F (PRO20110) se liga tanto ao receptor de IL-17 (IL-17R, aqui designado PRO1) assim como ao receptor IL-17RH2 (PRO20040); o ligando IL-17C (PRO1122) e o ligando IL-17D (PRO21175) não interactuam com os receptores IL-17R, IL-17RH1 ou IL-17RH2.

A Figura 36 representa gráficos de barras que representam as actividades biológicas de IL-17, IL-17B (PRO1031) e IL-17C (PRO1122). A Figura 36 (parte A.) mostra células fibroblastos de prepúcio humano (HFF) cultivadas com proteína de fusão de Fc de controlo, IL-17, IL-17B.Fc ou IL-17C.3Fc a 100 ng/ml durante 18 horas e os meios condicionados foram testados quanto a IL-6 como descrito no EXEMPLO 28. A Figura 36 (parte B.) mostra a linha celular leucémica humana, THP-1, que foi tratada com as mesmas citoquinas (100 ng/ml) que acima sob as mesmas condições em que os sobrenadantes foram ensaiados quanto ao nível de libertação de TNF-α. Os resultados estão expressos como a media +/- EP de determinações em triplicado de uma experiência representativa.

A Figura 37 mostra um decorrer de tempo que representa a dependência da libertação de TNF-α activada por IL-17B (PRO1031) e IL-17C (PRO1122) a partir de células THP-1. Na Figura 37 (parte A.), as células THP-1 foram incubadas com 100 ng/ml (2,2 nM) de IL-17B.Fc ou IL-17C.Fc durante 0,5 a 32 horas, os meios condicionados foram colhidos, e a

concentração de TNF- $\alpha$  foi quantificada como descrito no EXEMPLO 28. Na Figura 37 (parte B.), as células THP-1 foram tratadas com a IL-17B.Fc e a IL-17C.Fc numa gama de concentrações de 0 a 120 nM durante 18 horas e a libertação de TNF- $\alpha$  foi determinada.

A Figura 38 mostra a análise FACS da ligação de IL-17B.Fc e IL-17C.Fc a células THP-1 como descrito no EXEMPLO 29. As células THP-1 foram incubadas com IL-17B.Fc (Figura 38, parte A.) ou IL-17C.Fc (Figura 38, parte B.) ou proteínas de fusão de Fc de controlo em PBS (5% de soro de cavalo) e seguiu-se a adição de anticorpos secundários anti-Fc conjugados com FIT.

A Figura 39 mostra o efeito de IL-17 sobre a cartilagem articular. Cultivaram-se explantes de cartilagem com a concentração indicada de IL-17 sozinha (contínuo) ou na presença de IL-1 $\alpha$  na concentração indicada (traçado) ou IL-1ra (antagonista do receptor de IL-1, R & D Sistemas, 1  $\mu$ g/ml, durante 72 horas). A libertação de proteoglicanos (PG) para os meios (painel do topo) indica quebra da matriz. A síntese de matriz foi determinada por incorporação de  $^{35}$ S-sulfato no tecido (painel do fundo).

A Figura 40 mostra o efeito de IL-17 sobre a libertação de óxido nítrico. Os explantes foram tratados com IL-17 (10 ng/ml) sozinha (colunas da esquerda) ou na presença de IL-1 $\alpha$  (10 ng/ml) (colunas da direita). Após 48 horas, ensaiaram-se os meios quanto à concentração de nitrito.

A Figura 41 mostra o efeito de óxido nítrico (NO) sobre alterações induzidas por IL-17 no metabolismo da matriz. Os explantes foram tratados com IL-17 (5 ng/ml) sozinha (+) ou com um inibidor irreversível da óxido nítrico-sintase, NOS (L-NIO, Caymen Chemical, 0,5 mM). Após 72 horas de tratamento, ensaiaram-se os meios quanto a nitrito (Figura 41, parte A.) e proteoglicanos (Pg) (Figura 41, parte B.). A Figura, 41 parte C, mostra a síntese de proteoglicanos determinada por incorporação de  $^{35}$ S-sulfato no tecido.

A Figura 42 mostra o efeito da inibição de óxido nítrico (NO) sobre alterações induzidas por IL-17 no metabolismo dos

proteoglicanos (PG). Trataram-se explantes de cartilagem articular com IL-1 $\alpha$  (5 ng/ml) sozinha (+) ou com inibidores de NOS (L-NIO ou L-NIL) (NIL, inibidor reversível de NOS, Caymen Chemical) ou IL-1ra (antagonista do receptor de IL-1, R & D Systems, 1  $\mu$ g/ml). Após 72 horas de tratamento, os meios foram ensaiados quanto à concentração de nitrito e à quantidade de proteoglicanos. A síntese da matriz foi determinada por incorporação de  $^{35}$ S-sulfato no tecido.

A Figura 43 mostra o efeito de IL-17C (PRO1122) sobre a cartilagem articular. Trataram-se os explantes com IL-17C a 1% ou 0,1% na ausência (3 colunas mais à esquerda) ou na presença (3 colunas mais à direita) de IL-1 $\alpha$ (+) (10 ng/ml). A libertação e a síntese de proteoglicanos (PG) estão mostradas como quantidade acima do controlo.

A Figura 44 mostra a expressão relativa da família da IL-17 humana no modelo de ratinho de doença inflamatória do intestino [DII] como demonstrado por valores -delta Ct relativamente a GAPDH. A IL-17 mostra expressão melhorada neste modelo de ratinho durante as etapas moderada e grave da doença inflamatória do intestino. Em contraste, a IL-17E (PRO10272) demonstra uma marcada diminuição na expressão durante as etapas graves de DII, enquanto a IL-17B (PRO1031) demonstra uma diminuição moderada na expressão na DII grave.

A Figura 45 mostra um estudo no decorrer no tempo que mede a expressão relativa de IL-17D (PRO21175) num modelo de ratinho de icto ao longo das primeiras 72 horas. A expressão de IL-17D no cérebro diminui drasticamente a partir do momento do icto é induzida para o ponto final de 72 horas.

#### Descrição Detalhada das Concretizações Preferidas

##### I. Definições

Os termos "polipéptido PRO" e "PRO", como aqui se utilizam, e quando imediatamente seguidos por uma designação numérica referem-se a vários polipéptidos, em que a designação completa (*i.e.*, PRO/número) se refere a sequências polipeptídicas específicas como aqui descrito. Os termos "polipéptido PRO/número" e "PRO/número" em que o termo

"número" é proporcionado como uma designação numérica real, como aqui se utilizam, abrangem polipéptidos de sequência nativa e polipéptidos variantes (que são aqui adicionalmente definidos). Os polipéptidos PRO aqui descritos podem ser isolados de uma variedade de fontes, tais como de tipos de tecidos humanos ou de outra fonte, ou preparados por métodos recombinantes ou sintéticos. O termo "polipéptido PRO" refere-se a cada polipéptido PRO/número individual aqui divulgado. Todas as divulgações no presente fascículo que se referem ao "polipéptido PRO" referem-se a cada um dos polipéptidos individualmente assim como conjuntamente. Por exemplo, descrições da preparação, purificação, derivação, formação de anticorpos para ou contra, administração, composições contendo, tratamento de uma doença com, etc., referem-se a cada polipéptido da invenção individualmente. O termo "polipéptido PRO" também inclui variantes dos polipéptidos PRO/número aqui divulgados.

Um "polipéptido PRO de sequência nativa" compreende um polipéptido possuindo a mesma sequência de aminoácidos que o polipéptido PRO correspondente derivado da natureza. Estes polipéptidos PRO de sequência nativa podem ser isolados da natureza ou podem ser produzidos por meios recombinantes ou sintéticos. A expressão "polipéptido PRO de sequência nativa" abrange especificamente formas segregadas ou truncadas de ocorrência natural ou formas do polipéptido PRO específicas (e.g., uma sequência de domínio extracelular), formas variantes de ocorrência natural (e.g., formas de *splicing* alternativo) e variantes alélicas de ocorrência natural do polipéptido. Em várias concretizações da invenção, os polipéptidos PRO de sequência nativa aqui divulgados são polipéptidos maduros ou de sequência nativa de comprimento completo compreendendo as sequências de aminoácidos de comprimento completo mostradas nas figuras anexas. Os codões de início e de paragem estão mostrados a negrito e sublinhados nas figuras. Contudo, embora os polipéptidos PRO divulgados nas figuras anexas estejam mostrados a começar com resíduos de metionina aqui designados por posição de aminoácido 1 nas figuras, é concebível e possível que outros resíduos de metionina localizados a montante ou a jusante da posição de aminoácido 1 nas figuras possam ser empregues como resíduo de aminoácido de partida para o polipéptidos PRO.

O "domínio extracelular" ou "ECD" do polipéptido PRO refere-se a uma forma do polipéptido PRO que está essencialmente isenta dos domínios transmembranar e citoplasmático. Vulgarmente, um ECD de polipéptido PRO terá menos de 1% destes domínios transmembranar e/ou citoplasmático e preferivelmente, terá menos de 0,5% destes domínios. Entender-se-á que quaisquer domínios transmembranares identificados para os polipéptidos PRO da presente invenção são identificados segundo critérios rotineiramente empregues na especialidade para a identificação desse tipo de domínios hidrófobos. As fronteiras exactas de um domínio transmembranar podem variar mas mais provavelmente em não mais de cerca de 5 aminoácidos em cada extremidade do domínio como inicialmente aqui identificado. Opcionalmente, portanto, um domínio extracelular de um polipéptido PRO pode conter de cerca de 5 ou menos aminoácidos de cada lado da fronteira do domínio transmembranar/domínio extracelular como identificado nos Exemplos ou no fascículo e esses polipéptidos, com ou sem o péptido de sinal associado, e o ácido nucleico que os codifica, estão contemplados pela presente invenção.

As localizações aproximadas dos "péptidos de sinal" dos vários polipéptidos PRO aqui divulgados estão mostradas no presente fascículo e/ou nas figuras anexas. Note-se, contudo, que a fronteira C-terminal de um péptido de sinal pode variar, mas mais provavelmente em não mais de cerca de 5 aminoácidos de cada lado da fronteira C-terminal do péptido de sinal como aqui inicialmente identificada, em que a fronteira C-terminal do péptido de sinal pode ser identificada segundo critérios rotineiramente empregues na especialidade para a identificação desse tipo de elementos de sequências de aminoácidos (e.g., Nielsen *et al.*, Prot. Eng., 10:1-6 (1997) e von Heinje *et al.*, Nucl. Acids. Res., 14:4683-4690 (1986)). Adicionalmente, é também reconhecido que, em alguns casos, a clivagem de uma sequência de sinal de um polipéptido segregado não é inteiramente uniforme, resultando mais do que uma espécie segregada. Estes polipéptidos maduros, onde o péptido de sinal é clivado em não mais de cerca de 5 aminoácidos de cada lado da fronteira C-terminal do péptido de sinal como aqui identificado, e os polinucleótidos que os codificam, estão contemplados pela presente invenção.

"Variante de polipéptido PRO" significa um polipéptido PRO activo como definido acima ou adiante possuindo pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência de aminoácidos com uma sequência de um polipéptido PRO de sequência nativa de comprimento completo como aqui divulgado, uma sequência de um polipéptido PRO a que falta o péptido de sinal como aqui divulgado, um domínio extracelular de um polipéptido PRO, com ou sem o péptido de sinal, como aqui divulgado, ou qualquer outro fragmento de uma sequência de um polipéptido de PRO de comprimento completo como aqui divulgado. Estas variantes de polipéptido PRO incluem, por exemplo, polipéptidos PRO em que um ou mais resíduos de aminoácido são adicionados, ou eliminados, nos terminais N ou C da sequência de aminoácidos nativa de comprimento completo. Vulgarmente, uma variante de polipéptido PRO terá pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 81% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 82% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 83% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 84% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 85% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 86% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 87% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 88% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 89% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 90% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 91% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 92% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 93% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 94% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 95% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 96% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 97% de identidade de sequência de aminoácidos, alternativamente pelo menos cerca de 98% de identidade de sequência de aminoácidos e

alternativamente pelo menos cerca de 99% de identidade de sequência de aminoácidos com uma sequência de um polipéptido PRO de sequência nativa de comprimento completo como aqui divulgado, uma sequência de um polipéptido PRO a que falta o péptido de sinal como aqui divulgado, um domínio extracelular de um polipéptido PRO, com ou sem o péptido de sinal, como aqui divulgado ou qualquer outro fragmento especificamente definido de uma sequência de um polipéptido PRO de comprimento completo como aqui divulgado. Vulgarmente, os polipéptidos PRO variantes têm pelo menos cerca de 10 aminoácidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 20 aminoácidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 30 aminoácidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 40 aminoácidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 50 aminoácidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 60 aminoácidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 70 aminoácidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 80 aminoácidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 90 aminoácidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 100 aminoácidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 150 aminoácidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 200 aminoácidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 300 aminoácidos de comprimento, ou mais.

"Percentagem (%) de identidade de sequência de aminoácidos" em relação às sequências de polipéptidos PRO aqui identificadas é definida como a percentagem de resíduos de aminoácido numa sequência candidata que são idênticos aos resíduos de aminoácido na sequência específica de um polipéptido PRO, após alinhamento das sequências e introdução de hiatos, se necessário, para se conseguir o máximo de percentagem de identidade de sequências, e não considerando quaisquer substituições conservativas como parte da identidade de sequências. O alinhamento para fins de determinação da percentagem de identidade de sequências de aminoácidos pode ser conseguido de várias maneiras que fazem parte dos conhecimentos dos peritos na especialidade, por exemplo, utilizando *software* de computador disponível ao público tal como *software* BLAST, BLAST-2, ALIGN ou Megalign (DNASTAR). Os peritos na especialidade podem determinar os parâmetros

apropriados para a medição do alinhamento, incluindo quaisquer algoritmos necessários para se conseguir o alinhamento máximo ao longo da totalidade do comprimento das sequências em comparação. Para os presentes fins, contudo, os valores da % de identidade de sequência de aminoácidos são gerados utilizando o programa de computador para comparação de sequências ALIGN-2, em que o código-fonte completo para o programa ALIGN-2 é proporcionado na Tabela 1 adiante. O programa de computador para comparação de sequências ALIGN-2 é da autoria da Genentech, Inc. e o código-fonte mostrado na Tabela 1 adiante foi depositado com documentação para o utilizador no U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, onde está registado com o número de registo U.S. Copyright Registration No. TXU510087. O programa ALIGN-2 está disponível ao público através da Genentech, Inc., South San Francisco, California ou pode ser compilado a partir do código-fonte proporcionado na Tabela 1 adiante. O programa ALIGN-2 deverá ser compilado para utilização num sistema operativo UNIX, preferivelmente digital UNIX V4.0D. Todos os parâmetros da comparação de sequências são estabelecidos pelo programa ALIGN-2 e não variam.

Em situações onde se emprega o ALIGN-2 para comparações de sequências de aminoácidos, a % de identidade de sequência de aminoácidos de uma determinada sequência de aminoácidos A relativamente a, com, ou contra uma determinada sequência de aminoácidos B (o que pode alternativamente ser parafraseado como uma determinada sequência de aminoácidos A que tem ou compreende uma determinada % de identidade de sequência de aminoácidos relativamente a, com, ou contra uma determinada sequência de aminoácidos B) é calculada como se segue:

$$100 \text{ vezes a fração } X/Y$$

onde X é o número de resíduos de aminoácido pontuados como correspondências idênticas pelo programa de alinhamento de sequências ALIGN-2 nesse alinhamento do programa de A e B, e onde Y é o número total de resíduos de aminoácido em B. Será notado que quando o comprimento da sequência de aminoácidos A não é igual ao comprimento da sequência de aminoácidos B, a % de identidade de sequências de aminoácidos de A relativamente B não será igual à % de identidade de sequências de

aminoácidos de B relativamente A. Como exemplos de cálculos da % de identidade de sequências de aminoácidos utilizando este método, as Tabelas 2 e 3 demonstram como calcular a % de identidade de sequências de aminoácidos da sequência de aminoácidos designada "Proteína de Comparação" relativamente à sequência de aminoácidos designada "PRO", em que "PRO" representa a sequência de aminoácidos de um polipéptido PRO hipotético de interesse, "Proteína de Comparação" representa a sequência de aminoácidos de um polipéptido contra o qual o polipéptido "PRO" de interesse está a ser comparado, e "X", "Y" e "Z" representam, cada um, diferentes resíduos de aminoácido hipotéticos.

A menos que especificamente observado em contrário, todos os valores de % de identidade de sequência de aminoácidos aqui utilizados são obtidos como descrito no parágrafo imediatamente anterior utilizando o programa de computador ALIGN-2. Contudo, os valores de % de identidade de sequência de aminoácidos podem também ser obtidos como descrito adiante utilizando o programa de computador WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, Methods in Enzymology **266**:460-480 (1996)). A maioria dos parâmetros de busca do WU-BLAST-2 é estabelecida nos valores por defeito. Os que não são estabelecidos nos valores por defeito, *i.e.*, os parâmetros ajustáveis, são estabelecidos nos seguintes valores: "overlap span = 1" (extensão de sobreposição), "overlap fraction = 0.125" (fracção de sobreposição), "word threshold (T) = 11" (limite da palavra), e "scoring matrix = BLOSUM62" (matriz de pontuação). Quando se emprega o WU-BLAST-2, um valor de % de identidade de sequência de aminoácidos é determinado dividindo (a) o número de resíduos de aminoácido correspondentemente idênticos entre a sequência de aminoácidos do polipéptido PRO de interesse possuindo uma sequência derivada do polipéptido PRO nativo e a sequência de aminoácidos de interesse de comparação (*i.e.*, a sequência contra a qual o polipéptido PRO de interesse está a ser comparado que pode ser um polipéptido variante de PRO) como determinado por WU-BLAST-2 por (b) o número total de resíduos de aminoácido do polipéptido PRO de interesse. Por exemplo, na afirmação "um polipéptido compreendendo uma sequência de aminoácidos A que tem ou possuindo pelo menos 80% de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos B", a sequência de aminoácidos A é a sequência de

aminoácidos de interesse de comparação e a sequência de aminoácidos B é a sequência de aminoácidos do polipéptido PRO de interesse.

A percentagem de identidade de sequência de aminoácidos pode também ser determinada utilizando o programa de comparação de sequências NCBI-BLAST2 (Altschul *et al.*, Nucleic Acid Res. **25**:3389-3402 (1997)). O programa de comparação de sequências NCBI-BLAST2 pode ser descarregado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> ou obtido de outro modo do National Institute of Health, Bethesda, MD. NCBI-BLAST2, utiliza vários parâmetros de busca, em que todos esses parâmetros de busca são estabelecidos em valores por defeito incluindo, por exemplo, "unmask = yes" (desmascarado = sim), "strand = all" (cadeia = todas), "expected occurrences = 10" (ocorrências esperadas), "minimum low complexity lenght = 15/5" (comprimento mínimo de baixa complexidade), "multi-pass e-value = 0.01" (valor e de múltiplas passagens), "constant for multi-pass = 25" (constante para múltiplas passagens), "dropoff for final gapped alignment = 25" (quebra para alinhamento final com hiatos) e "scoring matrix = BLOSUM62" (matriz de pontuação).

Em situações em que se emprega o NCBI-BLAST2 para comparações de sequências de aminoácidos, a % de identidade de sequências de aminoácidos de uma determinada sequência de aminoácidos A relativamente a, com, ou contra uma determinada sequência de aminoácidos B (o que pode alternativamente ser parafraseado como uma determinada sequência de aminoácidos A que tem ou compreende uma determinada % de identidade de sequência de aminoácidos relativamente a, com, ou contra uma determinada sequência de aminoácidos B) é calculada como se segue:

$$100 \text{ vezes a fracção X/Y}$$

onde X é o número de resíduos de aminoácido pontuados como correspondências idênticas pelo programa de alinhamento de sequências NCBI-BLAST2 nesse alinhamento do programa de A e B, e onde Y é o número total de resíduos de aminoácido em B. Notar-se-á que quando o comprimento da sequência de aminoácidos A não é igual ao comprimento da sequência de

aminoácidos B, a % de identidade de sequências de aminoácidos de A relativamente a B não será igual à % de identidade de sequências de aminoácidos de B relativamente a A.

"Polinucleótido variante de PRO" ou "sequência de ácido nucleico variante de PRO" significa uma molécula de ácido nucleico que codifica um polipéptido PRO activo como definido adiante e que tem pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência de ácido nucleico com uma sequência de ácido nucleico que codifica uma sequência de um polipéptido PRO de comprimento completo de sequência nativa como aqui divulgado, uma sequência de um polipéptido PRO de comprimento completo de sequência nativa a que falta o péptido de sinal como aqui divulgado, um domínio extracelular de um polipéptido PRO, com ou sem o péptido de sinal, como aqui divulgado ou qualquer outro fragmento de uma sequência de um polipéptido PRO de comprimento completo como aqui divulgado. Vulgarmente, um polinucleótido variante de PRO terá pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 81% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 82% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 83 % de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 84% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 85 % de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 86% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 87% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 88% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 89% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 90% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 91 % de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 92% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 93% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 94% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 95% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 96% de

identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 97% de identidade de sequência de ácido nucleico, alternativamente pelo menos cerca de 98% de identidade de sequência de ácido nucleico e alternativamente pelo menos cerca de 99% de identidade de sequência de ácido nucleico com a sequência de ácido nucleico que codifica uma sequência de um polipéptido PRO de comprimento completo de sequência nativa como aqui divulgado, uma sequência de um polipéptido PRO de comprimento completo de sequência nativa a que falta o péptido de sinal como aqui divulgado, um domínio extracelular de um polipéptido PRO, com ou sem a sequência de sinal, como aqui divulgado ou qualquer outro fragmento de uma sequência de um polipéptido PRO de comprimento completo como aqui divulgado. As variantes não abrangem a sequência de nucleótidos nativa.

Vulgarmente, os polinucleótidos variantes de PRO têm pelo menos cerca de 30 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 60 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 90 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 120 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 150 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 180 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 210 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 240 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 270 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 300 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 450 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 600 nucleótidos de comprimento, alternativamente pelo menos cerca de 900 nucleótidos de comprimento, ou mais.

"Percentagem (%) de identidade de sequência de ácido nucleico" em relação a sequências de ácido nucleico que codificam PRO aqui identificadas é definida como a percentagem de nucleótidos numa sequência candidata que são idênticos aos nucleótidos na sequência de ácido nucleico de PRO de interesse, após alinhamento das sequências e introdução de hiatos, se necessário, para se conseguir a percentagem máxima de identidade de sequências. O alinhamento para fins de

determinação da percentagem de identidade de sequência de ácido nucleico pode ser conseguido de várias maneiras que fazem parte dos conhecimentos dos peritos na especialidade, por exemplo, utilizando software de computador disponível ao público tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN ou Megalign (DNASTAR). Para os presentes fins, contudo, os valores da % de identidade de sequência de ácido nucleico são gerados utilizando o programa de computador para comparação de sequências ALIGN-2, em que o código-fonte completo para o programa ALIGN-2 é proporcionado na Tabela 1 adiante. O programa de computador para comparação de sequências ALIGN-2 é da autoria da Genentech, Inc. e o código-fonte mostrado na Tabela 1 adiante foi depositado com documentação para o utilizador no U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, onde está registado com o número U.S. Copyright Registration No. TXU510087. O programa ALIGN-2 está disponível ao público através da Genentech, Inc., South San Francisco, California ou pode ser compilado a partir do código-fonte proporcionado na Tabela 1 adiante. O programa ALIGN-2 deverá ser compilado para utilização num sistema operativo UNIX, preferivelmente digital UNIX V4.0D. Todos os parâmetros da comparação de sequências são estabelecidos pelo programa ALIGN-2 e não variam.

Em situações em que se emprega o ALIGN-2 para comparações de sequências de ácido nucleico, a % de identidade de sequência de ácido nucleico de uma determinada sequência de ácido nucleico C relativamente a, com, ou contra uma determinada sequência de ácido nucleico D (o que pode alternativamente ser parafraseado como uma determinada sequência de ácido nucleico C que tem ou compreende uma determinada % de identidade de sequência de ácido nucleico relativamente a, com, ou contra uma determinada sequência de ácido nucleico D) é calculada como se segue:

**100 vezes a fracção W/Z**

onde W é o número de nucleótidos pontuados como correspondências idênticas pelo programa de alinhamento de sequências ALIGN-2 nesse alinhamento do programa de C e D, e onde Z é o número total de nucleótidos em D. Notar-se-á que quando o comprimento da sequência de ácido nucleico C não é igual ao comprimento da sequência de ácido nucleico D, a % de

identidade de sequência de ácido nucleico de C relativamente a D não será igual à % de identidade de sequência de ácido nucleico de D relativamente a C. Como exemplos de cálculos de % de identidade de sequência de ácido nucleico, as Tabelas 4 e 5, demonstram como calcular a % de identidade de sequência de ácido nucleico da sequência de ácido nucleico designada "ADN de Comparação" com a sequência de ácido nucleico designada "ADN-PRO", em que "ADN-PRO" representa uma sequência de ácido nucleico que codifica PRO hipotética de interesse, "ADN de Comparação" representa a sequência de nucleótidos de uma molécula de ácido nucleico contra a qual a molécula de ácido nucleico de interesse "ADN-PRO" está a ser comparada, e "N", "L" e "V" representam, cada um, diferentes nucleótidos hipotéticos.

A menos que especificamente afirmado em contrário, todos os valores de % de identidade de sequência de ácido nucleico aqui utilizados são obtidos como descrito no parágrafo imediatamente anterior utilizando o programa de computador ALIGN-2. Contudo, os valores de % de identidade de sequência de ácido nucleico podem também ser obtidos como descrito adiante utilizando o programa de computador WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, Methods in Enzymology 266:460-480 (1996)). A maioria dos parâmetros de busca do WU-BLAST-2 é estabelecida nos valores por defeito. Os que não estão estabelecidos nos valores por defeito, *i.e.*, os parâmetros ajustáveis, são estabelecidos nos valores seguintes: "overlap span = 1" (extensão de sobreposição), "overlap fraction = 0.125" (fracção de sobreposição), "word threshold (T) = 11" (limite da palavra), e "scoring matrix = BLOSUM62" (matriz de pontuação). Quando se emprega o WU-BLAST-2, o valor de % de identidade de sequência de ácido nucleico é determinado dividindo (a) o número de nucleótidos correspondentemente idênticos entre a sequência de ácido nucleico da molécula de ácido nucleico que codifica o polipéptido PRO de interesse possuindo uma sequência derivada da sequência de ácido nucleico nativa que codifica o polipéptido PRO e a molécula de ácido nucleico de comparação de interesse (*i.e.*, a sequência contra a qual a molécula de ácido nucleico que codifica o polipéptido PRO de interesse está a ser comparada que pode ser um polinucleótido de PRO variante) como determinado por WU-BLAST-2, por (b) o número total de nucleótidos da molécula de

ácido nucleico que codifica o polipéptido PRO de interesse. Por exemplo, na afirmação "uma molécula de ácido nucleico isolada compreendendo uma sequência de ácido nucleico A que possui ou possuindo pelo menos 80% de identidade de sequência de ácido nucleico com a sequência de ácido nucleico B", a sequência de ácido nucleico A é a molécula de ácido nucleico de comparação de interesse e a sequência de ácido nucleico B é a sequência de ácido nucleico da molécula de ácido nucleico que codifica o polipéptido PRO de interesse.

A percentagem de identidade de sequência de ácido nucleico pode também ser determinada utilizando o programa de comparação de sequências NCBI-BLAST2 (Altschul *et al.*, Nucleic Acid Res. 25:3389-3402 (1997)). O programa de comparação de sequências NCBI-BLAST2 pode ser descarregado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> ou obtido de outro modo do National Institute of Health, Bethesda, MD. O NCBI-BLAST2 utiliza vários parâmetros de busca, em que todos esses parâmetros de busca estão estabelecidos nos valores por defeito incluindo, por exemplo, "unmask = yes" (desmascarado = sim), "strand = all" (cadeia = todas), "expected occurrences = 10" (ocorrências esperadas), "minimum low complexity length = 15/5" (comprimento mínimo de baixa complexidade), "multi-pass e-valor = 0.01" (valor e de múltiplas passagens), "constant for multi-pass = 25" (constante para múltiplas passagens), "dropoff for final gapped alignment = 25" (queda para alinhamento final com hiatos) e "scoring matrix = BLOSUM62" (matriz de pontuação).

Em situações em que se emprega o NCBI-BLAST2 para comparações de sequências, a % de identidade de sequência de ácido nucleico de uma determinada sequência de ácido nucleico C relativamente a, com, ou contra uma determinada sequência de ácido nucleico D (o que pode alternativamente ser parafraseado como uma determinada sequência de ácido nucleico C que tem ou compreende uma determinada % de identidade de sequência de ácido nucleico relativamente a, com, ou contra uma determinada sequência de ácido nucleico D) é calculada como se segue:

$$100 \text{ vezes a fração } w/z$$

onde  $W$  é o número de nucleótidos pontuados como correspondências idênticas pelo programa de alinhamento de sequências NCBI-BLAST2 nesse alinhamento do programa de C e D, e onde  $Z$  é o número total de nucleótidos em D. Notar-se-á que quando o comprimento da sequência de ácido nucleico C não é igual ao comprimento da sequência de ácido nucleico D, a % de identidade de sequência de ácido nucleico de C relativamente a D não será igual à % de identidade de sequência de ácido nucleico de D relativamente a C.

Noutras concretizações, os polinucleótidos variantes de PRO são moléculas de ácido nucleico que codificam um polipéptido PRO activo e que são capazes de hibridar, preferivelmente sob condições rigorosas de hibridação e lavagem, com sequências de nucleótidos que codificam um polipéptido PRO de comprimento completo como aqui divulgado. Os polipéptidos variantes de PRO podem ser aqueles que são codificados por um polinucleótido variante de PRO.

"Isolado", quando utilizado para descrever os vários polipéptidos aqui divulgados, significa um polipéptido que foi identificado e separado e/ou recuperado de um componente do seu ambiente natural. Os componentes contaminantes do seu ambiente natural são materiais que iriam tipicamente interferir com utilizações em diagnóstico ou terapêuticas para o polipéptido, e podem incluir enzimas, hormonas e outros solutos proteináceos ou não proteináceos. Em concretizações preferidas, o polipéptido será purificado (1) até um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos de sequência de aminoácidos N-terminal ou interna utilizando um sequenciador de taça rotativa, ou (2) até à homogeneidade por SDS-PAGE sob condições não redutoras ou redutoras utilizando coloração com azul de Coomassie ou, preferivelmente, com prata. Polipéptido isolado inclui o polipéptido *in situ* no interior de células recombinantes, pois pelo menos um componente do ambiente natural do polipéptido PRO não estará presente. Vulgarmente, contudo, o polipéptido isolado será preparado através de pelo menos um passo de purificação.

Um ácido nucleico que codifica um polipéptido PRO "isolado" ou ácido nucleico que codifica outro polipéptido é uma molécula de ácido nucleico que é identificada e separada

de pelo menos uma molécula de ácido nucleico contaminante com a qual está vulgarmente associada na fonte natural do ácido nucleico que codifica o polipéptido. Uma molécula de ácido nucleico que codifica um polipéptido isolada está noutra que não na forma ou configuração em que se encontra na natureza. As moléculas de ácido nucleico que codificam um polipéptido isoladas distinguem-se portanto da molécula de ácido nucleico que codifica um polipéptido específico conforme existe em células naturais. Contudo, uma molécula de ácido nucleico que codifica um polipéptido isolada inclui moléculas de ácido nucleico que codificam um polipéptido contidas em células que vulgarmente expressam o polipéptido onde, por exemplo, a molécula de ácido nucleico está numa localização cromossómica diferente daquela das células naturais.

A expressão "sequências de controlo" refere-se a sequências de ADN necessárias para a expressão de uma sequência de codificação operativamente ligada num organismo hospedeiro particular. As sequências de controlo que são adequadas para procariotas, por exemplo, incluem um promotor, opcionalmente uma sequência operadora, e um local de ligação ao ribossoma. Sabe-se que as células eucariotas utilizam promotores, sinais de poliadenilação, e potenciadores.

Um ácido nucleico está "operativamente ligado" quando está colocado numa relação funcional com outra sequência de ácido nucleico. Por exemplo, um ADN para uma pré-sequência ou um comando de secreção está operativamente ligado a ADN para um polipéptido se é expresso na forma de uma pré-proteína que participa na secreção do polipéptido; um promotor ou um potenciador estão operativamente ligados a uma sequência de codificação se afectam a transcrição da sequência; ou um local de ligação ao ribossoma está operativamente ligado a uma sequência de codificação se está posicionado de modo a facilitar a tradução. Geralmente, "operativamente ligado" significa que as sequências de ADN que estão ligadas são contíguas, e, no caso de um comando de secreção, contíguas e em fase de leitura. Contudo, os potenciadores não têm que ser contíguos. A ligação é realizada por ligação em locais de restrição convenientes. Se estes locais não existirem, os adaptadores ou ligantes oligonucleotídicos sintéticos são utilizados de acordo com a prática convencional.

O termo "anticorpo" é utilizado no sentido mais amplo e especificamente cobre, por exemplo, anticorpos monoclonais anti-PRO simples (incluindo anticorpos agonistas, antagonistas e neutralizantes), composições de anticorpos anti-PRO com especificidade poliepitópica, anticorpos anti-PRO de cadeia simples e fragmentos de anticorpos anti-PRO (veja-se adiante). A expressão "anticorpo monoclonal", como aqui se utiliza, refere-se a um anticorpo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogéneos, i.e., os anticorpos individuais que constituem a população são idênticos excepto quanto a possíveis mutações de ocorrência natural que podem estar presentes em quantidades mínimas.

O "rigor" de reacções de hibridação é prontamente determinável por uma pessoa competente na matéria, e geralmente é um cálculo empírico dependente do comprimento da sonda, da temperatura de lavagem e da concentração salina. Em geral, sondas mais longas requerem temperaturas superiores para uma correcta hibridação, enquanto sondas mais curtas necessitam de temperaturas inferiores. A hibridação geralmente depende da capacidade de ADN desnaturado voltar a hibridar quando estão presentes cadeias complementares num ambiente abaixo da sua temperatura de fusão. Quanto maior o grau de homologia desejado entre a sonda e a sequência hibridável, maior da temperatura relativa que pode ser utilizada. Em resultado, segue-se que maiores temperaturas relativas tenderiam a tornar as condições da reacção mais rigorosas, enquanto temperaturas inferiores, menos rigorosas. Para detalhes e explicações adicionais sobre o rigor de reacções de hibridação, veja-se Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

"Condições rigorosas" ou "condições muito rigorosas", como aqui definido, podem ser identificadas como aquelas que: (1) empregam baixa força iónica e temperatura elevada para a lavagem, por exemplo cloreto de sódio 0,015 M/citrato de sódio 0,0015 M/dodecilsulfato de sódio a 0,1% a 50°C; (2) empregam durante a hibridação um agente desnaturante, tal como formamida, por exemplo, formamida a 50% (v/v) com albumina sérica bovina a 0,1%/Ficoll a 0,1%/polivinilpirrolidona a 0,1%/tampão de fosfato de sódio 50mM a pH 6,5 com cloreto de

sódio 750 mM, citrato de sódio 75 mM a 42°C; ou (3) empregam formamida a 50%, SSC 5x (NaCl 0,75 M, citrato de sódio 0,075 M), fosfato de sódio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sódio a 0,1%, solução de Denhardt 5x, ADN de esperma de salmão tratado com ultra-sons (50 µg/ml), SDS a 0,1% e sulfato de dextrano a 10% a 42°C, com lavagens a 42°C com SSC 0,2x (cloreto de sódio/citrato de sódio) e formamida a 50% a 55°C, seguidas de uma lavagem muito rigorosa consistindo em SSC 0,1x contendo EDTA a 55°C.

"Condições moderadamente rigorosas" podem ser identificadas como descrito por Sambrook *et al.*, Molecular Clonagem: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluem a utilização de solução de lavagem e condições de hibridação (e.g., temperatura, força iônica e % de SDS) menos rigorosas do que como descritas acima. Um exemplo de condições moderadamente rigorosas consiste em incubação durante a noite a 37°C numa solução compreendendo: formamida a 20%, SSC 5x (NaCl 150 mM, citrato de trissódio 15 mM), fosfato de sódio 50 mM (pH 7,6), solução de Denhardt 5x, sulfato de dextrano a 10% e ADN de esperma de salmão cisalhado desnaturado a 20 mg/ml, seguida de lavagem dos filtros com SSC 1x a cerca de 37-50°C. O técnico especialista saberá como ajustar a temperatura, força iônica, etc. conforme necessário para acomodar factores tais como o comprimento da sonda e similares.

A expressão "marcado com epítopo" quando aqui utilizada refere-se a um polipéptido químérico compreendendo um polipéptido PRO fundido com um "polipéptido marcador". O polipéptido marcador possui resíduos suficientes para proporcionar um epítopo contra o qual um anticorpo possa ser criado, e no entanto é suficientemente curto para que não interfira com a actividade do polipéptido ao qual está fundido. O polipéptido marcador preferivelmente também é bastante único de modo a que o anticorpo não reaja substancialmente de forma cruzada com outros epítopos. Os polipéptidos marcadores adequados possuem geralmente pelo menos seis resíduos de aminoácido e usualmente entre cerca de 8 e 50 resíduos de aminoácido (preferivelmente, entre cerca de 10 e 20 resíduos de aminoácido).

Como aqui se utiliza, o termo "imunoadesina" designa moléculas semelhantes a anticorpos que combinam a especificidade de ligação de uma proteína heteróloga (uma "adesina") com as funções efectoras de domínios constantes de imunoglobulinas. Estruturalmente, as imunoadesinas compreendem uma fusão de uma sequência de aminoácidos com a especificidade de ligação desejada que é outra que não o reconhecimento de抗igenos e o local de ligação de um anticorpo (*i.e.*, é "heteróloga"), e uma sequência de um domínio constante de imunoglobulina. A parte adesina de uma molécula de imunoadesina tipicamente é uma sequência de aminoácidos contígua compreendendo pelo menos o local de ligação de um receptor ou de um ligando. A sequência do domínio constante de imunoglobulina na imunoadesina pode ser obtida a partir de qualquer imunoglobulina, tal como dos subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 ou IgG-4, IgA (incluindo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD ou IgM.

O termo "antagonista" é utilizado no sentido mais lato, e inclui qualquer molécula que bloquee, iniba ou neutralize parcial ou completamente a actividade biológica de um polipéptido PRO nativo aqui divulgado. De maneira similar, o termo "agonista" é utilizado no sentido mais lato e inclui qualquer molécula que imite a actividade biológica de um polipéptido PRO nativo aqui divulgado. As moléculas de agonistas ou antagonistas adequados incluem especificamente anticorpos agonistas ou antagonistas ou fragmentos de anticorpos, fragmentos ou variantes de sequência de aminoácidos de polipéptidos PRO nativos, péptidos, oligonucleótidos anti-sentido, moléculas orgânicas pequenas, etc. Os métodos para identificação de agonistas ou antagonistas de um polipéptido PRO podem compreender o contacto de um polipéptido PRO com uma molécula agonista ou antagonista candidata e a medição de uma alteração detectável numa ou mais actividades biológicas normalmente associadas ao polipéptido PRO.

"Tratamento" refere-se tanto a tratamento terapêutico como a medidas profilácticas ou preventivas, em que o objectivo é prevenir ou retardar (diminuir) a condição ou desordem patológica alvo. Aqueles que necessitam de tratamento incluem aqueles que já têm a desordem assim como aqueles que

são propensos a ter a desordem ou aqueles em que a desordem se pretende prevenir.

Administração "crónica" refere-se a administração do(s) agente(s) num modo contínuo em oposição a um modo agudo, de modo a manter o efeito terapêutico inicial (actividade) durante um período de tempo prolongado. Administração "intermitente" é o tratamento que não é realizado consecutivamente sem interrupção, mas é de natureza cíclica.

"Mamífero" para os fins de tratamento refere-se a qualquer animal classificado como um mamífero, incluindo seres humanos, animais domésticos e de criação, e de zoológico, desporto, ou animais de estimação, tais como cães, gatos, gado vacum, cavalos, ovelhas, porcos, cabras, coelhos, etc. Preferivelmente, o mamífero é o ser humano.

Administração "em combinação com" um ou mais outros agentes terapêuticos inclui a administração simultânea (concorrente) e consecutiva por qualquer ordem.

"Transportadores", como aqui se utiliza, incluem transportadores, excipientes ou estabilizantes farmaceuticamente aceitáveis que não são tóxicos para a célula ou mamífero que lhes estão expostos nas dosagens e concentrações empregues. Frequentemente, o transportador fisiologicamente aceitável é uma solução aquosa de pH tamponado. Os exemplos de transportadores fisiologicamente aceitáveis incluem tampões tais como fosfato, citrato, e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico; polipéptidos de baixo peso molecular (menos de cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina sérica, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrófilos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, arginina ou lisina; monossacáridos, dissacáridos, e outros hidratos de carbono incluindo glucose, manose ou dextrinas; agentes quelantes tais como EDTA; aldóis tais como manitol ou sorbitol; contra-iões formadores de sais tais como sódio; e/ou tensioactivos não iónicos tais como TWEEN™, polietilenoglicol (PEG) e PLURONICS™.

"Fragments de anticorpos" compreendem uma porção de um anticorpo intacto, preferivelmente a região de ligação ao抗原 ou variável do anticorpo intacto. Os exemplos de fragmentos de anticorpos incluem fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> e Fv; diacorpos; anticorpos lineares (Zapata *et al.*, Protein Eng., 8(10):1057-1062 [1995]); moléculas de anticorpo de cadeia simples; e anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpos.

A digestão com papaina de anticorpos produz dois fragmentos de ligação ao抗原 idênticos, denominados fragmentos "Fab", cada um com um único local de ligação ao抗原, e um fragmento "Fc" residual, uma designação que reflecte a capacidade de cristalizar prontamente. O tratamento com pepsina origina um fragmento F(ab')<sub>2</sub> que possui dois locais de combinação com o抗原 e é ainda capaz de ligar de modo cruzado o抗原.

"Fv" é o fragmento mínimo de anticorpo que contém um local de reconhecimento e de ligação ao抗原 completo. Esta região consiste num dímero de um domínio variável de cadeia pesada e de uma cadeia leve em associação forte, não covalente. É nesta configuração que as três CDR de cada domínio variável interactuam para definir um local de ligação ao抗原 na superfície do dímero V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>. Colectivamente, as seis CDR conferem especificidade de ligação ao抗原 ao anticorpo. Contudo, mesmo um único domínio variável (ou metade de um Fv compreendendo apenas três CDR específicas para um抗原) possui a capacidade de reconhecer e ligar o抗原, apesar de com menor afinidade do que o local de ligação completo.

O fragmento Fab também contém o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (CH1) da cadeia pesada. Os fragmentos Fab diferem de fragmentos Fab' pela adição de alguns resíduos no terminal carboxi do domínio CH1 da cadeia pesada incluindo uma ou mais cisteínas da região de charneira do anticorpo. Fab'-SH é a designação aqui para um Fab' em que o(s) resíduo(s) de cisteína dos domínios constantes possui(em) um grupo tiol livre. Os fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de anticorpos originalmente eram produzidos na forma de pares de fragmentos Fab' que possuem cisteínas de charneira

entre si. São também conhecidos outros acoplamento químicos de fragmentos de anticorpos.

As "cadeias leves" de anticorpos (imunoglobulinas) de qualquer espécie de vertebrado podem ser atribuídas a um de 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, as imunoglobulinas podem ser atribuídas a diferentes classes. Existem cinco classes principais de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, e várias destas podem ainda ser divididas em subclasses (isotipos), e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2.

Os fragmentos de anticorpos "Fv de cadeia simples" ou "sFv" compreendem os domínios de anticorpos  $V_H$  e  $V_L$ , em que esses domínios estão presentes numa única cadeia polipeptídica. Preferivelmente, o polipeptídeo Fv compreende ainda um ligante polipeptídico entre os domínios  $V_H$  e  $V_L$  o que permite que o sFv forme a estrutura desejada para ligação ao抗原. Para uma revisão de sFv, veja-se Pluckthun em The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg e Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

O termo "diacorpos" refere-se a fragmentos pequenos de anticorpos com dois locais de ligação ao抗原, fragmentos esses que compreendem um domínio variável de cadeia pesada ( $V_H$ ) ligado a um domínio variável de cadeia leve ( $V_L$ ) na mesma cadeia polipeptídica ( $V_H-V_L$ ). Utilizando um ligante que é demasiado curto para permitir o emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia, os domínios são forçados a emparelhar com os domínios complementares de outra cadeia e criar dois locais de ligação ao抗原. Os diacorpos estão descritos mais completamente, por exemplo, em EP 404,097; WO 93/11161; e Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993).

Um anticorpo "isolado" é um que foi identificado e separado e/ou recuperado de um componente do seu ambiente natural. Os componentes contaminantes do seu ambiente natural

são materiais que iriam interferir com utilizações em diagnóstico ou terapêuticas para o anticorpo, e podem incluir enzimas, hormonas e outros solutos proteináceos ou não proteináceos. Em concretizações preferidas, o anticorpo será purificado (1) até mais de 95% em peso de anticorpo determinado pelo método de Lowry, e mais preferivelmente mais de 99% em peso, (2) até um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos de sequência de aminoácidos N-terminal ou interna utilizando um sequenciador de taça rotativa, ou (3) até à homogeneidade por SDS-PAGE sob condições redutoras ou não redutoras utilizando coloração com azul de Coomassie ou, preferivelmente, com prata. O anticorpo isolado inclui o anticorpo *in situ* no interior de células recombinantes pois pelo menos um componente do ambiente natural do anticorpo não estará presente. Vulgarmente, contudo, o anticorpo isolado será preparado através de pelo menos um passo de purificação.

Um anticorpo que "se liga especificamente a" ou é "específico para" um polipéptido particular ou um epítopo num polipéptido particular, é um que se liga a esse polipéptido particular ou epítopo num polipéptido particular sem substancialmente se ligar a qualquer outro polipéptido ou epítopo polipeptídico.

A palavra "marcador" quando aqui utilizada refere-se a um composto ou composição detectável que é conjugado directamente ou indirectamente ao anticorpo de modo a gerar um anticorpo "marcado". O marcador pode ser detectável por si só (e.g. marcadores radioisotópicos ou marcadores fluorescentes) ou, no caso de um marcador enzimático, pode catalisar uma alteração química de um composto ou composição substrato que é detectável.

Por "fase sólida" entenda-se uma matriz não aquosa à qual o anticorpo da presente invenção pode aderir. Os exemplos de fases sólidas aqui abrangidas incluem as formadas parcial ou totalmente por vidro (e.g., vidro de poro controlado), polissacáridos (e.g., agarose), poliacrilamidas, poliestireno, poli(álcool vinílico) e silicones. Em determinadas concretizações, dependendo do contexto, a fase sólida pode compreender o poço de uma placa de ensaio; em outros é uma coluna de purificação (e.g., uma coluna de cromatografia de afinidade). Este termo

também inclui uma fase sólida descontínua de partículas discretas, tais como descritas na Patente U.S. 4,275,149.

Um "lipossoma" é um vesicular pequena composta por vários tipos de lípidos, fosfolípidos e/ou tensioactivos que é útil para a entrega de um fármaco (tal como um polipéptido PRO ou um seu anticorpo) a um mamífero. Os componentes do lipossoma são normalmente dispostos numa formação em bicamada, similar ao arranjo lipídico das membranas biológicas.

Uma "molécula pequena" é definida aqui como possuindo um peso molecular inferior a cerca de 500 Daltons.

O termo "modular" significa afectar (e.g., seja supra-regular, infra-regular ou controlar de outro modo) o nível de uma via de sinalização. Os processos celulares sob o controlo de transdução de sinal incluem, mas não se lhes limitam, transcrição de genes específicos, funções celulares normais, tais como metabolismo, proliferação, diferenciação, adesão, apoptose e sobrevivência, assim como processos anómalos, tais como transformação, bloqueio de diferenciação e metástase.

"Activo" ou "actividade" para os presentes fins referem-se a forma(s) de um polipéptido PRO que retêm uma actividade biológica e/ou imunológica dos polipéptidos PRO nativos ou de ocorrência natural, em que actividade "biológica" se refere a uma função biológica (seja inibidora ou estimuladora) causada por um polipéptido PRO nativo ou de ocorrência natural outra que não a capacidade de induzir a produção de um anticorpo contra um epítopo antigénico possuído por um polipéptido PRO nativo ou de ocorrência natural e uma actividade "imunológica" refere-se à capacidade de induzir a produção de um anticorpo contra um epítopo antigénico possuído por um polipéptido PRO nativo ou de ocorrência natural. Uma actividade biológica preferida inclui a indução de activação de NF- $\kappa$ B e estimulação da produção da quimioquina pró-inflamatória IL-8. Outra actividade biológica preferida inclui estimulação de células mononucleares de sangue periférico ou células CD4 $^{+}$ . Outra actividade biológica preferida inclui a estimulação da proliferação de linfócitos T. Outra actividade biológica preferida inclui, por exemplo, a libertação de TNF- $\alpha$  por células THP1. Uma actividade alternativa é a redução da

produção de NO (óxido nítrico) induzida por IL-1a a partir da cartilagem articular. Outra actividade inclui um aumento da síntese de matriz em cartilagem articular. Alternativamente, outra actividade inclui a promoção da quebra de matriz de cartilagem articular assim como a inibição da síntese da matriz. Outra actividade biológica preferida inclui a modulação do nível da via de sinalização de interleucina-17 durante etapas moderadas a graves de doença inflamatória do intestino ou durante o icto.

Uma actividade "imunológica" refere-se apenas à capacidade de induzir a produção de um anticorpo contra um epítopo antigénico possuído por um polipeptídeo PRO nativo ou de ocorrência natural.

"Desordem cartilaginosa degenerativa" descreve uma hoste de desordens que é caracterizada principalmente pela destruição da matriz de cartilagem. Patologias adicionais incluem produção de óxido nítrico, e quebra elevada de proteoglicanos. Os exemplos de desordens abrangidas nesta definição, incluem, por exemplo, artrite (e.g., osteoartrite, artrite reumatóide, artrite psoriásica).

A expressão "doença imuno-relacionada" significa uma doença em que um componente do sistema imunitário de um mamífero causa, medeia ou de outro modo contribui para uma morbidade no mamífero. Também estão incluídas doenças em que a estimulação ou a intervenção da resposta imunitária tem um efeito de melhoria na progressão da doença. Estão incluídas nesta expressão doenças inflamatórias imunomediadas, doenças inflamatórias não imunomediadas, doenças infecciosas, doenças de imunodeficiência, neoplasia, etc.

A expressão "doença mediada por células T" significa uma doença em que células T medeiam directa ou indirectamente ou de outro modo contribuem para uma morbidade num mamífero. A doença mediada por células T pode estar associada com efeitos mediados por células, efeitos mediados por linfoquinas, etc., e mesmo efeitos associados com células B se as células B são estimuladas, por exemplo, pelas linfoquinas segregadas por células T.

Os exemplos de doenças imuno-relacionadas e inflamatórias, algumas das quais são imunomediadas ou mediadas por células T, que podem ser tratadas de acordo com a invenção incluem lúpus eritematoso sistémico, artrite reumatóide, artrite crónica juvenil, espondiloartropatias, esclerose sistémica (esclerodermia), miopatias inflamatórias idiopáticas (dermatomiosite, polimiosite), síndrome de Sjögren, vasculite sistémica, sarcoidose, anemia hemolítica auto-imune (pancitopenia imune, hemoglobinúria nocturna paroxística), trombocitopenia auto-imune (púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia imunomediada), tiroidite (doença de Grave, tiroidite de Hashimoto, tiroidite linfocítica juvenil, tiroidite atrópica), diabetes mellitus, doença renal imunomediada (glomerulonefrite, nefrite túbulo-intersticial), doenças desmielinizantes dos sistemas nervosos central e periférico tais como esclerose múltipla, polineuropatia desmielinizante idiopática ou Síndrome de Guillain-Barré, e polineuropatia desmielinizante inflamatória crónica, doenças hepatobiliares tais como hepatite infecciosa (hepatite A, B, C, D, E e outros vírus não hepatotrópicos), hepatite activa crónica auto-imune, cirrose biliar primária, hepatite granulomatosa e colangite esclerosante, doença inflamatória do intestino (colite ulcerativa: doença de Crohn), enteropatia sensível ao glúten, e Doença de Whipple, doenças da pele auto-imunes ou imunomediadas incluindo doenças cutâneas bolhosas, dermatite de contacto e eritema multiforme, psoriase, doenças alérgicas tais como asma, rinite alérgica, dermatite atópica, hipersensibilidade a alimentos e urticária, doenças imunológicas do pulmão tais como pneumonias eosinofílicas, fibrose pulmonar idiopática e pneumonite de hipersensibilidade, doenças associadas a transplantações incluindo rejeição de enxertos e doença enxerto-versus-hospedeiro. Doenças infecciosas incluindo doenças virais tais como SIDA (infecção por HIV), hepatite A, B, C, D e E, herpes, etc., infecções bacterianas, infecções fúngicas, infecções por protozoários e infecções parasíticas. A expressão "quantidade eficaz" é uma concentração ou quantidade de um polipéptido PRO e/ou agonista/antagonista que resulta no alcance de um propósito particular estabelecido. Uma "quantidade eficaz" de um polipéptido PRO ou seu agonista ou antagonista pode ser determinada empiricamente. Adicionalmente, uma "quantidade terapeuticamente eficaz" é uma concentração ou quantidade de

um polipéptido PRO e/ou agonista/antagonista que é eficaz para se conseguir um efeito terapêutico estabelecido. Esta quantidade pode também ser determinada empiricamente.

A expressão "agente citotóxico", como aqui se utiliza, refere-se a uma substância que inibe ou previne a função de células e/ou causa a destruição de células. Na expressão pretende-se incluir isótopos radioactivos (e.g., I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup> e Re<sup>186</sup>), agentes quimioterapêuticos e toxinas tais como toxinas enzimaticamente activas de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, ou seus fragmentos.

Um "agente quimioterapêutico" é um composto químico útil no tratamento de cancro. Os exemplos de agentes quimioterapêuticos incluem adriamicina, doxorubicina, epirubicina, 5-fluorouracilo, arabinósido de citosina ("Ara-C"), ciclofosfamida, tiotepa, bussulfano, citoxina, taxóides, e.g., paclitaxel (Taxol, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), e doxetaxel (Taxotere, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, França), toxotere, metotrexato, cisplatina, melfalano, vinblastina, bleomicina, etoposido, ifosfamida, mitomicina C, mitoxantrona, vincristina, vinorrelbina, carboplatina, teniposido, daunomicina, carminomicina, aminopterina, dactinomicina, mitomicinas, espiramicinas (veja-se a Pat. U.S. 4,675,187), melfalano e outras mostardas de azoto relacionadas. Estão também incluídos nesta definição agentes hormonais que actuam para regular ou inibir a acção de hormonas sobre tumores tais como tamoxifeno e onapristona.

Um "agente inibidor do crescimento", quando aqui utilizado, refere-se a um composto ou uma composição que inibem o crescimento de uma célula, especialmente células cancerosas que sobre-expressam qualquer dos genes aqui identificados, quer *in vitro* quer *in vivo*. Assim, o agente inibidor do crescimento é um que reduz significativamente a percentagem de células que sobre-expressam esses genes em fase S. Os exemplos de agentes inibidores do crescimento incluem agentes que bloqueiam a progressão no ciclo celular (num local que não a fase S), tais como agentes que induzem paragem em G1 e paragem em fase M. Os bloqueadores clássicos em fase M incluem as vincas (vincristina e vinblastina), o taxol e os inibidores de topo II tais como doxorubicina,

epirubicina, daunorubicina, etoposido e bleomicina. Os agentes que param G1 também se estendem a paragem em fase S, por exemplo, agentes alquilantes de ADN tais como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatina, metotrexato, 5-fluorouracilo e ara-C. Pode-se encontrar informação adicional em The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, intitulado "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" de Murakami et al., (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente p. 13.

O termo "citoquina" é um termo genérico para proteínas libertadas por uma população celular que actuam sobre outra célula como mediadores intercelulares. Os exemplos destas citoquinas são linfoquinas, monoquinas e hormonas polipeptídicas tradicionais. Estão incluídas entre as citoquinas a hormona do crescimento como a hormona do crescimento humana, N-metionil-hormona do crescimento humana, e hormona do crescimento bovina; hormona paratiróide; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas glicoproteínicas tais como a hormona estimulante dos folículos (FSH), hormona estimulante da tiróide (TSH), e hormona luteinizante (LH); factor de crescimento hepático; factor de crescimento de fibroblastos; prolactina; lactogénio placentário; factor- $\alpha$  e - $\beta$  de necrose tumoral; substância inibidora da *mulleriana*; péptido associado a gonadotropina de ratinho; inibina; activina; factor de crescimento vascular endotelial; integrina; trombopoietina (TPO); factores de crescimento de nervos tais como NGF- $\beta$ ; factor de crescimento de plaquetas; factores de crescimento transformante (TGF) tais como TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ ; factor-I e -II de crescimento semelhante a insulina; eritropoietina (EPO); factores osteoindutores; interferões tais como interferão- $\alpha$ , - $\beta$  e - $\gamma$ ; factores estimulantes de colónias (CSF) tais como macrófagos-CSF (M-CSF); granulócitos-macrófagos-CSF (GM-CSF); e granulócitos-CSF (G-CSF); interleucinas (IL) 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, ou IL-17; um factor de necrose tumoral tal como TNF- $\alpha$  ou TNF- $\beta$ ; e outros factores polipeptídicos incluindo LIF e ligando kit (KL). Como aqui se utiliza, o termo citoquina inclui proteínas de fontes naturais ou de cultura de células recombinantes e equivalentes biologicamente activos das citoquinas de sequência nativa.

Tabela 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 */ { 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, 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, 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, 1, -3, -2, 5, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -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, 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, 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 },
/* 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, -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, _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, 0 },
/* Y */ { -3, -3, 0, -4, -4, 7, -5, 0, -1, 0, 4, -1, -2, -2, _M, -5, -4, -4, -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 }
};

```

Tabela 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 J MPS 1024     /* max jmps in a 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 delay) */
    unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
};

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[J MPS]; /* size of jmp (gap) */
    int x[J MPS]; /* 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 *calloc0, *malloc0, *index0, *strcpy0;
char *getseq0, *g_calloc0;

```

Tabela 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 '>' 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)
{
    int      ac;
    char    *av[];
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        sprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
        sprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        sprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        sprintf(stderr, "Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
        sprintf(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();            /* unlink any tmp files */
}

```

Tabela 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.
 */
nw0
{
    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_malloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

    ndely = (int *)g_malloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_malloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_malloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_malloc("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;
        }
    }
}

```

Tabela 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 ongoing 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 ongoing 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
     */
}

```

Tabela 1 (cont.)

...NW

```

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

```

Tabela 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 pp[]: 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[25][25];
int    olen;           /* set output line length */
FILE   *fx;            /* output file */

print()
{
    int    ix, 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;
    ix = 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);
        ix -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        ix -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(ix, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

```

Tabela 1 (cont.)

```

/*
 * 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 int 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);
}
getmat

```

Tabela 1 (cont.)

```

printf(fx, "< gaps in first sequence: %d", gapx); ...getmat
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
    ngapx, (DNA)? "base":"residue", (ngapx == 1)? ":";"s");
    sprintf(fx, "%s", outx);

    printf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
    if (gapy) {
        (void) sprintf(outx, " (%d %s%s",
        ngapy, (DNA)? "base":"residue", (ngapy == 1)? ":";"s");
        sprintf(fx, "%s", outx);
    }
    if (DNA)
        sprintf(fx,
        "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
        smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
    else
        sprintf(fx,
        "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
        smax, PINS0, PINS1);
    if (endgaps)
        sprintf(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
        sprintf(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];
    }
}

```

Tabela 1 (cont.)

```

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].n[i][i]) {
                /*
                 * we need to merge all gaps
                 * at this location
                 */
                siz[i] = pp[i].n[i][i]++;
                while (ni[i] == pp[i].n[i][i])
                    siz[i] += pp[i].n[i][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()
{
    register i;

    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i] = '\0';

```

**dumpblock**

Tabela 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)
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 /= 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)
int ix;
{

```

putline

Tabela 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:
 * n[] 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()
{
    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 (!dma && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                cx = '.';
            else
                cx = ' ';
        }
        else
            cx = ' ';
        *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}

```

Tabela 1 (cont.)

```
/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_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));
}
```

Tabela 1 (cont.)

```

/*
 * cleanup() - cleanup any tmp file
 * getseq() - read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_malloc() - malloc() with error checkin
 * readjmps() - get the good jmps, from tmp file if necessary
 * writejmps() - write a filled array of jmps to a tmp file: nw0
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char *jname = "/tmp/homeXXXXXX";           /* tmp file for jmps */
FILE *fj;

int cleanup();                                /* cleanup tmp file */
long lseek();

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)
{
    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)
{
    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';
}

```

Tabela 1 (cont.)

...getseq

```

py = pseq + 4;
*tlen = 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);
}

char *
g_calloc(msg, nx, sz)                                g_calloc
{
    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, il;
    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 = il = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
;
    }

```

Tabela 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 >= J MPS) {
    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;
}

```

Tabela 1 (cont.)

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw0
 */
writejmps(ix)                                writejmps
{
    int     ix;
    {
        char   *mktemp0;

        if (16) {
            if (mktemp(jname) < 0) {
                sprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
                cleanup(1);
            }
            if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
                sprintf(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);
    }
}

```

Tabela 2

PRO XXXXXXXXXXXXXXXXX (Comprimento = 15 aminoácidos)

Proteína de Comparação XXXXXYYYYYYY (Comprimento = 12 aminoácidos)

% de identidade de sequência de aminoácidos = (o número de resíduos de aminoácido correspondentemente idênticos entre as duas sequências polipeptídicas como determinado por ALIGN-2) dividido por (o número total de resíduos de aminoácido do polipéptido PRO) = 5 dividido por 15 = 33,3%

Tabela 3

PRO XXXXXXXXXXXX (Comprimento = 10 aminoácidos)

Proteína de Comparação XXXXXYYYYYYZZZ (Comprimento = 15 aminoácidos)

% de identidade de sequência de aminoácidos = (o número de resíduos de aminoácido correspondentemente idênticos entre as duas sequências polipeptídicas como determinado por ALIGN-2) dividido por (o número total de resíduos de aminoácido do polipéptido PRO) = 5 dividido por 10 = 50%

Tabela 4

ADN-PRO NNNNNNNNNNNNNNN (Comprimento = 14 nucleótidos)

ADN de Comparação NNNNNNNLLLLLLL (Comprimento = 16 nucleótidos)

% de identidade de sequência de ácido nucleico = (o número de nucleótidos correspondentemente idênticos entre as duas sequências de ácido nucleico como determinado por ALIGN-2) dividido por (o número total de nucleótidos da sequência de ácido nucleico ADN-PRO) = 6 dividido por 14 = 42,9%

**Tabela 5**

ADN-PRO	NNNNNNNNNNNN	(Comprimento = 12 nucleótidos)
ADN de Comparação	NNNNLLLLVV	(Comprimento = 9 nucleótidos)
% de identidade de sequência de ácido nucleico = (o número de nucleótidos correspondentemente idênticos entre as duas sequências de ácido nucleico como determinado por ALIGN-2) dividido por (o número total de nucleótidos da sequência de ácido nucleico ADN-PRO) = 4 dividido por 12 = 33,3%		

## II. Composições e Métodos

### A. Polipéptidos PRO de Comprimento Completo

O presente pedido descreve sequências de nucleótidos identificadas e isoladas pela primeira vez, que codificam polipéptidos referidos no presente pedido de patente como polipéptidos PRO. Em particular, foram identificados e isolados ADNc que codificam vários polipéptidos PRO, como divulgado com mais detalhes nos Exemplos adiante. Note-se que a proteínas produzidas em ciclos de expressão separados podem ser dados diferentes números PRO mas o número UNQ é único para qualquer determinado ADN e a proteína codificada, e não será alterado. Contudo, a título de simplificação, no presente fascículo a proteína codificada pelas moléculas de ácido nucleico nativas de comprimento completo aqui divulgadas assim como a todos os homólogos e variantes nativos incluídos na definição anterior de PRO, serão referidos como "PRO/número", independentemente da sua origem ou modo de preparação.

Como divulgado nos Exemplos adiante, vários clones de ADNc foram depositados na ATCC. As sequências de nucleótidos efectivas desses clones podem ser prontamente determinadas por um técnico especialista por sequenciação do clone depositado utilizando métodos de rotina na especialidade. A sequência de aminoácidos prevista pode ser determinada a partir da sequência de nucleótidos utilizando conhecimentos de rotina. Para os polipéptidos PRO e ácidos nucleicos que os codificam aqui descritos, os requerentes identificaram o que se crê ser ao quadro de leitura mais bem identificável com a informação sobre a sequência disponível na altura.

### **B. Variantes de Polipéptidos PRO**

Em adição aos polipéptidos PRO de sequência nativa de comprimento completo aqui descritos, está contemplado que possam ser preparadas variantes de PRO. As variantes de PRO podem ser preparadas introduzindo alterações de nucleótidos apropriadas no ADN do PRO, e/ou por síntese do polipéptido PRO desejado. Os peritos na especialidade notarão que alterações de aminoácidos podem alterar processos pós-tradução do PRO, tais como alteração do número ou posição de locais de glicosilação ou alteração das características de ancoragem à membrana.

Podem ser efectuadas variações na sequência de PRO nativa de comprimento completo ou em vários domínios do PRO aqui descrito, por exemplo, utilizando quaisquer das técnicas e orientações para mutações conservativas e não conservativas apresentadas, por exemplo, na Patente U.S. 5,364,934. As variações podem ser uma substituição, deleção ou inserção de um ou mais codões que codificam o PRO que resultam numa alteração na sequência de aminoácidos do PRO em comparação com o PRO de sequência nativa. Opcionalmente a variação é por substituição de pelo menos um aminoácido por qualquer outro aminoácido num ou mais dos domínios do PRO. Pode-se encontrar orientações sobre a determinação de que resíduo de aminoácido pode ser inserido, substituído ou eliminado sem afectar adversamente a actividade desejada comparando a sequência do PRO com a de moléculas de proteínas homólogas conhecidas e minimizando o número de alterações na sequência de aminoácidos feitas em regiões de elevada homologia. As substituições de aminoácidos podem ser o resultado de substituição de um aminoácido por outro aminoácido possuindo propriedades estruturais e/ou químicas similares, tal como a substituição de uma leucina por uma serina, *i.e.*, substituições conservativas de aminoácidos. As inserções ou deleções podem opcionalmente ser na gama de cerca de 1 a 5 aminoácidos. A variação permitida pode ser determinada fazendo sistematicamente inserções, deleções ou substituições de aminoácidos na sequência e testando as variantes resultantes quanto à actividade exibida pela sequência nativa de comprimento completo ou madura.

São aqui proporcionados fragmentos de polipéptidos PRO. Estes fragmentos podem ser truncados no terminal N ou no terminal C, ou podem-lhe faltar resíduos internos, por exemplo, quando comparados com uma proteína nativa de comprimento completo. Determinados fragmentos não possuem resíduos de aminoácido que não são essenciais para uma actividade biológica desejada do polipéptido PRO.

Os fragmentos PRO podem ser preparados por qualquer de várias técnicas convencionais. Os fragmentos peptídicos desejados podem ser sintetizados quimicamente. Uma abordagem alternativa envolve a geração de fragmentos de PRO por digestão enzimática, e.g., por tratamento da proteína com uma enzima que se sabe que cliva proteínas em locais definidos por resíduos de aminoácido particulares, ou põe digestão do ADN com enzimas de restrição adequadas e isolamento do fragmento desejado. Ainda outra técnica adequada envolve o isolamento e a amplificação de um fragmento de ADN que codifica um fragmento polipeptídico desejado, por reacção em cadeia pela polimerase (PCR). Os oligonucleótidos que definem os terminais desejados do fragmento de ADN são empregues nos iniciadores 5' e 3' na PCR. Preferivelmente, os fragmentos de polipéptido PRO partilham pelo menos uma actividade biológica e/ou imunológica com o polipéptido PRO nativo aqui divulgado.

Em concretizações particulares, as substituições conservativas de interesse estão mostradas na Tabela 6 na coluna intitulada substituições preferidas. Se estas substituições resultam numa alteração na actividade biológica, então são introduzidas alterações mais substanciais, denominadas substituições exemplificativas na Tabela 6, ou como adicionalmente descrito adiante com referência às classes de aminoácidos, e os produtos são rastreados.

Tabela 6

Resíduo Original	Substituições Exemplificativas	Substituições Preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; ile met; ala; phe	
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; leu norleucina	

Modificações substanciais na função ou identidade imunológica do polipéptido PRO são realizadas seleccionando substituições que diferem significativamente no seu efeito sobre a manutenção (a) da estrutura do esqueleto do polipéptido na área da substituição, por exemplo, na forma de uma conformação em folha ou helicoidal, (b) da carga ou da hidrofobicidade da molécula no local alvo, ou (c) do volume da

cadeia lateral. Os resíduos de ocorrência natural dividem-se em grupos com base em propriedades comuns da cadeia lateral:

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

As substituições não conservativas implicarão a troca de um membro de uma destas classes por outra classe. Estes resíduos substituídos também podem ser introduzidos nos locais de substituição conservativa ou, mais preferivelmente, nos locais restantes (não conservados).

As variações podem ser feitas utilizando métodos conhecidos na especialidade tais como mutagénese mediada por oligonucleótidos (dirigida ao local), por varrimento de alaninas e mutagénese por PCR. A mutagénese dirigida ao local [Carter et al., Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)], mutagénese por cassetes (Wells et al., Gene, 34:315 [1985]), a mutagénese por selecção de restrição (Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 [1986]) ou outras técnicas conhecidas podem ser realizadas com o ADN clonado para produzir o ADN da variante de PRO.

A análise por varrimento de aminoácidos pode também ser empregue para identificar um ou mais aminoácidos ao longo de uma sequência contígua. Entre os aminoácidos preferidos para varrimento encontram-se os aminoácidos neutros relativamente pequenos. Estes aminoácidos incluem alanina, glicina, serina e cisteína. A alanina é tipicamente um aminoácido preferido para varrimento entre este grupo porque elimina a cadeia lateral para além do carbono beta e é menos provável que altere a conformação da cadeia lateral da variante (Cunningham e Wells, Science, 244: 1081-1085 [1989]). A alanina é também tipicamente preferida porque é o aminoácido mais comum. Adicionalmente, encontra-se frequentemente tanto em posições

ocultas como expostas (Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 [1976]). Se a substituição por alanina não originar quantidades adequadas de variante, pode utilizar-se um aminoácido isotérico.

### C. Modificações de PRO

Estão também contempladas modificações covalentes de PRO. Um tipo de modificação covalente inclui a reacção de resíduos de aminoácido alvo de um polipéptido PRO com um agente de derivatização orgânico que é capaz de reagir com cadeias laterais seleccionadas ou com os resíduos N- ou C- terminais do PRO. A derivatização com agentes bifuncionais é útil, por exemplo, para reticulação do PRO com uma matriz de suporte insolúvel em água ou uma superfície para utilização no método de purificação de anticorpos anti-PRO, e vice-versa. Os agentes de reticulação normalmente utilizados incluem, e.g., 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldeído, ésteres de N-hidroxissuccinimida, por exemplo, ésteres com ácido 4-azidossalícílico, 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 desamidação de resíduos glutaminilo e asparaginilo nos correspondentes resíduos glutamilo e aspartilo, respectivamente, hidroxilação de prolina e lisina, fosforilação de grupos hidroxilo de resíduos serilo ou treonilo, metilação dos grupos  $\alpha$ -amino das cadeias laterais da lisina, arginina e histidina [T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)], acetilação da amina N-terminal, e amidação de qualquer grupo carboxilo C-terminal.

Outro tipo de modificação covalente do polipéptido PRO comprehende a alteração do padrão de glicosilação nativo do polipéptido. Por "alteração do padrão de glicosilação nativo" entenda-se para os presentes fins a deleção de um ou mais porções hidrato de carbono encontradas no PRO de sequência nativa (quer por remoção do local de glicosilação subjacente quer por deleção da glicosilação por meios químicos e/ou

enzimáticos), e/ou a adição de um ou mais locais de glicosilação que não estão presentes no PRO de sequência nativa. Em adição, a frase inclui alterações qualitativas na glicosilação das proteínas nativas, envolvendo uma alteração na natureza e nas proporções das várias porções hidrato de carbono presentes.

A adição de locais de glicosilação ao polipéptido PRO pode ser conseguida alterando a sequência de aminoácidos. A alteração pode ser feita, por exemplo, pela adição de, ou substituição por, um ou mais resíduos de serina ou treonina no PRO de sequência nativa (para locais de glicosilação ligada a O). A sequência de aminoácidos de PRO pode opcionalmente ser alterada através de alterações ao nível do ADN, particularmente por mutação do ADN que codifica o polipéptido PRO em bases pré-selecionadas de modo a que sejam gerados codões que se irão traduzir nos aminoácidos desejados.

Outro meio para aumentar o número de porções hidrato de carbono no polipéptido PRO é por acoplamento químico ou enzimático de glicósidos ao polipéptido. Estes métodos estão descritos na especialidade, e.g., em WO 87/05330 publicado em 11 de Setembro de 1987, e em Aplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981).

A remoção de porções hidrato de carbono presentes no polipéptido PRO pode ser realizada química ou enzimaticamente ou por substituição por mutação de codões que codificam para resíduos de aminoácido que servem como alvos para glicosilação. As técnicas de desglicosilação química são conhecidas na especialidade e estão descritas, por exemplo, por Hakimuddin, et al., Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987) e por Edge et al., Anal. Biochem., 118:131 (1981). A clivagem enzimática de porções hidrato de carbono em polipéptidos pode ser realizada utilizando uma variedade de endo- e exo-glicosidases como descrito por Thotakura et al., Meth. Enzymol., 138:350 (1987).

Outro tipo de modificação covalente de PRO compreende a ligação do polipéptido PRO a um de uma variedade de polímeros não proteináceos, e.g., polietilenoglicol (PEG), polipropilenoglicol ou polioxialquilenos, da maneira

estabelecida nas Patentes U.S. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 ou 4,179,337.

O PRO aqui descrito pode também ser modificado de maneira a formar uma molécula quimérica compreendendo o PRO fundido a outro polipéptido ou sequência de aminoácidos heterólogos.

Numa concretização, uma tal molécula quimérica compreende uma fusão do PRO com um polipéptido marcador que proporciona um epítopo ao qual um anticorpo anti-marcador se pode ligar selectivamente. O marcador epítópico está geralmente colocado no terminal amino ou carboxilo do PRO. A presença destas formas marcadas com epítopo do PRO pode ser detectada utilizando um anticorpo contra o polipéptido marcador. Igualmente, proporcionar o marcador epítópico permite que o PRO seja prontamente purificado por purificação de afinidade utilizando um anticorpo anti-marcador ou outro tipo de matriz de afinidade que se liga ao marcador epítópico. Vários polipéptidos marcadores e seus anticorpos respectivos são bem conhecidos na especialidade. Os exemplos incluem marcadores poli-histidina (poli-his) ou poli-histidina-glicina (poli-his-gly); o polipéptido marcador HA da gripe e o seu anticorpo 12CA5 [Field et al., Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]; o marcador c-myc e os seus anticorpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 e 9E10 [Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]; e o marcador glicoproteína D (gD) do vírus Herpes Simplex e o seu anticorpo [Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]. Outros polipéptidos marcadores incluem o péptido Flag [Hopp et al., BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]; o péptido epítópico KT3 [Martin et al., Science, 255:192-194 (1992)]; um péptido epítópico de  $\alpha$ -tubulina [Skinner et al., J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]; e o marcador peptídico proteína do gene 10 de T7 [Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)].

Numa concretização alternativa, a molécula quimérica pode compreender uma fusão do PRO com uma imunoglobulina ou uma região particular de uma imunoglobulina. Para uma forma bivalente da molécula quimérica (também referida como "imunoadesina"), esta fusão pode ser com a região Fc de uma molécula de IgG. As fusões de Ig preferivelmente incluem a

substituição de uma forma solúvel (domínio transmembranar eliminado ou inactivada) de um polipéptido PRO no lugar de pelo menos uma região variável no interior de uma molécula Ig. Numa concretização particularmente preferida, a fusão de imunoglobulina inclui as regiões de charneira, CH2 e CH3, ou as regiões de charneira, CH1, CH2 e CH3 de uma molécula de IgG1. Para a produção de fusões de imunoglobulina veja-se também a Patente US 5,428,130 concedida em 27 de Junho, 1995.

Em ainda uma outra concretização, os polipéptidos PRO podem também ser modificados de maneira a formar uma molécula químérica compreendendo um polipéptido PRO fundido com um "fecho de correr" de leucinas. Vários polipéptidos "fecho de correr" de leucinas foram descritos na especialidade. Veja-se, e.g., Landschulz et al., Science, 240:1759 (1988); WO 94/10308; Hoppe et al., FEBS Letters, 344:1991 (1994); Maniatis et al., Nature, 341:24 (1989). Crê-se que a utilização de um "fecho de correr" de leucinas fundido com um polipéptido PRO pode ser desejável para ajudar na dimerização ou trimerização de um polipéptido PRO solúvel em solução. Os peritos na especialidade notarão que o "fecho de correr" de leucinas pode ser fundido quer no terminal N quer no C da molécula PRO.

#### **D. Preparação de PRO**

A descrição que se segue refere-se principalmente à produção de PRO por cultura de células transformadas ou transfectadas com um vector contendo ácido nucleico de PRO. Está, evidentemente, contemplado que métodos alternativos, que são bem conhecidos na especialidade, possam ser empregues para preparar PRO. Por exemplo, a sequência de PRO, ou suas porções, podem ser produzidos por síntese peptídica directa utilizando técnicas de fase sólida [veja-se, e.g., Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)]. A síntese de proteínas *in vitro* pode ser realizada utilizando técnicas manuais ou por automatização. A síntese automatizada pode ser realizada, por exemplo, utilizando um sintetizador de péptidos da Applied Biosystems (Foster City, CA) utilizando as instruções do fabricante. Várias porções do PRO podem ser sintetizadas quimicamente em

separado e combinadas utilizando métodos químicos ou enzimáticos para produzir o PRO de comprimento completo.

### **1. Isolamento de ADN Que Codifica PRO**

O ADN que codifica PRO pode ser obtido a partir de uma biblioteca de ADNc preparada a partir de tecido que se crê possuir o ARNm de PRO e expressá-lo a um nível detectável. Assim, o ADN de PRO humano pode ser convenientemente obtido a partir de uma biblioteca de ADNc preparada a partir de tecido humano, tal como descrito nos Exemplos. O gene que codifica PRO pode também ser obtido a partir de uma biblioteca genómica ou por procedimentos conhecidos (e.g., síntese automática de ácido nucleico).

As bibliotecas podem ser rastreadas com sondas (tais como anticorpos contra o PRO ou oligonucleótidos de pelo menos cerca de 20-80 bases) desenhadas para identificar o gene de interesse ou a proteína por ele codificada. O rastreio da biblioteca de ADNc ou genómica com a sonda seleccionada pode ser conduzido utilizando procedimentos padrão, tal como descrito em Sambrook *et al.*, Molecular Clonagem: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Um meio alternativo para isolar o gene que codifica PRO consiste em utilizar metodologia de PCR [Sambrook *et al.*, *supra*; Dieffenbach *et al.*, PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Os Exemplos adiante descrevem técnicas para o rastreio de uma biblioteca de ADNc. As sequências de oligonucleótidos seleccionados como sondas deverão ter comprimento suficiente e ser suficientemente desambíguas para minimizar os falsos positivos. O oligonucleótido é preferivelmente marcado de modo a poder ser detectado após hibridação com ADN na biblioteca que se está a rastrear. Os métodos de marcação são bem conhecidos na especialidade, e incluem a utilização de marcadores radioactivos como ATP marcado com  $^{32}\text{P}$ , biotinilação ou marcação enzimática. As condições de hibridação, incluindo rigor moderado e rigor elevado, são proporcionadas em Sambrook *et al.*, *supra*.

As sequências identificadas nestes métodos de rastreio de bibliotecas podem ser comparadas e alinhadas com outras sequências conhecidas depositadas e disponíveis em bases de dados públicas tais como GenBank ou outras bases de dados de sequências privadas. A identidade de sequências (quer ao nível dos aminoácidos quer dos nucleótidos) no interior de regiões definidas da molécula ou ao longo da sequência de comprimento completo pode ser determinada utilizando métodos conhecidos na especialidade e como aqui descrito.

O ácido nucleico possuindo a sequência de codificação da proteína pode ser obtido por rastreio de bibliotecas de ADNc ou genómicas seleccionadas utilizando a sequência de aminoácidos deduzida aqui divulgada pela primeira vez, e, se necessário, utilizando procedimentos convencionais de extensão de iniciadores como descrito em Sambrook *et al.*, *supra*, para detectar precursores e intermediários de processamento de ARNm que possam ter sido transcritos de forma inversa em ADNc.

## **2. Selecção e Transformação de Células Hospedeiras**

As células hospedeiras são transfetadas ou transformadas com vectores de expressão ou clonagem aqui descritos para a produção de PRO e cultivadas em meios nutrientes convencionais modificados como apropriado para indução de promotores, selecção de transformantes ou amplificação dos genes que codificam as sequências desejadas. As condições de cultura, tais como meios, temperatura, pH e similares, podem ser seleccionadas pelo perito na especialidade sem experimentação indevida. Em geral, os princípios, protocolos e técnicas práticas para a maximização da produtividade de culturas celulares podem ser encontrados em Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) e Sambrook *et al.*, *supra*.

Os métodos de transfecção de células eucariotas e transformação de células procariotas são conhecidos das pessoas competentes na matéria, por exemplo,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaPO}_4$ , mediado por lipossomas e electroporação. Dependendo da célula hospedeira utilizada, a transformação é realizada utilizando técnicas padrão apropriadas para essas células. O tratamento com cálcio empregando cloreto de cálcio, como descrito em

Sambrook et al., *supra*, ou a electroporação, são geralmente utilizados para procariotas. A infecção com *Agrobacterium tumefaciens* é utilizada para transformação de determinadas células de plantas, como descrito por Shaw et al., Gene, 23:315 (1983) e WO 89/05859 publicado em 29 de Junho, 1989. Para células de mamífero sem estas paredes celulares, pode ser empregue o método de precipitação com fosfato de cálcio de Graham e van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978). Aspectos gerais de transfecções em sistemas de células hospedeiras de mamífero foram descritos na Patente U.S. 4,399,216. As transformações em levedura são tipicamente realizadas 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). Contudo, podem também ser utilizados outros métodos para introdução de ADN em células, tal como por micro-injecção nuclear, electroporação, fusão de protoplastos bacterianos com células intactas, ou policatiões, e.g., polibreno, poliornitina. Para várias técnicas para a transformação de células de mamífero, veja-se Keown et al., Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990) e Mansour et al., Nature, 336:348-352 (1988).

As células hospedeiras adequadas para clonagem ou expressão do ADN nos presentes vectores incluem células procariotas, de levedura ou eucariotas superiores. Os procariotas adequados incluem, mas não se lhes limitam, eubactérias, tais como organismos Gram-negativos ou Gram-positivos, por exemplo, *Enterobacteriaceae* tais como *E. coli*. Várias estirpes de *E. coli* estão disponíveis ao público, tais como *E. coli* K12 estirpe MM294 (ATCC 31,446); *E. coli* X1776 (ATCC 31,537); *E. coli* estirpe W3110 (ATCC 27,325) e K5 772 (ATCC 53,635). Outras células hospedeiras procariotas adequadas incluem *Enterobacteriaceae* tais como *Escherichia*, e.g., *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, e.g., *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, e.g., *Serratia marcescans*, e *Shigella*, assim como *Bacilli* tais como *B. subtilis* e *B. licheniformis* (e.g., *B. licheniformis* 41P divulgado em DD 266,710 publicado em 12 de Abril, 1989), *Pseudomonas* tais como *P. aeruginosa*, e *Streptomyces*. Estes exemplos são ilustrativos e não limitantes. A estirpe W3110 é um hospedeiro ou hospedeiro progenitor particularmente preferido porque é uma estirpe hospedeira comum para

fermentações de produtos de ADN recombinante. Preferivelmente, a célula hospedeira segregá quantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por exemplo, a estirpe W3110 pode ser modificada para efectuar uma mutação genética nos genes que codificam proteínas endógenas para o hospedeiro, em que os exemplos destes hospedeiros incluem *E. coli* W3110 estirpe 1A2, que possui o genótipo completo *tonA*; *E. coli* W3110 estirpe 9E4, que possui o genótipo completo *tonA ptr3*; *E. coli* W3110 estirpe 27C7 (ATCC 55,244), que possui o genótipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan<sup>r</sup>*; *E. coli* W3110 estirpe 37D6, que possui o genótipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan<sup>r</sup>*; *E. coli* W3110 estirpe 40B4, que é a estirpe 37D6 com uma mutação de deleção *degP* não resistente a canamicina; e uma estirpe de *E. coli* possuindo protease periplasmática mutante divulgada na Patente U.S. 4,946,783 concedida em 7 de Agosto, 1990. Alternativamente, são adequados métodos de clonagem *in vitro*, e.g., PCR ou outras reacções pela polimerase de ácido nucleico.

Em adição a procariotas, os micróbios eucariotas como fungos filamentosos ou leveduras, são hospedeiros de clonagem ou expressão adequados para vectores que codificam PRO. A *Saccharomyces cerevisiae* é um microorganismo hospedeiro eucariota inferior vulgarmente utilizado. Outros incluem *Schizosaccharomyces pombe* [Beach e Nurse, Nature, 290: 140 (1981); EP 139,383 publicado em 2 de Maio, 1985]; hospedeiros *Kluyveromyces* (Patente U.S. 4,943,529; Fleer et al., Bio/Technology, 9:968-975 [1991]) tais como, e.g., *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. drosophilae* (ATCC 36,906; Van den Berg et al., Bio/Technology, 8:135 [1990]), *K. thermotolerans* e *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070; Sreekrishna et al., J. Basic Microbiol., 28:265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesiae* (EP 244,234); *Neurospora crassa* (Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces* tais como *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394,538 publicado em 31 de Outubro, 1990); e fungos filamentosos tais como, e.g., *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357 publicado

em 10 de Janeiro, 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 aqui adequadas e incluem, mas não se lhes limitam, leveduras susceptíveis de crescimento em metanol seleccionadas dos géneros que consistem em *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* e *Rhodotorula*. Uma listagem de espécies específicas que são exemplificativas desta classe de leveduras pode ser encontrada em C. Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs*, 269 (1982).

As células hospedeiras adequadas para a expressão de PRO glicosilado são derivadas de organismos pluricelulares. Os exemplos de células de invertebrado incluem células de insecto tais como células de *Drosophila* S2 e *Spodoptera* Sf9 ou *Spodoptera* High 5, assim como células de plantas. Os exemplos de linhas de células hospedeiras de mamífero úteis incluem células de ovário de hamster chinês (CHO) e células COS. Exemplos mais específicos incluem a linha CV1 de rim de macaco transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); linha de rim embrionário humano (células 293 ou 293 subclonadas para crescimento em cultura em suspensão, Graham et al., *J. Gen Virol.*, 36:59(1977)); células de ovário de hamster chinês/-DHFR (CHO, Urlaub e Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 [1980]); células de Sertoli de rato (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 [1980]); células de pulmão humano (W138, ATCC CCL 75); células de fígado humano (Hep G2, HB 8065); e tumor mamário de rato (MMT 060562, ATCC CCL51). A selecção da célula hospedeira apropriada é considerada dentro dos conhecimentos na especialidade.

### **3. Selecção e Utilização de um Vector Replicável**

O ácido nucleico (e.g., ADNc ou ADN genómico) que codifica PRO pode ser inserido num vector replicável para clonagem (amplificação do ADN) ou para expressão. Vários vectores estão disponíveis ao público. O vector pode, por exemplo, estar na forma de um plasmídeo, cosmídeo, partícula viral ou fago. A sequência de ácido nucleico apropriada pode ser inserida no vector através de uma variedade de

procedimentos. Em geral, o ADN é inserido num ou mais locais de endonucleases de restrição apropriados utilizando técnicas conhecidas na especialidade. Os componentes do vector incluem geralmente, mas não se lhes limitam, uma ou mais entre uma sequência de sinal, uma origem de replicação, um ou mais genes marcadores, um elemento potenciador, um promotor e uma sequência de terminação da transcrição. A construção de vectores adequados contendo um ou mais destes componentes emprega técnicas de ligação padrão que são conhecidos do técnico especialista.

O PRO pode ser produzido recombinantemente não apenas directamente, como também na forma de um polipéptido de fusão com um polipéptido heterólogo, que pode ser uma sequência de sinal ou outro polipéptido possuindo um local de clivagem específico no terminal N da proteína ou polipéptido maduros. Em geral, a sequência de sinal pode ser um componente do vector, ou pode ser uma parte do ADN que codifica PRO que é inserido no vector. A sequência de sinal pode ser uma sequência de sinal procariota seleccionada, por exemplo, do grupo dos comandos da fosfatase alcalina, da penicilinase, Ipp ou enterotoxina estável ao calor II. Para secreção em levedura a sequência de sinal pode ser, e.g., o comando da invertase de levedura, o comando do factor alfa (incluindo os comandos de factor  $\alpha$  de *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*, este último descrito na Patente U.S. 5,010,182), ou o comando da fosfatase ácida, o comando da glucoamilase de *C. albicans* (EP 362,179 publicado a 4 de Abril, 1990), ou o sinal descrito em WO 90/13646 publicado em 15 de Novembro, 1990. Em expressão em células de mamífero podem ser utilizadas sequências de sinal de mamífero para dirigir a secreção da proteína, tais como sequências de sinal de polipéptidos segregados da mesma espécie ou espécies relacionadas, assim como comandos de secreção virais.

Tanto os vectores de expressão como os de clonagem contêm uma sequência de ácido nucleico que permite que o vector replique numa ou mais células hospedeiras seleccionadas. Estas sequências são bem conhecidas para uma variedade de bactérias, leveduras e vírus. A origem de replicação do plasmídeo pBR322 é adequada para a maioria das bactérias Gram-negativas, a origem do plasmídeo  $2\mu$  é adequada para levedura, e várias

origens virais (SV40, polioma, adenovírus, VSV ou BPV) são úteis para vectores de clonagem em células de mamífero.

Os vectores de expressão e clonagem conterão tipicamente um gene de selecção, também denominado um marcador seleccionável. Os genes de selecção típicos codificam proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou outras toxinas, e.g., ampicilina, neomicina, metotrexato, ou tetraciclina, (b) complementam deficiências auxotróficas, ou (c) fornecem nutrientes críticos não disponíveis em meios complexos, e.g., o gene que codifica D-alanina-racemase para *Bacilli*.

Um exemplo de marcadores seleccionáveis adequados para células de mamífero é aqueles que permitem a identificação de células competentes assimilem o ácido nucleico que codifica PRO, tal como DHFR ou timidina-quinase. Uma célula hospedeira apropriada quando se emprega DHFR de tipo selvagem é a linha de células de CHO deficiente em actividade de DHFR, preparada e propagada como descrito por Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980). Um gene de selecção adequado para utilização em levedura é o gene *trp1* presente no plasmídeo YRp7 de levedura [Stinchcomb *et al.*, Nature, 282:39 (1979); Kingsman *et al.*, Gene, 7:141 (1979); Tschemper *et al.*, Gene, 10:157 (1980)]. O gene *trp1* proporciona um marcador de selecção para uma estirpe mutante de levedura a que falta a capacidade de crescer em triptofano, por exemplo, ATCC N.º 44076 ou PEP4-1 [Jones, Genetics, 85:12 (1977)].

Os vectores de expressão e clonagem usualmente contêm um promotor operativamente ligado á sequência de ácido nucleico que codifica PRO para dirigir a síntese directa de ARNm. São bem conhecidos promotores reconhecidos por uma variedade de potenciais células hospedeiras. Os promotores adequados para utilização com hospedeiros procariotas incluem os sistemas promotores da  $\beta$ -lactamase e da lactose [Chang *et al.*, Nature, 275:615 (1978); Goeddel *et al.*, Nature, 281:544 (1979)], fosfatase alcalina, um sistema promotor do triptofano (trp) [Goeddel, Nucleic Acid Res., 8:4057 (1980); 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 uma

sequência de Shine-Dalgarno (S.D.) operativamente ligada ao ADN que codifica PRO.

Os exemplos de sequências promotoras adequadas para utilização com hospedeiros de levedura incluem os promotores para 3-fosfoglicerato-quinase [Hitzeman *et al.*, J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] ou outras enzimas glicolíticas [Hess *et al.*, J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)], tais como enolase, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, hexoquinase, piruvato-descarboxilase, fosfofrutoquinase, glucose-6-fosfato-isomerase, 3-fosfoglicerato-mutase, piruvato-quinase, triosefósfato-isomerase, fosfoglucose-isomerase e glucoquinase.

Outros promotores de levedura, que são promotores indutíveis possuindo a vantagem adicional de transcrição controlada pelas condições de crescimento, são as regiões promotoras para álcool-desidrogenase 2, isocitocromo C, fosfatase ácida, enzimas degradativas associadas ao metabolismo do azoto, metionina, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, e enzimas responsáveis pela utilização de maltose e galactose. Os vectores e promotores adequados para utilização em expressão em levedura estão adicionalmente descritos EM EP 73,657.

A transcrição de PRO a partir de vectores em células hospedeiras de mamífero é controlada, por exemplo, por promotores obtidos dos genomas de vírus tais como poliomavírus, poxvírus avícola (UK 2,211,504 publicado a 5 de Julho, 1989), adenovírus (tais como Adenovírus 2), papilomavírus bovino, vírus do sarcoma avícola, citomegalovírus, um retrovírus, vírus da hepatite-B e Vírus Síntese 40 (SV40), de promotores heterólogos de mamífero, e.g., o promotor da actina ou um promotor de imunoglobulina, e de promotores de choque térmico, desde que esses promotores sejam compatíveis com os sistemas de células hospedeiras.

A transcrição de um ADN que codifica o PRO por eucariotas superiores pode ser aumentada por inserção de uma sequência potenciadora no vector. Os potenciadores são elementos de ADN de actuação em *cis*, usualmente de cerca de 10 a 300 pb, que actuam sobre um promotor para aumentar a sua transcrição.

Muitas sequências potenciadoras são hoje conhecidas de genes de mamífero (globina, elastase, albumina,  $\alpha$ -fetoproteína e insulina). Tipicamente, contudo, utilizar-se-á um potenciador de um vírus de célula eucariota. Os exemplos incluem o potenciador de SV40 do lado tardio da origem de replicação (pb 100-270), o potenciador do promotor precoce de citomegalovírus, o potenciador de polioma do lado tardio da origem de replicação e potenciadores de adenovírus. O potenciador pode ser unido no vector numa posição a 5' ou 3' da sequência de codificação de PRO, mas está preferivelmente localizada num local a 5' do promotor.

Os vectores de expressão utilizados em células hospedeiras eucariotas (células de levedura, fungos, insectos, plantas, animais, humanas ou células nucleadas de outros organismos pluricelulares) conterão também sequências necessárias para a terminação da transcrição e para estabilização do ARNm. Estas sequências estão vulgarmente disponíveis a partir das regiões não traduzidas a 5' e, ocasionalmente a 3', de ADN ou ADNc eucariotas ou virais. Estas regiões contêm segmentos de nucleótidos transcritos na forma de fragmentos poliadenilados na porção não traduzida do ARNm que codifica PRO.

Ainda outros métodos, vectores e células hospedeiras adequados para adaptação à síntese de PRO em cultura de células de vertebrado recombinantes estão descritos em Gething et al., Nature, 293:620-625 (1981); Mantei et al., Nature, 281:40-46 (1979); EP 117,060; e EP 117,058.

#### **4. Detecção de Amplificação/Expressão de Genes**

A amplificação e/ou expressão de genes podem ser medidas numa amostra directamente, por exemplo, por *Southern blotting* convencional, *Northern blotting* para quantificar a transcrição de ARNm (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 [1980]), *dot blotting* (análise de ADN), ou hibridação *in situ*, utilizando uma sonda apropriadamente marcada, com base nas sequências aqui proporcionadas. Alternativamente, podem ser empregues anticorpos que possam reconhecer dúplices específicos, incluindo dúplices de ADN, dúplices de ARN e dúplices híbridos de ADN-ARN ou dúplices de ADN-proteína. Os

anticorpos por sua vez podem ser marcados e o ensaio pode ser realizado quando o duplex está ligado a uma superfície, de modo a que após a formação do duplex sobre a superfície, a presença do anticorpo ligado ao duplex possa ser detectada.

A expressão de genes, alternativamente, pode ser medida por métodos imunológicos, tais como coloração imuno-histoquímica de células ou secções de tecido e ensaio da cultura celular ou fluidos corporais, para quantificar directamente a expressão do produto génico. Os anticorpos úteis para coloração imuno-histoquímica 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 um polipéptido PRO de sequência nativa ou contra um péptido sintético baseado nas sequências de ADN aqui proporcionadas ou contra uma sequência exógena fundida com ADN de PRO e que codifica um epítopo de anticorpo específico.

##### **5. Purificação de Polipéptidos**

As formas de PRO podem ser recuperadas do meio de cultura ou dos lisados das células hospedeiras. Se estiver ligado a membranas, pode ser libertado da membrana utilizando uma solução detergente adequada (e.g., Triton-X 100) ou por clivagem enzimática. As células empregues em expressão de PRO podem ser rebentadas por vários meios físicos ou químicos, tais como por ciclos de congelação-descongelação, ultra-sons, ruptura mecânica ou agentes de lise celular.

Pode-se pretender purificar o PRO a partir de proteínas ou polipéptidos de células recombinantes. Os procedimentos que se seguem são exemplificativos de procedimentos de purificação adequados: por fraccionamento numa coluna de permuta iônica; precipitação com etanol; HPLC de fase inversa; cromatografia sobre sílica ou numa resina de permuta catiónica tal como DEAE; cromatofocagem; SDS-PAGE; precipitação com sulfato de amónio; filtração em gel utilizando, por exemplo, colunas de Sephadex G-75; proteína A-Sepharose para remover contaminantes tais como IgG; e colunas quelantes de metal para ligar formas do PRO marcadas com epítopo. Podem ser empregues vários métodos de purificação de proteínas e esses métodos são

conhecidos na especialidade e estão descritos por exemplo em Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982). O(s) passo(s) de purificação seleccionados dependerão, por exemplo, da natureza do processo de produção utilizado e do PRO particular produzido.

#### **E. Utilizações para PRO**

As sequências de nucleótidos (ou seu complemento) que codificam PRO têm várias aplicações na especialidade da biologia molecular, incluindo utilizações como sondas de hibridação, em mapeamento de cromossomas e genes e na geração de ARN e ADN anti-sentido. O ácido nucleico de PRO será também útil para a preparação de polipeptídos PRO pelas técnicas recombinantes aqui descritas.

O gene de PRO de comprimento completo de sequência nativa, ou suas porções, pode ser utilizado como sondas de hibridação para uma biblioteca de ADNc para isolar o ADNc de PRO de comprimento completo ou para isolar ainda outros ADNc (por exemplo, os que codificam variantes de PRO de ocorrência natural ou PRO de outras espécies) que têm uma identidade de sequência desejada relativamente à sequência de PRO nativa aqui divulgada. Opcionalmente, o comprimento das sondas será de cerca de 20 a cerca de 50 bases. As sondas de hibridação podem ser derivadas de regiões pelo menos parcialmente novas da sequência de nucleótidos nativa de comprimento completo em que essas regiões podem ser determinadas sem experimentação indevida ou de sequências genómicas incluindo promotores, elementos potenciadores e intrões de PRO de sequência nativa. A título de exemplo, um método de rastreio compreenderá o isolamento da região de codificação do gene de PRO utilizando a sequência de ADN conhecida para sintetizar uma sonda seleccionada de cerca de 40 bases. As sondas de hibridação podem ser marcadas através de uma variedade de marcadores, incluindo radionucleótidos tais como  $^{32}P$  ou  $^{35}S$ , ou marcadores enzimáticos tais como fosfatase alcalina acoplada à sonda através de sistemas de acoplamento avidina/biotina. As sondas marcadas possuindo uma sequência complementar à do gene de PRO da presente invenção podem ser utilizadas para o rastreio de bibliotecas de ADNc humano, ADN genómico ou ARNm, para

determinar com que membros dessas bibliotecas a sonda hibrida. Estão descritas técnicas de hibridação com mais detalhes nos Exemplos adiante.

Quaisquer sequências EST divulgadas no presente pedido podem ser similarmente empregues como sondas, utilizando os métodos aqui divulgados.

Outros fragmentos úteis dos ácidos nucleicos de PRO incluem oligonucleótidos anti-sentido ou de sentido directo compreendendo uma sequência de ácido nucleico de cadeia simples (quer ARN quer ADN) capaz de se ligar a sequências alvo de ARNm de PRO (sentido directo) ou ADN de PRO (anti-sentido). Os oligonucleótidos anti-sentido ou de sentido directo, de acordo com a presente invenção, compreendem um fragmento da região de codificação de ADN de PRO. Estes fragmentos geralmente compreendem pelo menos cerca de 14 nucleótidos, preferivelmente de cerca de 14 a 30 nucleótidos. A capacidade de derivar um oligonucleótido anti-sentido ou de sentido directo, com base numa sequência de ADNc que codifica uma determinada proteína está descrita em, por exemplo, Stein e Cohen (Cancer Res. 48:2659, [1988]) e van der Krol *et al.* (BioTechniques, 6:958, [1988]).

A ligação de oligonucleótidos anti-sentido ou de sentido directo a sequências de ácido nucleico alvo resulta na formação de díplices que bloqueiam a transcrição ou a tradução da sequência alvo por um de vários meios, incluindo degradação aumentada dos díplices, terminação prematura da transcrição ou da tradução, ou por outros meios. Os oligonucleótidos anti-sentido assim podem ser utilizados para bloquear a expressão de proteínas PRO. Os oligonucleótidos anti-sentido ou de sentido directo compreendem ainda oligonucleótidos possuindo esqueletos de açúcar-fosfodiéster modificados (ou outras ligações dos açúcares, tais como descritas em WO 91/06629) e em que essas ligações de açúcares são resistentes a nucleases endógenas. Estes oligonucleótidos com ligações de açúcares resistentes são estáveis *in vivo* (*i.e.*, capazes de resistir a degradação enzimática) mas retêm a especificidade de sequência para se poderem ligar a sequências de nucleótidos alvo.

Outros exemplos de oligonucleótidos de sentido directo ou anti-sentido incluem os oligonucleótidos que estão covalentemente ligados a porções orgânicas, tais como os descritos em WO 90/10048, e outras porções que aumentam a afinidade do oligonucleótido para com uma sequência de ácido nucleico alvo, tais como poli-(L-lisina). Ainda adicionalmente, agentes intercalantes, tais como elipticina, e agentes alquilantes ou complexos metálicos, podem ser ligados a oligonucleótidos de sentido directo ou anti-sentido para modificar as especificidades de ligação do oligonucleótido anti-sentido ou de sentido directo para a sequência de nucleótidos alvo.

Os oligonucleótidos anti-sentido ou de sentido directo podem ser introduzidos numa célula contendo a sequência de ácido nucleico alvo por qualquer método de transferência de genes, incluindo, por exemplo, transfecção de ADN mediada por CaPO<sub>4</sub>, electroporação ou utilizando vectores de transferência de genes tais como o vírus de Epstein-Barr. Num procedimento preferido, um oligonucleótido anti-sentido ou de sentido directo é inserido num vector retroviral adequado. Uma célula contendo a sequência de ácido nucleico alvo é colocada em contacto com o vector retroviral recombinante, quer *in vivo* quer *ex vivo*. Os vectores retrovirais adequados incluem, mas não se lhes limitam, os derivados do retrovírus murino M-MuLV, N2 (um retrovírus derivado de M-MuLV), ou dos vectores de cópia dupla designados DCT5A, DCT5B e DCT5C (veja-se WO 90/13641).

Os oligonucleótidos de sentido directo ou anti-sentido também podem ser introduzidos numa célula contendo a sequência de nucleótidos alvo por formação de um conjugado com uma molécula de ligação ao ligando, como descrito em WO 91/04753. As moléculas de ligação ao ligando adequadas incluem, mas não se lhes limitam, receptores de superfície celular, factores de crescimento, outras citoquinas, ou outros ligandos que se ligam a receptores de superfície celular. Preferivelmente, a conjugação da molécula de ligação ao ligando não interfere substancialmente com a capacidade da molécula de ligação ao ligando se ligar à sua molécula ou receptor correspondentes, ou bloquear a entrada do oligonucleótido de sentido directo ou anti-sentido ou da sua versão conjugada, na célula.

Alternativamente, um oligonucleótido de sentido directo ou um anti-sentido podem ser introduzidos numa célula contendo a sequência de ácido nucleico alvo por formação de um complexo oligonucleótido-lípido, como descrito em WO 90/10448. O complexo oligonucleótido de sentido directo ou anti-sentido-lípido é preferivelmente dissociado no interior da célula por uma lipase endógena.

As moléculas de ARN ou ADN anti-sentido ou de sentido directo têm geralmente pelo menos cerca de 5 bases de comprimento, cerca de 10 bases de comprimento, cerca de 15 bases de comprimento, cerca de 20 bases de comprimento, cerca de 25 bases de comprimento, cerca de 30 bases de comprimento, cerca de 35 bases de comprimento, cerca de 40 bases de comprimento, cerca de 45 bases de comprimento, cerca de 50 bases de comprimento, cerca de 55 bases de comprimento, cerca de 60 bases de comprimento, cerca de 65 bases de comprimento, cerca de 70 bases de comprimento, cerca de 75 bases de comprimento, cerca de 80 bases de comprimento, cerca de 85 bases de comprimento, cerca de 90 bases de comprimento, cerca de 95 bases de comprimento, cerca de 100 bases de comprimento, ou mais.

Podem também ser empregues sondas em técnicas de PCR para gerar um conjunto de sequências para identificação de sequências de codificação de PRO estreitamente relacionadas.

As sequências de nucleótidos que codificam um PRO podem também ser utilizadas para construir sondas de hibridação para mapeamento do gene que codifica esse PRO e para a análise genética de indivíduos com desordens genéticas. As sequências de nucleótidos aqui proporcionadas podem ser mapeadas num cromossoma e regiões específicas de um cromossoma utilizando técnicas conhecidas, tais como hibridação *in situ*, análise de ligação contra marcadores cromossómicos conhecidos, e rastreio de hibridação com bibliotecas.

Quando as sequências de codificação para PRO codificam uma proteína que se liga a outra proteína (por exemplo, quando o PRO é um receptor), o PRO pode ser utilizado em ensaios para identificar as outras proteínas ou moléculas envolvidas na interacção de ligação. Através destes métodos, podem ser

identificados inibidores da interacção de ligação receptor/ligando. As proteínas envolvidas nestas interacções de ligação podem também ser utilizadas para o rastreio de inibidores ou agonistas peptídicos ou de molécula pequena da interacção de ligação. Igualmente, o PRO receptor pode ser utilizado para isolar ligando(s) correlativos. Podem ser desenhados ensaios de rastreio para encontrar compostos-guia que imitam a actividade biológica de um PRO nativo ou um receptor para PRO. Estes ensaios de rastreio incluirão ensaios susceptíveis de rastreio de elevado rendimento de bibliotecas químicas, o que os torna particularmente adequados para a identificação de candidatos a fármacos de molécula pequena. As moléculas pequenas contempladas incluem compostos sintéticos orgânicos ou inorgânicos. Os ensaios podem ser realizados numa variedade de formatos, incluindo ensaios de ligação proteína-proteína, ensaios de rastreio bioquímicos, imunoensaios e ensaios à base de células, que estão bem caracterizados na especialidade.

Os ácidos nucleicos que codificam PRO ou as suas formas modificadas podem também ser utilizados para gerar animais transgénicos ou animais "knock out" que, por sua vez, são úteis no desenvolvimento e rastreio de reagentes terapeuticamente úteis. Um animal transgénico (e.g., um ratinho ou um rato) é um animal possuindo células que contêm um transgene, transgene esse que foi introduzido no animal ou num antecessor do animal num estádio pré-natal, e.g., embrionário. Um transgene é um ADN que está integrado no genoma de uma célula a partir da qual se desenvolve um animal transgénico. Numa concretização, ADNc que codifica PRO pode ser utilizado para clonar ADN genómico que codifica PRO de acordo com técnicas estabelecidas e as sequências genómicas podem ser utilizadas para gerar animais transgénicos que contêm células que expressam ADN que codifica PRO. Os métodos para a geração de animais transgénicos, particularmente animais tais como ratinhos ou ratos, tornaram-se convencionais na especialidade e estão descritos, por exemplo, nas Patentes U.S. 4,736,866 e 4,870,009. Tipicamente, células particulares seriam os alvos de incorporação do transgene de PRO através de potenciadores específicos de tecidos. Os animais transgénicos que incluem uma cópia de um transgene que codifica PRO introduzido na linha germinal do animal num estádio

embrionário podem ser utilizados para examinar o efeito de expressão aumentada de ADN que codifica PRO. Estes animais podem ser utilizados como animais de teste para reagentes que se pensa que conferem protecção contra, por exemplo, condições patológicas associadas à sua sobre-expressão. De acordo com esta faceta da invenção, um animal é tratado com o reagente e uma incidência reduzida da condição patológica, comparativamente com animais não tratados portadores do transgene, indicaria uma potencial intervenção terapêutica para a condição patológica.

Alternativamente, homólogos não humanos de PRO podem ser utilizados para construir um animal "*knock out*" para PRO que tem defeituoso ou alterado um gene que codifica PRO em resultado de recombinação homóloga entre o gene que codifica PRO endógeno e o ADN genómico que codifica PRO alterado introduzido numa célula estaminal embrionária do animal. Por exemplo, ADNc que codifica PRO pode ser utilizado para clonar ADN genómico que codifica PRO de acordo com técnicas estabelecidas. Uma porção do ADN genómico que codifica PRO pode ser eliminada ou substituída por outro gene, tal como um gene que codifica um marcador seleccionável que possa ser utilizado para monitorar a integração. Tipicamente, várias quilobases de ADN flanqueador inalterado (em ambos as extremidades, 5' e 3') são incluídas no vector [veja-se e.g., Thomas e Capecchi, Cell, 51:503 (1987) para uma descrição de vectores de recombinação homóloga]. O vector é introduzido numa linha de células estaminais embrionárias (e.g., por electroporação) e as células em que o ADN introduzido foi homologamente recombinado com o ADN endógeno são seleccionadas [veja-se, e.g., Li et al., Cell, 69:915 (1992)]. As células seleccionadas são então injectadas num blastocisto de um animal (e.g., um ratinho ou um rato) para formar quimeras de agregação [veja-se, e.g., Bradley, em Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E.J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152]. Um embrião quimérico pode então ser implantado num animal hospedeiro fêmea pseudoprenhe adequado e o embrião levado a termo para criar um animal "*knock out*". A progénie portadora do ADN homologamente recombinado nas suas células germinais pode ser identificada por técnicas padrão e utilizada para criar animais em que todas as células do animal contêm o ADN homologamente

recombinado. Os animais *knockout* podem ser caracterizados por exemplo, pela sua capacidade de se defenderem contra determinadas condições patológicas e pelo seu desenvolvimento de condições patológicas devido à ausência do polipeptídeo PRO.

O ácido nucleico que codifica os polipeptídos PRO pode também ser utilizado em terapia génica. Em aplicações de terapia génica, os genes são introduzidos em células de modo a se conseguir a síntese *in vivo* de um produto genético terapeuticamente eficaz, por exemplo para substituição de um gene defeituoso. A "terapia génica" inclui tanto a terapia génica convencional onde se atinge um efeito duradouro através de um único tratamento, como a administração de agentes terapêuticos génicos, que envolve a administração de uma só vez ou repetida de um ADN ou ARNm terapeuticamente eficaz. ARN e ADN anti-sentido podem ser utilizados como agentes terapêuticos para o bloqueio da expressão de determinados genes *in vivo*. Foi já mostrado que oligonucleótidos anti-sentido curtos podem ser importados por células onde actuam como inibidores, apesar das suas baixas concentrações intracelulares causadas pela sua assimilação 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 assimilação, *e.g.*, por substituição dos seus grupos fosfodiéster carregados negativamente por grupos não carregados.

Existem uma variedade de técnicas disponíveis para a introdução de ácidos nucleicos em células viáveis. As técnicas variam dependendo de se o ácido nucleico é transferido para células de cultura *in vitro*, ou *in vivo* nas células do hospedeiro pretendido. As técnicas adequadas para a transferência de ácido nucleico em células de mamífero *in vitro* incluem a utilização de lipossomas, electroporação, micro-injeção, fusão celular, DEAE-dextrano, o método de precipitação com fosfato de cálcio, etc. As técnicas de transferência de genes *in vivo* correntemente preferidas incluem transfecção com vectores virais (tipicamente retrovirais) transfecção mediada por lipossoma da proteína do revestimento viral (Dzau *et al.*, Trends in Biotechnology, 11: 205-210 [1993]). Em algumas situações é desejável proporcionar a fonte de ácido nucleico com um agente que direciona para as

células alvo, tal como um anticorpo específico para uma proteína da membrana da superfície celular ou para a célula alvo, um ligando para um receptor na célula alvo, etc. Quando se empregam lipossomas, as proteínas que se ligam a uma proteína da membrana da superfície celular associada a endocitose podem ser utilizadas para o direccionamento e/ou para facilitar a assimilação, e.g., proteínas da cápside ou seus fragmentos trópicos para um tipo celular particular, anticorpos para proteínas que sofrem internalização em ciclos, proteínas que direccionam para uma localização intracelular e aumentam a semivida intracelular. A técnica de endocitose mediada por receptores está descrita, 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 uma revisão de protocolos de marcação de genes e terapia génica veja-se Anderson et al., Science, 256: 808-813 (1992).

Os polipéptidos PRO aqui descritos podem também ser empregues como marcadores de peso molecular para fins de electroforese de proteínas e as sequências de ácido nucleico isoladas podem ser utilizadas para expressar recombinantemente esses marcadores.

As moléculas de ácido nucleico que codificam os polipéptidos PRO ou seus fragmentos aqui descritas são úteis para a identificação de cromossomos. A este respeito, existe uma necessidade crescente de identificar novos marcadores cromossómicos, pois estão presentemente disponíveis relativamente poucos reagentes de marcação de cromossomos, com base em dados actuais de sequências. Cada molécula de ácido nucleico de PRO da presente invenção pode ser utilizada como um marcador cromossómico.

Os polipéptidos PRO e moléculas de ácido nucleico aqui descritos podem também ser utilizados em diagnóstico para a tipificação de tecidos, em que os polipéptidos PRO da presente invenção podem ser diferencialmente expressos num tecido em comparação com outro, preferivelmente num tecido doente em comparação com um tecido normal do mesmo tipo de tecido. As moléculas de ácido nucleico de PRO serão úteis para gerar sondas para PCR, análise de Northern, análise de Southern e análise de Western.

Os polipéptidos PRO aqui descritos podem também ser empregues como agentes terapêuticos. Os polipéptidos PRO da presente invenção podem ser formulados de acordo com métodos conhecidos para preparar composições farmaceuticamente úteis, em que o produto PRO é combinado em mistura com um veículo transportador farmaceuticamente aceitável. As formulações terapêuticas são preparadas para armazenagem por mistura do ingrediente activo possuindo o grau desejado de pureza com transportadores, excipientes ou estabilizantes opcionais fisiologicamente aceitáveis (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), na forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Os transportadores, excipientes ou estabilizantes aceitáveis não são tóxicos para os beneficiários nas dosagens e concentrações empregues, e incluem tampões tais como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico; polipéptidos de baixo peso molecular (inferior a cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina sérica, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrófilos tais como polivinilpirrolidona, aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, arginina ou lisina; monossacáridos, dissacáridos e outros hidratos de carbono incluindo glucose, manose ou dextrinas; agentes quelantes tais como EDTA; aldóis tais como manitol ou sorbitol; contra-iões formadores de sais tais como sódio; e/ou tensioactivos não iónicos tais como TWEEN<sup>TM</sup>, PLURONICS<sup>TM</sup> ou PEG.

As formulações a utilizar para administração *in vivo* têm que ser estéreis. Isto é prontamente conseguido por filtração através de membranas de esterilização por filtração, antes ou após a liofilização e a reconstituição.

As presentes composições terapêuticas geralmente são colocadas num recipiente possuindo uma porta de acesso estéril, por exemplo, um saco ou frasco de solução intravenosa possuindo uma tampa perfurável por uma agulha de injecção hipodérmica.

A via de administração é de acordo com métodos conhecidos, e.g., injecção ou infusão pelas vias intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intra-ocular,

intra-arterial ou intralesional, administração tópica, ou por sistemas de libertação sustentada.

As dosagens e concentrações desejadas de fármaco de composições farmacêuticas da presente invenção podem variar dependendo da utilização particular pretendida. A determinação da dosagem ou via de administração apropriadas está bem dentro dos conhecimentos de um médico de clínica geral. Experiências com animais proporcionam orientações fiáveis para a determinação de doses eficazes para terapia humana. O escalamento inter-espécies de doses eficazes pode ser realizado seguindo os princípios estipulados põe Mordenti, J. e Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics" em Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi et al., Eds., Pergamon Press, New York 1989, pp. 42-96.

Quando se utiliza a administração *in vivo* de um polipéptido PRO ou de um seu agonista ou antagonista, as quantidades da dosagem normal podem variar de cerca de 10 ng/kg até 100 mg/kg de peso corporal do mamífero ou mais por dia, preferivelmente de cerca de 1 µg/kg/dia a 10 mg/kg/dia, dependendo da via de administração. São proporcionadas na literatura orientações quanto a dosagens e métodos de entrega particulares; veja-se, por exemplo, as Pat. U.S. 4,657,760; 5,206,344; ou 5,225,212. Antecipa-se que diferentes formulações serão eficazes para diferentes compostos de tratamento e diferentes desordens; que a administração direcionada a um órgão ou tecido, por exemplo, pode necessitar de entrega de uma maneira diferentes daquela que necessita outro órgão ou tecido.

Quando se pretende a administração de libertação sustentada de um polipéptido PRO numa formulação com características de libertação adequadas para o tratamento de qualquer doença ou desordem que requeira a administração do polipéptido PRO, está contemplada a microencapsulação do polipéptido PRO. A microencapsulação de proteínas recombinantes para libertação sustentada foi realizada com sucesso com a hormona do crescimento humana (rhGH), interferão- (rhIFN-), interleucina-2 e MN rgp120. Johnson et al., Nat. Med., 2:795-799 (1996); Yasuda, Biomed. Ther., 27:1221-1223 (1993); Hora et al., Bio/Technology, 8:755-758

(1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems", em Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell and Newman, eds, (Plenum Press: New York, 1995), pp. 439-462; WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399; e Pat. U.S. 5,654,010.

As formulações de libertação sustentada destas proteínas foram desenvolvidas utilizando polímero poli-ácido láctico-coglicólico (PLGA) devido á sua biocompatibilidade e ampla gama de propriedades biodegradáveis. Os produtos de degradação do PLGA, os ácidos láctico e glicólico, podem ser depurados rapidamente no corpo humano. Adicionalmente, a degradabilidade deste polímero pode ser ajustada desde meses a anos dependendo do seu peso molecular e composição. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer", em: M. Chasin and R. Langer (Eds.), Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker: New York, 1990), pp. 1-41.

O presente pedido de patente descreve métodos de rastreio de compostos para identificar aqueles que imitam o polipéptido PRO (agonistas) ou previnem o efeito do polipéptido PRO (antagonistas). São desenhados ensaios de rastreio para candidatos a fármacos antagonistas para identificar compostos que se ligam ou complexam com os polipéptidos PRO codificados pelos genes aqui identificados, ou que de outro modo interferem com a interacção dos polipéptidos codificados com outras proteínas celulares. Estes ensaios de rastreio incluirão ensaios susceptíveis de rastreio de alto rendimento de bibliotecas químicas, o que os torna particularmente adequados para a identificação de candidatos a fármacos de molécula pequena.

Os ensaios podem ser realizados numa variedade de formatos, incluindo ensaios de ligação proteína-proteína, ensaios de rastreio bioquímicos, imunoensaios e ensaios à base de células, que estão bem caracterizados na especialidade.

Todos os ensaios para antagonistas têm em comum a exigência de contacto do candidato a fármaco com um polipéptido PRO codificado por um ácido nucleico aqui identificado sob condições e durante um tempo suficientes para permitir que estes dois componentes interactuem.

Em ensaios de ligação, a interacção é a ligação e o complexo formado pode ser isolado ou detectado na mistura reacional. Numa concretização particular, o polipéptido PRO codificado pelo gene aqui identificado ou o candidato a fármaco é imobilizado numa fase sólida, *e.g.*, numa placa de microtítulo, por fixações covalentes ou não covalentes. A fixação não covalente geralmente é realizada por revestimento da superfície sólida com uma solução do polipéptido PRO e secagem. Alternativamente, um anticorpo imobilizado, *e.g.*, um anticorpo monoclonal, específico para o polipéptido PRO a imobilizar, pode ser utilizado para o ancorar a uma superfície sólida. O ensaio é realizado por adição do componente não imobilizado, que pode estar marcado com um marcador detectável, ao componente imobilizado, *e.g.*, a superfície revestida contendo o componente ancorado. Quando a reacção está completa, os componentes que não reagiram são removidos, *e.g.*, por lavagem, e os complexos ancorados na superfície sólida são detectados. Quando o componente originalmente não imobilizado é portador de um marcador detectável, a detecção de marcador imobilizado na superfície indica que ocorreu complexação. Quando o componente originalmente não imobilizado não é portador de marcador, a complexação pode ser detectada, por exemplo, utilizando um anticorpo marcado que se liga especificamente ao complexo imobilizado.

Se o composto candidato interactua com, mas não se liga, a um polipéptido PRO particular codificado por um gene aqui identificado, a sua interacção com esse polipéptido pode ser ensaiada por métodos bem conhecidos para a detecção de interacções proteína-proteína. Estes ensaios incluem abordagens tradicionais, tais como, *e.g.*, reticulação, co-imunoprecipitação e co-purificação através de gradientes ou colunas cromatográficas. Em adição, as interacções proteína-proteína podem ser monitorizadas utilizando um sistema genético à base de levedura como 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]) como divulgado por Chevray e Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5789-5793 (1991). Muitos activadores da transcrição, tais como GAL4 de levedura, consistem em dois domínios modulares fisicamente discretos, um que actua como

domínio de ligação ao ADN, o outro funcionando como o domínio de activação da transcrição. O sistema de expressão em levedura descrito nas publicações anteriores (genericamente referido como o "sistema de dois híbridos") usa a vantagem desta propriedade, e emprega duas proteínas híbridas, uma em que a proteína-alvo está fundida com o domínio de ligação ao ADN de GAL4, e outra, em que as proteínas de activação do candidato estão fundidas ao domínio de activação. A expressão de um gene repórter *GAL1-lacZ* sob o controlo de um promotor activado por GAL4 depende da reconstituição da actividade de GAL4 através da interacção proteína-proteína. As colónias contendo polipéptidos com interacção são detectadas com um substrato cromogénico para  $\beta$ -galactosidase. Um kit completo (MATCHMAKER<sup>TM</sup>) para a identificação de interacções proteína-proteína entre duas proteínas específicas utilizando a técnica de dois híbridos está disponível no comércio por Clontech. Este sistema pode também ser estendido ao mapeamento de domínios de proteínas envolvidos em interacções específicas da proteína assim como à localização exacta de resíduos de aminoácido que são cruciais para estas interacções.

Os compostos que interferem com a interacção de um gene que codifica um polipéptido PRO aqui identificado e outros componentes intra- ou extracelulares podem ser testados como se segue: usualmente prepara-se uma mistura reacional contendo o produto do gene e o componente intra- ou extracelular sob condições e durante um tempo que permitam a interacção e a ligação dos dois produtos. Para testar a capacidade de um composto candidato inibir a ligação, a reacção é realizada na ausência e na presença do composto de teste. Em adição, pode ser adicionado um placebo a uma terceira mistura reacional, para servir como controlo positivo. A ligação (formação de complexo) entre o composto de teste e o componente intra- ou extracelular presentes na mistura é monitorizada como acima descrito. A formação de um complexo na reacção ou reacções de controlo, mas não na mistura reacional contendo o composto de teste, indica que o composto de teste interfere com a interacção do composto de teste e o seu parceiro reacional.

Para ensaiar antagonistas, o polipéptido PRO pode ser adicionado a uma célula juntamente com o composto a rastrear

quanto a uma actividade particular e a capacidade do composto inibir a actividade de interesse na presença do polipéptido PRO indica que o composto é um antagonista do polipéptido PRO. Alternativamente, os antagonistas podem ser detectados por combinação do polipéptido PRO e um potencial antagonista com receptores de polipéptido PRO ligados à membrana ou receptores recombinantes sob condições apropriadas para um ensaio inibição competitiva. O polipéptido PRO pode ser marcado, tal como por radioactividade, de modo a que o número de moléculas de polipéptido PRO ligadas ao receptor possa ser utilizado para determinar a eficácia do potencial antagonista. O gene que codifica o receptor pode ser identificado por numerosos métodos conhecidos dos peritos na especialidade, por exemplo, selecção de ligandos ("panning") e classificação por FACS. Coligan *et al.*, Current Protocols in Immun., 1(2): Chapter 5 (1991). Preferivelmente, emprega-se clonagem de expressão em que ARN poliadenilado é preparado a partir de uma célula responsiva ao polipéptido PRO e uma biblioteca de ADNc criada a partir deste ARN é dividida em conjuntos e utilizada para transfectar células COS ou outras células que não são responsivas ao polipéptido PRO. As células transfectadas que são crescidas em lâminas de vidro são expostas a polipéptido PRO marcado. O polipéptido PRO pode ser marcado através de uma variedade de meios incluindo iodação ou inclusão de um local de reconhecimento para uma proteína-quinase não específica do local. Após a fixação e a incubação, as lâminas são submetidas a análise autorradiográfica. Os conjuntos positivos são identificados e são preparados subconjuntos que são re-transfectados utilizando um processo iterativo de divisão em subconjuntos e rastreio, eventualmente originando um único clone que codifica o receptor putativo.

A título de abordagem alternativa para a identificação de receptores, o polipéptido PRO marcado pode ser ligado por fotoafinidade a preparações de membrana ou extracto celulares que expressam a molécula do receptor. O material reticulado é resolvido por PAGE e exposto a filme de raios-X. o complexo marcado contendo o receptor pode ser excisado, resolvido em fragmentos peptídicos, e submetido a micro-sequenciação da proteína. A sequência de aminoácidos obtida da micro-sequenciação seria utilizada para desenhar um conjunto de sondas oligonucleotídicas degeneradas para o rastreio de uma

biblioteca de ADNc para identificar o gene que codifica o receptor putativo.

Num outro ensaio para antagonistas, células de mamífero ou uma preparação de membrana que expressam o receptor seriam incubadas com polipeptídeo PRO marcado, na presença do composto candidato. A capacidade do composto aumentar ou bloquear esta interacção iria então ser medida.

Exemplos mais específicos de potenciais antagonistas incluem um oligonucleótido que se liga às fusões de imunoglobulina com polipeptídeo PRO, e, em particular, anticorpos incluindo, sem limitação, anticorpos policlonais e monoclonais e fragmentos de anticorpos, anticorpos de cadeia simples, anticorpos anti-idiotípicos e versões quiméricas ou humanizadas destes anticorpos ou fragmentos, assim como anticorpos e fragmentos de anticorpos humanos. Alternativamente, um potencial antagonista pode ser uma proteína estreitamente relacionada, por exemplo, uma forma mutada do polipeptídeo PRO que reconhece o receptor mas não confere efeito, desse modo inibindo competitivamente a acção do polipeptídeo PRO.

Outro potencial antagonista de polipeptídeo PRO é uma construção de ARN ou ADN anti-sentido preparada utilizando tecnologia anti-sentido, onde, e.g., uma molécula de ARN ou ADN anti-sentido actua para bloquear directamente a tradução de ARNm através de hibridação com ARNm alvo e prevenindo a tradução na proteína. A tecnologia anti-sentido pode ser utilizada para controlar a expressão de genes através da formação de hélices triplas ou ADN ou ARN anti-sentido, sendo ambos os métodos baseados na ligação de um polinucleótido a ADN ou ARN. Por exemplo, a porção de codificação a 5' da sequência do polinucleótido, que codifica os presentes polipeptídos PRO maduros, é utilizada para desenhar um oligonucleótido de ARN anti-sentido de cerca de 10 a 40 pares de bases de comprimento. Um oligonucleótido de ADN é desenhado para ser complementar a uma 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)), desse modo prevenindo a transcrição e a produção do polipeptídeo PRO. O

oligonucleótido de ARN anti-sentido híbrida com o ARNm *in vivo* e bloqueia a tradução da molécula de ARNm no polipéptido PRO (anti-sentido - Okano, Neurochem., 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Anti-sense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988). Os oligonucleótidos acima descritos podem também ser entregues a células de modo a que o ARN ou ADN anti-sentido possa ser expresso *in vivo* para inibir a produção do polipéptido PRO. Quando se utiliza ADN anti-sentido, preferem-se oligodesoxirribonucleótidos derivados do local de iniciação da tradução, e.g., entre cerca de -10 e + 10 posições da sequência de nucleótidos do gene alvo.

Os antagonistas potenciais incluem molécula pequenas que se ligam ao local activo, ao local de ligação ao receptor ou ao local de ligação ao factor de crescimento ou outro relevante, do polipéptido PRO, desse modo bloqueando a actividade biológica normal do polipéptido PRO. Os exemplos de moléculas pequenas incluem, mas não se lhes limitam, péptidos pequenos ou moléculas semelhantes a péptidos, preferivelmente péptidos solúveis e compostos orgânicos ou inorgânicos sintéticos que não peptidilo.

As ribozimas são moléculas de ARN enzimáticas capazes de catalisar a clivagem específica de ARN. As ribozimas actuam por hibridação específica da sequência ao ARN alvo complementar, seguida por clivagem endonucleolítica. Os locais de clivagem específicos das ribozimas num potencial ARN alvo podem ser identificados por técnicas conhecidas. Para mais detalhes *veja-se*, e.g., Rossi, Current Biology, 4:469-471 (1994), e a publicação do PCT WO 97/33551 (publicado em 18 de Setembro, 1997).

As moléculas de ácido nucleico em formação em hélice tripla utilizadas para inibir a transcrição deverão ser de cadeia simples e compostas por desoxinucleótidos. A composição de bases destes oligonucleótidos é desenhada de modo a promover a formação em hélice tripla pelas regras de emparelhamento de bases de Hoogsteen, que geralmente requerem trechos dimensionáveis de purinas ou pirimidinas numa cadeia de um duplex. Para mais detalhes *veja-se*, e.g., a publicação do PCT WO 97/33551, *supra*.

Estas molécula pequenas podem ser identificadas através de qualquer um ou mais dos ensaios de rastreio acima discutidos e/ou através de quaisquer outras técnicas de rastreio bem conhecidas dos peritos na especialidade.

As utilizações em diagnóstico e terapêuticas das moléculas aqui divulgadas podem também ser baseadas nos resultados positivos no ensaio funcional adiante divulgado e descrito.

#### **F. Distribuição nos Tecidos**

A localização de tecidos que expressam o PRO pode ser identificada determinando a expressão de ARNm em vários tecidos humanos. A localização destes genes proporciona informação acerca de que tecidos mais provavelmente serão afectados pelas actividades de estimulação e inibição dos polipéptidos PRO. A localização de um gene num tecido específico também proporciona tecido de amostra para ensaios de bloqueia da actividade adiante discutidos.

Como notado acima, a expressão génica em vários tecidos pode ser medida por *Southern blotting* convencional, *Northern blotting* para quantificar a transcrição de ARNm (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 [1980]), *dot blotting* (análise de ADN), ou hibridação *in situ*, utilizando uma sonda apropriadamente marcada, com base nas sequências aqui proporcionadas. Alternativamente, podem ser empregues anticorpos que possam reconhecer dúplices específicos, incluindo dúplices de ADN, dúplices de ARN e dúplices híbridos de ADN-ARN ou ADN-proteína.

A expressão genica em vários tecidos, alternativamente, pode ser medida por métodos imunológicos, tais como coloração imuno-histoquímica de secções de tecidos e ensaio de cultura celular ou fluidos corporais, para quantificar directamente a expressão do produto génico. Os anticorpos úteis para coloração imuno-histoquímica 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 um polipéptido PRO de sequência nativa

ou contra um péptido sintético baseado nas sequências de ADN que codificam o polipéptido PRO ou contra uma sequência exógena fundida com um ADN que codifica um polipéptido PRO e que codifica um epítopo específico de um anticorpo. São proporcionados adiante técnicas gerais para a geração de anticorpos, e protocolos especiais para *Northern blotting* e hibridação *in situ*.

#### **G. Estudos de Ligação de Anticorpos**

A actividade dos polipéptidos PRO pode ainda ser verificada por estudos de ligação de anticorpos, em que é testada a capacidade de anticorpos anti-PRO inibirem o efeito dos polipéptidos PRO, respectivamente, em células de tecido. Anticorpos exemplificativos incluem anticorpos policlonais, monoclonais, humanizados, biespecíficos e heteroconjugados, cuja preparação será adiante descrita.

Os estudos de ligação de anticorpos podem ser realizados em qualquer método de ensaio conhecido, tal como ensaios de ligação competitiva, ensaios em sanduíche directos e indirectos e ensaios de imunoprecipitação. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press, Inc., 1987).

Os ensaios de ligação competitiva assentam na capacidade de um padrão marcado competir com o analito da amostra de teste pela ligação com uma quantidade limitada de anticorpo. A quantidade de proteína-alvo na amostra de teste é inversamente proporcional à quantidade de padrão que fica ligado aos anticorpos. Para facilitar a determinação da quantidade de padrão que fica ligado, os anticorpos preferivelmente são insolubilizados antes ou após a competição, se modo a que o padrão e o analito que estão ligados aos anticorpos possam ser convenientemente separados do padrão e do analito que permanecem desligados.

Os ensaios em sanduíche envolvem a utilização de dois anticorpos, cada um susceptível de ligação a uma porção imunogénica diferente, ou epítopo, da proteína a detectar. Num ensaio em sanduíche, o analito da amostra de teste é ligado por um primeiro anticorpo que está imobilizado num suporte

sólido, e posteriormente um segundo anticorpo liga-se ao analito, formando desse modo um complexo insolúvel tripartido. Veja-se, e.g., Pat US 4,376,110. O segundo anticorpo pode ele próprio ser marcado com uma porção detectável (ensaios em sanduíche directos) ou pode ser medido utilizando um anticorpo anti-imunoglobulina que está marcado com uma porção detectável (ensaio sanduíche indirecto). Por exemplo, um tipo de ensaio em sanduíche é um ensaio ELISA, caso em que a porção detectável é uma enzima. Para imuno-histoquímica, a amostra de tecido pode ser fresca ou congelada ou pode ser embebida em parafina e fixada com um conservante tal como formalina, por exemplo.

#### **H. Ensaios à base de células**

Ensaios à base de células e modelos animais para doenças imuno-relacionadas podem ser utilizados para entender adicionalmente a relação entre os genes e os polipéptidos aqui identificados e o desenvolvimento e patogénese de doença imuno-relacionada.

Numa abordagem diferente, células de um tipo celular que se sabe estar envolvido numa doença imuno-relacionada particular são transfectadas com os ADNc aqui descritos, e analisa-se a capacidade destes ADNc estimularem ou inibirem a função imunitária. As células adequadas podem ser transfectadas com o gene desejado, e monitorizadas quanto à actividade da função imunitária. Estas linhas celulares transfectadas podem então ser utilizadas para testar a capacidade de anticorpos policlonais ou monoclonais ou composições de anticorpos inibirem ou estimularem a função imunitária, por exemplo para modular a proliferação ou infiltração de células inflamatórias. As células transfectadas com as sequências de codificação dos genes aqui identificados podem ainda ser utilizadas para identificar candidatos a fármacos para o tratamento de doenças imuno-relacionadas.

Em adição, culturas primárias derivadas de animais transgénicos (como descrito adiante) podem ser utilizadas aqui nos ensaios à base de células, embora se prefiram linhas celulares estáveis. As técnicas para derivar linhas celulares contínuas a partir de animais transgénicos são bem conhecidas

na especialidade (veja-se, e.g., Small et al., Mol. Cell. Biol., 5: 642-648 [1985]).

Um ensaio adequado à base de células é a reacção mista de linfócitos (MLR). Current Protocols in Immunology, unit 3.12; editado por J E Coligan, A M Kruisbeek, D H Marglies, E M Shevach, W Strober, National Institutes of Health, Publicado por John Wiley & Sons, Inc. Neste ensaio, é ensaiada a capacidade de um composto de teste estimular ou inibir a proliferação de células T activadas. Uma suspensão de células T respondedora é cultivada com células estimuladoras alogénicas e é medida a proliferação de células T pela assimilação de timidina tritiada. Este ensaio é uma medida geral da reactividade de células T. Como a maioria de células T respondem a, e produzem, IL-2 após activação, as diferenças na responsividade neste ensaio reflectem em parte diferenças na produção de IL-2 pelas células que respondem. Os resultados de MLR podem ser verificados através de um ensaio padrão de detecção de linfoquinas (IL-2). Current Protocols in Immunology, acima, 3.15, 6.3.

Uma resposta de células T proliferativas num ensaio MLR pode dever-se a propriedades mitogénicas directas de uma molécula ensaiada ou a activação induzida por抗igenios externos. A verificação adicional da actividade estimulante de células T dos polipeptídos PRO pode ser obtida através de um ensaio de co-estimulação. A activação de células T requer um sinal específico do抗igenio mediado através do receptor de células T (TCR) e um sinal co-estimulador mediado através de uma segunda interacção de ligação ao ligando, por exemplo, a interacção de ligação B7 (CD80, CD86)/CD28. A ligação cruzada de CD28 aumenta a secreção de linfoquinas por células T activadas. A activação de células T tem ambos os controlos, negativo e positivo, através da ligação de ligandos que têm um efeito negativo ou positivo. CD28 e CTLA-4 são glicoproteínas relacionadas na superfamília de Ig que se ligam a B7. A ligação de CD28 a B7 tem um efeito de co-estimulação positivo de activação de células T; inversamente, a ligação de CTLA-4 a B7 tem um efeito negativo de desactivação de células T. Chambers, C.A. e Allison, J.P., Curr. Opin. Immunol., (1997) 9:396. Schwartz, R.H., Cell (1992) 71:1065; Linsey, P.S. e Ledbetter, J.A., Annu. Rev. Immunol. (1993) 11:191; June, C.H.

*et al.*, Immunol. Today (1994) 15:321; Jenkins, M.K., Immunity (1994) 1:405. Num ensaio de co-estimulação, os polipéptidos PRO são ensaiados quanto a actividade co-estimulante ou inibidora de células T.

Os polipéptidos PRO, assim como outros compostos da invenção que são estimuladores (co-estimuladores) de proliferação de células T e seus agonistas, *e.g.*, anticorpos agonista, como determinado por MLR e ensaios de co-estimulação, por exemplo, são úteis no tratamento de doenças imuno-relacionadas caracterizadas por uma função imunitária pobre, sub-óptima ou inadequada. Estas doenças são tratadas por estimulação da proliferação e activação de células T (e imunidade mediada por células T) e aumento da resposta imunitária num mamífero através de administração de um composto estimulador, tal como os polipéptidos PRO estimuladores. O polipéptido estimulador pode, por exemplo, ser um polipéptido PRO ou um seu antícorpo agonista.

A utilização directa de um composto estimulante como na invenção foi validada em experiências com glicoproteína 4-1BB, um membro da família de receptores do factor de necrose tumoral, que se liga a um ligando (4-1BBL) expresso em células T sensibilizadas e sinaliza a activação e crescimento de células T. Alderson, M.E. *et al.*, J. Immunol., 24:2219 (1994).

A utilização de um composto estimulante agonista foi também validada experimentalmente. A activação de 4-1BB por tratamento com um antícorpo anti-4-1BB agonista melhora a erradicação de tumores. Hellstrom, I. e Hellstrom, K.E., Crit. Rev. Immunol., 18:1 (1998). A terapia imunoadjuvante para tratamento de tumores, descrita com mais detalhes adiante, é outro exemplo da utilização dos compostos estimulantes da invenção. Um efeito imunoestimulante ou melhorador pode também ser conseguido por antagonização ou bloqueio da actividade de um PRO que se verificou ser inibidor no ensaio MLR. Negar a actividade inibidora do composto produz um efeito global estimulador. Compostos antagonistas/bloqueadores adequados são anticorpos ou seus fragmentos que reconhecem e se ligam à proteína inibidora, desse modo bloqueando a interacção eficaz da proteína com o seu receptor e inibindo a sinalização através do receptor. Este efeito foi validado em experiências

utilizando anticorpos anti-CTLA-4 que aumentam a proliferação de células T, presumivelmente por remoção do sinal inibidor causado pela ligação de CTLA-4. Walunas, T.L. *et al.*, Immunity, 1:405 (1994).

Alternativamente, um efeito imunoestimulante ou melhorador pode também ser conseguido por administração de um polipéptido PRO que tem propriedades melhoradoras da permeabilidade vascular. Uma permeabilidade vacuolar melhorada seria benéfica para desordens que podem ser atenuadas por infiltração local de células imunitárias (e.g., monócitos, eosinófilos, PMN) e inflamação.

Por outro lado, os polipéptidos PRO, assim como outros compostos aqui descritos, que são inibidores directos da proliferação/activação de células T, da secreção de linfoquinas e/ou da permeabilidade vascular, podem ser directamente utilizados para suprimir a resposta imunitária. Esses compostos são úteis para reduzir o grau da resposta imunitária e para tratar doenças imuno-relacionadas caracterizadas por uma resposta auto-imune hiperactiva, super-óptima. Esta utilização dos compostos da invenção foi validada pelas experiências como descritas acima em que a ligação de CTLA-4 ao receptor B7 desactiva células T. Os compostos inibidores directos aqui descritos funcionam de maneira análoga. Será de esperar que a utilização de um composto que suprime a permeabilidade vascular reduza a inflamação. Estas utilizações seriam benéficas no tratamento de condições associadas com inflamação excessiva.

Alternativamente, compostos, e.g., anticorpos, que se ligam a polipéptidos PRO estimulantes e bloqueiam o efeito estimulante destas moléculas produzem um efeito global inibidor e podem ser utilizados para suprimir a resposta imunitária mediada por células T por inibição da proliferação/activação de células T e/ou da secreção de linfoquinas. O bloqueio do efeito estimulante dos polipéptidos suprime a resposta imunitária do mamífero. Esta utilização foi validada em experiências utilizando um anticorpo anti-IL2. Nestas experiências, o anticorpo liga-se a IL2 e bloqueia a ligação de IL2 ao seu receptor conseguindo deste modo um efeito inibidor de células T.

## I. Modelos animais

Os resultados dos ensaios *in vitro* à base de células podem adicionalmente ser verificados utilizando modelos animais *in vivo* e ensaios quanto à função das células T. Podem ser utilizados uma variedade de modelos animais bem conhecidos para adicionalmente entender o papel dos genes aqui identificados no desenvolvimento e patogénese da doença imuno-relacionada, e para testar a eficácia de agentes terapêuticos candidatos, incluindo anticorpos, e outros antagonistas dos polipeptídos nativos, incluindo antagonistas de molécula pequena. A natureza *in vivo* destes modelos torna-os preditivos de respostas em pacientes humanos. Modelos animais de doenças imuno-relacionadas incluem animais não recombinantes e recombinantes (transgénicos). Os modelos animais não recombinantes incluem, por exemplo, roedores, e.g., modelos murinos. Estes modelos podem ser gerados introduzindo células em ratinhos singénicos utilizando técnicas padrão, e.g., injecção subcutânea, injecção na veia da cauda, implantação do baço, implantação intraperitoneal, implantação sob a cápsula renal, etc.

A doença enxerto-*versus*-hospedeiro ocorre quando células imunocompetentes são transplantadas para pacientes imunossuprimidos ou tolerantes. As células dadoras reconhecem e respondem a抗igénios do hospedeiro. A resposta pode variar desde inflamação grave com risco de vida até casos moderados de diarreia e perda de peso. Os modelos de doença enxerto-*versus*-hospedeiro proporcionam um meio para avaliar a reactividade de células T contra抗igénios do MHC e抗igénios menores de transplante. Um procedimento adequado está descrito em detalhe em Current Protocols in Immunology, acima, unit 4.3.

Um modelo animal para rejeição de aloenxerto de pele é um meio de testar a capacidade de células T mediarem a destruição de tecidos *in vivo* e uma medida do seu papel na rejeição de transplantes. O mais comum e aceite dos modelos utiliza enxertos de pele da cauda de murinos. Experiências repetidas mostraram que a rejeição de aloenxerto de pele é mediada por células T, células T auxiliares e células T assassinas-

efectoras, e não anticorpos. Auchincloss, H. Jr. e Sachs, D. H., Fundamental Immunology, 2nd ed., W. E. Paul ed., Raven Press, NY, 889-992 (1989). Um procedimento adequado está descrito em detalhe em Current Protocols in Immunology, acima, unit 4.4. Outros modelos de rejeição de transplantes que podem ser utilizados para testar os compostos da invenção são os modelos de transplante do coração alogénico descritos por Tanabe, M. et al., Transplantation, 58:23 (1994) e Tinubu, S.A. et al., J. Immunol., 4330-4338 (1994).

Os modelos animais para hipersensibilidade de tipo retardado proporcionam também um ensaio da função imunitária mediada por células. As reacções de hipersensibilidade de tipo retardado são uma resposta imunitária *in vivo* mediada por células T caracterizada por inflamação, que não atinge um pico antes de ter decorrido um período de tempo após provoção com um抗ígenio. Estas reacções também ocorrem em doenças auto-imunes específicas do tecido tais como esclerose múltipla (EM) e encefalomielite auto-imune experimental (EAE, um modelo para EM). Um procedimento adequado está descrito em detalhe em Current Protocols in Immunology, acima, unit 4.5.

A EAE é uma doença auto-imune mediada por células T caracterizada por inflamação de células T e células mononucleares e subsequente desmielinização de axónios no sistema nervoso central. A EAE é geralmente considerada como sendo um modelo animal relevante para EM em seres humanos. Bolton, C., Multiple Sclerosis, 1:143 (1995). Foram desenvolvidos tanto os modelos agudos como relapsante-remitente. Os compostos aqui descritos podem ser testados quanto a actividade estimuladora ou inibidora de células T contra doença desmielinizante imunomediada utilizando o protocolo descrito em Current Protocols in Immunology, acima, units 15.1 e 15.2. Vejam-se também os modelos para doença da mielina em que oligodendrócitos ou células de Schwann são enxertados no sistema nervoso central como descrito em Duncan, I.D. et al., Molec. Med. Today, 554-561 (1997).

A hipersensibilidade de contacto é um ensaio *in vivo* simples de hipersensibilidade de tipo retardado da função imunitária mediada por células. Neste procedimento, a exposição cutânea a haptenos exógenos que dá origem a uma

reacção de hipersensibilidade de tipo retardado que é medida e quantificada. A sensibilidade de contacto envolve uma fase inicial de sensibilização seguida por uma fase de eliciação. A fase de eliciação ocorre quando os linfócitos T encontram um抗ígeno com o qual tiveram contacto prévio. Ocorrem intumescimento e inflamação, o que torna este modelo um modelo excelente de dermatite de contacto alérgica humana. Um procedimento adequado está descrito em detalhe em Current Protocols in Immunology, Eds. J.E. Cologan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach e W. Strober, John Wiley & Sons, Inc., unit 4.2 (1994). I also Grabbe, S. e Schwarz, T, Immun. Today, 19 (1): 37-44 (1998).

Um modelo animal para artrite é a artrite induzida por colagénio. Este modelo partilha características clínicas, histológicas e imunológicas de artrite reumatóide auto-imune humana e é um modelo aceitável para artrite auto-imune humana. Os modelos de ratinho e rato são caracterizados por sinovite, erosão da cartilagem e osso subcondral. Os compostos da invenção podem ser testados quanto a actividade contra artrite auto-imune utilizando os protocolos descritos em Current Protocols in Immunology, acima, units 15.5. Veja-se também o modelo utilizando um anticorpo monoclonal contra CD18 e integrinas VLA-4 descrito em Issekutz, A.C. et al., Immunology. 88:569 (1996).

Foi descrito um modelo de asma em que hiper-reactividade das vias aéreas induzida por抗ígenos, eosinofilia pulmonar e inflamação são induzidas por sensibilização de um animal com ovalbumina e depois provocação do animal com a mesma proteína entregue por aerossol. Vários modelos animais (porquinho-da-índia, rato, primata não humano) apresentam sintomas similares a asma atópica em seres humanos após provocação com抗ígenos por aerossol. Os modelos murinos têm muitas das características da asma humana. Procedimentos adequados para testar os compostos da invenção quanto a actividade e eficácia no tratamento de asma estão descritos por Wolyniec, W.W. et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 18:777 (1998) e as referências aí citadas.

Adicionalmente, os compostos aqui descritos podem ser testados em modelos animais para doenças do tipo psoriase. As

evidências sugerem uma patogénese de células T para a psoriase. Os compostos aqui descritos podem ser testados no modelo de ratinho scid/scid descrito por Schon, M P. et al., Nat. Med., 3:183 (1997), em que os ratinhos demonstram lesões cutâneas histopatológicas semelhantes a psoriase. Outro modelo adequado é a quimera pele humana/ratinho scid preparada como descrito por Nickoloff, B.J. et al., Am. J. Path., 146:580 (1995).

Modelos animais recombinantes (transgénicos) podem ser manipulados por introdução da porção de codificação dos genes aqui identificados no genoma de animais de interesse, utilizando técnicas padrão para produção de animais transgénicos. Os animais que podem servir como alvo para manipulação transgénica incluem, sem limitação, ratinhos, ratos, coelhos, porquinhos-da-índia, ovelhas, cabras, porcos e primatas não humanos, e.g., babuínos, chimpanzés e macacos. As técnicas conhecidas na especialidade para introduzir um transgene nestes animais incluem micro-injecção pronucleica (Hoppe e Wanger, Patente U.S. 4,873,191); transferência de genes mediada por retrovírus em linhas germinais (e.g., Van der Putten et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 6148-615 [1985]); direcccionamento de genes em células estaminais embrionárias (Thompson et al., Cell, 56, 313-321 [1989]); electroporação de embriões (Lo, Mol. Cel. Biol., 3, 1803-1814 [1983]); transferência de genes mediada por esperma (Lavitrano et al., Cell, 57, 717-73 [1989]). Para revisão, veja-se, por exemplo, a Patente U.S. 4,736,866.

Para os fins do presente pedido, os animais transgénicos incluem aqueles que são portadores do transgene apenas em parte das suas células ("animais mosaico"). O transgene pode ser integrado quer na forma de um único transgene, quer em concatâmeros, e.g., tandem cabeça-com-cabeça ou cauda-com-cauda. A introdução selectiva de um transgene num tipo celular particular é também possível seguindo, por exemplo, a técnica de Lasko et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6232-636 (1992).

A expressão do transgene em animais transgénicos pode ser monitorizada por técnicas padrão. Por exemplo, podem-se utilizar análise *Southern blot* ou amplificação por PCR para

verificar a integração do transgene. O nível de expressão de ARNm pode também ser analisado utilizando técnicas tais como hibridação *in situ*, análise *Northern blot*, PCR ou imunocitoquímica.

Os animais podem ainda ser examinados quanto a sinais de patologia de doença imunitária, por exemplo por exame histológico, para determinar a infiltração de células imunitárias em tecidos específicos. Podem também ser realizadas experiências de bloqueio em que os animais transgénicos são tratados com os compostos da invenção para determinar a extensão da estimulação ou inibição da proliferação de células T dos compostos. Nestas experiências, são administrados ao animal anticorpos bloqueadores que se ligam ao polipéptido PRO, preparados como descrito acima, e é determinado o efeito sobre a função imunitária.

Alternativamente, podem ser construídos animais "knock out" que têm defeituoso ou alterado um gene que codifica um polipéptido aqui identificado, como resultado de recombinação homóloga entre o gene endógeno que codifica o polipéptido e ADN genómico alterado que codifica o mesmo polipéptido introduzido numa célula embrionária do animal. Por exemplo, ADNc que codifica um polipéptido particular pode ser utilizado para clonar ADN genómico que codifica esse polipéptido de acordo com técnicas estabelecidas. Uma porção do ADN genómico que codifica um polipéptido particular pode ser eliminada ou substituída por outro gene, tal como um gene que codifica um marcador seleccionável que pode ser utilizado para monitorar a integração. Tipicamente, são incluídos vários quilobases de ADN flanqueador inalterado (em ambas as extremidades 5' e 3') no vector [veja-se e.g., Thomas e Capecchi, *Cell*, 51:503 (1987) para uma descrição de vectores de recombinação homóloga]. O vector é introduzido numa linha de células estaminais embrionárias (e.g., por electroporação) e as células em que o ADN introduzido foi homologamente recombinado com o ADN endógeno são seleccionadas [veja-se e.g., Li *et al.*, *Cell*, 69:915 (1992)]. As células seleccionadas são então injectadas num blastocisto de um animal (e.g., um ratinho ou um rato) para formar quimeras de agregação [veja-se e.g., Bradley, em *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E.J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987),

pp. 113-152]. Um embrião quimérico pode então ser implantado num animal hospedeiro fêmea pseudo-prenhe adequado e o embrião levado a termo para criar um animal "knock out". A progénie portadora do ADN homologamente recombinado nas suas células germinais pode ser identificada por técnicas padrão e utilizada para criar animais em que todas as células do animal contêm o ADN homologamente recombinado. Os animais knockout podem ser caracterizados por exemplo, pela sua capacidade de se defenderem contra determinadas condições patológicas e quanto ao seu desenvolvimento de condições patológicas devidas à ausência do polipéptido.

#### **J. Terapia Imunoajuvante**

Numa concretização, os compostos imunoestimulantes aqui descritos podem ser utilizados em terapia imunoajuvante para o tratamento de tumores (cancro). Está actualmente bem estabelecido que as células T reconhecem抗igénios específicos de tumores humanos. Um grupo de抗igénios tumorais, codificados pelas famílias de genes MAGE, BAGE e GAGE, são silenciosos em todos os tecidos adultos normais, mas são expressos em quantidades significativas em tumores, tais como melanomas, tumores pulmonares, tumores da cabeça e pescoço e carcinomas da bexiga. DeSmet, C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:7149 (1996). Foi demonstrado que a co-estimulação de células T induz a regressão de tumores e uma resposta antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo*. Melero, I. et al., Nature Medicine, 3:682 (1997); Kwon, E.D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 8099 (1997); Lynch, D.H. et al., Nature Medicine, 3:625 (1997); Finn, O.J. e Lotze, M.T., J. Immunol., 21:114 (1998). Os compostos estimuladores podem ser administrados como adjuvantes, sozinhos ou juntamente com um agente regulador do crescimento, um agente citotóxico ou um agente quimioterapêutico, para estimular a proliferação/activação de células T e uma resposta antitumoral a抗igénios tumorais. O agente regulador do crescimento, citotóxico ou quimioterapêutico podem ser administrados em quantidades convencionais utilizando regimes de administração conhecidos. A actividade imunoestimulante dos compostos da invenção permite quantidades reduzidas dos agentes reguladores do crescimento, citotóxicos ou quimioterapêuticos, desse modo diminuindo potencialmente a toxicidade para o paciente.

## **K. Ensaios de Rastreio para Candidatos a Fármacos**

Os ensaios de rastreio para candidatos a fármacos são desenhados para identificar compostos que se ligam a, ou complexam com, os polipéptidos codificados pelos genes aqui identificados ou um seu fragmento biologicamente activo, ou que de outro interferem com a interacção dos polipéptidos codificados com outras proteínas celulares. Estes ensaios de rastreio incluirão ensaios susceptíveis de rastreio de alto rendimento de bibliotecas químicas, o que os torna particularmente adequados para a identificação de candidatos a fármacos de molécula pequena. As moléculas pequenas contempladas incluem compostos orgânicos ou inorgânicos sintéticos, incluindo péptidos, preferivelmente péptidos solúveis, fusões (poli)péptido-imunoglobulina, e, em particular, anticorpos incluindo, sem limitação, anticorpos policlonais e monoclonais e fragmentos de anticorpos, anticorpos de cadeia simples, anticorpos anti-idiotípicos e versões químéricas ou humanizadas destes anticorpos ou fragmentos, assim como anticorpos e fragmentos de anticorpos humanos. Os ensaios podem ser realizados numa variedade de formatos, incluindo ensaios de ligação proteína-proteína, ensaios de rastreio bioquímicos, imunoensaios e ensaios à base de células, que estão bem caracterizados na especialidade. Todos os ensaios têm em comum exigirem o contacto do candidato a fármaco com um polipéptido codificado por um ácido nucleico aqui identificado sob condições e durante um tempo suficientes para permitir que estes dois componentes interactuem.

Em ensaios de ligação, a interacção é a ligação e o complexo formado pode ser isolado ou detectado na mistura reacional. Numa concretização particular, o polipéptido codificado pelo gene aqui identificado ou o candidato a fármaco está imobilizado numa fase sólida, e.g., numa placa de microtípulo, por fixações covalentes ou não covalentes. A fixação não covalente é geralmente realizada através do revestimento da superfície sólida com uma solução do polipéptido e secagem. Alternativamente, pode ser utilizado um anticorpo imobilizado, e.g., um anticorpo monoclonal, específico para o polipéptido a imobilizar, para o ancorar a uma superfície sólida. O ensaio é realizado por adição do

componente não imobilizado, que pode estar marcado com um marcador detectável, ao componente imobilizado, e.g., a superfície revestida contendo o componente ancorado. Quando a reacção está completa, os componentes que não reagiram são removidos, e.g., por lavagem, e os complexos ancorados na superfície sólida são detectados. Quando o componente originalmente não imobilizado é portador de um marcador detectável, a detecção do marcador imobilizado na superfície indica que ocorreu complexação. Quando o componente originalmente não imobilizado não possui um marcador, a complexação pode ser detectada, por exemplo, utilizando um anticorpo marcado que se liga especificamente ao complexo imobilizado.

Se o composto candidato interactua com, mas não se liga a, uma proteína particular codificada por um gene aqui identificado, a sua interacção com essa proteína pode ser ensaiada por métodos bem conhecidos para a detecção das interacções proteína-proteína. Estes ensaios incluem abordagens tradicionais, tais como, reticulação, co-imunoprecipitação e co-purificação através de gradientes ou colunas cromatográficas. Em adição, as interacções proteína-proteína podem ser monitorizadas utilizando um sistema genético à base de levedura como 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)] como divulgado por Chevray e Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 5789-5793 (1991). Muitos activadores da transcrição, tais como GAL4 de levedura, consistem em dois domínios modulares fisicamente discretos, um que actua como o domínio de ligação a ADN, enquanto o outro funciona como o domínio de activação da transcrição. O sistema de expressão em levedura descrito nas publicações anteriores (genericamente referidas como "sistema de dois híbridos") toma vantagem desta propriedade, e emprega duas proteínas híbridas, uma em que a proteína-alvo está fundida com o domínio de ligação ao ADN de GAL4, e a outra, em que proteínas de activação candidatas estão fundidas com o domínio de activação. A expressão de um gene repórter GAL1-lacZ sob o controlo de um promotor activado por GAL4 depende da reconstituição da actividade de GAL4 através de interacção proteína-proteína. Colónias contendo polipeptídos que interactuam são detectadas com um substrato

cromogénico para a  $\beta$ -galactosidase. Um kit completo (MATCHMAKER<sup>TM</sup>) para identificação de interacções proteína-proteína entre duas proteínas específicas utilizando a técnica de dois híbridos está comercialmente disponibilizado pela Clontech. Este sistema pode também ser estendido ao mapeamento de domínios de proteínas envolvidos em interacções de proteínas específicas assim como para localizar exactamente resíduos de aminoácido que são cruciais para estas interacções.

De modo a encontrar compostos que interferem com a interacção de um gene aqui identificado e outros componentes intra- ou extracelulares poderem ser testados, é usualmente preparada uma mistura reacional contendo o produto do gene e o componente intra- ou extracelular sob condições e durante um tempo que permitam a interacção e a ligação dos dois produtos. Para testar a capacidade de um composto de teste inibir a ligação, a reacção é realizada na ausência e na presença do composto de teste. Em adição, pode ser adicionado um placebo a uma terceira mistura reacional, para servir como controlo positivo. A ligação (formação de complexo) entre o composto de teste e o componente intra- ou extracelular presente na mistura, é monitorizada como descrito acima. A formação de um complexo na reacção ou reacções de controlo mas não na mistura reacional contendo o composto de teste indica que o composto de teste interfere com a interacção do composto de teste e o seu parceiro reacional.

#### **L. Composições e Métodos para o Tratamento de Doenças Imuno-relacionadas**

As composições úteis no tratamento de doenças imuno-relacionadas incluem, sem limitação, proteínas, anticorpos, moléculas orgânicas pequenas, péptidos, fosfopéptidos, moléculas anti-sentido e de ribozima, moléculas de hélice tripla, etc., que inibem ou estimulam a função imunitária, por exemplo, a proliferação/activação de células T, a libertação de linfoquinas ou a infiltração de células imunitárias.

Por exemplo, as moléculas de ARN e ARN anti-sentido actuam para bloquear directamente a tradução de ARNm por hibridação com ARNm alvo e prevenindo a tradução da proteína.

Quando se utiliza ADN anti-sentido, preferem-se oligodesoxirribonucleótidos derivados do local de iniciação da tradução, e.g., entre cerca das posições -10 e +10 da sequência de nucleótidos do gene alvo.

As ribozimas são moléculas de ARN enzimáticas capazes de catalisar a clivagem específica de ARN. As ribozimas actuam por hibridação específica da sequência com o ARN alvo complementar, seguida de clivagem endonucleolítica. Os locais de clivagem específicos de ribozimas no interior de um potencial ARN alvo podem ser identificados por técnicas conhecidas. Para mais detalhes veja-se, e.g., Rossi, Current Biology, 4, 469-471 (1994), e publicação do PCT WO 97/33551 (publicado em 18 de Setembro, 1997).

As moléculas de ácido nucleico em formação em hélice tripla utilizadas para inibir a transcrição deverão ser de cadeia simples e compostas por desoxinucleótidos. A composição de bases destes oligonucleótidos é desenhada de modo a promover a formação em hélice tripla por meio das regras de emparelhamento de bases de Hoogsteen, o que geralmente requer trechos dimensionáveis de purinas ou pirimidinas numa cadeia de um duplex. Para mais detalhes veja-se, e.g., a publicação do PCT WO 97/33551, *supra*.

Estas moléculas podem ser identificadas através de qualquer um ou qualquer combinação dos ensaios de rastreio discutidos acima e/ou através de quaisquer outras técnicas de rastreio bem conhecidas dos peritos na especialidade.

#### **M. Anticorpos Anti-PRO**

Em alguns aspectos, a presente invenção refere-se a anticorpos anti-PRO. Exemplos de anticorpos incluem anticorpos policlonais, monoclonais, humanizados, biespecíficos e heteroconjugados.

##### **1. Anticorpos Polyclonais**

Os anticorpos anti-PRO podem compreender anticorpos policlonais. Os métodos de preparação de anticorpos policlonais são conhecidos do técnico especialista. Os anticorpos policlonais podem ser criados num mamífero, por

exemplo, através de uma ou mais injecções de um agente imunizante e, se desejado, um adjuvante. Tipicamente, o agente imunizante e/ou adjuvante será injectado no mamífero por múltiplas injecções subcutâneas ou intraperitoneais. O agente imunizante pode incluir o polipéptido PRO ou uma sua proteína de fusão. Pode ser útil conjugar o agente imunizante a uma proteína que se sabe ser imunogénica no mamífero a imunizar. Os exemplos destas proteínas imunogénicas incluem, mas não se lhes limitam, hemocianina de lapa *Fissurella*, albumina sérica, tiroglobulina bovina e inibidor de tripsina de soja. Os exemplos de adjuvantes que podem ser empregues incluem adjuvante completo de Freund e adjuvante MPL-TDM (monofosforil-Lípido A, dicitrionomicolato de trealose sintético). O protocolo de imunização pode ser seleccionado por um perito na especialidade sem experimentação indevida.

## 2. Anticorpos Monoclonais

Os anticorpos anti-PRO podem, alternativamente, ser anticorpos monoclonais. Os anticorpos monoclonais podem ser preparados utilizando métodos de hibridoma, tais como os descritos por Kohler e Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). Num método de hibridoma, um ratinho, um hamster ou outro animal hospedeiro apropriado, é tipicamente imunizado com um agente imunizante para eliciar linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que se irão ligar especificamente ao agente imunizante. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*.

O agente imunizante incluirá tipicamente o polipéptido PRO ou uma sua proteína de fusão. Geralmente, ou utilizam-se linfócitos de sangue periférico ("PBL") quando se pretendem células de origem humana, ou utilizam-se células de baço ou células de nódulos linfáticos quando se pretendem fontes de mamífero não humano. Os linfócitos são então fundidos com uma linha celular imortalizada utilizando um agente de fusão adequado, tal como polietilenoglicol, para formar uma célula de hibridoma [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103]. As linhas celulares imortalizadas são usualmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origem em roedor, bovino e humana. Usualmente, empregam-se linhas celulares de mieloma de rato ou ratinho. As células de

hibridoma podem ser cultivadas num meio de cultura adequado que preferivelmente contém uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou sobrevivência das células imortalizadas não fundidas. Por exemplo, se as células progenitoras não têm a enzima hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas tipicamente incluirá hipoxantina, aminopterina e timidina ("meio HAT"), substâncias estas que previnem o crescimento de células deficientes em HGPRT.

As linhas celulares imortalizadas preferidas são aquelas que se fundem eficientemente, suportam a expressão estável a nível elevado de anticorpo pelas células produtoras de anticorpo seleccionadas, e são sensíveis a um meio tal como meio HALT. As linhas celulares imortalizadas mais preferidas são linhas de mieloma murino, que podem ser obtidas, por exemplo, do Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California e da American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Linhas celulares de mieloma humano e de heteromieloma ratinho-humano também foram descritas para a produção de anticorpos monoclonais humanos [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63].

O meio de cultura em que as células de hibridoma são cultivadas pode então ser ensaiado quanto à presença de anticorpos monoclonais dirigidos contra PRO. Preferivelmente, a especificidade de ligação de anticorpos monoclonais produzidos pelas células de hibridoma é determinada por imunoprecipitação ou através de um ensaio de ligação *in vitro*, tal como um radioimunoensaio (RIA) ou um ensaio imunossorvente com enzima ligada (ELISA). Estas técnicas e ensaios são conhecidos na especialidade. A afinidade de ligação do anticorpo monoclonal pode, por exemplo, ser determinada pela análise Scatchard de Munson e Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Após identificadas as células de hibridoma desejadas, os clones podem ser subclonados por procedimentos de diluição limitante e crescidas por métodos padrão [Goding, *supra*]. Os meios de cultura adequados para este fim incluem, por exemplo,

Meio de Eagle Modificado por Dulbecco e meio RPMI-1640. Alternativamente, as células de hibridoma podem ser crescidas *in vivo* na forma de ascites num mamífero.

Os anticorpos monoclonais segregados pelos subclones podem ser isolados ou purificados a partir do meio de cultura ou do fluido ascítico por procedimentos convencionais de purificação de imunoglobulinas tais como, por exemplo, cromatografia em proteína A-Sepharose, hidroxilapatite, electroforese em gel, diálise ou cromatografia de afinidade.

Os anticorpos monoclonais podem também ser preparados por métodos de ADN recombinante, tais como os descritos na Patente U.S. 4,816,567. O ADN que codifica os anticorpos monoclonais da invenção pode ser prontamente isolado e sequenciado utilizando procedimentos convencionais (e.g., utilizando sondas oligonucleotídicas que são capazes de se ligar especificamente a genes que codificam as cadeias pesadas e leves de anticorpos murinos). As células de hibridoma da invenção servem como uma fonte preferida deste ADN. Uma vez isolado, o ADN pode ser colocado em vectores de expressão, que são então transfetados para células hospedeiras tais como células COS de símio, células de ovário de hamster chinês (CHO) ou células de mieloma, que de outro modo não produzem a proteína imunoglobulina, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. O ADN também pode ser modificado, por exemplo, substituindo a sequência de codificação para domínios constantes da cadeia pesada e leve humanos no lugar das sequências murinas homólogas [Patente U.S. 4,816,567; Morrison et al., *supra*] ou por união covalente à sequência de codificação da imunoglobulina da totalidade ou parte da sequência de codificação para um polipéptido que não imunoglobulina. Este polipéptido que não imunoglobulina pode substituir os domínios constantes de um anticorpo da invenção, ou pode substituir os domínios variáveis de um local de combinação com o antigénio de um anticorpo da invenção para criar um anticorpo quimérico bivalente.

Os anticorpos podem ser anticorpos monovalentes. Os métodos para a preparação de anticorpos monovalentes são bem conhecidos na especialidade. Por exemplo, um método envolve a

expressão recombinante de cadeia leve e cadeia pesada modificada de imunoglobulina. A cadeia pesada é truncada geralmente num ponto na região Fc de modo a prevenir a reticulação da cadeia pesada. Alternativamente, os resíduos de cisteína relevantes são substituídos por outro resíduo de aminoácido ou são eliminados de modo a prevenir a reticulação.

Os métodos *in vitro* são também adequados para a preparação de anticorpos monovalentes. A digestão de anticorpos para produzir seus fragmentos, particularmente, fragmentos Fab, pode ser realizada utilizando técnicas de rotina conhecidas na especialidade.

### **3. Anticorpos Humanos e Humanizados**

Os anticorpos anti-PRO utilizados na invenção podem adicionalmente compreender anticorpos humanizados ou anticorpos humanos. As formas humanizadas de anticorpos não humanos (e.g., murinos) são imunoglobulinas quiméricas, cadeias de imunoglobulina ou seus fragmentos (tais como Fv, Fab, Fab', F(ab')2 ou outras subsequências de ligação ao抗原, de anticorpos) que contêm a sequência mínima derivada da imunoglobulina não humana. Os anticorpos humanizados incluem imunoglobulinas humanas (anticorpo recebedor) em que resíduos de uma região determinante de complementaridade (CDR) do recebedor são substituídos por resíduos de uma CDR de uma espécie não humana (anticorpo dador) tal como ratinho, rato ou coelho, possuindo a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Em alguns casos, resíduos estruturais de Fv da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não humanos correspondentes. Os anticorpos humanizados podem também compreender resíduos que não se encontram nem no anticorpo recebedor nem nas sequências de CDR ou estruturais importadas. Em geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente a totalidade de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, em que todas ou substancialmente todas as regiões CDR correspondem às de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as regiões FR são as de uma sequência de consenso de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado optimamente também compreenderá pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de uma

imunoglobulina humana [Jones *et al.*, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332:323-329 (1988); e Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)].

Os métodos para a humanização de anticorpos não humanos são bem conhecidos na especialidade. Geralmente, um anticorpo humanizado possui um ou mais resíduos de aminoácido introduzidos de uma fonte que não é humana. Estes resíduos de aminoácido não humanos são frequentemente referidos como resíduos "importados", que são tipicamente tomados de um domínio variável "importado". A humanização pode ser essencialmente realizada seguindo 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)], substituindo por CDR ou sequências de CDR de roedor as sequências correspondentes de um anticorpo humano. Assim, estes anticorpos "humanizados" são anticorpos quiméricos (Patente U.S. 4,816,567), em que substancialmente menos de um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente de uma espécie não humana. Na prática, os anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos em que alguns resíduos de CDR e possivelmente alguns resíduos FR estão substituídos por resíduos de locais análogos em anticorpos de roedor.

Os anticorpos humanos podem também ser produzidos utilizando várias técnicas conhecidas na especialidade, incluindo bibliotecas de exibição em fagos [Hoogenboom e Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581 (1991)]. As técnicas de Cole *et al.*, e Boerner *et al.*, estão também disponíveis para a preparação de anticorpos monoclonais humanos (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) e Boerner *et al.*, J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)]. Similarmente, os anticorpos humanos podem ser preparados por introdução de loci de imunoglobulina humana em animais transgénicos, e.g., ratinhos em que os genes endógenos de imunoglobulina foram parcial ou completamente inactivados. Após provocação, observa-se produção de anticorpo humano, que se assemelha de próximo ao observado em seres humanos em todos os aspectos, incluindo rearranjo de genes, montagem e repertório de anticorpos. Esta abordagem é descrita, por

exemplo, nas Patentes U.S. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, e nas seguintes publicações científicas: Marks *et al.*, Bio/Technology, 10, 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, Nature, 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature, 368: 812-13 (1994); Fishwild *et al.*, Nature Biotechnology, 14: 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology, 14: 826 (1996); Lonberg e Huszar, Intern. Rev. Immunol., 13: 65-93 (1995).

Os anticorpos podem também ser maturados por afinidade utilizando métodos conhecidos de selecção e/ou mutagénese como descrito acima. Os anticorpos maturados por afinidade preferidos têm uma afinidade que é cinco vezes, mais preferivelmente 10 vezes, ainda mais preferivelmente 20 ou 30 vezes maior do que o antícorpo de partida (geralmente murinos, humanizados ou humanos) a partir do qual o antícorpo maturado é preparado.

#### **4. Anticorpos Biespecíficos**

Os anticorpos biespecíficos são anticorpos monoclonais, preferivelmente humanos ou humanizados, que possuem especificidades de ligação para com pelo menos dois抗énios diferentes. No presente caso, uma das especificidades de ligação é para com o PRO, a outra é para com qualquer outro抗énio, e preferivelmente para com uma proteína ou receptor ou subunidade de receptor da superfície celular.

Os métodos para a preparação de anticorpos biespecíficos são conhecidos na especialidade. Tradicionalmente, a produção recombinante de anticorpos biespecíficos é baseada na co-expressão de dois pares cadeia pesada/cadeia leve de imunoglobulina, onde as duas cadeias pesadas têm diferentes especificidades [Milstein e Cuello, Nature, 305:537-539 (1983)]. Devido à distribuição aleatória de cadeias pesadas e leves de imunoglobulina, estes hibridomas (quadromas) produzem uma mistura potencial de dez diferentes moléculas de anticorpo, das quais apenas uma possui a estrutura biespecífica correcta. A purificação da molécula correcta é usualmente realizada por passos de cromatografia de afinidade. Procedimentos similares são divulgados em WO 93/08829,

publicado em 13 de Maio de 1993, e em Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

Os domínios variáveis de anticorpos com as especificidades de ligação desejadas (locais de combinação anticorpo-antigénio) podem ser fundidos com sequências de domínios constantes de imunoglobulinas. A fusão preferivelmente é com um domínio constante de cadeia pesada de imunoglobulina, compreendendo pelo menos parte das regiões de charneira, CH2 e CH3. Prefere-se ter a primeira região constante da cadeia pesada (CH1) contendo o local necessário para a ligação da cadeia leve presente em pelo menos uma das fusões. Os ADN que codificam as fusões de cadeias pesadas de imunoglobulina e, se desejado, a cadeia leve de imunoglobulina, são inseridos em vectores de expressão separados, e são co-transflectados para um organismo hospedeiro adequado. Para mais detalhes sobre a geração de anticorpos biespecíficos veja-se, por exemplo, Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986).

De acordo com outra abordagem descrita em WO 96/27011, a interface entre um par de moléculas de anticorpo pode ser manipulada para maximizar a percentagem de heterodímeros que são recuperados a partir da cultura de células recombinantes. A interface preferida compreende pelo menos uma parte da região CH3 de um domínio constante de anticorpo. Neste método, uma ou mais cadeias laterais de aminoácidos pequenos da interface da primeira molécula de anticorpo são substituídas por cadeias laterais maiores (e.g., tirosina ou triptofano). São criadas "cavidades" compensatórias de tamanho idêntico ou similar à(s) cadeia(s) lateral(ais) grandes na interface da segunda molécula de anticorpo substituindo cadeias laterais de aminoácidos grandes por mais pequenas (e.g., alanina ou treonina). Isto proporciona um mecanismo para aumentar o rendimento do heterodímero relativamente a outros produtos finais indesejados tais como homodímeros.

Anticorpos biespecíficos podem ser preparados na forma de anticorpos de comprimento completo ou fragmentos de anticorpos (e.g., anticorpos biespecíficos F(ab')2). As técnicas para gerar anticorpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticorpos foram descritas na literatura. Por exemplo, podem

preparar-se anticorpos biespecíficos utilizando ligação química. Brennan *et al.*, Science, 229:81 (1985) descrevem um procedimento em que anticorpos intactos são proteoliticamente clivados para gerar fragmentos F(ab')2. Estes fragmentos são reduzidos na presença do agente de complexação de ditiol arsenito de sódio para estabilizar ditióis vicinais e prevenir a formação de dissulfureto intermolecular. Os fragmentos Fab' gerados são então convertidos em derivados de tionitrobenzoato (TNB). Um dos derivados Fab'-TNB é então reconvertido no Fab'-tiol por redução com mercaptoetilamina e é misturado com uma quantidade equimolar do outro derivado Fab'-TNB para formar o anticorpo biespecífico. Os anticorpos biespecíficos produzidos podem ser utilizados como agentes para a imobilização selectiva de enzimas.

Os fragmentos Fab' podem ser directamente recuperados de *E. coli* e quimicamente acoplados para formar anticorpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, J. Exp. Med., 175:217-225 (1992) descrevem a produção de uma molécula de anticorpo biespecífico F(ab')2 completamente humanizado. Cada fragmento Fab' foi segregado separadamente por *E. coli* e submetido a acoplamento químico dirigido *in vitro* para formar o anticorpo biespecífico. O anticorpo biespecífico assim formado foi capaz de se ligar a células que sobre-expressam o receptor ErbB2 e células T humanas normais, assim como de desencadear a actividade lítica de linfócitos citotóxicos humanos contra alvos de tumor da mama humano.

Foram também descritas várias técnicas para a preparação e isolamento de fragmentos de anticorpos biespecíficos directamente a partir da cultura de células recombinantes. Por exemplo, foram produzidos anticorpos biespecíficos utilizando "fechos de correr" de leucinas. Kostelny *et al.*, J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992). Os péptidos "fecho de correr" de leucinas originários das proteínas Fos e Jun foram ligados às porções Fab' de dois anticorpos diferentes por fusão génica. Os homodímeros do anticorpo foram reduzidos na região de charneira para formar monómeros e depois foram re-oxidados para formar os heterodímeros do anticorpo. Este método pode também ser utilizado para a produção de homodímeros de anticorpos. A tecnologia dos "diacorpos" descrita por Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448

(1993) proporcionou um mecanismo alternativo para a preparação de fragmentos de anticorpos biespecíficos. Os fragmentos compreendem um domínio variável de cadeia pesada (VH) ligado a um domínio variável de cadeia leve (VL) através de um ligante que é demasiado curto para permitir o emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia. Assim, os domínios VH e VL de um fragmento são forçados a emparelhar com os domínios VL e VH complementares de outro fragmento, formando desse modo dois locais de ligação ao antígeno. Foi também relatada outra estratégia para a preparação de fragmentos de anticorpos biespecíficos através da utilização de dímeros de Fv de cadeia simples (sFv). Veja-se, Gruber *et al.*, J. Immunol., 152:5368 (1994).

Estão contemplados anticorpos com mais de duas valências. Por exemplo, podem preparar-se anticorpos triespecíficos. Tutt *et al.*, J. Immunol., 147:60 (1991).

Anticorpos biespecíficos exemplificativos podem ligar-se a dois epítocos diferentes num determinado polipeptídeo PRO. Alternativamente, um braço anti-polipeptídeo PRO pode ser combinado com um braço que se liga a uma molécula desencadeadora num leucócito tal como uma molécula receptora de células T (e.g., CD2, CD3, CD28 ou B7), ou receptores de Fc para IgG (FcγR), tais como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) e FcγRIII (CD16) de modo a focar os mecanismos de defesa celulares para a célula que expressa o polipeptídeo PRO particular. Os anticorpos biespecíficos podem também ser utilizados para localizar agentes citotóxicos em células que expressam um polipeptídeo PRO particular. Estes anticorpos possuem um braço de ligação a PRO e um braço que se liga a um agente citotóxico ou um quelante de radionuclídos, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA ou TETA. Outro anticorpo biespecífico de interesse liga-se ao polipeptídeo PRO e liga-se ainda ao factor tissular (TF).

##### **5. Anticorpos Heteroconjugados**

Os anticorpos heteroconjugados estão também no âmbito da presente invenção. Os anticorpos heteroconjugados são compostos por dois anticorpos ligados covalentemente. Estes anticorpos foram propostos, por exemplo, para direcionar

células do sistema imunitário para células indesejadas [Patente U.S. 4,676,980], e para o tratamento de infecção por HIV [WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089]. Está contemplado que os anticorpos possam ser preparados *in vitro* utilizando métodos conhecidos na química da síntese de proteínas, incluindo os que envolvem agentes de reticulação. Por exemplo, podem ser construídas imunotoxinas utilizando uma reacção de permuta de dissulfureto ou por formação de uma ligação tioéter. Os exemplos de reagentes adequados para este fim incluem iminotiolato e metil-4-mercaptobutirimidato e os divulgados, por exemplo, na Patente U.S. 4,676,980.

## **6. Manipulação da Função Efectora**

Pode ser desejável modificar o anticorpo utilizado na invenção em relação à função efectora, de modo a aumentar, e.g., a eficácia do anticorpo no tratamento do cancro. Por exemplo, podem ser introduzidos um ou mais resíduos de cisteína na região Fc, desse modo permitindo a formação de ligações dissulfureto intercadeias nesta região. O anticorpo homodimérico assim gerado pode ter uma capacidade de internalização melhorada e/ou uma morte celular mediada pelo complemento e citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) aumentadas. Veja-se Caron *et al.*, J. Exp Med., 176: 1191-1195 (1992) e Shope, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992). Os anticorpos homodiméricos com actividade antitumoral melhorada podem também ser preparados utilizando reticulantes heterobifuncionais como descrito em Wolff *et al.*, Cancer Research, 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, pode ser manipulado um anticorpo que possui regiões Fc duplas e pode assim ter-se aumentadas as capacidades de lise pelo complemento e ADCC. Veja-se Stevenson *et al.*, Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989).

## **7. Imunoconjungados**

A invenção também se refere a imunoconjungados compreendendo um anticorpo conjugado com um agente citotóxico tal como um agente quimioterapêutico, uma toxina (e.g., uma toxina enzimaticamente activa de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, ou seus fragmentos), ou um isótopo radioactivo (i.e., um radioconjungado).

Os agentes quimioterapêuticos úteis na geração destes imunoconjungados foram descritos acima. As toxinas enzimaticamente activas e seus fragmentos que podem ser utilizados incluem cadeia A da difteria, fragmentos da toxina da difteria não activos para ligação, cadeia A da exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia A de ricina, cadeia A de abrina, cadeia A de modecina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII e PAP-S), inibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inibidor de *Sapaponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina e os tricotecenos. Estão disponíveis uma variedade de radionuclídos para a produção de anticorpos radioconjungados. Os exemplos incluem  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$  e  $^{186}\text{Re}$ .

Os conjugados do anticorpo e do agente citotóxico são preparados utilizando uma variedade de agentes de acoplamento de proteínas bifuncionais tais como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tais como suberato de di-succinimidilo), aldeídos (tais como glutaraldeído), compostos de bis-azido (tais como bis(p-azidobenzoíl)hexanodiamina), derivados de bis-diazónio (tais como bis-(p-diazónio-benzoíl)etilenodiamina), diisocianatos (tais como 2,6-diisocianato de tolueno) e compostos de flúor bis-activos (tais como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por exemplo, uma imunotoxina de ricina pode ser preparada como descrito em Vitetta *et al.*, Science, 23:1098 (1987). O 1-isotiocianatobenzil-3-metildietíleno de ácido triaminopentacético (NIX-DTPA) é um exemplo de agente quelante para a conjugação de um radionucleótilo ao anticorpo. Veja-se W094//11026.

Noutra concretização, o anticorpo pode ser conjugado com um "receptor" (tal como estreptavidina) para utilização no pré-direcccionamento para tumores em que o conjugado anticorpo-receptor é administrado ao paciente, seguido por remoção de conjugado não ligado da circulação utilizando um agente de depuração e posterior administração de um "ligando" (e.g.,

avidina) que está conjugada com um agente citotóxico (e.g., um radionucleórido).

#### 8. Imunolipossomas

Os anticorpos aqui divulgados podem também ser formulados na forma de imunolipossomas. Os lipossomas contendo o anticorpo são preparados por métodos conhecidos na especialidade, tais como os descritos em Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); e nas Pat. U.S. 4,485,045 e 4,544,545. Estão divulgados lipossomas com tempo de circulação aumentado na Patente U.S. 5,013,556.

Lipossomas particularmente úteis podem ser gerados pelo método da evaporação em fase inversa com uma composição de lípidos compreendendo fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina derivatizada com PEG (PEG-PE). Os lipossomas são extrudidos através de filtros de dimensão de poros definida para originar lipossomas com o diâmetro desejado. Os fragmentos Fab' do anticorpo da presente invenção podem ser conjugados com os lipossomas como descrito em Martin *et al.*, J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982) através da reacção de interpermuta de dissulfureto. Um agente quimioterapéutico (tal como Doxorubicina) está opcionalmente contido no interior do lipossoma. Veja-se Gabizon *et al.*, J. National Cancer Inst., 81(19):1484 (1989).

#### 9. Utilizações para Anticorpos anti-PRO

Os anticorpos anti-PRO podem ser úteis em aspectos da invenção. Por exemplo, os anticorpos anti-PRO podem ser utilizados em ensaios de diagnóstico para PRO, e.g., detecção da sua expressão (e em alguns casos, expressão diferencial) em células, tecidos ou soro específicos de acordo com as reivindicações. Podem utilizar-se várias técnicas de ensaio de diagnóstico conhecidas na especialidade, tais como ensaios de ligação competitiva, ensaios em sanduíche directos ou indirectos e ensaios de imunoprecipitação conduzidos quer em fase heterogénea quer homogénea [Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987) pp. 147-158]. Os anticorpos utilizados nos ensaios de diagnóstico podem ser

marcados com uma porção detectável. A porção detectável deverá ser capaz de produzir, directa ou indirectamente, um sinal detectável. Por exemplo, a porção detectável pode ser um radioisótopo, tal como  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  ou  $^{125}\text{I}$ , um composto fluorescente ou quimioluminescente, tal como isoftiocianato de fluoresceína, rodamina ou luciferina, ou uma enzima, tal como fosfatase alcalina, beta-galactosidase ou peroxidase de rábano-silvestre. Qualquer método conhecido na especialidade para a conjugação do anticorpo à porção detectável pode ser empregue, incluindo os métodos descritos por Hunter *et al.*, Nature, 144:945 (1962); David *et al.*, Biochemistry, 13:1014 (1974); Pain *et al.*, J. Immunol. Meth., 40:219 (1981); e Nygren, J. Histochem and Cytochem., 30:407 (1982).

Os anticorpos anti-PRO também são úteis para a purificação por afinidade de PRO a partir da cultura de células recombinantes ou de fontes naturais. Neste processo, os anticorpos contra PRO são imobilizados num suporte adequado, tal como resina Sephadex ou papel de filtro, utilizando métodos bem conhecidos na especialidade. O anticorpo imobilizado é então colocado em contacto com uma amostra contendo o PRO a purificar, e posteriormente o suporte é lavado com um solvente adequado que irá remover substancialmente todo o material na amostra excepto o PRO, que está ligado ao anticorpo imobilizado. Finalmente, o suporte é lavado com outro solvente adequado que irá libertar o PRO a partir do anticorpo.

Os exemplos seguintes são oferecidos para fins ilustrativos apenas, e não se destinam a limitar o âmbito da presente invenção de nenhuma maneira.

#### N. Composições farmacêuticas

As moléculas activas de PRO da invenção (e.g., polipéptidos PRO, anticorpos anti-PRO e/ou variantes de cada um) assim como outras moléculas identificadas pelos ensaios de rastreio aqui divulgados, podem ser administradas para o tratamento de doenças imuno-relacionadas, na forma de composições farmacêuticas. As formulações terapêuticas da molécula activa de PRO, preferivelmente um polipéptido ou um anticorpo da invenção, são preparadas para armazenagem por mistura da molécula activa possuindo o grau desejado de pureza

com transportadores, excipientes ou estabilizantes opcionais farmaceuticamente aceitáveis (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. [1980]), na forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Os transportadores, excipientes ou estabilizantes aceitáveis não são tóxicos para os beneficiários nas dosagens e concentrações empregues, e incluem tampões tais como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; os antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de octadecildimetilbenzilamónio; cloreto de hexametónio; cloreto de benzalcónio, cloreto de benzetónio; fenol, álcool butílico ou benzílico; alquilparabenos tais como metilparabeno ou propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclo-hexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipéptidos de baixo peso molecular (inferior a cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina sérica, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrófilos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina ou lisina; monossacáridos, dissacárido, e outros hidratos de carbono incluindo glucose, manose ou dextrinas; agentes quelantes tais como EDTA; açúcares tais como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; contra-íões formadores de sais tais como sódio; complexos de metais (e.g., complexos Zn-proteína); e/ou tensioactivos não iónicos tais como TWEEN<sup>TM</sup>, PLURONICS<sup>TM</sup> ou polietilenoglicol (PEG).

Os compostos identificados pelos ensaios de rastreio aqui divulgados podem ser formulados de uma maneira análoga, utilizando técnicas padrão bem conhecidas na especialidade.

Podem também utilizar-se lipofecções ou lipossomas para a entrega da molécula de PRO às células. Quando se utilizam fragmentos de anticorpos, prefere-se o menor fragmento inibidor que se liga especificamente ao domínio de ligação da proteína alvo. Por exemplo, com base em sequências da região variável de um anticorpo, podem ser desenhadas moléculas de péptidos que retêm a capacidade de se ligar à sequência da proteína alvo. Estes péptidos podem ser sintetizados quimicamente e/ou produzidos por tecnologia de ADN recombinante (veja-se, e.g., Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7889-7893 [1993]).

A presente formulação pode também conter mais de um composto activo conforme necessário para a indicação particular a tratar, preferivelmente aqueles com actividades complementares que não se afectam adversamente uns aos outros. Alternativamente, ou em adição, a composição pode compreender um agente citotóxico, uma citoquina ou um agente inibidor do crescimento. Estas moléculas estão adequadamente presentes em combinação em quantidades que são eficazes para o fim pretendido.

As moléculas activas de PRO podem também ser aprisionadas em microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial, por exemplo, hidroximetilcelulose ou microcápsulas de gelatina e microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, em sistemas de entrega de fármacos coloidais (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Estas técnicas estão divulgadas em Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

As formulações a utilizar para administração *in vivo* têm que ser estéreis. Isto consegue-se prontamente por filtração através de membranas de esterilização por filtração.

Podem preparar-se preparações de libertação sustentada das moléculas de PRO. Os exemplos adequados de preparações de libertação sustentada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrófobos sólidos contendo o anticorpo, matrizes estas que estão na forma de artigos conformados, e.g., filmes, ou microcápsulas. Os exemplos de matrizes de libertação sustentada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), ou poli(álcool vinílico)), polilactidas (Pat. U.S. 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutâmico e  $\gamma$ -etyl-L-glutamato, copolímeros não degradáveis de etileno-acetato de vinilo, degradáveis de ácido láctico-ácido glicólico tais como o LUPRON DEPOT<sup>TM</sup> (microesferas injectáveis compostas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolida) e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Enquanto polímeros tais como etileno-acetato de vinilo e ácido láctico-ácido glicólico permitem a libertação de moléculas durante mais de 100 dias, determinados

hidrogéis libertam proteínas durante períodos de tempo mais curtos. Quando os anticorpos encapsulados permanecem no corpo durante um longo período, podem desnaturar ou agregar-se em resultado da exposição à humidade a 37°C, resultando uma perda de actividade biológica e possíveis alterações de imunogenicidade. Podem ser deduzidas estratégias racionais para a estabilização dependendo do mecanismo envolvido. Por exemplo, quando se verifica que o mecanismo de agregação é a formação de ligações S-S intermoleculares através da interpermute de tio-dissulfureto, a estabilização pode ser conseguida por modificação de resíduos sulfidrilo, liofilização a partir de soluções ácidas, controlo do teor de humidade, utilizando aditivos apropriados, e desenvolvimento de composições de matrizes poliméricas específicas.

#### **O. Métodos de Tratamento**

Está contemplado que os polipéptidos, anticorpos e outros compostos activos aqui descritos possam ser utilizados para tratar várias doenças imuno-relacionadas e condições, tais como doenças mediadas por células T, incluindo as que são caracterizadas por infiltração de células inflamatórias num tecido, a estimulação da proliferação de células T, a inibição da proliferação de células T, uma permeabilidade vascular aumentada ou diminuída ou a sua inibição.

Os exemplos de condições ou desordens a tratar com os polipéptidos, anticorpos e outros compostos aqui descritos incluem, mas não se lhes limitam, lúpus eritematoso sistémico, artrite reumatóide, artrite crónica juvenil, osteoartrite, espondiloartropatias, esclerose sistémica (esclerodermia), miopatias inflamatórias idiopáticas (dermatomiosite, polimiosite), síndrome de Sjögren, vasculite sistémica, sarcoidose, anemia hemolítica auto-imune (pancitopenia imune, hemoglobinúria nocturna paroxística), trombocitopenia auto-imune (púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia imunomediada), tiroidite (doença de Grave, tiroidite de Hashimoto, tiroidite linfocítica juvenil, tiroidite atrópica), diabetes mellitus, doença renal imunomediada (glomerulonefrite, nefrite túbulo-intersticial), doenças desmielinizantes dos sistemas nervosos central e periférico tais como esclerose múltipla, polineuropatia desmielinizante

idiopática ou Síndrome de Guillain-Barré, e polineuropatia desmielinizante inflamatória crónica, doenças hepatobiliares tais como hepatite infecciosa (hepatite A, B, C, D, E e outros vírus não hepatotrópicos), hepatite activa crónica auto-imune, cirrose biliar primária, hepatite granulomatosa e colangite esclerosante, doença inflamatória do intestino (colite ulcerativa: doença de Crohn), enteropatia sensível ao glúten, e Doença de Whipple, doenças da pele auto-imunes ou imunomediadas incluindo doenças cutâneas bolhosas, dermatite de contacto e eritema multiforme, psoriase, doenças alérgicas tais como asma, rinite alérgica, dermatite atópica, hipersensibilidade a alimentos e urticária, doenças imunológicas do pulmão tais como pneumonias eosinofílicas, fibrose pulmonar idiopática e pneumonite de hipersensibilidade, doenças associadas a transplantações incluindo rejeição de enxertos e doença enxerto-versus-hospedeiro.

No lúpus eritematoso sistémico, o mediador central da doença é a produção de anticorpos auto-reactivos contra proteínas/tecidos próprios e a subsequente geração de inflamação imunomediada. Os anticorpos medeiam directa ou indirectamente uma lesão do tecido. Embora os linfócitos T não se tenham mostrado directamente envolvidos em danos nos tecidos, os linfócitos T são necessários para o desenvolvimento de anticorpos auto-reactivos. A génesis da doença é assim dependente dos linfócitos T. Múltiplos órgãos e sistemas são afectados clinicamente incluindo rim, pulmão, sistema músculo-esquelético, mucocutâneo, olho, sistema nervoso central, sistema cardiovascular, tracto gastrointestinal, medula óssea e sangue.

A artrite reumatóide (AR) é uma doença inflamatória auto-imune sistémica e crónica que envolve principalmente a membrana sinovial de múltiplas articulações com resultante lesão na cartilagem articular. A patogénese é dependente dos linfócitos T e está associada com a produção de factores reumatóides, auto-anticorpos dirigidos contra IgG própria, com a resultante formação de complexos imunitários que atingem elevados níveis no fluido articular e no sangue. Estes complexos na articulação podem induzir o infiltrado marcado de linfócitos e monócitos no sinóvio e subsequentes alterações

sinoviais marcadas; o espaço/fluido articular se infiltrado por células similares com a adição de numerosos neutrófilos. Os tecidos afectados são principalmente as articulações, frequentemente com um padrão simétrico. Contudo, também ocorre a doença extra-articular em duas formas principais. Uma forma é o desenvolvimento de lesões extra-articulares com surgimento progressivo de doença na articulação e lesões típicas de fibrose pulmonar, vasculite e úlceras cutâneas. A segunda forma de doença extra-articular é a denominada síndrome de Felty que ocorre tardivamente na progressão da doença da AR, por vezes após a doença da articulação ter ficado quiescente, e envolve a presença de neutropenia, trombocitopenia e esplenomegalia. Isto pode ser acompanhado por vasculite em múltiplos órgãos com formações de enfartes, úlceras cutâneas e gangrena. Os pacientes frequentemente também desenvolvem nódulos reumatóides no tecido subcutâneo sobrejacente às articulações afectadas; o estádio tardio dos nódulos tem centros necróticos rodeados por um infiltrado misto de células inflamatórias. Outras manifestações que podem ocorrer na AR incluem: pericardite, pleurite, arterite coronária, pneumonite intersticial com fibrose pulmonar, queratoconjuntivite seca e nódulos reumatóides.

A artrite crónica juvenil é uma doença inflamatória idiopática crónica que tem início frequentemente abaixo dos 16 anos de idade. O seu fenótipo tem algumas semelhanças com a AR; alguns pacientes que são positivos a factores reumatóides são classificados como artrite reumatóide juvenil. A doença é subclassificada em três categorias principais: pauciarticular, poliarticular e sistémica. A artrite pode ser grave e é tipicamente destrutiva e conduz a anquilose articular e crescimento retardado. Outras manifestações podem incluir uveíte anterior crónica e amiloidose sistémica.

As espondiloartropatias constituem um grupo de desordens com algumas características clínicas comuns e a associação comum com a expressão do produto do gene HLA-B27. As desordens incluem: espondilite anquilosante, síndrome de Reiter (artrite reactiva), artrite associada com doença inflamatória do intestino, espondilite associada com psoriase, espondiloartropatia com início juvenil e espondiloartropatia indiferenciada. As características distintivas incluem

sacroileite com ou sem espondilite; artrite inflamatória assimétrica; associação com HLA-B27 (um alelo serologicamente definido do locus HLA-B do MHC de classe I); inflamação ocular e ausência de auto-anticorpos associados com outra doença reumatóide. A célula mais implicada como chave para a indução da doença é o linfócito T CD8<sup>+</sup>, uma célula que tem como alvos抗原s apresentados por moléculas do MHC de classe I. As células T CD8<sup>+</sup> podem reagir contra o alelo HLA-B27 do MHC de classe I como se este fosse um péptido estranho expresso por moléculas do MHC de classe I. Foi colocada a hipótese de que um epítopo de HLA-B27 pode imitar um epítopo抗原ico bacteriano ou outro epítopo抗原ico microbiano e assim induzir uma resposta de células T CD8<sup>+</sup>.

A esclerose sistémica (esclerodermia) tem uma etiologia incomum. Um marco da doença é a induração da pele; provavelmente isto é induzido por um processo inflamatório activo. A esclerodermia pode ser localizada ou sistémica; são comuns lesões vasculares e a lesão de células endoteliais na microvasculatura constitui um evento precoce e importante no desenvolvimento de esclerose sistémica; a lesão vascular pode ser imunomediada. A base imunológica é implicada pela presença de infiltrados de células mononucleares nas lesões cutâneas e pela presença de anticorpos anti-nucleares em muitos pacientes. A ICAM-1 está frequentemente supra-regulada na superfície celular de fibroblastos nas lesões cutâneas sugerindo que a interacção de células T com estas células pode ter um papel na patogénese da doença. Outros órgãos envolvidos incluem: o tracto gastrointestinal: atrofia do músculo liso e fibrose resultante em peristalse/motilidade anómalas; rim: proliferação da íntima subendotelial concêntrica afectando artérias pequenas arqueadas e interlobulares com resultante fluxo sanguíneo cortical renal reduzido, resulta em proteinúria, azotemia e hipertensão; músculo-esquelético: atrofia, fibrose intersticial; inflamação; pulmão: pneumonite intersticial e fibrose intersticial; e coração: contracção de necrose em banda, cicatrização/fibrose.

As miopatias inflamatórias idiopáticas incluindo dermatomiosite, polimiosite e outras, são desordens de inflamação crónica dos músculos de etiologia desconhecida resultante no enfraquecimento do músculo. A lesão/inflamação

do músculo é frequentemente simétrica e progressiva. Auto-anticorpos estão associados com a maioria das formas. Estes auto-anticorpos específicos de miosite são dirigidos contra, e inibem a função de, componentes, proteínas e ARN, envolvidos na síntese de proteínas.

A síndrome de Sjögren é devida a inflamação imunomediada e subsequente destruição funcional das glândulas lacrimais e das glândulas salivares. A doença pode estar associada com, ou ser acompanhada de, doenças inflamatórias do tecido conjuntivo. A doença está associada com a produção de auto-anticorpos contra抗原s Ro e La, ambos pequenos complexos ARN-proteína. As lesões resultam em queratoconjuntivite seca, xerostomia, com outras manifestações ou associações incluindo cirrose biliar, neuropatia periférica ou sensorial, e púrpura palpável.

Vasculites sistémicas são doenças em que a lesão principal é a inflamação e subsequentes danos em vasos sanguíneos que resulta em isquemia/necrose/degeneração em tecidos fornecidos pelos vasos afectados e eventual disfunção no órgão final em alguns casos. As vasculites podem também ocorrer como lesão secundária ou sequelas a outras doenças inflamatórias imunomediadas tais como artrite reumatóide, esclerose sistémica, etc., particularmente em doenças também associadas com a formação de complexos imunitários. As doenças no grupo da vasculite sistémica primária incluíam vasculite sistémica necrotizante: poliarterite nodosa, angiite alérgica e granulomatose, poliangeite; granulomatose de Wegener; granulomatose linfomatóide; e arterite de células gigantes. As vasculites miscelâneas incluem: síndrome de nódulos linfáticos mucocutâneos (MLNS ou doença de Kawasaki), vasculite do SNC isolada, doença de Behet, tromboangiite obliterante (doença de Buerger) e venulite cutânea necrotizante. Crê-se que o mecanismo patogénico da maioria dos tipos de vasculite se deve principalmente à deposição de complexos de imunoglobulina na parede dos vasos e à subsequente indução de uma resposta inflamatória quer por via de ADCC, da activação do complemento, ou ambas.

A sarcoidose é uma condição de etiologia desconhecida que é caracterizada pela presença de granulomas epitelioides em

praticamente qualquer tecido no corpo; o envolvimento do pulmão é o mais comum. A patogénese envolve a persistência de macrófagos e células linfóides activados em locais da doença com subsequentes sequelas crónicas resultantes da libertação de produtos local e sistemicamente activos libertados por estes tipos de células.

A anemia hemolítica auto-imune incluindo anemia hemolítica auto-imune, pancitopenia imune e hemoglobinúria paroxística nocturna é um resultado da produção de anticorpos que reagem com抗igénios expressos na superfície de glóbulos vermelhos do sangue (e em alguns casos outras células sanguíneas incluindo também plaquetas) e é um reflexo da remoção destas células revestidas de anticorpo através de lise mediada pelo complemento e/ou de mecanismos mediados por ADCC/receptores de Fc.

Na trombocitopenia auto-imune incluindo púrpura trombocitopénica, e trombocitopenia imunomediada noutra contexto clínico, ocorre destruição/remoção de plaquetas em resultado do ataque quer do anticorpo quer do complemento a plaquetas e subsequente remoção por mecanismos mediados por lise do complemento, ADCC ou receptores de FC.

As tiroïdites, incluindo doença de Grave, tiroïdite de Hashimoto, tiroïdite linfocítica juvenil e tiroïdite atrópica, são o resultado de uma resposta auto-imune contra抗igénios da tiroide com produção de anticorpos que reagem com proteínas presentes na, e frequentemente específicas para, a glândula tiroideia. Existem modelos experimentais incluindo modelos espontâneos: ratos (ratos BUF e BB) e galináceos (estirpe de galinhas obesas); modelos indutíveis: imunização de animais com tiroglobulina,抗igénio microssómico da tiroide (peroxidase da tiroide).

A diabetes mellitus tipo I ou diabetes insulino-dependente é a destruição auto-imune de células dos ilhéus pancreáticos; esta destruição é mediada por auto-anticorpos e células T auto-reactivas. Os anticorpos contra a insulina ou contra o receptor de insulina podem também produzir o fenótipo de não responsividade à insulina.

As doenças renais imunomediadas, incluindo glomerulonefrite e nefrite túbulo-intersticial, são o resultado de lesão mediada por anticorpos ou linfócitos T no tecido renal quer directamente em resultado da produção de anticorpos auto-reactivos ou células T contra抗énios renais quer indirectamente em resultado da deposição de anticorpos e/ou complexos imunitários no rim que são reactivos contra outros抗énios não renais. Assim, outras doenças imunomediadas que resultam na formação de complexos imunitários podem também induzir doença renal imunomediada como sequela indirecta. Mecanismos imunitários, quer directos quer indirectos, resultam em resposta inflamatória que produz/induz o desenvolvimento de lesões em tecidos renais com resultante prejuízo da função do órgão e em alguns casos progressão para falência renal. Ambos os mecanismos imunitários, humorais e celulares, podem estar envolvidos na patogénese de lesões.

Crê-se que as doenças desmielinizantes dos sistemas nervosos central e periférico, incluindo esclerose múltipla; polineuropatia desmielinizante idiopática ou Síndrome de Guillain-Barré; e polineuropatia desmielinizante inflamatória crónica, têm uma base auto-imune e resultam na desmielinização dos nervos em resultado de danos causados em oligodendrócitos ou directamente na mielina. Na EM há evidências que sugerem que a indução e a progressão da doença estão dependentes dos linfócitos T. A esclerose múltipla é uma doença desmielinizante que é dependente de linfócitos T e tem uma progressão relapsante-remitente ou uma progressão progressiva crónica. A etiologia é desconhecida; contudo, infecções virais, predisposição genética, ambiente e auto-imunidade, todos contribuem. As lesões contêm infiltrados mediados predominantemente por linfócitos T, células microgliais e macrófagos infiltrantes; os linfócitos T CD4<sup>+</sup> são o tipo de células predominante nas lesões. O mecanismo da morte de células oligodendrocíticas e subsequente desmielinização não é conhecido mas é provavelmente conduzido por linfócitos T.

As Doenças Inflamatórias e Fibróticas do Pulmão, incluindo pneumonias eosinofílicas; fibrose pulmonar idiopática e pneumonite de hipersensibilidade, podem envolver

uma resposta imuno-inflamatória desregulada. A inibição dessa resposta terá benefícios terapêuticos.

As Doenças Cutâneas Auto-imunes ou Imunomedidas incluindo doenças cutâneas bolhosas, Eritema Multiforme e Dermatite de Contacto, são mediadas por auto-anticorpos, cuja génesis é dependente de linfócitos T.

A psoriase é uma doença inflamatória mediada por linfócitos T. as lesões contêm infiltrados de linfócitos T, macrófagos e células possuidoras de抗igénios, e alguns neutrófilos.

As doenças alérgicas, incluindo asma; rinite alérgica; dermatite atópica; hipersensibilidade a alimentos; e urticária são dependentes de linfócitos T. Estas doenças são predominantemente mediadas por inflamação induzida por linfócitos T, inflamação mediada por IgE ou uma combinação de ambos.

As doenças associadas a transplantações, incluindo Rejeição de Enxertos e Doença enxerto-versus-hospedeiro (GVHD) são dependentes de linfócitos T; a inibição da função dos linfócitos T é indutora de melhorias.

Outras doenças em que a intervenção da resposta imunitária e/ou inflamatória tem benefício são doenças infecciosas incluindo, mas não se lhes limitando, infecção viral (incluindo, mas não se lhes limitando SIDA, hepatite A, B, C, D, E e herpes), infecção bacteriana, infecções fúngicas, e infecções por protozoários e parasíticas (moléculas (ou derivados/agonistas) que estimulam a MLR podem ser utilizadas terapeuticamente para melhorar a resposta imunitária a agentes infecciosos), doenças de imunodeficiência (moléculas/ derivados/ agonistas) que estimulam a MLR podem ser utilizadas terapeuticamente para melhorar a resposta imunitária a condições imunodeficiência hereditária, adquirida, induzida por infecção (como na infecção por HIV), ou iatrogénica (i.e., como a derivada da quimioterapia), e neoplasia.

Foi demonstrado que alguns pacientes humanos de cancro desenvolvem uma resposta de anticorpos e/ou linfócitos T a

antigénios em células neoplásicas. Também foi demonstrado em modelos animais de neoplasia que a melhoria da resposta imunitária pode resultar em rejeição ou regressão desse neoplasma particular. As moléculas que melhoram a resposta de linfócitos T na MLR têm utilidade *in vivo* na melhoria da resposta imunitária contra neoplasia. As moléculas que melhoram a resposta proliferativa de linfócitos T na MLR (ou agonistas de molécula pequena ou anticorpos que afectam o mesmo receptor de uma maneira agonista) podem ser utilizadas terapeuticamente para tratar o cancro. As moléculas que inibem a resposta de linfócitos na MLR também funcionam *in vivo* durante a neoplasia para suprimir a resposta imunitária a um neoplasma; estas moléculas podem ou ser expressas pelas próprias células neoplásicas ou a sua expressão pode ser induzida pelo neoplasma noutras células. O antagonismo destas moléculas inibidoras (quer com anticorpo, antagonistas de molécula pequena ou outros meios) melhora a rejeição tumoral imunomediada.

Adicionalmente, a inibição de moléculas com propriedades pró-inflamatórias pode ter benefício terapêutico em lesão por reperfusão; icto; enfarte do miocárdio; aterosclerose; lesão pulmonar aguda; choque hemorrágico; queimadura; sepsia/choque séptico; necrose tubular aguda; endometriose; doença degenerativa das articulações e pancreatite. Os compostos da presente invenção, e.g., polipéptidos ou anticorpos, são administrados a um mamífero, preferivelmente um ser humano, de acordo com métodos conhecidos, tais como administração intravenosa na forma de *bolus* ou por infusão contínua ao longo de um período de tempo, pelas vias intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutânea, intra-articular, intra-sinovial, intratecal, oral, tópica ou de inalação (intranasal, intrapulmonar). É preferida a administração intravenosa ou inalada de polipéptidos e anticorpos. Em terapia imunoadjuvante, outros regimes terapêuticos, como a administração de um agente anticanceroso, podem ser combinados com a administração das proteínas, anticorpos ou compostos da presente invenção. Por exemplo, o paciente a tratar com o imunoadjuvante da invenção pode também receber um agente anticanceroso (agente quimioterapêutico) ou terapia de radiação. A preparação e esquemas de dosagem para estes agentes quimioterapêuticos podem ser utilizados de

acordo com as instruções dos fabricantes ou como determinado empiricamente pelo técnico especialista. A preparação e esquemas de dosagem para esta quimioterapia estão também descritos em Chemotherapy Service, Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992). O agente quimioterapêutico pode preceder, ou seguir-se à administração do imunoadjuvante ou pode ser dado simultaneamente com ele. Adicionalmente, um composto anti-estrogénio tal como o tamoxifeno ou um composto anti-progesterona como a onapristona (veja-se, EP 616812) podem ser dados em dosagens conhecidas para essas moléculas. Pode ser desejável também administrar anticorpos contra outra doença imunitária associada ou抗igénios associados a tumores, tais como anticorpos que se ligam a CD20, CD11a, CD18, ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4, ou factor endotelial vascular (VEGF). Alternativamente, ou em adição, podem ser co-administrados ao paciente dois ou mais anticorpos que se ligam a mesmo ou a dois ou mais diferentes抗igénios aqui divulgados. Por vezes, pode ser benéfico também administrar uma ou mais citoquinas ao paciente. Numa concretização, os polipéptidos PRO são co-administrados com um agente inibidor do crescimento. Por exemplo, o agente inibidor do crescimento pode ser administrado primeiro, seguido de um polipéptido PRO. Contudo, a administração simultânea ou a administração primeiro estão também contempladas. As dosagens adequadas para o agente inibidor do crescimento são as presentemente utilizadas e podem ser diminuídas devido à acção combinada (sinergia) do agente inibidor do crescimento e do polipéptido PRO. Para o tratamento ou redução na gravidade da doença imuno-relacionada, a dosagem apropriada de um composto da invenção dependerá do tipo de doença a tratar, como definido acima, da gravidade e progressão da doença, de se o agente é administrado para fins preventivos ou terapêuticos, da terapia anterior, da história clínica do paciente e da resposta ao composto, e da descrição do médico assistente. O composto é adequadamente administrado ao paciente de uma só vez ou ao longo de uma série de tratamentos.

Por exemplo, dependendo do tipo e da gravidade da doença, cerca de 1 mg/kg a 15 mg/kg (e.g., 0,1-20 mg/kg) de polipéptido ou anticorpo constituem uma dosagem inicial candidata para administração ao paciente, quer, por exemplo, numa ou mais administrações separadas, quer por infusão contínua. Uma

dosagem diária típica pode variar de cerca de 1 mg/kg a 100 mg/kg ou mais, dependendo dos factores acima mencionados. Para administrações repetidas ao longo de vários dias ou mais, dependendo da condição, o tratamento é sustentado até que ocorra uma supressão desejada dos sintomas da doença. Contudo, podem ser úteis outros regimes de dosagem. A progressão desta terapia é facilmente monitorizada por técnicas e ensaios convencionais.

#### **P. Artigos Fabricados**

É igualmente aqui descrito um artigo fabricado contendo materiais (e.g., compreendendo uma molécula de PRO) úteis para o diagnóstico ou o tratamento das desordens acima descritas. O artigo fabricado compreende um recipiente e instruções. Os recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos, seringas e tubos de ensaio. Os recipientes podem ser formados de uma variedade de materiais tais como vidro ou plástico. O recipiente contém uma composição que é eficaz para o diagnóstico ou o tratamento da condição e pode ter uma porta de acesso estéril (por exemplo o recipiente pode ser um saco ou um frasco de solução intravenosa possuindo uma tampa perfurável por uma agulha de injecção hipodérmica). O agente activo na composição é usualmente um polipéptido ou um anticorpo da invenção. Uma instrução ou rótulo sobre, ou associado ao recipiente indicam que a composição é utilizada para o diagnóstico ou tratamento da condição de eleição. O artigo fabricado pode ainda compreender um segundo recipiente compreendendo um tampão farmaceuticamente aceitável, tal como solução salina tamponada com fosfato, solução de Ringer e solução de dextrose. Pode ainda incluir outros materiais desejáveis do ponto de vista comercial e do utilizador, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas e bulas de embalagem com instruções de utilização.

#### **Q. Diagnóstico e Prognóstico de Doença Imuno-relacionada**

As proteínas da superfície celular, tais como proteínas que são sobre-expressas em determinadas doenças imuno-relacionadas, são excelentes alvos para candidatos a fármacos ou tratamento de doenças. As mesmas proteínas, juntamente com proteínas segregadas codificadas pelos genes amplificados em

estados de doença imuno-relacionada, são adicionalmente úteis no diagnóstico e prognóstico destas doenças. Por exemplo, anticorpos dirigidos contra os produtos proteínicos de genes amplificados na esclerose múltipla, artrite reumatóide, desordem inflamatória do intestino, ou outra doença imuno-relacionada, podem ser utilizados em diagnóstico ou prognóstico.

Por exemplo, anticorpos, incluindo fragmentos de anticorpos, podem ser utilizados para detectar qualitativa ou quantitativamente a expressão de proteínas codificadas por genes amplificados ou sobre-expressos ("produtos de genes marcadores"). O anticorpo preferivelmente está equipado com um marcador detectável, e.g., fluorescente, e a ligação pode ser monitorizada por microscopia óptica, citometria de fluxo, fluorimetria, ou outras técnicas conhecidas na especialidade. Estas técnicas são particularmente adequadas, quando o gene sobre-expresso codifica uma proteína da superfície celular. Estes ensaios de ligação são realizados essencialmente como descrito acima.

A detecção *in situ* de ligação do anticorpo aos produtos do gene marcador pode ser realizada, por exemplo, por microscopia de imunofluorescência ou imunoelétrónica. Para este fim, remove-se um espécime histológico do paciente, e aplica-se-lhe um anticorpo marcado, preferivelmente por sobreposição do anticorpo sobre a amostra biológica. Este procedimento também permite a determinação da distribuição do produto do gene marcado no tecido examinado. Será evidente para os peritos na especialidade que estão prontamente disponíveis uma ampla variedade de métodos histológicos para detecção *in situ*.

Os exemplos que se seguem são oferecidos apenas para fins ilustrativos, e não se pretendem limitantes do âmbito da presente invenção de nenhum modo.

#### EXEMPLOS

Os reagentes comercialmente disponíveis referidos nos exemplos foram utilizados de acordo com as instruções dos fabricantes a menos que indicado em contrário. A fonte das

células identificadas nos exemplos seguintes, e ao longo de todo o fascículo, por números de acesso na ATCC é a American Type Culture Collection, Manassas, VA.

#### **EXEMPLO 1**

##### **Isolamento de Clones de ADNc Que Codificam PRO1031 Humano**

As sequências de domínios extracelulares (ECD) (incluindo o sinal de secreção, se existir) de cerca de 950 proteínas segregadas conhecidas da base de dados pública de proteínas Swiss-Prot foram utilizadas para pesquisar bases de dados de marcadores de sequência expressa (EST). As bases de dados de EST incluíram bases de dados de EST públicas (e.g., GenBank, Merck/Wash U.) e uma base de dados de ADN de EST privada (LIFESEQ\*. Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA). A busca foi realizada utilizando o programa de computador BLAST ou BLAST2 (Altshul *et al.*, *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)) como comparação das sequências de ECD de proteínas com uma tradução de 6 quadros da sequência EST. As comparações que resultam numa pontuação BLAST de 70 (ou em alguns casos, 90) ou mais que não codificam proteínas conhecidas foram agrupadas e montadas em sequências de ADN de consenso com o programa "phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington).

Um fragmento de sequência virtual inicial (montagem de consenso) foi montado relativamente a outras sequências EST utilizando o phrap. A sequência de ADN de consenso inicial foi alongada utilizando ciclos repetidos de BLAST e phrap para alongar a sequência de consenso tanto quanto possível utilizando as fontes de sequências EST acima discutidas. O resultado desta montagem de consenso é referido como DNA47332.

Uma sequência compreendendo a montagem de consenso, W74558 (clone 344649) foi adicionalmente examinada. A sequência foi obtida a partir do consórcio IMAGE e analisada. Lennon *et al.*, *Genomics*, 33: 151 (1996). A sequenciação do ADN originou a sequência de ADN de comprimento completo para PRO1031 [aqui designada por DNA59294-1381] (SEQ ID NO:1) e a sequência da proteína PRO 1031 derivada (UNQ516) (SEQ ID NO:2).

A totalidade da sequência de nucleótidos de DNA59294-1381 está apresentada na Figura 1 (SEQ ID NO:1). O clone DNA59294-1381 contém um único quadro de leitura aberto com um local de iniciação da tradução aparente nas posições de nucleótidos 42-44 e terminando no codão de stop nas posições de nucleótidos 582-584 (Figura 1; SEQ ID NO:1). O precursor polipeptídico previsto tem 180 aminoácidos de comprimento (Figura 2; SEQ ID NO:2). A proteína PRO1031 de comprimento completo (UNQ516) apresentada na Figura 2 (SEQ ID NO:2) tem um peso molecular estimado de cerca de 20 437 daltons e um pI de cerca de 9,58. O clone DNA59294-1381 foi depositado na ATCC, e foi-lhe atribuído o número de depósito 209866. No caso de quaisquer irregularidades ou erros da sequenciação com as sequências aqui proporcionadas, entenda-se que o clone depositado contém a sequência correcta para o DNA59624-1381 (SEQ ID NO:1). Adicionalmente, as sequências aqui proporcionadas são o resultado de técnicas de sequenciação conhecidas.

A análise da sequência de aminoácidos do polipéptido PRO1031 de comprimento completo (UNQ516) (SEQ ID NO:2) sugere que é um novo homólogo de interleucina-17, aqui designado por IL-17B.

A análise adicional da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2 revela que o péptido de sinal putativo está a cerca dos aminoácidos 1-20 de SEQ ID NO:2. Um local de N-glicosilação está a cerca dos aminoácidos 75-78 de SEQ ID NO:2. A região possuindo identidade de sequência com IL-17 está a cerca dos aminoácidos 96-180. Os nucleótidos correspondentes podem ser determinados rotineiramente dadas as sequências aqui proporcionadas.

## **EXEMPLO 2**

### **Isolamento de Clones de ADNc Que Codificam PRO1122 Humano**

Uma base de dados de ADN de marcadores de sequência expressa (EST) (LIFESEQ<sup>†</sup>, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) foi pesquisada e foi identificada uma EST. A EST era Incyte 1347523 também denominada DNA49665. Com base no DNA49665, sintetizaram-se oligonucleótidos: 1) para identificar por PCR uma biblioteca de ADNc que continha a

sequência de interesse, e 2) para utilizar como sondas para isolar um clone da sequência de codificação de comprimento completo para o PRO1122 [e.g., Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989); Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995) ].

Os iniciadores de PCR directo e reverso variam geralmente de 20 a 30 nucleótidos e são frequentemente desenhados para originar um produto de PCR de cerca de 100-1000 pb de comprimento. As sequências das sondas têm tipicamente 40-55 pb de comprimento. Em alguns casos, sintetizaram-se oligonucleótidos adicionais quando a sequência de consenso é superior a cerca de 1-1,5 kpb. De modo a pesquisar várias bibliotecas quanto a um clone de comprimento completo, pesquisou-se ADN a partir das bibliotecas por amplificação por PCR, como em Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, com o par de iniciadores de PCR. Uma biblioteca positiva foi então utilizada para isolar clones que codificam o gene de interesse utilizando a sonda oligonucleotídica e um dos pares de iniciadores.

Sintetizaram-se os iniciadores de PCR (directo, inverso e de hibridação):

Iniciador de PCR directo: 5'-ATCCACAGAACGCTGGCCTCGCCG-3' (SEQ ID NO:19)

Iniciador de PCR inverso: 5'-GGGACGTGGATGAACTCGGTGTGG-3' (SEQ ID NO:20)

Sonda de hibridação:

5'-TATCCACAGAACGCTGGCCTCGCCGAGTGCCTGTGCAGAG-3' (SEQ ID NO:21).

De modo a pesquisar várias bibliotecas quanto a uma fonte de um clone de comprimento completo, pesquisou-se ADN das bibliotecas por amplificação por PCR com o par de iniciadores de PCR acima identificado. Uma biblioteca positiva foi então utilizada para isolar clones que codificam o gene de PRO1122 utilizando a sonda oligonucleotídica e um dos iniciadores de PCR.

Isolou-se ARN para a construção das bibliotecas de ADNc a partir de tecido de rim fetal humano. As bibliotecas de ADNc utilizadas para isolar os clones de ADNc foram construídas utilizando métodos padrão utilizando reagentes comercialmente disponíveis tais como os da Invitrogen, San Diego, CA. O ADNc foi iniciado com oligo dT contendo um local *NotI*, ligado com extremidades lisas a adaptadores *SalI* tratados por hemiquinase, clivado com *NotI*, apropriadamente dimensionado por electroforese em gel, e clonado numa orientação definida num vector de clonagem adequado (tal como pRK5B ou pRKD; pRK5B é um precursor de pRK5D que não contém o local *SfiI*; veja-se, Holmes *et al.*, Science, 235: 1278-1280 (1991)) nos locais únicos *XbaI* e *NotI*.

A sequenciação de ADN dos clones isolados como descrito acima originou a sequência de ADN de comprimento completo para PRO1122 [aqui designada por DNA62377-1381-1] (SEQ ID NO:3) e a sequência PRO1122 da proteína derivada (UNQ561) (SEQ ID NO:4).

A totalidade da sequência de nucleótidos de DNA62377-1381-1 (SEQ ID NO:3) está apresentada na Figura 3 (SEQ ID NO:3). O clone DNA62377-1381-1 (SEQ ID NO:3) contém um único quadro de leitura aberto com um local de iniciação da tradução aparente nas posições de nucleótidos 50-52 e terminando no codão de stop nas posições de nucleótidos 641-643 de SEQ ID NO:3 (Figura 3). O polipeptídeo precursor previsto tem 197 aminoácidos de comprimento (Figura 4; SEQ ID NO:4). A proteína PRO1122 de comprimento completo apresentada na Figura 4 (UNQ561) (SEQ ID NO:4) tem um peso molecular estimado de cerca de 21765 daltons e um PI de cerca de 8,53. O clone DNA62377-1381-1 foi depositado na ATCC em 22 de Dezembro, 1998, e foi-lhe atribuído o número de depósito 203552. Entenda-se que no caso de uma irregularidade ou erro de sequenciação nas sequências aqui proporcionadas, a sequência correcta é a sequência depositada. Adicionalmente, todas as sequências aqui proporcionadas são o resultado de técnicas de sequenciação conhecidas.

A análise da sequência de aminoácidos de PRO1122 de comprimento completo isolada (UNQ561) sugere que esta possui similaridade com IL-17, desse modo indicando que a PRO1122 (UNQ561) pode ser uma nova citoquina e é aqui designada IL-17C. A Figura 4 (SEQ ID NO:4) também mostra as localizações

aproximadas do péptido de sinal, do padrão em "fecho de correr" de leucinas e de uma região possuindo identidade de sequência com IL-17.

### **EXEMPLO 3**

#### **Isolamento de clones de ADNc Que Codificam PRO10272 Humana**

As sequências de domínio extracelular (ECD) (incluindo a sequência de sinal de secreção, se existir) de cerca de 950 proteínas segregadas conhecidas da base de dados pública Swiss-Prot foram utilizadas para pesquisar sequências de ADN genómico de GenBank. A pesquisa foi realizada utilizando o programa de computador BLAST ou BLAST2 [Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)] como comparação das sequências de ECD de proteínas com uma tradução de 6 quadros das sequências EST. As comparações que resultam numa pontuação BLAST de 70 (ou em alguns casos, 90) ou mais, que não codificam proteínas conhecidas, foram agrupadas e montadas em sequências de ADN de consenso com o programa "phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington).

Montou-se uma sequência de ADN de consenso relativamente a outras sequências EST utilizando phrap como descrito acima. Esta sequência de consenso é aqui designada DNA146646. Em alguns casos, a sequência de consenso deriva de uma sequência de ADN de consenso intermediária que foi alongada utilizando ciclos repetidos de BLAST e phrap para alongar essa sequência de consenso intermediária tanto quanto possível utilizando as fontes de sequências EST acima discutidas.

Com base na sequência de consenso DNA146646, sintetizaram-se oligonucleótidos: 1) para identificar por PCR uma biblioteca de ADNc que continha a sequência de interesse, e 2) para utilizar como sondas para isolar um clone da sequência de codificação de comprimento completo para PRO10272. Os iniciadores de PCR directo e inverso variam geralmente de 20 a 30 nucleótidos e são frequentemente desenhados para originar um produto de PCR de cerca de 100-1000 pb de comprimento. As sequências da sonda têm tipicamente 40-55 pb de comprimento. Em alguns casos, são sintetizados oligonucleótidos adicionais quando a sequência de consenso é maior que cerca de 1-1,5 kpb. De modo a pesquisar várias

bibliotecas quanto a um clone de comprimento completo, o ADN das bibliotecas foi pesquisado por amplificação por PCR, como em Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, supra, com o par de iniciadores de PCR. Utilizou-se então uma biblioteca positiva para isolar clones que codificam o gene de interesse utilizando a sonda oligonucleotídica e um dos pares de iniciadores.

Sintetizaram-se os iniciadores de PCR (directo e inverso):

Iniciador de PCR directo:

5'-GTTGCATTCTGGCAATGGTCATGGGA-3' (SEQ ID NO:22)

Iniciador de PCR inverso:

5'-GGTCCATGTGGAGCCTGTCTGTA-3' (SEQ ID NO:23)

Adicionalmente, construiu-se uma sonda oligonucleotídica de hibridação sintética a partir da sequência de consenso DNA146646 que tinha a seguinte sequência de nucleótidos:

Sonda de hibridação

5'-CAGCAGCTCCTCAGAGGTGTCCTGCCCTTGCTGGGCAGCAGCT-3' (SEQ ID NO:24)

O ARN para a construção das bibliotecas de ADNc foi isolado a partir de tecido de testículos humanos. As bibliotecas de ADNc utilizadas para isolar os clones de ADNc foram construídas por métodos padrão utilizando reagentes comercialmente disponíveis tais como os da Invitrogen, San Diego, CA. O ADNc foi iniciado com oligo dT contendo um local *NotI*, ligados com extremidades lisas a adaptadores *SalI* tratados com hemiquinase, clivados com *NotI*, dimensionados apropriadamente por electroforese em gel, e clonados numa orientação definida num vector de clonagem adequado (tal como pRKB ou pRKD; pRK5B é um precursor de pRK5D que não contém o local *SfiI*; veja-se, Holmes *et al.*, Science, 253:1278-1280 (1991)) nos locais únicos *XhoI* e *NotI*.

A sequenciação de ADN dos clones isolados como descrito acima originou a sequência de ADN de comprimento completo para um polipéptido PRO10272 de comprimento completo (designado aqui como DNA147531-2821 [Figura 5, SEQ ID NO:5]) e a sequência da proteína derivada para esse polipéptido PRO10272.

O clone de comprimento completo identificado acima continha um único quadro de leitura aberto com um local de iniciação da tradução aparente nas posições de nucleótidos 259-261 e um sinal de stop nas posições de nucleótidos 790-792 (Figura 5, SEQ ID NO:5). O polipeptídeo precursor previsto tem 177 aminoácidos de comprimento, tem um peso molecular calculado de aproximadamente 20 330 daltons e um PI estimado de aproximadamente 8,78. A análise da sequência de PRO10272 de comprimento completo apresentada na Figura 6 (SEQ ID NO:6) evidencia a presença de uma variedade de importantes domínios polipeptídicos como mostrado na Figura 6, em que as localizações dadas para esses domínios polipeptídicos importantes são aproximadas como descrito acima. O clone DNA147531-2821 foi depositado na ATCC em 11 de Janeiro, 2000, e foi-lhe atribuído o n.º de depósito na ATCC PTA-1185.

A análise da sequência de aminoácidos do PRO10272 de comprimento completo isolado sugere que este possui similaridade com IL-17 e vários seus homólogos, desse modo indicando que o PRO10272 pode ser uma nova citoquina e é aqui designado IL-17E. Especificamente, uma análise da base de dados Dayhoff (SwissProt 35 versão 35.45), utilizando a análise de alinhamento de sequências ALIGN-2 da sequência de comprimento completo mostrada na Figura 6 (SEQ ID NO:6), evidenciou identidade de sequências entre a sequência de aminoácidos de PRO10272 e as seguintes sequências Dayhoff: P\_Y22197, P\_W85620, AF18469\_1, P\_Y41762, P\_Y28235, P\_W97350, P\_Y22198, P\_Y28236, P\_W28514, P\_W13651.

#### **EXEMPLO 4**

##### **Isolamento de Clones de ADNc Que Codificam um PRO21175 Humano**

Uma base de dados de ADN de marcadores de sequência expressa (EST) da Merck/Washington University foi pesquisada e foi identificada uma EST que apresentava homologia com a Interleucina-17.

Um conjunto de 50 bibliotecas de ADNc humano diferentes, de vários tecidos, foi utilizado na clonagem. As bibliotecas de ADNc utilizadas para isolar os clones de ADNc que codificam PRO21175 humano foram construídas por métodos padrão utilizando reagentes comercialmente disponíveis tais como os

da Invitrogen, San Diego, CA. O ADNc foi iniciado com oligo dT contendo um local *NotI*, ligado com extremidades lisas a adaptadores *SalI* tratados com hemiquinase, clivado com *NotI*, dimensionado apropriadamente por electroforese em gel, e clonado numa orientação definida num vector de clonagem adequado (tal como pRK5B ou pRK5D; pRK5B é um precursor de pRK5D que não contém o local *SfiI*; veja-se, Holmes *et al.*, Science, 253:1278-1280 (1991)) nos *XhoI* e *NotI* únicos.

Foram então sintetizadas sondas oligonucleotídicas com base na sequência EST descrita acima: 1) para identificar por PCR uma biblioteca de ADNc que continha a sequência de interesse, e 2) para utilizar como sondas para isolar um clone da sequência de codificação de comprimento completo para PRO21175. Os iniciadores de PCR directo e inverso variam geralmente de 20 a 30 nucleótidos e são frequentemente desenhados para originar um produto de PCR de cerca de 100-1000 pb de comprimento. As sequências da sonda têm tipicamente 40-55 pb de comprimento. De modo a pesquisar várias bibliotecas quanto a um clone de comprimento completo, o ADN das bibliotecas foi pesquisado por amplificação por PCR, como em Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, *supra*, com o par de iniciadores de PCR. Foi então utilizada uma biblioteca positiva para isolar clones que codificam o gene de interesse utilizando a sonda oligonucleotídica e um dos pares de iniciadores.

As sondas oligonucleotídicas empregues foram como se segue:

iniciador de PCR directo 5'-GCTCAGTGCCTTCCACACACGC-3' (SEQ ID NO:25)

iniciador de PCR inverso 5'-CTGCGTCCTCTCCGGCTCGG-3' (SEQ ID NO:26)

sonda de hibridação

5'-CGTTCCGTCTACACCGAGGCCTACGTCACCATCCCCGTGGGCTGC-3' (SEQ ID NO:27)

Foi identificado um clone de comprimento completo que continha um único quadro de leitura aberto com um local de iniciação da tradução aparente nas posições de nucleótidos 1-3 e um sinal de stop nas posições de nucleótidos 607-609

(Figura 7, SEQ ID NO:7). O precursor polipeptídico previsto tem 202 aminoácidos de comprimento, tem um peso molecular calculado de aproximadamente 21 879 daltons e um PI estimado de aproximadamente 9,3. A análise da sequência de PRO21175 de comprimento completo apresentada na Figura 8 (SEQ ID NO:8) evidencia a presença de uma variedade de importantes domínios polipeptídicos como mostrado na Figura 8, em que as localizações dadas para esses domínios polipeptídicos importantes são aproximadas como descrito acima. O mapeamento de cromossomas evidencia que o ácido nucleico que codifica PRO21175 se mapeia em 13q11 nos seres humanos. O clone DNA173894-2947 foi depositado na ATCC em 20 de Junho, 2000, e foi-lhe atribuído o n.º de depósito na ATCC PTA-2108.

A análise da sequência de aminoácidos do PRO21175 de comprimento completo isolado sugere que este possui similaridade com IL-17, desse modo indicando que o PRO21175 pode ser uma nova citoquina e é aqui designado IL-17D. Especificamente, uma análise da base de dados de proteínas (SwissProt 35 versão 35.45), utilizando a análise de alinhamento de sequências ALIGN-2 da sequência de comprimento completo apresentada na Figura 8 (SEQ ID NO:8) evidenciou identidade de sequências entre a sequência de aminoácidos de PRO21175 e a seguinte sequência: AF152099\_1.

#### **EXEMPLO 5**

##### **Isolamento de Clones de ADNc Que Codificam um PRO5801 Humano**

As sequências de domínio extracelular (ECD) (incluindo a sequência de sinal de secreção, se existir) de cerca de 950 proteínas segregadas conhecidas da base de dados pública Swiss-Prot foram utilizadas para pesquisar bases de dados de EST. As bases de dados de EST incluíam (1) bases de dados de EST públicas (e.g., GenBank) e (2) uma base de dados de EST privada LIFESEQ\*, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA). A pesquisa foi realizada utilizando o programa de computador BLAST ou BLAST2 [Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)] como comparação das sequências de ECD de proteínas com uma tradução de 6 quadros das sequências EST. As comparações que resultam numa pontuação BLAST de 70 (ou em alguns casos, 90) ou mais que não codificam proteínas conhecidas foram agrupadas e montadas em sequências de ADN de

consenso com o programa "phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington).

Montou-se uma sequência de ADN de consenso relativamente a outras sequências EST utilizando phrap como descrito acima. Esta sequência de consenso é aqui designada DNA105850. Em alguns casos, a sequência de consenso deriva de uma sequência de ADN de consenso intermediária que foi alongada utilizando ciclos repetidos de BLAST e phrap para alongar essa sequência de consenso intermediária tanto quanto possível utilizando as fontes de sequências EST discutidas acima.

Com base na sequência de consenso DNA105850, sintetizaram-se oligonucleótidos: 1) para identificar por PCR uma biblioteca de ADNc que continha a sequência de interesse, e 2) para utilizar como sondas para isolar um clone da sequência de codificação de comprimento completo para PRO5801. Os iniciadores de PCR directo e inverso variam geralmente de 20 a 30 nucleótidos e são frequentemente desenhados para originar um produto de PCR de cerca de 100-1000 pb de comprimento. As sequências da sonda têm tipicamente 40-55 pb de comprimento. Em alguns casos, são sintetizados oligonucleótidos adicionais quando a sequência de consenso é maior que cerca de 1-1,5 kpb. De modo a pesquisar várias bibliotecas quanto a um clone de comprimento completo, o ADN das bibliotecas foi pesquisado por amplificação por PCR, como em Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, *supra*, com o par de iniciadores de PCR. Foi então utilizada uma biblioteca positiva para isolar clones que codificam o gene de interesse utilizando a sonda oligonucleotídica e um dos pares de iniciadores.

Sintetizaram-se os iniciadores de PCR (directo e inverso):

iniciador de PCR directo 1

5'-ACTCCATATTCCTACTTGTGGCA-3' (SEQ ID NO:28)

iniciador de PCR directo 2

5'-CCCAAAGTGACCTAAGAAC-3' (SEQ ID NO:29)

iniciador de PCR inverso

5'-TCACTGAATTCTCAAAACCATTGCA-3' (SEQ ID NO:30)

Adicionalmente, construiu-se uma sonda de hibridação oligonucleotídica sintética a partir da sequência de consenso DNA105850 que tinha a seguinte sequência de nucleótidos

sonda de hibridação

5'-TGTGGCAGCGACTGCATCCGACATAAAGGAACAGTTGTGCTCTGCCACCA-3' (SEQ ID NO:31)

O ARN para a construção das bibliotecas de ADNc foi isolado de tecido de fígado fetal humano. As bibliotecas de ADNc utilizadas para isolar os clones de ADNc foram construídas por métodos padrão utilizando reagentes comercialmente disponíveis tais como os da Invitrogen, San Diego, CA. O ADNc foi iniciado com oligo dT contendo um local *NotI*, ligado com extremidades lisas a adaptadores *SaiI* tratados com hemiquinase, clivado com *NotI*, dimensionado apropriadamente por electroforese em gel, e clonado numa orientação definida num vector de clonagem adequado (tal como pRKB ou pRKD; pRK5B é um precursor de pRK5D que não contém o local *SfiI*; veja-se, Holmes *et al.*, *Science*, 253:1278-1280 (1991)) nos locais únicos *XhoI* e *NotI*.

A sequenciação do ADN dos clones isolados como descrito acima originou a sequência de ADN de comprimento completo para o polipeptídeo PRO5801 de comprimento completo (designado aqui por DNA115291-2681 [Figura 11, SEQ ID NO:11]) e a sequência da proteína derivada para esse polipeptídeo PRO5801.

O clone de comprimento completo acima identificado continha um único quadro de leitura aberto com um local de iniciação da tradução aparente nas posições de nucleótidos 7-9 e um sinal de stop nas posições de nucleótidos 1513-1515 (Figura 12, SEQ ID NO:12). O polipeptídeo precursor previsto tem 502 aminoácidos de comprimento, tem um peso molecular calculado de aproximadamente 55 884 daltons e um PI estimado de aproximadamente 8,52. A análise da sequência do PRO5801 de comprimento completo apresentada na Figura 12 (SEQ ID NO:12) evidencia a presença de uma variedade de importantes domínios polipeptídicos como mostrado na Figura 12, em que as localizações dadas para esses domínios polipeptídicos importantes são aproximadas como descrito acima. O clone

DNA115291-2681 foi depositado na ATCC em 8 de Junho, 1999, e foi-lhe atribuído o n.º de depósito na ATCC PTA-202.

Uma análise da base de dados Dayhoff mostra que PRO5801 tem similaridade de sequências com uma proteína receptora de IL-17 e o PRO5801 é também designado aqui por IL-17RH1 como descrito no Exemplo 22 do presente pedido de patente. Especificamente, uma análise da base de dados Dayhoff (SwissProt 35 versão 35.45), utilizando a análise de alinhamento de sequências de ALIGN-2 da sequência de comprimento completo mostrada na Figura 12 (SEQ ID NO:12), evidenciou identidade de sequências entre a sequência de aminoácidos de PRO5801 e as sequências dobragem Dayhoff: HSU58917\_1, P\_W92409, P\_W61272, P\_W04185, P\_W61271, ,P\_W04184, P\_W92408, GEN13979, MMU31993\_1 e YSO2\_CAEEL.

#### **EXEMPLO 6**

##### **Isolamento de Clones de ADNc que codificam um PRO20040 Humano**

Pesquisou-se uma base de dados de ADN de marcadores de sequência expressa (EST) (Merck/Washington University) e identificou-se uma EST que apresentava homologia com o receptor de Interleucina 17.

O ARN para a construção de bibliotecas de ADNc foi então isolado de um conjunto de 50 bibliotecas de ADNc humano diferentes. As bibliotecas de ADNc utilizadas para isolar os clones de ADNc que codificam PRO20040 humano foram construídas por métodos padrão utilizando reagentes comercialmente disponíveis tais como os da Invitrogen, San Diego, CA. O ADNc foi iniciado com oligo dT contendo um local *NotI*, ligado com extremidades lisas a adaptadores *SalI* tratados com hemiquinase, clivado com *NotI*, dimensionado apropriadamente por electroforese em gel, e clonado numa orientação definida num vector de clonagem adequado (tal como pRK5B ou pRK5D; pRK5B é um precursor de pRK5D que não contém o local *SfiI*; veja-se, Holmes *et al.*, *Science*, 253:1278-1280 (1991)) nos *XhoI* e *NotI* únicos.

Sintetizaram-se então sondas oligonucleotídicas com base na sequência EST descrita acima: 1) para identificar por PCR uma biblioteca de ADNc que continha a sequência de interesse,

e 2) para utilizar como sondas para isolar um clone da sequência de codificação de comprimento completo para PRO20040. Os iniciadores de PCR directo e inverso variam geralmente de 20 a 30 nucleótidos e são frequentemente desenhados para originar um produto de PCR de cerca de 100-1000 pb de comprimento. As sequências da sonda têm tipicamente 40-55 pb de comprimento. De modo a pesquisar várias bibliotecas quanto a um clone de comprimento completo, o ADN das bibliotecas foi pesquisado por amplificação por PCR, como em Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, *supra*, com o par de iniciadores de PCR. Foi então utilizada uma biblioteca positiva para isolar clones que codificam o gene de interesse utilizando a sonda oligonucleotídica e um dos pares de iniciadores.

As sondas oligonucleotídicas empregues eram como se segue:

iniciador de PCR directo

5'-CCGACTTCTTGCAGGGCCGG-3' (SEQ ID NO:32)

iniciador de PCR inverso

5'-GCAGCACGCAGCTGAGCGAG-3' (SEQ ID NO:33)

sonda de hibridação

5'-AGCGAGTGGCTACAGGATGGGTGTCCGGGCC-3' (SEQ ID NO:34)

Foi identificado um clone de comprimento completo que continha um único quadro de leitura aberto com um local de iniciação da tradução aparente nas posições de nucleótidos 233-235 e um sinal de stop nas posições de nucleótidos 2348-2350 (Figura 13, SEQ ID NO:13). O polipéptido precursor previsto tem 705 aminoácidos de comprimento, tem um peso molecular calculado de aproximadamente 76,898 daltons e um pI estimado de aproximadamente 6,08. A análise da sequência de PRO20040 de comprimento completo apresentada na Figura 14 (SEQ ID NO:14) evidencia a presença de uma variedade de importantes domínios polipeptídicos como mostrado na Figura 14, em que as localizações dadas para esses domínios polipeptídicos importantes são aproximadas como descrito acima. O clone DNA164625-2890 foi depositado na ATCC em 21 de Março, 2000, e foi-lhe atribuído o n.º de depósito na ATCC PTA-1535.

Uma análise da base de dados Dayhoff mostra que o PRO20040 tem similaridade de sequência com uma proteína receptora de IL-17 e o PRO20040 é também aqui designado por IL-17RH2 como descrito no Exemplo 20 do presente pedido de patente. Especificamente, uma análise da base de dados Dayhoff (SwissProt 35 versão 35.45), utilizando uma análise de alinhamento de sequências de ALIGN-2 da sequência de comprimento completo mostrada na Figura 14 (SEQ ID NO:14), evidenciou identidade de sequências entre a sequência de aminoácidos de PRO20040 e as seguintes sequências Dayhoff: HSU58917\_1.

#### **EXEMPLO 7**

##### **Isolamento de Clones de ADNc Que Codificam um PRO9877 Humano**

Identificou-se o DNA119502-2789 aplicando um algoritmo de busca de sequências de sinal privado desenvolvido pela Genentech, Inc. (South San Francisco, CA) sobre EST, assim como fragmentos de EST agrupados e montados de bases de dados públicas (e.g., GenBank) e/ou privadas (LIFESEQ\*, Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA). O algoritmo de sequências de sinal calcula uma pontuação para o sinal de secreção com base no carácter dos nucleótidos do ADN que circundam o primeiro, e opcionalmente o segundo, codões de metionina (ATG) na extremidade 5' da sequência ou do fragmento de sequência em consideração. Os nucleótidos que se seguem ao primeiro ATG têm que codificar para pelo menos 35 aminoácidos não ambíguos sem quaisquer codões de stop. Se o primeiro ATG tiver os aminoácidos necessários, o segundo não é examinado. Se nenhum cumprir os requisitos, a sequência candidata não é pontuada. De modo a determinar se a sequência EST contém uma sequência de sinal autêntica, o ADN que circunda o codão ATG e as sequências de aminoácidos correspondentes, são pontuados utilizando um conjunto de sete sensores (parâmetros de avaliação) que se sabe estarem associados a sinais de secreção.

A utilização do algoritmo de sequências de sinal descrito acima permitiu a identificação de um agrupamento de sequências EST da base de dados LIFESEQ\*, aqui designado por CLU42993. Este agrupamento de sequências EST foi então comparado com uma variedade de bases de dados de marcadores de sequência

expressa (EST) que incluía bases de dados de EST públicas (e.g., GenBank) e uma base de dados de ADN de EST privada (LIFESEQ<sup>\*</sup> Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) para identificar homologias existentes. A busca de homologia foi realizada utilizando o programa de computador BLAST ou BLAST2 (Altshul *et al.*, Methods in Enzymology, 266:460-480 (1996)). As comparações que resultam numa pontuação BLAST de 70 (ou em alguns casos, 90) ou mais que não codificam proteínas conhecidas foram agrupadas e montadas numa sequência de ADN de consenso com o programa "phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington). A sequência de consenso a partir daí obtida é aqui designada DNAFROM.

À luz de uma homologia de sequências observada entre a sequência DNAFROM e uma sequência EST abrangida no clone n.º 700536 da base de dados LIFESEQ<sup>\*</sup>, adquiriu-se o clone n.º 700536 e a inserção de ADNc dói obtida e sequenciada. Verificou-se aqui que essa inserção de ADNc codificava uma proteína de comprimento completo. A sequência desta inserção de ADNc está apresentada na Figura 15 e é aqui designada por DNA119502-2789.

O clone DNA119502-2789 contém um único quadro de leitura aberto com um local de iniciação da tradução aparente nas posições de nucleótidos 106-108 e terminando no codão de stop nas posições de nucleótidos 2107-2109 (Figura 15; SEQ ID NO:15). O polipéptido precursor previsto tem 667 aminoácidos de comprimento (Figura 16). A proteína PRO9877 de comprimento completo apresentada na Figura 16 tem um peso molecular estimado de cerca de 74 810 daltons e um pI de cerca de 9,55. A análise da sequência de PRO9877 de comprimento completo apresentada na Figura 16 (SEQ ID NO:16) evidencia a presença de uma variedade de importantes domínios polipeptídicos como mostrado na Figura 16, em que as localizações dadas para esses domínios polipeptídicos importantes são aproximadas como descrito acima. O clone DNA119502-2789 foi depositado na ATCC em 22 de Dezembro, 1999, e foi-lhe atribuído o n.º de depósito na ATCC PTA-1082.

Uma análise da base de dados Dayhoff mostra que PRO9877 tem similaridade de sequência com uma proteína receptora de IL-17 e o PRO9877 é também aqui designado por IL-17RH3.

Especificamente, uma análise da base de dados Dayhoff (SwissProt 35 versão 35.45), utilizando uma análise de alinhamento de sequências de ALIGN-2 da sequência de comprimento completo mostrada na Figura 16 (SEQ ID NO:16), evidenciou identidade de sequência entre a sequência de aminoácidos de PRO9877 e as seguintes sequências Dayhoff: P\_W61272, HSU58917\_1, P\_W04185, P\_W92409, GEN13979, P\_W04184, P\_W92408, MMU31993\_1, P\_W61271, e AF090114\_1.

#### **EXEMPLO 8**

##### **Isolamento de Clones de ADNc Que Codificam um PRO20026 Humano**

Utilizaram-se as sequências de domínio extracelular (ECD) (incluindo a sequência de sinal de secreção, se existir) de cerca de 950 proteínas segregadas conhecidas da base de dados pública Swiss-Prot para pesquisar bases de dados de EST. As bases de dados de EST incluíram uma base de dados de EST privada (LIFESEQ\*, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA). A pesquisa foi realizada utilizando o programa de computador BLAST ou BLAST2 [Altschul et al., *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)] como comparação das sequências de ECD de proteínas com uma tradução de 6 quadros das sequências de EST. As comparações que resultam numa pontuação BLAST de 70 (ou em alguns casos, 90) ou mais que não codificam proteínas conhecidas foram agrupadas e montadas em sequências de ADN de consenso com o programa "phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington).

Montou-se uma sequência de ADN de consenso relativamente a outras sequências EST utilizando phrap como descrito acima. Esta sequência de consenso é aqui designada DNA149870. Em alguns casos, a sequência de consenso DNA149870 deriva de uma sequência de ADN de consenso intermediária que foi alongada utilizando ciclos repetidos de BLAST e phrap para alongar essa sequência de consenso intermediária tanto quanto possível utilizando as fontes de sequências EST acima discutidas.

Com base na sequência de consenso DNA149870, realizou-se uma clonagem *flip*. Sintetizaram-se oligonucleótidos: 1) para identificar por PCR uma biblioteca de ADNc que continha a sequência de interesse, e 2) para utilizar como sondas para isolar um clone da sequência de codificação de comprimento

completo para PRO20026. Os iniciadores de PCR directo e inverso variam geralmente de 20 a 30 nucleótidos e são frequentemente desenhados para originar um produto de PCR de cerca de 100-1000 pb de comprimento. As sequências da sonda têm tipicamente 40-55 pb de comprimento. Em alguns casos, são sintetizados oligonucleótidos adicionais quando a sequência de consenso é maior que cerca de 1-1,5 kpb. De modo a pesquisar várias bibliotecas quanto a um clone de comprimento completo, pesquisou-se o ADN das bibliotecas por amplificação por Flip-PCR, como em Schanke *et al.*, BioTechniques, 16:414-416 (1994), com o par de iniciadores de PCR. Foi então utilizada uma biblioteca positiva para isolar clones que codificam o gene de interesse utilizando a sonda oligonucleotídica e um dos pares de iniciadores.

Sintetizaram-se iniciadores de PCR (directo e inverso):  
iniciador de PCR directo:  
5'-CGTTGTTGTCAGTGGAGAGCAGGG-3' (SEQ ID NO:35)  
iniciador de PCR inverso  
5'-CAGGAACACCTGAGGCAGAACGCG -3' (SEQ ID NO:36)

Adicionalmente, construiu-se uma sonda de hibridação oligonucleotídica sintética a partir da sequência de consenso DNA149870 que tinha a seguinte sequência de nucleótidos

sonda de hibridação  
5'-CTATCTCCCTGCCAGGAGGCCGGAGTGGGGAGGTCAGAC-3' (SEQ ID NO:37)

O ARN para a construção das bibliotecas de ADNc foi isolado de tecido humano. As bibliotecas de ADNc utilizadas para isolar os clones de ADNc foram construídas por métodos padrão utilizando reagentes comercialmente disponíveis tais como os da Invitrogen, San Diego, CA. O ADNc foi iniciado com oligo dT contendo um local *NotI*, ligado com extremidades lisas a adaptadores *SalI* tratados com hemiquinase, clivado com *NotI*, dimensionado apropriadamente por electroforese em gel, e clonado numa orientação definida num vector de clonagem adequado (tal como pRK5B ou pRK5D; pRK5B é um precursor de pRK5D que não contém o local *SfiI*; veja-se, Holmes *et al.*, Science, 253:1278-1280 (1991)) nos locais únicos *XbaI* e *NotI*.

A sequenciação de ADN dos clones isolados como descrito acima originou a sequência de ADN de comprimento completo para um polipéptido PRO20026 de comprimento completo (aqui designado por DNA154095-2998 [Figura 17, SEQ ID NO:17]) e a sequência da proteína derivada para esse polipéptido PRO20026.

O clone de comprimento completo identificado acima continha um único quadro de leitura aberto com um local de iniciação da tradução aparente nas posições de nucleótidos 70-72 e um sinal de stop nas posições de nucleótidos 2254-2256 (Figura 17, SEQ ID NO:17). O polipéptido precursor previsto tem 728 aminoácidos de comprimento, tem um peso molecular calculado de aproximadamente 81 310 daltons e um pI estimado de aproximadamente 6,84. A análise da sequência de PRO20026 de comprimento completo apresentada na Figura 18 (SEQ ID NO:18) evidencia a presença de uma variedade de importantes domínios polipeptídicos como mostrado na Figura 18, em que as localizações dadas para esses domínios polipeptídicos importantes são aproximadas como descrito acima. O clone DNA154095-2998 foi depositado na ATCC em 10 de Outubro, 2000, e foi-lhe atribuído o n.º de depósito na ATCC PTA-2591.

Uma análise da base de dados Dayhoff mostra que o PRO20026 tem similaridade de sequência com uma proteína receptora de IL-17 e o PRO2006 é também aqui designado por IL-17RH4. Especificamente, uma análise da base de dados Dayhoff (SwissProt 35 versão 35.45), utilizando uma análise de alinhamento de sequências de ALIGN-2 da sequência de comprimento completo mostrada na Figura 18 (SEQ ID NO:18), evidenciou identidade de sequências entre a sequência de aminoácidos de PRO20026 e as seguintes sequências Dayhoff: T42695, P\_W04185, P\_W92409, P\_W61272, NM\_014339\_1, HSU58917\_1, MMU31993\_1, GEN13979, P\_W04184, P\_W61271.

#### **EXEMPLO 9**

##### **Utilização de PRO como sonda de hibridação**

O método que se segue descreve a utilização de uma sequência de nucleótidos que codifica PRO como sonda de hibridação.

O ADN compreendendo a sequência de codificação do PRO de comprimento completo ou maduro como aqui divulgado é empregue como sonda para pesquisar ADN homólogos (tais como os que codificam variantes de ocorrência natural de PRO) em bibliotecas de ADNc de tecidos humanos ou bibliotecas genómicas de tecidos humanos.

A hibridação e a lavagem de filtros contendo os ADN das bibliotecas são realizadas sob as seguintes condições de elevado rigor. A hibridação de sonda derivada de PRO marcada com marcador radioactivo aos filtros é realizada numa solução de formamida a 50%, SSC 5x, SDS a 0,1%, pirofosfato de sódio 0,1%, fosfato de sódio 50 mM, pH 6,8, solução de Denhardt 2x, e sulfato de dextrano a 10% a 42°C durante 20 horas. A lavagem dos filtros é realizada numa solução aquosa de SSC 0,1x e SDS a 0,1% a 42°C.

Os ADN possuindo uma identidade de sequência desejada com o ADN que codifica o PRO de sequência nativa de comprimento completo podem ser então identificados utilizando técnicas padrão conhecidas na especialidade.

#### **EXEMPLO 10:**

##### Hibridação in situ

A hibridação *in situ* é uma técnica poderosa e versátil para a detecção e localização de sequências de ácido nucleico no interior de células ou preparações de tecidos. Pode ser útil, por exemplo, identificar locais de expressão de genes, analisar a distribuição nos tecidos da transcrição, identificar e localizar a infecção viral, seguir alterações em síntese de ARNm específico e auxiliar no mapeamento de cromossomos.

A hibridação *in situ* foi realizada seguindo uma versão optimizada do protocolo de Lu e Gillett, Cell Vision, 1:169-176 (1994), utilizando ribossondas geradas por PCR e marcadas com <sup>33</sup>P. Sucintamente, seccionaram-se tecidos humanos embebidos em parafina e fixados em formalina, desparafinizaram-se, desproteinizaram-se em proteinase K (20 g/ml) durante 15 minutos a 37°C, e processaram-se adicionalmente para hibridação *in situ* como descrito por Lu e

Gillett, *supra*. Gerou-se uma ribossonda anti-sentido marcada com [<sup>33</sup>P] UTP a partir de um produto de PCR e hibridou-se a 55°C durante a noite. Mergulharam-se as lâminas em emulsão Kodak NTB2 Nuclear Track e expuseram-se durante 4 semanas.

### Síntese <sup>33</sup>P-Ribossonda

Secaram-se 6,0 µl (125 mCi) de <sup>33</sup>P-UTP (Amersham BF 1002, SA < 2000 Ci/mmol) em Speed Vac. A cada tubo contendo <sup>33</sup>P-UTP seco, adicionaram-se os seguintes ingredientes:

2,0 µl de tampão de transcrição 5x

1,0 µl de DTT (100 mM)

2,0 µl de mistura de NTP (2,5 mM: 10 µl; cada um de GTP 10 mM, CTP & ATP + 10 µl de H<sub>2</sub>O)

1,0 µl de UTP (50 µM)

1,0 µl de Rnasin

1,0 µl de ADN molde (1µg)

1,0 µl de H<sub>2</sub>O

1,0 µl de ARN-polimerase (para produtos de PCR T3 = AS, T7 = S, usualmente)

Incubaram-se os tubos a 37°C durante uma hora. Adicionou-se 1,0 µl de ADNase RQ1, seguido por incubação a 37°C durante 15 minutos. Adicionaram-se 90 µl de TE (Tris 10 mM, pH 7,6/EDTA 1mM, pH 8,0), e pipetou-se a mistura para papel DE81. Carregou-se a solução restante numa unidade de ultrafiltração Microcon-50, e centrifugou-se utilizando o programa 10 (6 minutos). Inverteu-se a unidade de filtração sobre um segundo tubo e centrifugou-se utilizando o programa 2 (3 minutos). Após a centrifugação de recuperação final, adicionaram-se 100 µl de TE. Pipetou-se 1 µl do produto final para papel DE81 e contou-se em 6 ml de Biofluor II.

A sonda foi corrida num gel de TBE/ureia. Adicionaram-se 1-3 µl da sonda ou 5 µl de ARN Mrk III a 3 µl de tampão de carga. Após aquecimento num bloco térmico a 95°C durante três minutos, o gel foi imediatamente colocado em gelo. Os poços de gel foram lavados, a amostra foi carregada e corrida a 180-250 volts durante 45 minutos. O gel foi enrolado em saran e exposto a filme XAR com um ecrã de intensificação num congelador a -70°C uma hora a durante a noite.

### <sup>33</sup>P-Hibridação

#### A. Pré-tratamento de secções congeladas

Removeram-se as lâminas do congelador, colocaram-se em tabuleiros de alumínio e descongelaram-se à temperatura ambiente durante 5 minutos. Colocaram-se os tabuleiros numa incubadora a 55°C durante cinco minutos para reduzir a condensação. Fixaram-se as lâminas durante 10 minutos em paraformaldeído a 4% em gelo na câmara de extracção, e lavaram-se com SSC 0,5x durante 5 minutos, à temperatura ambiente (25 ml de SSC 20x + 975 ml de H<sub>2</sub>O SQ). Após desproteinização em proteinase K a 0,5 µg/ml durante 10 minutos a 37°C (12,5 µl de solução de reserva a 10 mg/ml em 250 ml de tampão de ARNase isento de ARNase pré-aquecido), lavaram-se as secções com SSC 0,5x durante 10 minutos à temperatura ambiente. Desidrataram-se as secções em etanol a 70%, 95%, 100%, 2 minutos cada.

#### B. Pré-tratamento de secções embebidas em parafina

Desparafinizaram-se as lâminas, colocaram-se em H<sub>2</sub>O SQ, e enxaguaram-se duas vezes com SSC 2x à temperatura ambiente, durante 5 minutos de cada vez. Desproteinizaram-se as secções em proteinase K a 20 µg/ml (500 µl de 10 mg/ml em 250 ml de tampão de ARNase isento de ARNase; 37°C, 15 minutos) - embrião humano, ou proteinase K 8x (100 µl em 250 ml de tampão de ARNase, 37°C, 30 minutos) - tecidos em formalina. Os subsequentes enxaguamento com SSC 0,5x e desidratação foram realizados como descrito acima.

#### C. Pré-hibridação

Dispuseram-se as lâminas numa caixa de plástico revestida com tampão Box (SSC 4x, formamida a 50%) - papel de filtro saturado. Cobriu-se o tecido com 50 µl de tampão de hibridação (3,75g de Sulfato de dextrano + 6 ml de H<sub>2</sub>O SQ), agitou-se no vórtex e aqueceu-se no microondas durante 2 minutos com a tampa solta. Após arrefecimento em gelo, adicionaram-se 18,75 ml de formamida, 3,75 ml de SSC 20x e 9 ml de H<sub>2</sub>O SQ, agitou-se bem o tecido no vórtex e incubou-se a 42°C durante 1-4 horas.

#### **D. Hibridação**

Aqueceram-se  $1,0 \times 10^6$  cpm de sonda e 1,0  $\mu$ l de ARNT (solução de reserve 50 mg/ml) por lâmina, a 95°C durante 3 minutos. Arrefeceram-se as lâminas em gelo, e adicionaram-se 48  $\mu$ l de tampão de hibridação por lâmina. Após agitação no vórtex, adicionaram-se 50  $\mu$ l de mistura  $^{33}\text{P}$  a 50  $\mu$ l de pré-hibridação na lâmina. Incubaram-se as lâminas durante a noite a 55°C.

#### **E. Lavagens**

A lavagem foi realizada 2x 10 minutos com SSC 2x, EDTA à temperatura ambiente (400 ml de SSC 20x + 16 ml de EDTA 0,25M,  $V_f=4\text{L}$ ), seguida de tratamento com ARNase A a 37°C durante 30 minutos (500  $\mu$ l de 10 mg/ml em 250 ml de tampão de ARNase = 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Lavaram-se as lâminas 2 x 10 minutos com SSC 2x, EDTA à temperatura ambiente. As condições de rigor da lavagem foram as seguintes: 2 horas a 55°C, SSC 0,1x, EDTA (20 ml de SSC 20x + 16 ml de EDTA,  $V_f=4\text{L}$ ).

#### **F. Oligonucleótidos**

A análise *in situ* foi realizada com DNA59294-1381 aqui divulgado. Os oligonucleótidos empregues para esta análise foram derivados das sequências de nucleótidos aqui divulgadas e geralmente variam de cerca de 40 a 55 nucleótidos de comprimento.

#### **G. Resultados**

A análise *in situ* foi realizada com DNA59294-1381 como aqui divulgado. Os resultados desta análise são os seguintes.

#### **DNA59294-1381 (PRO1031)**

A expressão deste homólogo de IL-17 foi avaliada num painel que consiste em tecidos normais adultos e fetais e tecidos com inflamação, predominantemente inflamação linfocítica crônica. Este painel é desenhado para avaliar especificamente o padrão de expressão na doença inflamatória imunomediada de novas proteínas que modulam a função dos linfócitos T (estimulante ou inibidora). Esta proteína, quando

expressa na forma de uma proteína de fusão com Ig, foi imunoestimulante de uma maneira dependente da dose na reacção linfocitária mista (MLR) humana; provocou um aumento de 285% e 147% acima da linha de base no índice de estimulação quando utilizada em duas concentrações diferentes (1,0% e 0,1 % de uma solução de reserva 560 nM) [veja-se o EXEMPLO 25 adiante]. Sumário: a expressão foi restrita ao músculo, determinados tipos de músculo liso no adulto e em músculo-esquelético e liso no feto humano. A expressão no ser humano adulto foi em músculo liso de órgãos tubulares avaliada incluindo cólon e vesícula biliar. Não houve expressão no músculo liso de vasos ou dos brônquios. Não foi avaliado músculo-esquelético adulto humano. Em tecidos fetais houve uma expressão difusa moderada a elevada no músculo-esquelético, no esqueleto axial e nos membros. Houve uma expressão fraca no músculo liso da parede intestinal mas não houve expressão no músculo cardíaco. Os tecidos adultos humanos com expressão incluem: Colón: houve baixo nível de expressão difusa no músculo liso (*tunica muscularis*) em 5 espécimes com doença inflamatória crónica do intestino; Vesícula biliar: houve expressão de nível fraco a baixo no músculo liso da vesícula biliar; Tecidos fetais humanos com expressão: houve expressão difusa moderada no músculo-esquelético e fraca a baixa expressão no músculo liso, não houve expressão no coração fetal nem em qualquer outro órgão fetal incluindo fígado, baço, SNC, rim, intestino, pulmão; Tecidos humanos sem expressão: pulmão com inflamação granulomatosa crónica e bronquite crónica (5 pacientes), nervo periférico, próstata, coração, placenta, fígado (doença multi-blocos), cérebro (cérebro e cerebelo), amígdala (hiperplasia reactiva), nódulos linfáticos periféricos, timo.

#### **EXEMPLO 11**

##### Expressão de PRO em *E. coli*

Este exemplo ilustra a preparação de uma forma não glicosilada de polipéptidos PRO por expressão recombinante em *E. coli*.

A sequência de ADN que codifica um polipéptido PRO é inicialmente amplificada utilizando iniciadores de PCR seleccionados. Os iniciadores deverão conter locais de enzimas de restrição que correspondam aos locais de enzimas de

restrição no vector de expressão seleccionado. Podem ser empregues uma variedade de vectores de expressão. Um exemplo de um vector adequado é o pBR322 (derivado de *E. coli*; veja-se Bolivar *et al.*, Gene, 2:95 (1977)) que contém genes para resistência a ampicilina e tetraciclina. O vector é digerido com enzima de restrição e desfosforilado. As sequências amplificadas por PCR são então ligadas no vector. O vector incluirá preferivelmente sequências que codificam para um gene de resistência a antibiótico, um promotor trp, um comando poli-His (incluindo os primeiros seis codões STII, a sequência poli-His e o local de clivagem para enteroquinase), a região de codificação do polipéptido PRO, o terminador da transcrição e um gene argU.

A mistura de ligação é então utilizada para transformar uma estirpe de *E. coli* seleccionada utilizando os métodos descritos em Sambrook *et al.*, *supra*. Os transformantes são identificados pela sua capacidade de crescer em placas LB e são então seleccionadas as colónias resistentes ao antibiótico. O ADN plasmídico pode ser isolado e confirmado por análise de restrição e sequenciação de ADN.

Os clones seleccionados podem ser crescidos durante a noite em meio de cultura líquido tal como caldo LB suplementado com antibióticos. A cultura da noite pode subsequentemente ser utilizada para inocular uma cultura em maior escala. As células são então crescidas até uma densidade óptica desejada, durante o que é o promotor de expressão é "ligado".

Após a cultura das células durante mais várias horas, as células podem ser colhidas por centrifugação. A pelete celular obtida na centrifugação pode ser solubilizada utilizando vários agentes conhecidos na especialidade, e a proteína PRO solubilizada pode então ser purificada utilizando uma coluna quelante de metal sob condições que permitem a forte ligação da proteína.

Os polipéptidos PRO podem ser expressos em *E. coli* de uma forma marcada com poli-His, utilizando o procedimento seguinte. O ADN que codifica um polipéptido PRO é inicialmente amplificado utilizando iniciadores de PCR seleccionados. Os

iniciadores conterão locais de enzimas de restrição que correspondem aos locais de enzimas de restrição no vector de expressão seleccionado, e outras sequências úteis que proporcionam uma iniciação da tradução eficiente e fiável, purificação rápida numa coluna quelante de metais, e a remoção proteolítica com enteroquinase. As sequências amplificadas por PCR, marcadas com poli-His, são então ligadas num vector de expressão, que é utilizado para transformar um hospedeiro *E. coli* com base na estirpe 52 (W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)). Os transformantes são primeiro crescidos em LB contendo 50 mg/ml de carbenicilina a 30°C com agitação até se atingir uma D.O. 600 de 3-5. As culturas são então diluídas 50-100 vezes em meios CRAP (preparados por mistura de 3,57 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,71 g de citrato de sódio•2H<sub>2</sub>O, 1,07 g de KCl, 5,36 g de extracto de levedura da Difco, 5,36 g de Hycase SF da Sheffield em 500 mL de água, assim como MPOS 110 mM, pH 7,3, glucose a 0,55% (p/v) e MgSO<sub>4</sub> 7 mM) e crescidas durante aproximadamente 20-30 horas a 30°C com agitação. Removem-se amostras para verificar a expressão por análise SDS-PAGE, e o volume da cultura é centrifugado para obter uma pelete de células. As peletes de células são congeladas até à purificação e redobragem.

A pasta de *E. coli* de fermentações de 0,5 a 1 L (peletes de 6-10 g) é ressuspensa em 10 volumes (p/v) em tampão de guanidina 7 M, Tris 20 mM, pH 8. Adicionam-se sulfito de sódio e tetracionato de sódio sólidos para perfazer concentrações finais de 0,1 M e 0,02 M, respectivamente, e a solução é agitada durante a noite a 4°C. Deste passo resulta uma proteína desnaturada com todos os resíduos de cisteína bloqueados por sulfitolização. A solução é centrifugada a 40 000 rpm numa Ultracentrífuga Beckman durante 30 min. O sobrenadante é diluído com 3-5 volumes da coluna de quelato de metal de tampão (guanidina 6 M, Tris 20 mM, pH 7,4) e filtrado através de filtros de 0,22 micrões para clarificar. O extracto clarificado é carregado numa coluna de quelato de metal de Ni-NTA de 5 ml da Qiagen equilibrada no tampão da coluna de quelato de metal. A coluna é lavada com tampão adicional contendo imidazole 50 mM (Calbiochem, qualidade Utrol), pH 7,4. A proteína é eluída com tampão contendo imidazole 250 mM. As fracções contendo a proteína desejada são reunidas e armazenadas a 4°C. A concentração de proteína é

estimada através da sua absorvância a 280 nm utilizando o coeficiente de extinção calculado com base na sua sequência de aminoácidos.

As proteínas são redobradas por diluição da amostra lentamente em tampão de redobragem preparado recentemente consistindo em: Tris 20 mM, pH 8,6, NaCl 0,3 M, ureia 2,5 M, cisteína 5 mM, glicina 20 mM e EDTA 1 mM. Os volumes de redobragem são escolhidos de modo a que a concentração final de proteína esteja entre 50 e 100 microgramas/ml. A solução de redobragem é agitada suavemente a 4°C durante 12-36 horas. A reacção de redobragem é extinta pela adição de TFA até uma concentração final de 0,4% (pH de aproximadamente 3). Antes de mais purificação da proteína, a solução é filtrada através de um filtro de 0,22 micrones e é adicionado acetonitrilo até 2-10% de concentração final. A proteína redobrada é chromatografada numa coluna Poros R1/H de fase inversa utilizando um tampão móvel de TFA a 0,1% com eluição com um gradiente de acetonitrilo de 10 a 80%. Aliquotas de fracções com absorvância A280 são analisadas em géis de SDS-poliacrilamida e as fracções contendo proteína redobrada homogénea são reunidas. Geralmente, as espécies correctamente redobradas da maioria das proteínas são eluídas com as concentrações mais baixas de acetonitrilo pois essas espécies são as mais compactas com os seus interiores hidrófobos escudados da interacção com a resina de fase inversa. As espécies agregadas são usualmente eluídas com as concentrações mais elevadas de acetonitrilo. Em adição à resolução de formas mal dobradas da proteína da forma desejada, o passo de fase inversa também remove endotoxina das amostras.

As fracções contendo o polipéptido PRO dobrado desejado são reunidas e o acetonitrilo é removido utilizando uma corrente suave de azoto dirigida à solução. As proteínas são formuladas em Hepes 20 mM, pH 6,8 com cloreto de sódio 0,14 M e manitol a 4% por diálise ou por filtração em gel utilizando resinas G25 Superfine (Pharmacia) equilibradas no tampão de formulação e esterilizadas por filtração.

Muitos dos polipéptidos PRO aqui divulgados foram expressos com sucesso como descrito acima.

## EXEMPLO 12

Expressão de PRO em células de mamífero

Este exemplo ilustra a preparação de uma forma potencialmente glicosilada de polipéptidos PRO por expressão recombinante em células de mamífero.

O vector, pRK5 (veja-se EP 307,247, publicado em 15 de Março, 1989), é empregue como vector de expressão. Opcionalmente, o ADN do PRO é ligado a pRK5 com enzimas de restrição seleccionadas para permitir a inserção do ADN de PRO utilizando métodos de ligação tais como os descritos em Sambrook *et al.*, *supra*. O vector resultante é denominado pRK5-PRO.

Numa concretização, as células hospedeiras seleccionadas podem ser células 293. As células 293 humanas (ATCC CCL 1573) são crescidas até à confluência em placas de cultura de tecidos em meio tal como DMEM suplementado com soro fetal de vitelo e opcionalmente, componentes nutrientes e/ou antibióticos. Cerca de 10 µg de ADN de pRK5-PRO 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 Tris-HCl 1 mM, EDTA 0,1 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,227 M. A esta mistura adicionam-se, gota a gota, 500 µl de HEPES 50 mM (pH 7,35), NaCl 280 mM, NaPO<sub>4</sub> 1,5 mM, e deixar-se formar um precipitado durante 10 minutos a 25°C. O precipitado é suspenso e adicionado às células 293 e deixado assentar durante cerca de quatro horas a 37°C. O meio de cultura é aspirado e adicionam-se 2 ml de glicerol a 20% em PBS durante 30 segundos. As células 293 são então lavadas com meio isento de soro, é adicionado meio fresco e as células são incubadas durante cerca de 5 dias.

Aproximadamente 24 horas após as transfecções, o meio de cultura é removido e substituído por meio de cultura (sozinho) ou meio de cultura contendo 200 µCi/ml de <sup>35</sup>S-cisteína e 200 µCi/ml de <sup>35</sup>S-metionina. Após uma incubação de 12 horas, o meio condicionado é recolhido, concentrado num filtro rotativo e carregado num gel de SDS a 15%. O gel processado pode ser seco e exposto a filme durante um período de tempo seleccionado para revelar a presença do polipéptido PRO. As

culturas contendo células transfectadas podem ser submetidas a incubação adicional (em meio isento de soro) e o meio é testado em bioensaios seleccionados.

Numa técnica alternativa, o PRO pode ser introduzido em células 293 transientemente utilizando o método do sulfato de dextrano descrito por Somparyrac *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 78:7575 (1981). As células 293 são crescidas até à densidade máxima num balão rotativo e adicionam-se 700 µg de ADN de pRK5-PRO. As células são primeiro concentradas a partir do balão rotativo por centrifugação e lavadas com PBS. O precipitado de ADN-dextrano é incubado sobre a pelete de células durante quatro horas. As células são testadas com glicerol a 20% durante 90 segundos, lavadas com meio de cultura de tecidos, e reintroduzidas no balão rotativo contendo meio de cultura de tecidos, 5 µg/ml de insulina bovina e 0,1 µ/ml de transferrina bovina. Após cerca de quatro dias, o meio condicionado é centrifugado e filtrado para remover células e detritos. A amostra contendo o polipéptido PRO expresso pode então ser concentrado e purificado por qualquer método seleccionado, tal como diálise e/ou cromatografia em coluna.

Noutra concretização, os polipéptidos PRO podem ser expressos em células CHO. O pRK5-PRO pode ser transfectado em células CHO utilizando reagentes conhecidos tais como CaPO<sub>4</sub> ou DEAE-dextrano. Como descrito acima, as culturas celulares podem ser incubadas, e o meio substituído por meio de cultura (sozinho) ou meio contendo um marcador radioactivo tal como <sup>35</sup>S-metionina. Após determinação da presença do polipéptido PRO, o meio de cultura pode ser substituído por meio isento de soro. Preferivelmente, as culturas são incubadas durante cerca de 6 dias, e depois o meio condicionado é colhido. O meio contendo o polipéptido PRO expresso pode então ser concentrado e purificado por qualquer método seleccionado.

O PRO marcado com epítopo pode também ser expresso em células CHO hospedeiras. O PRO pode ser subclonado a partir do vector pRK5. A inserção do subclone pode ser submetida a PCR para se fundir em enquadramento com um marcador epítópico seleccionado tal como um marcador poli-His num vector de

expressão de Baculovírus. A inserção de PRO marcada com poli-His pode então ser subclonada num vector conduzido por SV40 contendo um marcador de selecção tal como DHFR para selecção de clones estáveis. Finalmente, as células CHO podem ser transfectadas (como descrito acima) com o vector conduzido por SV40. A marcação pode ser realizada como descrito acima, para verificar a expressão. O meio de cultura contendo o PRO marcado com poli-His expresso pode então ser concentrado e purificado por qualquer método seleccionado, tal como por cromatografia de afinidade em  $\text{Ni}^{2+}$ -quelato.

Os polipeptídos PRO podem também ser expressos em células CHO e/ou COS através de um procedimento de expressão transiente ou em células CHO através de outro procedimento de expressão estável.

A expressão estável em células CHO é realizada utilizando o procedimento seguinte. As proteínas são expressas na forma de uma construção de IgG (imunoadesina), em que as sequências de codificação para as formas solúveis (e.g., domínios extracelulares) das proteínas respectivas são fundidas a uma sequência de região constante de IgG1 contendo os domínios de charneira, CH2 e CH2, e/ou numa forma marcada com poli-His.

Após a amplificação por PCR, os ADN respectivos são subclonados num vector de expressão de CHO utilizando técnicas padrão como descrito em Ausubel *et al.*, Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997). Os vectores de expressão de CHO são construídos de modo a terem locais de restrição compatíveis a 5' e 3' do ADN de interesse para permitir o conveniente vaivém dos ADNc. O vector utilizado na expressão em células CHO é como descrito em Lucas *et al.*, Nucl. Acids Res., 24:9 (1774-1779 (1996), e utilize o potenciador/promotor precoce de SV40 para conduzir a expressão do ADNc de interesse e di-hidrofolato-redutase (DHPR). A expressão de DHFR permite a selecção da manutenção estável do plasmídeo após a transfecção.

Doze microgramas do ADN plasmídico desejado são introduzidos em aproximadamente 10 milhões de células CHO utilizando reagentes de transfecção comercialmente disponíveis Superfect\* (Qiagen), Dosper\* ou Fugene\* (Boehringer Mannheim). As células são crescidas como descrito em Lucas *et al.*, *supra*.

Aproximadamente  $3 \times 10^7$  células são congeladas numa ampola para posterior crescimento e produção como descrito adiante.

As ampolas contendo o ADN plasmídico são descongeladas colocando-as num banho de água e misturando no vórtex. O conteúdo é pipetado para um tubo de centrífuga contendo 10 mL de meio e centrifugado a 1000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante é aspirado e as células são ressuspensas em 10 mL de meio selectivo (filtrado por PS20 de 0,2  $\mu\text{m}$  com 5% de soro fetal bovino diafiltrado por 0,2  $\mu\text{m}$ ). As células são então divididas em aliquotas num balão rotativo de 100 mL contendo 90 mL de meio selectivo. Após 1-2 dias, as células são transferidas para um balão rotativo de 250 mL cheio com 150 mL de meio de crescimento selectivo e incubadas a 37°C. Após mais 2-3 dias, balões rotativos de 250 mL, 500 mL e 2000 mL são semeados com  $3 \times 10^5$  células/mL. Os meios celulares são substituídos por meios frescos por centrifugação e ressuspensão em meio de produção. Embora qualquer meio adequado para CHO possa ser empregue, pode ser aqui utilizado um meio de produção descrito na Patente U.S. 5,122,469, concedida em 16 de Junho, 1992. Um balão rotativo de produção de 3L é semeado com  $1,2 \times 10^6$  células/mL. No dia 0, determinam-se o número de células e o pH. No dia 1, o balão rotativo é amostrado e inicia-se aspersão com ar filtrado. No dia 2, o balão rotativo é amostrado, a temperatura é desviada para 33°C, e tomam-se 30 mL de glucose a 500 g/L e 0,6 mL de antiespumante a 10% (e.g., emulsão de polidimetilsiloxano a 35%, Dow Coming 365 Medical Grade Emulsion). Ao longo de toda a produção, o pH é ajustado conforme necessário para o manter em torno de 7,2. Após 10 dias, ou até a viabilidade cair abaixo de 70%, a cultura celular é colhida por centrifugação e filtração através de um filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ . O filtrado foi armazenado a 4°C ou imediatamente carregado em colunas para purificação.

Para as construções marcadas com poli-His, as proteínas são purificadas utilizando uma coluna de Ni-NTA (Qiagen). Antes da purificação, adiciona-se imidazole aos meios condicionados até uma concentração de 5 mM. O meio condicionado é bombeado para uma coluna de 6 ml de Ni-NTA equilibrada em Hepes 20 mM, pH 7,4, tampão contendo NaCl 0,3 M e imidazole 5 mM a um caudal de 4-5 mL/min. a 4°C. Após a carga, a coluna é lavada com tampão de equilíbrio adicional e

a proteína é eluída com tampão de equilíbrio contendo imidazole 0,25 M. A proteína altamente purificada é subsequentemente dessalinizada num tampão de armazenagem contendo Hepes 10 mM, NaCl 0,14 M e manitol a 4%, pH 6,8, com uma coluna G25 Superfine (Pharmacia) de 25 ml e armazenada a -80°C.

As construções de imunoadesinas (contendo Fc) são purificadas a partir dos meios condicionados como se segue. O meio condicionado é bombeado para uma coluna de 5 ml de Proteína A (Pharmacia) que tinha sido equilibrada em tampão de fosfato de Na 20 mM, pH 6,8. Após a carga, a coluna é lavada extensamente com tampão de equilíbrio antes da eluição com ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. A proteína eluída é imediatamente neutralizada por recolha de fracções de 1 ml em tubos contendo 275 µL de tampão Tris 1 M, pH 9. A proteína altamente purificada é subsequentemente dessalinizada em tampão de armazenagem como descrito acima para as proteínas marcadas com poli-His. A homogeneidade é avaliada por géis de SDS-poliacrilamida e por sequenciação dos aminoácidos N-terminais por degradação de Edman.

Muitos dos polipéptidos PRO aqui divulgados foram expressos com sucesso como descrito acima.

### **EXEMPLO 13**

#### **Expressão de PRO em Levedura**

O método seguinte descreve a expressão recombinante de polipéptidos PRO em levedura.

Primeiro são construídos vectores de expressão em levedura para produção intracelular ou secreção de PRO a partir do promotor de ADH2/GAPDH. O ADN que codifica o polipéptido PRO e o promotor é inserido em locais de enzimas de restrição adequadas no plasmídeo seleccionado para dirigir a expressão intracelular do polipéptido PRO. Para secreção, o ADN que codifica PRO pode ser clonado no plasmídeo seleccionado, juntamente com ADN que codifica o promotor de ADH2/GAPDH, um péptido de sinal de PRO nativo ou outro péptido de sinal de mamífero, ou, por exemplo, uma sequência de sinal

de secreção/comando de factor alfa ou invertase de levedura, e sequências ligantes (se necessário) para a expressão de PRO.

As células de levedura, tais como a estirpe de levedura AB110, podem então ser transformadas com os plasmídeos de expressão descritos acima e cultivadas em meios de fermentação seleccionados. Os sobrenadantes da levedura transformada podem ser analisados por precipitação com ácido tricloroacético a 10% e separação por SDS-PAGE, seguidas de coloração dos géis com corante Azul de Coomassie.

Os polipéptidos PRO recombinantes podem subsequentemente ser isolados e purificados por remoção das células de levedura do meio de fermentação, por centrifugação, e depois concentração do meio utilizando filtros de cartucho seleccionados. O concentrado contendo o polipéptido PRO pode ser adicionalmente purificado utilizando resinas de cromatografia em coluna seleccionadas.

Muitos dos polipéptidos PRO aqui divulgados foram expressos com sucesso como descrito acima.

#### **EXEMPLO 14**

##### **Expressão de PRO em Células de Insecto Infectadas com Baculovírus**

O método seguinte descreve a expressão recombinante de polipéptidos PRO em células de insecto infectadas com Baculovírus.

A sequência de codificação para PRO é fundida a montante de um marcador epitópico contido no interior de um vector de expressão de baculovírus. Estes marcadores epitópicos incluem marcadores poli-His e marcadores imunoglobulina (como regiões Fc de IgG). Podem ser empregues uma variedade de plasmídeos, incluindo plasmídeos derivados de plasmídeos comercialmente disponíveis tais como pVL1393 (Novagen). Sucintamente, a sequência que codifica PRO ou a porção desejada da sequência de codificação de PRO tal como a sequência que codifica o domínio extracelular de uma proteína transmembranar ou a sequência que codifica a proteína madura se a proteína é

extracelular, é amplificada por PCR com iniciadores complementares às regiões 5' e 3'. O iniciador 5' pode incorporar locais de enzimas de restrição flanqueadores (seleccionados). O produto é então digerido com estas enzimas de restrição seleccionadas e subclonado no vector de expressão.

O baculovírus recombinante é gerado por co-transfecção do plasmídeo anterior e ADN de vírus BaculoGold™ (Pharmingen) em células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC CRL 1711) utilizando lipofectina (comercialmente disponível da GIBCO-BRL). Após 4-5 dias de incubação a 28°C, os vírus libertados foram colhidos e utilizados para mais amplificações. A infecção viral e a expressão da proteína são realizadas como descrito por O'Reilley *et al.*, Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994).

O PRO expresso marcado com poli-His pode então ser purificado, por exemplo, por cromatografia de afinidade em Ni<sup>2+</sup>-quelato como se segue. Os extractos são preparados a partir de células Sf9 infectadas com vírus recombinante como descrito por Rupert *et al.*, Nature, 362:175-179 (1993). Sucintamente, lavam-se as células Sf9, ressuspensem-se em tampão de ultra-sons (25 mL de Hepes, pH 7,9; MgCl<sub>2</sub> 12,5 mM; EDTA 0,1 mM; glicerol a 10%; NP-40 a 0,1%; KCl 0,4 M), e tratam-se com ultra-sons duas vezes durante 20 segundos em gelo. Os produtos tratados com ultra-sons são clarificados por centrifugação, e o sobrenadante é diluído 50 vezes com tampão de carga (fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, glicerol a 10%, pH 7,8) e filtrado através de um filtro de 0,45 µm. Prepara-se uma coluna de Ni<sup>2+</sup>-NTA agarose (comercialmente disponível da Qiagen) com um volume de leito de 5 mL, lava-se com 25 mL de água e equilibra-se com 25 mL de tampão de carga. O extracto celular filtrado é carregado na coluna a 0,5 mL por minuto. A coluna é lavada até à linha de base de A<sub>280</sub> com tampão de carga, ponto em que se inicia a recolha de fracções. Em seguida, lava-se a coluna com um tampão de lavagem secundário (fosfato 50 mM; NaCl 300 mM, glicerol a 10%, pH 6,0), que elui de modo não específico a proteína ligada. Após atingir novamente a linha de base de A<sub>280</sub>, desenvolve-se a coluna com um gradiente de Imidazole de 0 a 500 mM no tampão de lavagem secundário. Recolhem-se fracções de 1 mL e analisam-se por

SDS-PAGE e coloração com prata ou *Western blot* com  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA conjugado com fosfatase alcalina (Qiagen). As fracções contendo o PRO marcado com  $\text{His}_{10}$  eluído são reunidas e dialisadas contra tampão de carga.

Alternativamente, a purificação do PRO marcado com IgG (ou marcado com Fc) pode ser realizada utilizando técnicas de cromatografia conhecidas, incluindo por exemplo, cromatografia em coluna de Proteína A ou proteína G.

Muitos dos polipéptidos PRO aqui divulgados foram expressos com sucesso como descrito acima.

#### **EXEMPLO 15**

##### **Preparação de Anticorpos que se Ligam a PRO**

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

As técnicas para produzir os anticorpos monoclonais são conhecidas na especialidade e estão descritas, por exemplo, em Goding, *supra*. Os imunogénios que podem ser empregues incluem polipéptidos PRO purificados, proteínas de fusão contendo polipéptidos PRO e células que expressam polipéptidos PRO recombinantes na superfície celular. A selecção do imunogénio pode ser feita pelo técnico especialista sem experimentação indevida.

Ratinhos, tais como Balb/c, são imunizados com o imunogénio de PRO emulsionado em adjuvante completo de Freund e injectados subcutânea ou intraperitonealmente numa quantidade de 1-100 microgramas. Alternativamente, o imunogénio é emulsionado em adjuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) e injectado nas almofadas das patas traseiras dos animais. Os ratinhos imunizados recebem então reforços 10 a 12 dias mais tarde com imunogénio adicional emulsionado no adjuvante seleccionado. Posteriormente, durante várias semanas, os ratinhos podem também receber reforços com injecções de imunização adicionais. Podem ser obtidas periodicamente amostras de soro

dos ratinhos por sangria retro-orbital para teste em ensaios ELISA para detectar anticorpos anti-PRO.

Depois de detectado um título de anticorpos adequado, os animais "positivos" para anticorpos podem ser injectados com uma injeção intravenosa final de PRO. Três a quatro dias mais tarde, os ratinhos são sacrificados e são colhidas células do baço. As células do baço são então fundidas (utilizando polietilenoglicol a 35%) com uma linha celular de mieloma murino seleccionada tal como P3X63AgU.1, disponível na ATCC, N.º CRL 1597. As fusões geram células de hibridoma que podem então ser plaqueadas em placas de cultura de tecidos de 96 poços contendo meio HAT (hipoxantina, aminopterina e timidina) para inibir a proliferação de células não fundidas, híbridos de mieloma e híbridos de células de baço.

As células de hibridoma serão rastreadas num ELISA quanto a reactividade contra PRO. A determinação de células de hibridoma "positivas" que segregam os anticorpos monoclonais desejados contra PRO faz parte dos conhecimentos dos peritos na especialidade.

As células de hibridoma positivas podem ser injectadas intraperitonealmente em ratinhos Balb/c singénicos para produzir ascites contendo os anticorpos monoclonais anti-PRO. Alternativamente, as células de hibridoma podem ser crescidas em balões de cultura de tecidos ou frascos rolantes. A purificação dos anticorpos monoclonais produzidos nas ascites pode ser realizada utilizando precipitação com sulfato de amónio, seguida de cromatografia de exclusão em gel. Alternativamente, pode ser empregue cromatografia de afinidade baseada na ligação do anticorpo a proteína A ou proteína G.

#### **EXEMPLO 16**

#### **Purificação de Polipéptidos PRO Utilizando Anticorpos Específicos**

Os polipéptidos PRO nativos ou recombinantes podem ser purificados através de uma variedade de técnicas padrão no campo da purificação de proteínas. Por exemplo, pro-polipéptido PRO, polipéptido PRO maduro ou pre-polipéptido PRO, são purificados por cromatografia de imunoafinidade utilizando anticorpos específicos para o polipéptido PRO de

interesse. Em geral, é construída uma coluna de imunoafinidade por acoplamento covalente do anticorpo anti-polipéptido PRO a uma resina cromatográfica activada.

As imunoglobulinas policlonais são preparadas a partir de soros imunes quer por precipitação com sulfato de amónio quer por purificação em Proteína A imobilizada (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.). Do mesmo modo, os anticorpos monoclonais são preparados a partir de fluido ascítico de ratinho por precipitação com sulfato de amónio ou chromatografia em Proteína A imobilizada. A imunoglobulina parcialmente purificada é fixada covalentemente a uma resina cromatográfica tal como SEPHAROSE<sup>TM</sup> activada com 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.

Esta coluna de imunoafinidade é utilizada na purificação de polipéptido PRO preparando uma fracção a partir de células contendo polipéptido PRO numa forma solúvel. Esta preparação é derivada por solubilização da célula completa ou de uma fracção subcelular obtida por via de centrifugação diferencial através da adição de detergente ou por outros métodos bem conhecidos na especialidade. Alternativamente, o polipéptido PRO solúvel contendo uma sequência de sinal pode ser segregado em quantidade útil para o meio em que as células são crescidas.

Uma preparação contendo polipéptido PRO solúvel é passada sobre a coluna de imunoafinidade, e a coluna é lavada sob condições que permitem a absorvância preferencial de polipéptido PRO (e.g., tampões de elevada força iônica na presença de detergente). Então, a coluna é eluída sob condições que corrompem a ligação anticorpo/polipéptido PRO (e.g., um tampão de baixo pH tal como aproximadamente pH 2-3, ou uma elevada concentração de um caotropo tal como ureia ou ião tiocianato) e o polipéptido PRO é recolhido.

#### **EXEMPLO 17**

##### **Rastreio de fármacos**

A presente invenção é particularmente útil para rastreio de compostos utilizando polipéptidos PRO ou seus fragmentos de

ligação em qualquer de uma variedade de técnicas de rastreio de fármacos. O polipéptido PRO ou fragmento empregues nestes testes podem estar livres em solução, afixados num suporte sólido, transportados numa superfície celular, ou estar localizados intracelularmente. Um método de rastreio de fármacos utiliza células hospedeiras eucariotas ou procariotas que são estavelmente transformadas com ácidos nucleicos recombinantes que expressam o polipéptido PRO ou fragmento. Os fármacos são rastreados contra estas células transformadas em ensaios de ligação competitiva. Estas células, quer na forma viável quer fixada, podem ser utilizadas para ensaios de ligação padrão. Pode-se medir, por exemplo, a formação de complexos entre polipéptido PRO ou um fragmento e o agente a testar. Alternativamente, pode-se examinar a diminuição na formação de complexo entre o polipéptido PRO e a sua célula alvo ou receptores alvo provocada pelo agente a testar.

Assim, a presente invenção proporciona métodos de rastreio para fármacos ou quaisquer outros agentes que possam afectar uma doença ou desordem associadas ao polipéptido PRO. Estes métodos compreendem o contacto destes agentes com um polipéptido PRO ou um seu fragmento e o ensaio (i) quanto à presença de um complexo entre o agente e o polipéptido PRO ou o fragmento, ou (ii) quanto à presença de um complexo entre o polipéptido PRO ou um fragmento e a célula, por métodos bem conhecidos na especialidade. Nestes ensaios de ligação competitiva, o polipéptido PRO ou o fragmento são tipicamente marcados. Após uma incubação adequada, o polipéptido PRO ou o fragmento livres são separados dos que estão presentes na forma ligada, e a quantidade de marcador livre ou não complexado é uma medida da capacidade do agente particular se ligar ao polipéptido PRO ou interferir com o complexo polipéptido PRO/célula.

Outra técnica para o rastreio de fármacos proporciona um rastreio de elevado rendimento para compostos possuindo a afinidade de ligação adequada relativamente a um polipéptido e está descrita com detalhes em WO 84/03564, publicado em 13 de Setembro, 1984. Sucintamente colocado, sintetizam-se grandes números de diferentes compostos de teste polipeptídicos pequenos sobre um substrato sólido, tal como pinos de plástico ou alguma outra superfície. Aplicado a um polipéptido PRO, os

compostos peptídicos de teste são feitos reagir com polipéptido PRO e lavados. O polipéptido PRO ligado é detectado por métodos bem conhecidos na especialidade. O polipéptido PRO purificado pode também revestir directamente placas para utilização nas técnicas de rastreio de fármacos acima mencionadas. Em adição, podem ser utilizados anticorpos não neutralizantes para capturar o péptido e imobilizá-lo no suporte sólido.

A presente invenção também contempla a utilização de ensaios de rastreio de fármacos competitivos em que anticorpos neutralizantes capazes de se ligar ao polipéptido PRO competem especificamente com um composto de teste pela ligação ao polipéptido PRO ou seus fragmentos. Desta maneira, os anticorpos podem ser utilizados para detectar a presença de qualquer péptido que partilhe um ou mais determinantes antigénicos com o polipéptido PRO.

#### **EXEMPLO 18**

##### **Desenho Racional de Fármacos**

O objectivo do desenho racional de fármacos é produzir análogos estruturais do polipéptido biologicamente activo de interesse (*i.e.*, um polipéptido PRO) ou de moléculas pequenas com as quais interactuam, *e.g.*, agonistas, antagonistas ou inibidores. Quaisquer destes exemplos podem ser utilizados para o desenho de fármacos que são formas mais activas ou estáveis do polipéptido PRO ou que aumentam ou interferem com a função do polipéptido PRO *in vivo* (*c.f.*, Hodgson, *Bio/Technology*, 9: 19-21 (1991)).

Numa abordagem, a estrutura tridimensional do polipéptido PRO, ou de um complexo polipéptido PRO-inibidor, é determinada por cristalografia de raios-x, por modelagem em computador ou, mais tipicamente, através de uma combinação das duas abordagens. Tanto a forma como as cargas do polipéptido PRO têm que ser determinadas para elucidar a estrutura e para determinar o(s) local(ais) activos da molécula. Menos frequentemente, pode-se obter informação útil relativa à estrutura do polipéptido PRO através de modelagem baseada na estrutura de proteínas homólogas. Em ambos os casos, utiliza-se a informação estrutural relevante para desenhar moléculas

semelhantes a polipéptido PRO análogo ou para identificar inibidores eficientes. Os exemplos úteis de desenho racional de fármacos podem incluir moléculas que possuem actividade ou estabilidade melhoradas como mostrado por Braxton e Wells, Biochemistry, 31:7796-7801 (1992) ou que actuam como inibidores, agonistas ou antagonistas de péptidos nativos como mostrado por Athauda *et al.*, J. Biochem., 113:742-746 (1993).

É também possível isolar um anticorpo específico do alvo, seleccionado por ensaio funcional, como descrito acima, e depois resolver a sua estrutura cristalina. Esta abordagem, em princípio, origina um núcleo de fármaco ("pharmacore") no qual se pode basear o subsequente desenho de fármacos. É possível evitar a cristalografia da proteína gerando anticorpos anti-idiotípicos (anti-id) contra um anticorpo funcional, farmacologicamente activo. Como uma imagem num espelho de uma imagem num espelho, será de esperar que o local de ligação dos anti-id seja um análogo do receptor original. O anti-id pode então ser utilizado para identificar e isolar péptidos de bancos de péptidos produzidos química ou biologicamente. Os péptidos isolados irão então actuar como núcleo de fármaco.

Em virtude da presente invenção, podem ser tornadas disponíveis quantidades suficientes do polipéptido PRO para realizar estudos analíticos como cristalografia de raios-x. Em adição, o conhecimento da sequência de aminoácidos do polipéptido PRO aqui proporcionado irá proporcionar orientações para os que utilizam técnicas de modelação em computador em vez de, ou em adição a, cristalografia de raios-x.

#### **EXEMPLO 19**

##### **Distribuição da Expressão Diferencial nos Tecidos**

Construíram-se sondas oligonucleotídicas a partir das sequências de nucleótidos que codificam polipéptido PRO1031, PRO1122, PRO21175, PRO10272, PRO20110, PRO5801, PRO20040, PRO9877 e PRO20026 apresentadas nas figuras anexas para utilização em reacções de amplificação por PCR quantitativas. As sondas oligonucleotídicas foram escolhidas de modo originar um fragmento amplificado de aproximadamente 200-600 pares de bases a partir da extremidade 3' do seu molde associado numa

reacção PCR padrão. As sondas oligonucleotídicas foram empregues em reacções padrão de amplificação por PCR quantitativas com bibliotecas de ADNc isolado de diferentes fontes de tecido humano adulto e/ou fetal e foram analisadas por electroforese em gel de agarose de modo obter uma determinação quantitativa do nível de expressão dos ácidos nucleicos que codificam o polipéptido nos vários tecidos testados. O conhecimento do padrão de expressão ou da expressão diferencial do ácido nucleico que codifica o polipéptido em vários diferentes tipos de tecidos humanos proporciona um marcador de diagnóstico útil para tipificação de tecidos, com ou sem outros marcadores específicos do tecido, para determinação da fonte de tecido primária de um tumor metastático, e similares. Estes ensaios proporcionaram os seguintes resultados:

Molécula de ADN	Tecidos c/ Expressão Significativa	Tecidos s/ Expressão Significativa
DNA59294-1381	altamente expresso na glândula mamária, traqueia, testículos e coluna vertebral	fracamente expresso no intestino, medula óssea, pulmão, rim e timo; sem expressão no pâncreas, fígado, cérebro ou baço
DNA62377-1381-1	fortemente expresso nos testículos, baço, timo e traqueia	fracamente expresso no intestino, cérebro fetal, tecido mamário, útero, cólon, pulmão, placenta e estômago; sem expressão no músculo, pâncreas, fígado, coluna vertebral, cérebro e fígado fetal

Molécula de ADN	Tecidos c/ Expressão Significativa	Tecidos s/ Expressão Significativa
DNA173894-2974	altamente expresso no músculo, coluna vertebral e cérebro	não expresso no intestino, glândula mamária, medula, útero, traqueia, cólon, glândula salivar, pulmão, pâncreas, fígado, próstata, supra-renal, rim, timo, placenta, coração, estômago e baço
Molécula de ADN	Tecidos c/ Expressão Significativa	Tecidos s/ Expressão Significativa
DNA147531-2821	expresso em baixos níveis no cérebro, rim, pulmão, próstata, testículos, coluna vertebral, glândula supra-renal e traqueia	fígado, cólon, medula, intestino, baço, músculo, estômago, útero, placenta, timo, músculo, útero, placenta, pâncreas, glândula salivar e glândula mamária
Molécula de ADN	Tecidos c/ Expressão Significativa	Tecidos s/ Expressão Significativa
DNA166819	altamente expresso nos testículos, rim, timo e estômago	não expresso no intestino, glândula mamária, medula, útero, traqueia, cólon, glândula salivar, pulmão, músculo, pâncreas, fígado, próstata, glândula supra-renal, placenta, Coração, coluna vertebral, cérebro e baço

Molécula de ADN	Tecidos c/ Expressão Significativa	Tecidos s/ Expressão Significativa
DNA115291-2681	altamente expresso no rim; expressão significativa no fígado e placenta órgãos periféricos tais como cólon, intestino delgado, próstata, testículos, pâncreas e útero	não expresso no coração, medula óssea, baço e
Molécula de ADN	Tecidos c/ Expressão Significativa	Tecidos s/ Expressão Significativa
DNA164625-2890	altamente expresso na próstata; expresso no rim, coluna vertebral, placenta, fígado, pulmão, cólon, baço, útero, dendrócitos e hipocampo, intestino, glândula mamária, medula óssea, testículos, músculo, estômago e timo	fracamente expresso no coração, cartilagem, tumor do cólon, substância negra expresso em linfoblastos
Molécula de ADN	Tecidos c/ Expressão Significativa	Tecidos s/ Expressão Significativa
DNA119502-2789	fortemente expresso na glândula mamária, placenta e próstata; expresso no intestino, cólon, pulmão, rim, timo, estômago, coluna vertebral e baço	não expresso no músculo, fígado e coração; fracamente expresso na medula, útero, testículos cérebro

Molécula de ADN	Tecidos c/ Expressão Significativa	Tecidos s/ Expressão Significativa
DNA154095-2998	fortemente expresso no cérebro fetal; expressão significativa no útero e testículos; expresso na próstata, esófago e tumores esofágicos, estômago normal e tumor expresso no tumor do rim, tumor do pulmão e tumor rectal	expressão desprezável na glândula mamária, medula óssea, traqueia, cólon, pulmão, músculo, pâncreas, fígado, glândula suprarrenal, timo, placenta, coração, cérebro e baço, não expresso no recto; não expresso no tumor do fígado

#### EXEMPLO 20

Identificação de Interacções Receptor/Ligando - Resumo Geral do Ensaio de Rastreio de Polipéptidos PRO para Identificação de Interacções Receptor/Ligando

Neste ensaio, são testados vários polipéptidos PRO quanto à capacidade para se ligarem a um painel de moléculas potenciais receptores ou ligandos para fins de identificação de interacções receptor/ligando. A identificação de um ligando para um receptor conhecido, um receptor para um ligando conhecido ou um novo par receptor/ligando é útil para uma variedade de indicações incluindo, por exemplo, moléculas bioactivas de direcccionamento (ligadas ao ligando ou ao receptor) para uma célula que se sabe que expressa o receptor ou o ligando, utilização do receptor ou do ligando como um reagente para detectar a presença do ligando ou do receptor numa composição que se suspeita que contenha o mesmo, em que a composição pode compreender células que se suspeita que expressam o ligando ou o receptor, modulação do crescimento ou outra actividade biológica ou imunológica de uma célula que se sabe que expressa ou responde ao receptor ou ao ligando, modulação da resposta imunitária de células ou para células que expressam o receptor ou o ligando, permitir a preparação de agonistas, antagonistas e/ou anticorpos dirigidos contra o receptor ou o ligando que irão modular o crescimento ou uma actividade biológica ou imunológica de uma célula que expressa

o receptor ou o ligando, e várias outras indicações que serão prontamente evidentes para as pessoas competentes na matéria.

Em geral, o ensaio é realizado como se segue. Um polipéptido PRO da presente invenção que se suspeita ser um ligando para um receptor é expresso na forma de uma proteína de fusão contendo o domínio Fc de IgG humana (uma imunoadesina). A ligação receptor-ligando é detectada permitindo a interacção do polipéptido imunoadesina com células (e.g. células COS) que expressam receptores de polipéptido PRO candidatos e visualização da imunoadesina ligada com reagentes fluorescentes dirigidos para o domínio da fusão de Fc e exame por microscopia. As células que expressam receptores candidatos são produzidas por transfeccão transiente, em paralelo, de subconjuntos definidos de uma biblioteca de vectores de expressão de ADNc que codifica polipéptidos PRO que possam funcionar como moléculas receptoras. As células são então incubadas durante 1 hora na presença da imunoadesina de polipéptido PRO a testar quanto a possível ligação ao receptor. As células são então lavadas e fixadas com paraformaldeído. As células são então incubadas com anticorpo conjugado fluorescente dirigido contra a porção Fc da imunoadesina do polipéptido PRO (e.g. anticorpo anti-Fc humano de cabra conjugado com FITC). As células são então novamente lavadas e examinadas ao microscópio. Uma interacção positiva é avaliada pela presença de marcação fluorescente de células transfectadas com ADNc que codifica um receptor de polipéptido PRO particular ou um conjunto de receptores e uma ausência de marcação fluorescente similar de células preparadas de modo similar que foram transfectadas com outro ADNc ou conjuntos de ADNc. Se um conjunto definido de vectores de expressão de ADNc é considerado positivo quanto à interacção com uma imunoadesina de polipéptido PRO, as espécies individuais de ADNc que compreendem o conjunto são testadas individualmente (o conjunto é "desmembrado") para determinar o ADNc específico que codifica um receptor capaz de interactuar com a imunoadesina de polipéptido PRO.

Noutra concretização deste ensaio, um potencial polipéptido PRO ligando marcado com epítopo (e.g., marcador de 8 histidinas "His") é deixado interactuar com um painel de potenciais moléculas de polipéptido PRO receptoras que foram

expressas na forma de fusões com o domínio Fc de IgG humana (imunoadesinas). Após 1 hora de co-incubação com o polipeptídeo PRO marcado com epítopo, os receptores candidatos são cada um imunoprecipitados com contas de proteína A e as contas são lavadas. A potencial interacção do ligando é determinada por análise *Western blot* dos complexos imunoprecipitados com anticorpo dirigido contra o marcador epítópico. Considera-se que ocorre uma interacção se for observada uma banda com o peso molecular antecipado da proteína marcada com epítopo na análise *Western blot* com um receptor candidato, mas não é observada com os outros membros do painel de potenciais receptores.

Utilizando os ensaios acima descritos, foram aqui identificados as seguintes interacções receptor/ligando:

- (1) PRO1031 (aqui designado por ligando IL-17B humano) liga-se a PRO5801 (aqui designado por receptor IL-17RH1 humano).
- (2) PRO10272 (aqui designado por ligando IL-17E humano) liga-se a PRO5801 (aqui designado por receptor IL-17RH1 humano).
- (3) PRO20110 (aqui designado por ligando IL-17F humano) liga-se ao receptor de IL-17 humano (IL-17R) [(Yao *et al.*, *Cytokine*, 9(11):794-800 (1997); também aqui designado por PRO1] e a PRO20040 (aqui designado por receptor IL-17RH2 humano).
- (4) PRO1031 (ligando IL-17B) e PRO1122 (ligando IL-17C) não se ligam ao receptor de IL-17 humana (Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 97(2):773-778 (2000)).

#### EXEMPLO 21

Ligação de Receptor de IL-17 Humana (IL-17R; designado PRO1) com Novos Ligandos IL-17B (designado PRO1031) e IL-17C (designado PRO1122)

**A. Clonagem do ECD do Receptor de IL-17 Humana (designado IL-17R; aqui designado por PRO1):**

O ECD do receptor de IL-17 humana (IL-17R) [Yao *et al.*, *Cytokine* 9(11):794-800 (1997)] foi clonado de modo a estudar as interacções ligando/receptor dos novos polipeptídos

homólogos de IL-17, IL-17B e IL-17C. Desenharam-se dois iniciadores oligonucleotídicos nas extremidades 5' e 3' do ECD de IL-17R humano com base na sequência publicada. [Yao *et al.*, *Cytokine*, 9:794 (1997)]. As duas sondas tinham as seguintes sequências:

Iniciador 1: 5'-CTG TAC CTC GAG GGT GCA GAG-3' (SEQ ID NO:38)  
Iniciador 2: 5'-CCC AAG CTT GGG TCA ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG CCA CAG GGG CAT GTA GTC C-3' (SEQ ID NO:39)

Os iniciadores anteriores foram utilizados em reacções PCR para amplificar o ADNc de comprimento completo a partir de uma biblioteca de ADNc de testículos humanos com ADN-polimerase Pfu Turbo (Promega). Introduziu-se um marcador de His C-terminal por PCR através da adição de nucleótidos que codificam oito histidinas ao iniciador da extremidade 3'. O produto da PCR foi então subclonado num vector de expressão plasmídico pRK5B. A análise da sequência confirmou que a inserção contém um fragmento de ADN que codifica o domínio extracelular (1-320 aminoácidos) do receptor de hIL-17 publicado.

#### **B. Imunoprecipitação do ECD de IL-17R:**

A actividade diferencial de IL-17 quando comparada com IL-17B (PRO1031; SEQ ID NO:2) e IL-17C (PRO1122; SEQ ID NO:4) (vejam-se os Exemplos 28 a 30 do presente pedido de patente) sugeriu que estes se podem ligar e activar diferentes receptores da superfície celular. De modo a testar se IL-17B (PRO1031) ou IL-17C (PRO1122) se ligam directamente ao receptor, transfecção-se um plasmídeo de expressão contendo o IL-17R (PRO1) (marcado com His no terminal C) em células 293 utilizando o reagente de transfecção SuperFect (Qiagen). Realizou-se a marcação metabólica de células 293 16 horas após a transfecção utilizando 50 mCi/ml de mistura [<sup>35</sup>S]-Cys/Met durante 6 horas. Recolheu-se o meio condicionado e concentrou-se (Centricon-10, Amicon). Para examinar a expressão do ECD de IL-17R, utilizaram-se contas de Ni-NTA (Qiagen) para precipitar por afinidade o ECD de IL-17R marcado com His do meio condicionado.

O meio condicionado foi diluído em tampão RIPA (NP40 a 1%, desoxicolato de sódio a 0,5%, SDS a 0,1% em PBS) e foi incubado com IL-17 e as proteínas de fusão de Fc durante a

noite a 4°C. Adicionaram-se contas de Proteína A-agarose (Pierce) para precipitar as proteínas de fusão de Fc. Os precipitados foram lavados três para precipitar as proteínas de fusão de Fc. Os precipitados foram lavados três com tampão RIPA, desnaturados em tampão de amostra de SDS e submetidos a electroforese em géis NuPAGE de 4-12% de Bis-Tris (Novex). Para a imunoprecipitação de IL-17 adicionou-se anticorpo anti-IL-17 (R&D Systems). Numa experiência de ligação competitiva, realizou-se a imunoprecipitação de ECD de IL-17R por IL-17 na presença de um excesso molar de 5 vezes de IL-17B.His, IL-17C.His e proteína de controlo marcada com His.

O ECD de IL-17R migrou na forma de uma banda de 60 kDa quando purificado por via do seu marcador de histidinas (Figura 29A.), pista 1). Adicionalmente, o ECD de IL-17R também precipitou em combinação com IL-17 (pista 3). Contudo, nem o IL-17B nem o IL-17C competiram pela ligação de IL-17 para o ECD do receptor de IL-17 marcado (Figura 29B.), pistas 15 e 16).

## EXEMPLO 22

Ligaçao do Novo Receptor de IL-17 Humana (IL-17RH1) (designado PRO5801) a IL-17 Humana e Novos Ligandos IL-17B (designado PRO1031), IL-17C (designado PRO1122) e IL-17E (designado PRO10272); Induçao de Actividade de NF- $\kappa$ B e Produçao de IL-8 por IL-17E

**A. Isolamento de IL-17E (PRO10272) e Construçao de Vectores de Expressão:**

Isolaram-se clones de ADNc de IL-17E (DNA147531-2821; SEQ ID NO:5) e IL-17RH1 (DNA115291-2681; SEQ ID NO:11) a partir de uma biblioteca de ADNc humano e sequenciaram-se na sua totalidade como descrito no EXEMPLO 3 e no EXEMPLO 5, respectivamente. As proteínas de fusão de Fc (imunoadesões) foram preparadas por fusão da totalidade do quadro de leitura aberto de IL-17, IL-17B (PRO1031), IL-17C (PRO1122), e IL-17E (PRO10272) em enquadramento com a região Fc de IgG1 humana no vector de expressão eucariota pRK5tkNEO e no vector de baculovírus pHIF, um derivado de pVL1393 adquirido a Pharmingen. As proteínas de fusão foram expressas transientemente em células 293 humanas ou células de insecto

Sf9 e purificadas sobre uma coluna de Proteína A. O domínio extracelular do receptor IL-17RH1 (PRO5801) foi também expresso na forma de uma fusão C-terminal com o marcador 8xHis em baculovírus e purificado por coluna de afinidade de níquel. O IL-17E (PRO10272) foi também expresso na forma de uma fusão com o marcador de 8xHis em *E. coli* e foi purificado e redobrado. As identidades das proteínas purificadas foram verificadas por análise da sequência N-terminal.

#### **B. Análise Western Blot, Northern Blot e Taqman:**

A análise *Western blot* da ligação de IL-17E (PRO10272) a IL-17RH1 (PRO5801) foi realizada essencialmente como descrito por Xie *et al.*, *Cytokine*, 11(10):729-735 (1999) e Xie *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 275(40): 31335-31339 (2000). Para a análise *Northern blot*, sondaram-se *Northern blots* de múltiplos tecido (Clontech) com uma sonda marcada com  $^{32}\text{P}$  de ADNC de IL-17RH1 iniciado aleatoriamente de acordo com as recomendações do fabricante e expuseram-se a X-omat (Kodak) durante 72 horas. Para a análise quantitativa por PCR (Taqman<sup>TM</sup>), analisou-se o ARNm total de tecidos humanos (50 ng) conforme recomendado (Perkin Elmer) com iniciadores baseados na sequência de codificação de IL-17RH1.

#### **C. Análise FACS:**

Células 293 humanas foram co-transfetadas transientemente com vectores de expressão para proteína verde fluorescente (GFP), e IL-17RH1 (PRO5801) ou IL-17R (designado PRO1) conforme indicado. Após 24 horas, incubaram-se as células com ligando marcado com Fc conforme indicado e a ligação foi revelada com anticorpo anti-Fc humano conjugado com PE. As curvas de FACS mostraram a coloração com PE no interior da população de células positivas para GFP co-transfetado. (Figura 32A)

#### **D. Ensaios de NF-κB e IL-8 e Análise Western Blot:**

Conduziram-se ensaios com repórter luciferase essencialmente como descrito por Gurney *et al.*, *Curr Biol.*, 9(4):215-218 (1999). Sucintamente, células 293 ou TK-10 ( $2 \times 10^5$ ) foram transfectadas por transfeção de Effectine (Qiagen) com 0,5 µg do plasmídeo repórter de luciferase de

pirilampo pGL3-ELAM.tk e 0,05 µg do plasmídeo repórter de luciferase de *Renilla* como controlo interno de transfecção assim como plasmídeo de expressão de IL-17E (0,1 µg) e plasmídeo transportador pRK5D para manter o ADN constante entre as transfecções. Após 24 horas colheram-se as células e ensaiou-se a actividade da luciferase conforme recomendado (Pharmacia). Realizaram-se ELISA de IL-8 de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems). (Figura 33)

#### **E. Resultados e Discussão:**

Como descrito *supra*, foram identificados e caracterizados novos membros da família da IL-17, aqui designados por IL-17B (PRO1031), IL-17C (PRO1122), IL-17D (PRO21175) e IL-17E (PRO10272). Quatro membros da família da IL-17: IL-17, IL-17B, IL-17C e IL-17E partilham a maior similaridade na porção C-terminal da molécula com 20-30% de identidade de sequência de aminoácidos e conservação estrita de quatro cisteínas. As cisteínas adicionais que podem ser funcionalmente conservadas estão presentes com diferenças na posição. Em contraste, existe pouca conservação evidente nos 80 resíduos N-terminais. O alinhamento dos membros da família da IL-17 [IL-17 (SEQ ID NO:40); IL-17B (PRO1031; SEQ ID NO:2); IL-17C (PRO1122, SEQ ID NO:4); e IL-17E (PRO10272, SEQ ID NO:6)] está demonstrado na Figura 30. As sequências de sinal previstas estão sublinhadas. As cisteínas conservadas estão indicadas a negrito, e os potenciais locais de glicosilação ligada a N estão em caixas.

O ARNm de IL-17E não foi detectado por análise *Northern blot*. Contudo, a IL-17E foi detectada em níveis muito baixos em vários tecidos incluindo cérebro, rim, pulmão, próstata, testículos, coluna vertebral, glândula supra-renal e traqueia, por RT-PCR, utilizando iniciadores desenhados para distinguir ARNm após *splicing* do ADN genómico. Os resultados da análise RT-PCR da expressão de IL-17E (PRO10272) estão apresentados na Figura 23. Como descrito acima, o ARN dos tecidos indicados foi submetido a RT-PCR com iniciadores que foram desenhados para amplificar a totalidade da sequência de codificação de IL-17E. O produto de PCR foi resolvido por electroforese em gel de agarose, transferido para membrana de *nylon* e sondado com uma sonda de ADNc de IL-17E marcada com  $^{32}\text{P}$ .

Os requerentes demonstraram que IL-17B (PRO1031) e IL-17C (PRO1122) não se ligam ao receptor de IL-17 humana (aqui designado PRO1) (veja-se o EXEMPLO 21). Um novo receptor de IL-17 (aqui designado por IL-17RH1; PRO5801) foi aqui identificado e caracterizado. Os clones de ADNc de IL-17RH1 (DNA115291-2681; SEQ ID NO:11) foram isolados a partir de uma biblioteca de ADNc humano e sequenciados na sua totalidade como descrito no EXEMPLO 5. A expressão do ARNm de IL-17RH1 foi examinada por análise *Northern blot* como apresentado na Figura 31A e a PCR quantitativa está apresentada na Figura 31B. Os maiores níveis de expressão de IL-17RH1 (PRO5801) foram observados no rim, com expressão significativa também observada no fígado, e outros órgãos periféricos tais como cólon, intestino delgado, próstata, testículos, pâncreas e útero.

Foram conduzidos estudos de ligação para determinar se esta nova molécula (designada IL-17RH1; PRO5801) serve como um receptor para outros membros da família da IL-17. Mostrou-se que células 293 de rim humano transfectadas com um vector de expressão para IL-17RH1 se ligam à proteína de fusão IL-17E-Fc (imunoadesina), mas não apresentam ligação significativa a IL-17 humana (como mostrado na Figura 32A). A ligação da imunoadesina IL-17E a células que expressam IL-17RH1 pode ser completamente inibida por competição com IL-17E com epítopo marcador de His. Em comparação, células transfectadas com vector de expressão para IL-17R ligam a imunoadesina de IL-17 mas não de IL-17E. Para examinar havia uma interacção directa com membros da família da IL-17, conduziram-se estudos de ligação de ligandos com domínio extracelular marcado com epítopo do receptor IL-17RH1. Como mostrado na Figura 32B, este novo receptor exibe forte ligação de IL-17E-Fc, e fraca ligação com IL-17B-Fc mas não se liga a IL-17-Fc ou IL-17C-Fc.

Observou-se que a IL-17 induz actividade de NF-κB (Jovanovic *et al.*, *supra*). Realizou-se um estudo para determinar se IL-17E (PRO10272) também induzia a activação de um gene repórter de luciferase responsivo a NF-κB em duas linhas celulares de carcinoma de células renais humano, células 293 e TK-10 (verificou-se que ambas estas linhas celulares expressam ARNm de IL-17RH1 endógeno). Os resultados destes estudos estão apresentados na Figura 33A. A transfeccão

do vector de expressão para IL-17E induziu marcadamente actividade de luciferase. A actividade de luciferase foi induzida de uma maneira dependente da dose, e foi de grandeza similar à observada pela sobre-expressão do membro da superfamília de receptores de TNF, GITR (veja-se a Figura 33B), que previamente se demonstrou ser um potente indutor de actividade de NF- $\kappa$ B (Gurney *et al.*, *supra*). Pensa-se que NF- $\kappa$ B medeia um sinal pró-inflamatório, sugerindo que IL-17E pode ter acção pro-inflamatória. Para examinar esta possibilidade, examinou-se a produção de IL-8, uma citoquina pro-inflamatória induzida por IL-17. Como mostrado na Figura 34, IL-17E (PRO10272) induziu activação de IL-8 em células TK-10.

Em resumo, IL-17RH1 (PRO5801) é o segundo receptor identificado que se liga a membros da família da IL-17. A família de receptores de IL-17 é muito pouco relacionada com outras proteínas. Contudo, a comparação dos dois receptores revela uma conservação de muitas cisteínas no interior do domínio extracelular, sugerindo que estas podem partilhar uma estrutura similar. Existem também elementos conservados no interior do domínio intracelular, sugerindo que estes receptores provavelmente desencadeiam uma maquinaria intracelular similar. Isto está suportado pela observação de que como a IL-17, a IL-17E assinala a activação de NK- $\kappa$ B. As regiões de conservação no interior do domínio intracelular não possuem uma similaridade óbvia com outras famílias de receptores que se sabe activarem NF- $\kappa$ B, as famílias de receptores de TNF e IL1/Toll.

A IL-17E induz a produção de IL-8, uma molécula pro-inflamatória que foi também observado que era induzida por IL-17, o que sugere que as actividades biológicas destas duas citoquinas podem ser similares. O receptor de IL-17 tem um padrão de expressão muito amplo, em contraste com o padrão um pouco mais restrito da expressão do ARNm de IL-17RH1 (PRO5801) (veja-se a Figura 31). Se estas moléculas medeiam respostas pro-inflamatórias genericamente análogas, uma consideração chave no entendimento da função dos diferentes membros da família de citoquinas IL-17 em expansão será os padrões de expressão e a regulação dos receptores cognatos.

As Figuras 25 a 28 apresentam a distribuição da expressão relativa nos tecidos para os novos homólogos do receptor de IL-17 aqui identificados como IL-17RH1 (PRO5801; SEQ ID NO:12), IL-17RH2 (PRO20040; SEQ ID NO:14), IL-17RH3 (PRO9877; SEQ ID NO:16) e IL-17RH4 (PRO20026; SEQ ID NO:18), respectivamente.

Em resumo, a Figura 35 representa o padrão complexo da família de citoquinas da IL-17 de especificidades receptor-ligando de sobreposição. Como mostrado, os ligandos IL-17C e IL-17D parecem ter especificidade para um receptor de interleucina-17 diferente outro que não IL-17R, IL-17RH1 ou IL-17RH2. Em adição, as Figuras 20 a 28 e a Figura 31 demonstram a distribuição da expressão relativa nos tecidos para os novos análogos de IL-17 e receptores de IL-17 aqui identificados.

#### **EXEMPLO 23**

##### **Indução de c-fos em Células Endoteliais (ENSAIO #34)**

Este ensaio é desenhado para determinar se os polipéptidos PRO apresentam a capacidade de induzir c-fos em células endoteliais. Seria de esperar que os polipéptidos PRO com teste positivo neste ensaio fossem úteis para o tratamento terapêutico de condições ou desordens onde a angiogénesse seria benéfica incluindo, por exemplo, cura de ferimentos, e similares (como o seriam agonistas destes polipéptidos PRO). Seria de esperar que os antagonistas dos polipéptidos PRO com teste positivo neste ensaio fossem úteis para o tratamento terapêutico de tumores cancerosos.

Células endoteliais da veia umbilical venosa humana (HUVEC, Cell Systems) em meios de crescimento (50% de F12 de Ham a/ GHT: baixo teor de glucose, e 50% de DMEM sem glicina: com NaHCO<sub>3</sub>, 1% de glutamina, HEPES 10 mM, 10% de FBS, 10 ng/ml de bFGF) são plaqueadas em placas de microtítulo de 96 poços a uma densidade celular de 1x10<sup>4</sup> células/poço. No dia após o plaqueamento, as células são colocadas sem nutrição por remoção do meio de crescimento e tratamento das células com 100 µl/poço de amostras de teste e controlos (controlo positivo: meio de crescimento; controlo negativo: HEPES 10 mM, NaCl 140 mM, manitol a 4% (p/v), pH 6,8). As células são

incubadas durante 30 minutos a 37°C, em 5% de CO<sub>2</sub>. As amostras são removidas, e é seguida a primeira parte do protocolo do *kit* bDNA (Chiron Diagnostics, cat. #6005-037), onde cada reagente/tampão capitalizado enumerado adiante está disponível no *kit*.

Sucintamente, as quantidades do Tampão de Lise TM e das Sondas necessárias para os testes são calculadas com base na informação proporcionada pelo fabricante. As quantidades apropriadas para Sondas descongeladas são adicionadas ao Tampão de Lise TM. O Tampão de Hibridação de Captura é aquecido à temperatura ambiente. As tiras de bDNA são montadas nos suportes de tiras metálicos, e adicionam-se 100 µl de Tampão de Hibridação de Captura a cada poço de b-DNA necessário, seguindo-se a incubação durante pelo menos 30 minutos. As placas de teste com as células são removidas da incubadora, e os meios são suavemente removidos utilizando o colector de vácuo. 100 µl do Tampão de Hibridação de Lise com Sondas são rapidamente pipetados para cada poço das placas de microtípulo. As placas são então incubadas a 55°C durante 15 minutos. Após a remoção da incubadora, as placas são colocadas num misturador de vórtex com a cabeça adaptadora de microtípulo e agitadas no vórtex na regulação #2 durante um minuto. Removem-se 80 µl do lisado e adicionam-se aos poços de bDNA contendo o Tampão de Hibridação de Captura, e pipetam-se para cima e para baixo para misturar. As placas são incubadas a 53°C durante pelo menos 16 horas.

No dia seguinte, segue-se a segunda parte do protocolo do *kit* bDNA. Especificamente, as placas são removidas da incubadora e colocadas na bancada para arrefecer durante 10 minutos. Os volumes de adições necessárias são calculados com base na informação proporcionada pelo fabricante. Prepara-se uma Solução de Trabalho de Amplificador fazendo uma diluição de 1:100 do Concentrado de Amplificador (20 fm/µl) em Tampão de Hibridação AL. A mistura de hibridação é removida das placas e lavada duas vezes com Lavagem A. Adicionam-se 50 µl de Solução de Trabalho de Amplificador a cada poço e incubam-se os poços a 53°C durante 30 minutos. As placas são então removidas da incubadora e deixadas arrefecer durante 10 minutos. A Solução de Trabalho Sonda de Marcador é preparada fazendo uma diluição de 1:100 de Concentrado de Marcador (40 pmol/µl) em Tampão de Hibridação AL. Após o

período de arrefecimento de 10 minutos, remove-se a mistura de hibridação de amplificador e lavam-se as placas duas vezes com Lavagem A. Adicionam-se 50  $\mu$ l de Solução de Trabalho de Sonda Marcador a cada poço e incubam-se os poços a 53°C durante 15 minutos. Após arrefecimento durante 10 minutos, o Substrato é aquecido à temperatura ambiente. Após adição de 3  $\mu$ l de Potenciador de Substrato a cada ml de Substrato necessário para o ensaio, as placas são deixadas arrefecer durante 10 minutos, a mistura de hibridação de marcador é removida, e as placas são lavadas duas vezes com Lavagem A e três vezes com Lavagem D. Adicionam-se 50  $\mu$ l da Solução de Substrato com Potenciador a cada poço. As placas são incubadas durante 30 minutos a 37°C e lê-se a RLU num luminómetro apropriado.

Calcula-se a média das réplicas e determina-se o coeficiente de variação. A medida de actividade do número de vezes de diminuição relativamente ao valor do controlo negativo (tampão HEPES descrito acima) está indicada em unidades de quimioluminescência (RLU). As amostras que apresentam um valor de pelo menos duas vezes relativamente ao valor do controlo negativo são consideradas positivas.

O PRO1031 testou "positivo" como mostrado adiante:

ENSAIO #1

Controlo negativo	= 1,0 RLU
Controlo positivo	= 10,96 RLU
PRO1031 a 0,056 nM	= 2,22 RLU

ENSAIO #2

Controlo negativo	= 1,0 RLU
Controlo positivo	= 10,96 RLU
PRO1031 a 0,56 nM	= 2,01 RLU

**EXEMPLO 24**

**Ensaio de Permeabilidade Vascular Cutânea (ENSAIO #64)**

Este ensaio mostra que determinados polipéptidos PRO estimulam uma resposta imunitária e induzem inflamação por indução de células mononucleares, eosinófilos e infiltração de PMN no local de injecção do animal. Este ensaio de permeabilidade vascular cutânea é conduzido como se segue.

Porquinhos-da-índia sem pelo pesando 350 gramas ou mais são anestesiados com cetamina (75-80 mg/kg) e 5 mg/kg de Xilazina intramuscularmente (IM). Uma amostra de polipéptido PRO purificado ou uma amostra de teste de meios condicionados é injectada intradermicamente no dorso dos animais de teste com 100 µL por local de injecção. É possível ter cerca de 10-30, preferivelmente cerca de 16-24, locais de injecção por animal. Injecta-se 1 mL de corante azul de Evans (1% em solução salina tamponada fisiológica) intracardiacamente. São então medidas as manchas nos locais de injecção (mm de diâmetro) 1h, 6h e 24h após a injecção. Os animais foram sacrificados 6 h após a injecção. Efectua-se uma biopsia de cada local de injecção da pele e fixa-se em paraformaldeído. As peles são então preparadas para avaliação histopatológica. Cada local é avaliado quanto a infiltração de células inflamatórias na pele. Os locais com inflamação visível por células inflamatórias são classificados como positivos. As células inflamatórias podem ser neutrofílicas, eosinofílicas, monocíticas ou linfocíticas.

Pelo menos um mínimo de infiltrado perivasicular no local de injecção é classificado como positivo, ausência de infiltrado no local de injecção é classificado como negativo. O PRO1031 originou resultados positivos num intervalo de tempo de 24 horas neste ensaio.

#### **EXEMPLO 25**

#### **Actividade Estimulante em Reacção linfocitária mista (MLR)** **(ENSAIO #24)**

Este exemplo mostra que os polipéptidos da invenção são activos como estimulantes da proliferação de linfócitos T. os compostos que estimulam a proliferação de linfócitos são úteis terapeuticamente quando é benéfico o aumento de uma resposta imunitária. Um agente terapêutico pode também tomar a forma de antagonistas dos polipéptidos PRO da invenção, por exemplo, anticorpos quiméricos murino-humano, humanizados ou humanos contra o polipéptido, que se esperaria inibirem a proliferação de linfócitos T.

O protocolo básico para este ensaio está descrito em Current Protocols in Immunology, unidade 3.12; editado por

J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Marglies, E.M. Shevach, W. Strober, National Institutes of Health, Published by John Wiley & Sons, Inc.

Mais especificamente, numa variante do ensaio, células mononucleares de sangue periférico (PBMC) são isoladas de indivíduos mamíferos, por exemplo um voluntário humano, por leucoferese (um dador fornecerá PBMC estimulantes, o outro dador fornecerá PBMC respondedoras). Se desejado, as células são congeladas em soro fetal bovino e DMSO após o isolamento. As células congeladas podem ser descongeladas durante a noite em meios de ensaio ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$ ) e depois lavadas e ressuspensas em  $3 \times 10^6$  células/ml de meio de ensaio (RPMI; 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de glutamina, 1% de HEPES, 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de piruvato). As PBMC estimulantes são preparadas por irradiação das células (cerca de 3000 Rads). O ensaio é preparado por plaqueamento em poços em triplicado de uma mistura de: 100:1 de amostra de teste diluída para 1% ou para 0,1%; 50:1 de células estimulantes irradiadas e 50:1 de células PBMC respondedoras. Utilizam-se 100 microlitros de meio de cultura celular ou 100 microlitros de CD4-IgG como controlo. Os poços são então incubados a  $37^{\circ}\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$  durante 4 dias. No dia 5 cada poço é pulsado com timidina tritiada (1,0 mCi/poço; Amersham). Após 6 horas as células são lavadas 3 vezes e depois é avaliada a assimilação do marcador.

Noutra variante deste ensaio, as PBMC são isoladas dos baços de ratinhos Balb/c e ratinhos C57B6. As células são testadas a partir de baços recentemente colhidos em meios de ensaio (RPMI; 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de glutamina, 1% de HEPES, 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de piruvato) e as PBMC são isoladas dispondo estas células em camada sobre Lympholyte M (Organon Teknika), centrifugação a 2000 rpm durante 20 minutos, colheita e lavagem da camada de células mononucleares em meio de ensaio e ressuspensão das células em  $1 \times 10^7$  células/ml de meio de ensaio. O ensaio é então conduzido como descrito acima. Aumentos positivos relativamente ao controlo são considerados positivos sendo preferido aumentos superiores ou iguais a 180%. Contudo, qualquer valor superior ao controlo indica um efeito

estimulante para a proteína de teste. Os resultados deste ensaio para compostos da invenção estão apresentados adiante:

PRO	Concentração de PRO	Percentagem de Aumento Relativamente ao Controlo
PRO10272	0,84 nM	201,5

#### EXEMPLO 26

Estimulação de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) ou células CD4<sup>+</sup> com proteína anti-CD3 e PRO (ENSAIO #99)

Este ensaio mostra que um ou mais dos polipéptidos PRO são activos como potenciadores da estimulação de PBMC ou células CD4<sup>+</sup>. As células CD4<sup>+</sup> são enriquecidas por selecção negativa utilizando contas de MAC após separação de LSM. A capacidade do polipéptido PRO substituir anti-CD28 é examinada para determinar o efeito estimulador.

Sabe-se que o anti-CD3 e o anti-CD28 estimulam PBMC. O protocolo básico para o isolamento de PBMC utilizado neste ensaio está descrito em Current Protocols in Immunology, unit 3.12; editado por J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Marglies, E.M. Shevach, W. Strober, National Institutes of Health, Published by John Wiley & Sons, Inc.

Mais especificamente, numa variante do ensaio, células mononucleares de sangue periférico (PBMC) são isoladas de indivíduos mamíferos, por exemplo um voluntário humano, por leucoferese. Se desejado, as células são enriquecidas em células CD4<sup>+</sup>, depois são congeladas em soro fetal bovino a 90% e DMSO a 10% após isolamento. As células congeladas podem ser descongeladas durante a noite em meio de ensaio (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) e depois lavadas e ressuspensas a 0,5 x 10<sup>6</sup> células/ml de meio de ensaio (RPMI; 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de glutamina, 1% de HEPES, 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de piruvato).

O ensaio é preparado por plaqueamento em poços triplicados de uma mistura de: 200 µl de células após o revestimento durante a noite com anti-CD3 e proteína PRO.

Reveste-se uma placa de 96 poços com 50 µl de anti-CD3 (50 ng/ml, Amac 0178) e 50 µl de 1% da proteína PRO, em PBS a 4°C durante a noite. Utilizam-se 50 µl de Hu-IgG como controlo em vez da proteína PRO. Os poços são então incubados a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>, durante cerca de 3 dias. No dia 4, cada poço é pulsado com timidina tritiada (1,0 mC/poço; Amersham). Após 6 horas as células são colhidas e depois é avaliada a assimilação do marcador.

Um resultado que indique um efeito estimulador (*i.e.*, incorporação de <sup>3</sup>[H]-timidina) superior a 200% do controlo é considerado um resultado estimulador positivo.

Noutra variante deste ensaio, PBMC ou esplenócitos CD4<sup>+</sup> são isolados dos baços de ratinhos Balb/c. As células são cortadas de baços recentemente colhidos em meio de ensaio (RPMI; 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de glutamina, 1% de HEPES, 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de piruvato) e as PBMC são isoladas dispondendo estas células em camada sobre Lympholyte M (Organon Teknika), centrifugando a 2000 rpm durante 20 minutos, colhendo e lavando a camada de células mononucleares com meio de ensaio. As células CD4<sup>+</sup> são enriquecidas por selecção negativa utilizando contas, lavadas com meio e ressuspenderem-se as células a 1 x 10<sup>7</sup> células/ml de meio de ensaio. O ensaio é então conduzido como descrito acima. Os resultados estão apresentados adiante:

#### Concentração de PRO estimulação (+)/inibição (-)

PRO1031 5,6 nM	(+) 285% acima do índice de estimulação da linha de base
PRO1031 0,56 nM	(+) 147% acima do índice de estimulação da linha de base

#### **EXEMPLO 27**

#### Geração de proteínas de fusão IL-17B e IL-17C Fc/His

As sequências de codificação de IL17B e IL17C foram amplificadas por PCR e subclonadas nos locais *Eco*RI e *Sma*I de pBPH.His.c para gerar um marcador GH<sub>n</sub>HHHHHH C-terminal ou os locais *Eco*RI e *Stu*I de pBPH.IgG para gerar uma fusão C-terminal com a região Fc de IgG1 humana. Os vectores pBPH.His.c e

pBPH.IgG são derivados do vector de expressão de baculovírus pVL1393 (Pharmingen). Foi construída uma proteína marcada com Fc ou His de controlo de uma maneira semelhante ligando no terminal C a proteína associada a pancreatite (175 aminoácidos) á porção Fc da IgG1 humana ou um marcador de His-8.

As proteínas de fusão foram expressas em células High 5 utilizando o procedimento recomendado pelo fabricante (Invitrogen). Em resumo, as construções de ADN foram co-transfetadas com ADN de Baculovírus BaculoGold (Pharmingen) numa razão de 7:1 em células Sf9 aderentes. As células foram incubadas a 28°C durante 4 dias e colheu-se o sobrenadante. Amplificou-se o sobrenadante da transfecção e submeteu-se a purificação de afinidade quer através de contas de proteína A-Sepharose (Pharmacia) para proteínas de fusão de Fc quer através de contas de Ni-NTA agarose (QIAGEN) durante proteínas marcadas com His.

Para examinar a expressão de proteína, realizou-se uma análise SDS-PAGE das proteínas recombinantes purificadas por afinidade sob condições não redutoras e redutoras, seguindo-se coloração com prata.

#### **EXEMPLO 28**

#### **Indução de libertação de IL-6 e TNF- $\alpha$ por IL-17B (PRO1031) e IL-17C (PRO1122)**

Utilizando o procedimento delineado em Yao *et al.*, J. Immunol., 155: 5483 (1995) para a libertação de IL-6, cultivaram-se células fibroblastos de prepúcio humano (ATCC CRL-2091) em meio MEM (FBS a 10%) com a citoquina de teste. Após incubação durante 18 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, ensaiaram-se os meios condicionados quanto a IL-6 utilizando um *kit* de ELISA (R&D Systems). Para a secreção de TNF- $\alpha$ , cultivaram-se células monocíticas de leucemia humana THP-1 em meio RPMI (FBS a 10%) com a citoquina de teste. Após incubação durante 18 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, quantificaram-se os meios condicionados quanto a TNF- $\alpha$  utilizando um *kit* de ensaio ELISA (R&D Systems).

As células fibroblastos de prepúcio humano (ATCC) foram cultivadas separadamente em meio MEM (FBS a 10%) na presença de IL-17B (PRO1031) e IL-17C (PRO1122). Após incubação durante 18 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, ensaiaram-se os meios condicionados quanto à IL-6 utilizando um *kit* ELISA (R&D Systems). Em contraste com o elevado nível de IL-6 induzido por IL-17, nem IL-17B (PRO1031) nem IL17C (PRO1122) estimularam a secreção de IL-6 em células fibroblastos (como mostrado na Figura 36A).

Utilizando o procedimento delineado em Yao *et al.*, Cytokine, 9: 794 (1997), utilizou-se uma linha celular monocítica leucémica humana, THP-1, para ensaiar a estimulação da libertação de TNF- $\alpha$  por IL-17, IL-17B (PRO1031) e IL-17C (PRO1031) através de cultura em meio RPMI (FBS a 10%). Após incubação durante 18 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, quantificaram-se os meios condicionados quanto a TNF- $\alpha$  utilizando um *kit* de ensaio ELISA (R&D Systems). Enquanto a IL-17 induziu apenas um baixo nível de TNF- $\alpha$  em células THP-1, tanto a IL-17B como a IL-17C (na forma de proteínas de fusão de Fc) estimularam a produção de TNF- $\alpha$  em células THP-1 (como mostrado na Figura 36B). uma proteína de fusão de Fc de controlo não teve efeito.

De modo a caracterizar adicionalmente a estimulação da libertação de TNF- $\alpha$  por IL-17B e IL-17C, ensaiou-se a dependência da concentração e decorrer do tempo da resposta em células THP-1. A Figura 37 ilustra que a IL-17B e a IL-17C estimulam a libertação de TNF- $\alpha$  de uma maneira dependente do tempo e da concentração. A EC50 para a estimulação de IL-17B é de 2,4 nM, enquanto a EC50 para IL-17C é de 25 nM.

Embora as preparações de IL-17B e IL-17C utilizadas nestas experiências contivessem um nível não detectável de endotoxina (inferior a 1 EU/ml), realizaram-se experiências de controlo adicionais para confirmar que a libertação de TNF- $\alpha$  pelas células THP-1 era real e não artificial. As actividades de IL-17B e IL-17C não foram afectadas por tratamento com polimixina B e foram abolidas por tratamento térmico, suportando adicionalmente a noção de que eram as próprias proteínas as responsáveis pelas actividades e não qualquer endotoxina contaminante.

**EXEMPLO 29****Análise de Separação de Células Activadas por Fluorescência (FACS) da Ligação a Células THP-1 por Proteínas de Fusão de IL-17, IL-17B e IL-17C**

Células THP-1 ( $5 \times 10^5$ ) foram pré-incubadas em PBS contendo 5% de soro de cavalo a 4°C durante 30 minutos para bloquear a ligação não específica. Adicionaram-se IL-17, IL-17B.Fc, IL-17C.Fc ou Fc de controlo (1 mg cada) e incubou-se com as células THP-1 num volume de 0,25 ml em gelo durante 1 hora. Para a experiência de ligação de IL-17, adicionaram-se anticorpo primário anti-hIL-17 (diluição de 1:100) e anticorpo secundário de cabra anti-ratinho conjugado com FITC (Jackson Immunology Lab, diluição de 1:100) sequencialmente, com 30-60 minutos de incubação e extensas lavagens antes de cada adição. Para as proteínas de fusão de Fc, as células foram coradas com IgG de cabra anti-humana conjugada com FITC (específica de Fc, Jackson Immunology Lab, diluição de 1:100). Após profundas lavagens, analisaram-se um mínimo de 5000 células utilizando um FACScan (Becton Dickinson).

O resultante do procedimento anterior foi que ambas as proteínas de fusão de Fc com IL-17B e IL-17C apresentaram ligação a células THP-1 em comparação com uma proteína de fusão de Fc de controlo (como mostrado na Figura 38).

**EXEMPLO 30****Ensaio de Explante de Cartilagem Articular quanto a IL-17 e IL-17C****A. Introdução:**

Como previamente mencionado, a IL-17 provavelmente desempenha um papel na iniciação ou manutenção da resposta pro-inflamatória. A IL-17 é uma citoquina expressa por células Th CD4<sup>+</sup> e induz a secreção de citoquinas pro-inflamatórias e hematopoiéticas (e.g., IL-1b, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, GM-CSF) num número de tipos de células incluindo sinoviócitos e macrófagos [Aarvak et al., *J. Immunol.*,

162:1246-1251 (1999); Fossiez et al., J. Exp. Med., 183: 2593-2603 (1996); Jovanovic et al., J. Immunol., 160:3513-3521 (1998)]. Na presença de IL-17, os fibroblastos sustêm a proliferação de progenitores hematopoiéticos CD34<sup>+</sup> e induzem a sua maturação preferencial em neutrófilos. Como resultado, a IL-17 pode constituir um iniciador precoce da reacção inflamatória dependente de células T e ser parte da rede de citoquinas que faz a ponte entre o sistema imunitário e a hematopoiese.

Verificou-se expressão de IL-17 no sinóvio de pacientes com artrite reumatóide, artrite psoriásica ou osteoartrite, mas não em tecidos de articulações normais. A IL-17 pode sinergizar com as citoquinas pro-inflamatórias derivadas de monócitos, IL-1b ou TNF- $\alpha$ , para induzir IL-6 e GM-CSF. Actuando directamente nos sinoviócitos, a IL-17 pode aumentar a secreção de citoquinas pro-inflamatórias *in vivo* e assim exacerbar a inflamação e a destruição das articulações.

Para adicionalmente entender o possível papel da IL-17, os requerentes testaram os efeitos da IL-17 sobre o metabolismo da matriz da cartilagem. À luz dos efeitos catabólicos conhecidos do óxido nítrico (NO) sobre a cartilagem, e da existência de elevados níveis de NO em articulações artríticas, foi também medida a produção de NO.

#### **B. Métodos:**

Explantes de Cartilagem Articular: a articulação metacarpofalângica de porcos fêmea de 4-6 meses de idade foi dissecada assepticamente, e removeu-se a cartilagem articular por corte manual de maneira cuidadosa de modo a evitar o osso subjacente. Triturou-se a cartilagem e cultivou-se em volume durante pelo menos 24 horas numa atmosfera humidificada de 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> em meio isento de soro (SF) (DME/F12 1:1) com 0,1% de BSA e antibióticos. Após lavagem três vezes, dividiram-se aproximadamente 80 mg de cartilagem articular em alíquotas em tubos micrónicos e incubou-se durante pelo menos 24 horas no meio SF anterior. Adicionaram-se então as proteínas de teste a 1% quer sozinhas quer em combinação com IL-1a (10 ng/ml). Colheu-se o meio e trocou-se em vários pontos temporais (0, 24, 48, 72 horas) e ensaiou-se quanto ao teor de proteoglicanos utilizando o ensaio colorimétrico com

azul de 1,9-dimetil-metileno (DMB) descrito em Farndale e Buttle, Biochem. Biophys. Acta, 883:173-177 (1985). Após marcação (durante a noite) com <sup>35</sup>S-enxofre, pesaram-se os tubos para determinar a quantidade de tecido. Após uma digestão durante a noite, determina-se a quantidade de proteoglicanos restante no tecido assim como a síntese de proteoglicanos (incorporação de <sup>35</sup>S).

Medição da produção de NO: o ensaio é baseado no princípio de que o 2,3-diaminonaftaleno (DAN) reage com nitrito sob condições ácidas para formar 1-(H)-naftotriazole, um produto fluorescente. Como o NO é rapidamente metabolizado em nitrito (NO<sub>2</sub>-1) e nitrato (NO<sub>3</sub>-1), a detecção de nitrito é um meio para detectar (apesar de subestimado) o NO realmente produzido. Adicionam-se 10 mL de DAN (0,05 mg/mL em HCl 0,62 M) a 100 mL de amostra (sobrenadante da cultura celular), mistura-se e incuba-se à temperatura ambiente durante 10-20 minutos. A reacção é terminada com 5 mL de NaOH 2,8N. Mediú-se a formação de 2,3-diaminonaftotriazole utilizando um leitor de placas fluorescentes Cytoflor com excitação a 360 nm e emissão lida a 450 nm. Para uma medição óptima da intensidade fluorescente, utilizaram-se placas pretas com fundos transparentes.

### **C. Resultados e Discussão:**

Observou-se que a IL-17 aumenta a libertação e diminui a síntese de proteoglicanos (como mostrado na Figura 39). Adicionalmente, este efeito foi aditivo ao efeito observado com a IL-1a. Os efeitos da IL-17 não são mediados pela produção de óxido nítrico, nem a inibição da libertação de óxido nítrico aumenta a quebra da matriz (vejam-se as Figuras 40 a 42). A IL-17C (PRO1122) aumenta a quebra da matriz e inibe a síntese da matriz (Figura 43). Assim, a expressão de PRO1122 está provavelmente associada com desordens cartilaginosas degenerativas.

Em conclusão, a IL-17 contribui provavelmente para a perda de cartilagem articular em articulações artríticas, e assim a inibição da sua actividade pode limitar a inflamação e a destruição da cartilagem. A IL-1a e a IL-17 têm actividades similares, se bem que distintas, devido à sua utilização de receptores diferentes e mecanismos de sinalização a jusante

sobrepostos. Dadas as verificações dos potentes efeitos catabólicos da IL-17 sobre os explantes de cartilagem articular e a homologia da IL-17B (PRO1031) e da IL-17C (PRO1122) com IL-17, antagonistas de qualquer uma ou de todas estas proteínas podem ser úteis para o tratamento de condições inflamatórias e defeitos de cartilagem tais como artrite.

Finalmente, é bem conhecido que os factores de crescimento podem ter efeitos bifásicos e que o tecido doente pode responder de modo diferente do tecido normal a um determinado factor *in vivo*. Por estas razões, antagonistas ou agonistas (e.g., as próprias proteínas) de IL-17B (PRO1031), IL-17C (PRO1122) ou IL-17, podem ser úteis para o tratamento de condições inflamatórias e desordens articulares tais como a artrite.

#### **EXEMPLO 31**

##### **Doença inflamatória do intestino (DII): Expressão da Família de IL-17 em Modelo de Ratinho de DII**

Ratinhos deficientes no receptor de citoquinas CRF2-4/IL-1 ORb desenvolvem colite espontânea e progressiva que se assemelha à condição humana de doença inflamatória do intestino (DII). Este fenótipo foi previamente relatado (Spencer *et al.*, *J. Exp. Med.*, 187:571-578 [1998]). Para examinar o papel da expressão de membros da família da IL-17 neste modelo de DII, colheram-se os cólones de ratinhos normais (tipo selvagem, "WT") e de ratinhos deficientes em CRF2-4. Os cólones de ratinhos deficientes em CRF2-4 foram subcategorizados em espécimes que exibem DII moderada e espécimes que exibem DII grave mais avançada. O ARN foi isolado das amostras de cólon e a expressão relativa de membros da família da IL-17 foi determinada por PCR quantitativa (Taqman<sup>™</sup>). A Figura 44 demonstra a expressão relativa de IL-17, IL-17E (DNA147531-2821), IL-17B (DNA59294-1381-1), e IL-17D (DNA173894-2947) representada por -delta CT relativamente a GAPDH. A expressão de IL-17E diminui marcadamente na DII grave mais avançada comparativamente com os níveis de expressão em ratinhos normal (tipo selvagem, "WT"). Em contraste, observaram-se valores aumentados de expressão de IL-17 em DII moderada a grave. Assim, a IL-17E pode servir como um marcador para esta condição inflamatória.

**EXEMPLO 32****Expressão de IL-17D no Modelo de Ratinho de Icto**

Examinou-se a expressão de IL-17D (DNA173894-2947) num modelo experimental murino de icto. Isolou-se a artéria carótida comum direita (RCCA) de ratinhos C57B1/6 machos através de uma incisão na linha média. Fez-se um nó frouxo em torno do vaso. Visualizou-se a artéria cerebral média (MCA) formando uma janela craniana no crânio ao nível da fissura rinal. No tempo apontado, ocluíram-se a MCA e a RCCA durante um período isquémico de 45 minutos com sutura 11-0 e sutura 6-0, respectivamente. Após este insulto isquémico, soltaram-se as suturas da RCCA e da MCA para permitir a reperfusão do território da MCA. A expressão relativa de IL-17D foi determinada por PCR quantitativa (Taqman™) utilizando ARN isolado do córtex isquémico em cinco pontos temporais após a reperfusão (3, 6, 12, 24 e 72 horas) e comparou-se com a expressão de IL-17D observada em ARN isolado de tecido de controlo não isquémico. A Figura 45 representa os resultados deste estudo. Como mostrado, a expressão de IL-17D diminui rapidamente após o icto quando examinada ao longo dos cinco pontos temporais ilustrados.

**EXEMPLO 33****Análise de Microarray para Detectar a Sobre-expressão de Polipeptídos PRO em Tumores Cancerosos**

Microarrays de ácido nucleico, frequentemente contendo milhares de sequências génicas, são úteis para a identificação de genes diferencialmente expressos em tecidos doentes em comparação com as suas contrapartidas normais. Utilizando microarrays de ácido nucleico, amostras de ARNm de teste e de controlo de amostras de tecido de teste e de controlo são transcritas de forma inversa e marcadas para gerar sondas de ADNc. As sondas de ADNc são então hibridadas com um array de ácidos nucleicos imobilizado num suporte sólido. O array é configurado de modo a que a sequência e a posição de cada membro do array sejam conhecidas. Por exemplo, uma selecção de genes que se sabe que são expressos em determinados estados de doença pode ser disposta num array num suporte sólido. A

hibridação de uma sonda marcada com um membro particular do array indica que a amostra da qual a sonda foi derivada expressa esse gene. Se o sinal de hibridação de uma sonda originária de uma amostra de teste (tecido doente) é superior ao sinal de hibridação de uma sonda de uma amostra de controlo (tecido normal), são identificados o gene ou genes sobre-expressos no tecido doente. A implicação deste resultado é que uma proteína sobre-expressa num tecido doente é útil não apenas como marcador de diagnóstico quanto à presença da condição de doença, mas também como um alvo terapêutico para o tratamento da condição de doença.

A metodologia da hibridação de ácidos nucleicos e a tecnologia dos *microarrays* são bem conhecidas na especialidade. No presente exemplo, a preparação específica de ácidos nucleicos para hibridação e sondas, lâminas e condições de hibridação, estão todos detalhados em WO 01/75166.

No presente exemplo, tumores cancerosos derivados de vários tecidos humanos foram estudados quanto à expressão de genes que codificam polipéptido PRO relativamente a tecido humano não canceroso numa tentativa de identificar os polipéptidos PRO que são sobre-expressos em tumores cancerosos. Foram gerados dois conjuntos de dados experimentais. Num conjunto, obtiveram-se tecido canceroso de tumor do cólon humano e tecido não canceroso de tumor do cólon humano correspondente do mesmo paciente ("controlo de cólon correspondente") e analisaram-se quanto à expressão de polipéptido PRO utilizando a tecnologia dos *microarrays* descrita acima. No segundo conjunto de dados, obteve-se tecido de tumor humano canceroso de qualquer de uma variedade de diferentes tumores humanos e comparou-se com uma amostra epitelial "universal" de controlo que foi preparada reunindo tecidos humanos não cancerosos de origem epitelial, incluindo fígado, rim e pulmão. O ARNm isolado dos tecidos reunidos representa uma mistura de produtos de genes expressos destes diferentes tecidos. As experiências de hibridação de *microarrays* utilizando as amostras de controlo reunidas geraram um gráfico linear numa análise de 2 cores. O declive da linha gerada numa análise de 2 cores foi então utilizado para normalizar as razões de (detecção teste:controlo) em cada experiência. As razões normalizadas de várias experiências

foram então comparadas e utilizadas para identificar o agrupamento da expressão génica. Assim, a amostra reunida de "controlo universal" não só permitiu determinações eficazes da expressão relativa dos genes numa comparação simples de 2 amostras, como também permitiu comparações multi-amostras através de várias experiências.

Nas presentes experiências, utilizaram-se sondas de ácido nucleico derivadas das sequências de ácido nucleico que codificam polipéptidos PRO aqui descritas para criar o microarray e utilizaram-se ARN dos tecidos tumorais acima enumerados para hibridação com aquele. Um valor baseado na razão normalizada razão:experimental foi designado por uma "razão limite". Apenas valores que foram superiores a esta razão limite foram considerados significativos. A Tabela 7 adiante mostra os resultados destas experiências, demonstrando que vários polipéptidos PRO da presente invenção são significativamente sobre-expressos em vários tecidos tumorais humanos em comparação com um controlo de tecido humano não canceroso. Como descrito acima, estes dados demonstram que os polipéptidos PRO da presente invenção são úteis não apenas como marcadores de diagnóstico quanto à presença de um ou mais tumores cancerosos, mas também servem como alvos terapêuticos para o tratamento desses tumores.

Tabela 7

Molécula é sobre-expressa em: Em comparação com:

PRO1031	tumor do pulmão	controlo normal universal
PRO1122	tumor da mama	controlo normal universal
PRO1122	tumor do pulmão	controlo normal universal
PRO5801	tumor do cólon	controlo normal universal
PRO21175	tumor da mama	controlo normal universal
PRO21175	tumor do cólon	controlo normal universal
PRO21175	tumor do pulmão	controlo normal universal

### Depósito de Material

Os materiais seguintes foram depositados na American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC):

Material	N.º de Dep. na ATCC	Data de Depósito
DNA59294-1381	209866	14 de Maio, 1998
DNA62377-1381-1	203552	22 de Dezembro, 1998
DNA147531-2821	PTA-1185	11 de Janeiro, 2000
DNA173894-2947	PTA-2108	20 de Junho, 2000
DNA115291-2681	PTA-202	8 de Junho, 1999
DNA164625-2890	PTA-1535	21 de Março, 2000
DNA119502-2789	PTA-1082	22 de Dezembro, 1999
DNA154095-2998	PTA-2591	10 de Outubro, 2000

Estes depósitos foram feitos segundo as disposições do Tratado de Budapeste sobre o Reconhecimento Internacional do Depósito de Microorganismos em Matéria de Procedimentos de Patentes e seus Regulamentos (Tratado de Budapeste). Este assegura a manutenção de uma cultura viável do depósito durante 30 anos desde a data do depósito. Os depósitos serão tornados disponíveis pela ATCC segundo os termos do Tratado de Budapeste, e sujeito a um acordo entre a Genentech, Inc. e a ATCC, que assegura a disponibilidade permanente e não restrita da progénie da cultura do depósito ao público após publicação da patente U.S. pertinente ou depois de disponível ao público qualquer pedido de patente U.S. ou estrangeira, o que ocorrer primeiro, e assegura a disponibilidade da progénie a quem determinado pelo U.S. Commissioner of Patents and Trademarks com esse direito de acordo com 35 USC § 122 e as regras do Commissioner relacionadas (incluindo 37 CFR § 1.14 com particular referência a 886 OG 638).

A cessionária do presente pedido de patente concordou que se uma cultura dos materiais depositados morrer ou se perder ou for destruída quando cultivada sob condições adequadas, os materiais serão prontamente substituídos após notificação por outros iguais. A disponibilidade do material depositado não

deve ser entendida como uma licença para a prática da invenção em infracção dos direitos concedidos pela autoridade de qualquer governo ao abrigo das suas leis sobre patentes.

A anterior descrição escrita é considerada suficiente para permitir que um perito na especialidade ponha em prática a invenção. A presente invenção não está limitada em âmbito à construção depositada, pois a concretização depositada é destinada apenas a mera ilustração de determinados aspectos da invenção e quaisquer construções que sejam funcionalmente equivalentes estão dentro do âmbito da presente invenção. O depósito de material aqui não constitui uma admissão de que a descrição escrita aqui contida é inadequada para permitir a prática de qualquer aspecto da invenção, incluindo o seu melhor modo, nem deve ser entendida como limitante do âmbito das reivindicações às ilustrações específicas que representa.

Lisboa, 2012-03-16

REIVINDICAÇÕES

**1.** Método *in vitro* de detecção de um tumor canceroso da mama, do cólon ou do pulmão, compreendendo a detecção de sobre-expressão de um polipéptido PRO21175 ou um ácido nucleico que codifica o referido polipéptido no tecido tumoral em comparação com um tecido normal do mesmo tipo, em que o referido polipéptido PRO21175 possui pelo menos 80% de identidade com a sequência de aminoácidos do polipéptido apresentado na Figura 8 (SEQ ID NO:8).

**2.** Método da reivindicação 1, em que a referida sobre-expressão é detectada utilizando uma sonda de ácido nucleico.

**3.** Método da reivindicação 1, em que a referida sobre-expressão é detectada utilizando um anticorpo que se liga especificamente ao referido polipéptido PRO21175.

**4.** Método da reivindicação 3, em que o anticorpo é um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um fragmento de anticorpo ou anticorpo de cadeia simples.

**5.** Utilização de um anticorpo que se liga especificamente a um polipéptido PRO21175 num ensaio de diagnóstico *in vitro*, para detecção de sobre-expressão do referido polipéptido PRO21175 em tumor da mama, do cólon ou do pulmão em comparação com tecido normal do mesmo tipo, em que o referido polipéptido PRO21175 possui pelo menos 80% de identidade com a sequência de aminoácidos do polipéptido apresentada na Figura 8 (SEQ ID NO:8).

**6.** Utilização da reivindicação 5, em que o anticorpo é um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um fragmento de anticorpo ou um anticorpo de cadeia simples.

**7.** Anticorpo que se liga especificamente a um polipéptido PRO21175, para utilização num método de tratamento de um tumor canceroso da mama, do cólon ou do pulmão, em que o referido polipéptido PRO21175 possui pelo menos 80% de identidade com a sequência de aminoácidos do polipéptido apresentado na Figura 8 (SEQ ID NO:8).

**8.** Anticorpo para a utilização da reivindicação 7, que é um anticorpo monoclonal, um anticorpo humanizado, um fragmento de anticorpo ou um anticorpo de cadeia simples.

**9.** Anticorpo para a utilização da reivindicação 7 ou 8, que está conjugado com um agente citotóxico ou com um receptor para pré-direcccionamento ao tumor.

Lisboa, 2012-03-16

FIGURA 1

AGGCAGGGCAGCAGCTGCAGGCTGACCTTGCAGCTGGCGGAATGGACTGGCCTCACAACTGCTGTTCTT  
CTTACCATTCATCTTCTGGGGCTGGGCCAGCCCAGGAGCCCCAAAGCAAGAGGAAGGGCAAGGGCG  
GCCTGGGGCCCTGGCCCTGGCCACTACCAGGTGCCACTGGACCTGGTGTACGGATGAAACCGTATGCC  
GCATGGAGGAGTATGAGAGGAACATCGAGGAGATGGTGGCCAGCTGAGGAACAGCTCAGAGCTGGCCAG  
AGAAAGTGTGAGGTCAACTGCAGCTGTGGATGTCCAACAAGAGGAGCCTGTCTCCCTGGGCTACAGCAT  
CAACCACGGACCCAGCCGTATCCCCGTGGACCTGCCGGAGGCACGGTGCCTGTGTCTGGCTGTGAACC  
CCTTCACCATGCAGGAGGACCGCAGCAGTGGTGAGCGTGCCGGTGTTCAGCCAGGTTCTGTGCCCGCCGC  
CTCTGCCGCCACCGCCCCGCACAGGGCCTTGCCTGCCAGCGCGAGTCATGGAGACCATCGCTGTGGCTG  
CACCTGCATCTTCTGAATCACCTGGCCAGAAGCCAGCAGCCCCAGACCATCCTCCTTGCACCTT  
GTGCCAAGAAAGGCCTATGAAAAGTAAACACTGACTTTGAAAGCAAG

FIGURA 2

MDWPHNLLFLLTISIFLGLGQPRSPKSKRKGQGRGPLAPGPHQVPLDLVSRMKPYARMEYERNIEEMVA  
QLRNSSELAQRKCEVNQLQWMSNRSLSPWGYSINHDPSRIPVDLPEARCLCLGCVNPFTMQEDRSMVSVP  
VFSQVPVRRRLCPPPPRTGPCRQRAVMETIAVGCTCIF

**FIGURA 3**

GCCAGGGTGTGCAGGCCGCTCCAAGCCCAGCCTGCCCGCTGCCGCCACCATTGACGCTCCTCCCCGGCCTCC  
TGTTTCTGACCTGGCTGCACACATGCCTGGCCACCATGACCCCTCCCTCAGGGGGCACCCCCACAGTCAC  
GGTACCCCACACTGCTACTCGGCTGAGGAACGTGCCCTCGGCCAGGCCCCCACACCTGCTGGCTCGAGG  
TGCCTAAGTGGGGCAGGGCTTGCCTGTAGCCCTGGTGTCCAGCCTGGAGGCAGCAAGCCACAGGGGGAGGC  
ACGAGAGGCCCTCAGCTACGACCCAGTGCCCGGTGCTGCCGCCGGAGGAGGTGTTGGAGGCAGACACCCAC  
CAGCGCTCCATCTCACCCCTGGAGATACCGTGTGGACACGGATGAGGACCGTATCCACAGAAGCTGGCCTT  
CGCCGAGTGCCTGTGCAGAGGCTGTATCGATGCACGGACGGCCGCGAGACAGCCTGGCTCAACTCCGTGC  
GGCTGCTCCAGAGCCTGCTGGTGTGCAGGCCGCGCCCTGCTCCCGCGACGGCTGGGCTCCCCACACCT  
GGGGCCTTGCCTTCCACACCGAGTTCATCCACGTCCCCGTGGCTGCACCTGGCTGCTGCCCGTTCACT  
GTGACCGCCGAGGCCGTGGGGCCCTAGACTGGACACGTGTGCTCCCCAGAGGGCACCCCCCTATTTATGTG  
TATTTATTGTTATTTATATGCCTCCCCAACACTACCCCTGGGTCTGGCATTCCCGTGTCTGGAGGAC  
AGCCCCCCTGTCAGAAAAGGTGTACACGGCTGCCTGTACCTGGCTCCCTGTCCGTCTCCGGCTTCCCT  
CCTTAAAGCTGCAGAAAAGGTGTACACGGCTGCCTGTACCTGGCTCCCTGTCCGTCTCCGGCTTCCCT  
TACCCCTATCACTGGCCTCAGGCCCGCAGGCTGCCTTCCCAACCTCCTGGAAAGTACCCCTGTTCTTA  
AACAAATTATTTAAGTGTACGTGTATTATTAACGTGAAACACATCCCCAAAA

**FIGURA 4**

MTLLPGLLFLTWLHTCLAHHDPSLRGHPHSHGTPHCYSAEELPLGQAPPHLLARGAKWGQALPVALVSSLE  
AASHRGRHRPSATTQCPVLRPEEVLEADTHQRSISPWRYRVDTDEDRYPQKLAFAECLRGCIDARTGRE  
TAALNSVRLLQSLLVLRRLRPCSRDGSGLPTPGAFAFHTEFIHVPVGCTCVLPRSV

Péptido de sinal: aminoácido 1-18  
Local de fosforilação de tirosina-quinase: aminoácidos 112-121  
Locais de N-miristoilação: aminoácidos 32-38; 55-61;  
133-139  
Padrão de "fecho de correr" de leucinas: aminoácidos 3-25  
Região homóloga a IL-17: aminoácidos 99-195

FIGURA 5

GGCTTGCTGAAATAAAATCAGGACTCTAACCTGCTCCAGTCAGCCTGTTCCACGAGGCCTGTCAGTCA  
CTGCCCAGCTTGTACTGAGTGTGCAGTGCCACCATGTACCAAGGTCACTGCAGAGGGCTGCCCTGAGGGCT  
GTGCTGAGAGGGAGAGGGAGCAGAGATGCTGCTGAGGGTGGAGGGAGGCCAAGCTGCCAGGTTGGGCTGG  
GGGCCAAGTGGAGTGAGAAACTGGGATCCCAGGGGGAGGTGCAGATGAGGGAGCGACCCAGATTAGGTGA  
GGACAGTTCTCTCATTAAGCCTTCTACAGGTGGTTGCATTCTGGCAATGGTCACTGGGAACCCACACCT  
ACAGCCACTGGCCCAGCTGCTGCCAGCAAAGGCAGGACACCTCTGAGGAGCTGCTGAGGTGGAGCACT  
GTGCCTGTGCCTCCCCTAGAGCCTGCTAGGCCAACCGCCACCCAGAGTCTGTAGGCCAGTGAAGATGG  
CCCCCTCAACAGCAGGGCCATCTCCCCCTGGAGATATGAGTTGGACAGAGACTTGAACCGGCTCCCCCAGGA  
CCTGTACCAACGCCGTTGCCTGTGCCCGACTGCGTCAGCCTACAGACAGGCTCCACATGGACCCCCGGG  
GCAACTCGGAGCTGCTCTACCACAAACAGACTGTCTTCTACAGGCGGCCATGCCATGGCGAGAAGGGCACC  
CACAAGGGCTACTGCCTGGAGCGCAGGCTGTACCGTGTCTTAGCTTGTGTGCAGGGCCGTGT  
GATGGGCTAGCCGGACCTGCTGGAGGCTGGTCCCTTTGGGAAACCTGGAGCCAGGTGTACAACCACTTG  
CCATGAAGGGCCAGGATGCCAGATGCTTGGCCCTGTGAAGTGTCTGGAGCAGCAGGATCCGGGAC  
AGGATGGGGGGCTTGGGAAACCTGCACTTCTGCACATTGAAAAGAGCAGCTGCTGCTTAGGGCCGC  
CGGAAGCTGGTGCCTGTCATTTCTCTCAGGAAAGGTTTCAAAGTTCTGCCATTCTGGAGGCCACCA  
CTCCTGTCCTTCCCTTTCCCATCCCCCTGCTACCCCTGGCCAGCACAGGCACTTCTAGATATTC  
CTTGCTGGAGAAGAAAGAGCCCTGGTTTATTGTTACTCATCACTCAGTGAGCATCTACTTGG  
GTGCATTCTAGTGTAGTTACTAGTCTTGTACATGGATGATTCTGAGGAGGAAGCTGTTATTGAATGTATA  
GAGATTATCCAATAATATCTTATTAAAAATGAAAAA

**FIGURA 6**

MRERPRLGEDSSLISLFLQVVAFLAMVMGTHTYSHWPSCCPKGQDTSEELLRWSTVPVPPLEPARPNRHP  
ESCRASEDGPLNSRAISPWRYELDRDLNRLPQDLYHARCLCPHCVSLQTGSHMDPRGNSELLYHNQTVFYR  
RPCHGEKGTHKGYCLERRLYRVSLACVCVRPRVMG

**Péptido de sinal:** aminoácidos 1-32

**Local de N-glicosilação:** aminoácidos 136-140

**Local de fosforilação de tirosina-quinase:** aminoácidos 127-135

**Locais de N-miristoilação:** aminoácidos 44-50; 150-156

FIGURA 7

ATGCTGGTAGCCGGCTTCCTGCTGGCGCTGCCGCCAGCTGGGCCGCCGGCCCCAGGGCGGGCAGGCG  
CCCCGCCGCCGCCGGGGCTGCCGGACCGGGGGAGGAGCTACTGGAGCAGCTGACGGGCCCTGGCG  
CCGGCGTGCCTCAGTGCCTTCCACACACGCTGCAGCTGGGCCGCGTGAAGCAGGCCAACGCGAGCTGC  
CCGGCAGGGGGCAGGCCGCCGACCGCCGCTCCGGCCGCCACCAACCTGCCAGCGTGTGCCCTGGGC  
CTACAGAATCTCCTACGACCCGGCAGGTACCCAGGTACCTGCCCTGAAGCCTACTGCCGTGCCGGGGCT  
GCCGTACCGGGCTGTTGGCGAGGAGGACGTGCGCTCCGCAGGCCCTGTCTACATGCCACCGTCGTC  
CTGCCGCCACCCCGCCTGCCGGCGCCCTCCGTCTACACCGAGGCCTACGTACCATCCCCTGGG  
CTGCACCTGCGTCCCCGAGCCGAGAACAGACAGCATCAACTCCAGCATGACAAACAGGGCGCCA  
AGCTCCTGCTGGCCCAACGACGCCGCTGGCCCTGAGGCCGGTCTGCCCGGGAGGTCTCCCGG  
CCCGCATCCGAGGCCCAAGCTGGAGGCCCTGGAGGGCTGGTGGACCTCTGAAGAGAGTCACC  
GAGCAAACCAAGTGGCGAGCACAGCGCCCTTCCATGGAGACTCGTAAGCAGCTCATCTGACACGG  
GCATCCCTGGCTTGCTTTAGCTACAAGCAAGCAGCGTGGAGCTGATGGAAACGACCCGGCACGG  
GCATCCTGTGTGCGGCCGCATGGAGGGTTGGAAAAGTTCACGGAGGCTCCCTGAGGAGCCTCTCAGATC  
GGCTGCTGCGGGTGCAGGGCGTGAECTCACCGCTGGGTGCTTGCCAAAGAGATAGGGACGCATATGCTTTT  
AAAGCAATCTAAAATAATAAGTATAGCGACTATATACTACTTTAAAATCAACTGTTGAATAGA  
GGCAGAGCTATTITATATTATCAAATGAGAGCTACTCTGTACATTTCTTAACATATAAACATCGTTTTT  
ACTTCTCTGGTAGAATTAAAGCATAAATTGGAATCCTTGATAAATTGGTAGCTGGTACACTCTGG  
CCTGGGTCTCTGAATTCAAGCTGTACCGATGGCTGACTGATGAAATGGACACGTCTCATCTGACCCACTC  
TTCCCTCACTGAAGGTCTTCAGGGCCCTCAGGTGGACCAAAGGGATGCACAGGGCTCGCATGCCCA  
GGGCCAGCTAAGAGTCCAAAGATCTCAGATTGGTTAGTCATGAATAACATAAACAGTCTCAAACCTCGC  
ACAATTTTTCCCCCTTTGAAAGCCACTGGGCCAATTGTTGGTAAGAGGTGGAGATAAGAAGTGG  
ACGTGACATCTTGCCAGTTGTCAGAAGAATCCAAGCAGGTATTGGCTTAGTTGTAAGGGCTTAGGATCA  
GGCTGAAATATGAGGACAAAGTGGCCACGTTAGCATCTGCAGAGATCAATCTGGAGGCTCTGTTCTGCA  
TTCTGCCACGAGAGCTAGGTCTTGATCTTTCTTAGATTGAAAGTCTGTCTCTGAACACAATTATTGT  
AAAAGTTAGTAGTTCTTTAAATCATTAAAGAGGCTTGCTGAAGGAT

**FIGURA 8**

MLVAGFLALPPSWAAGAPRAGRPARPRGCADRPEELLEQLYGRLAAGVLSAFHHTLQLGPREQARNASC  
PAGGRPGDERRFRPPTNLRSVSPWAYRISYDPARYPRYLPEAYCLCRGCLTGLFGEEDVRFRSAPVYMPVV  
LRRTPACAGGRSVYTEAYVTIPVGCTCVPPEKEKDADSINSSIDKQGAKLLLGPNDAPAGP

**Péptido de sinal:** aminoácidos 1-15

**Locais de N-glicosilação:** aminoácidos 68-72; 181-185

**Local de fosforilação de tirosina-quinase:** aminoácidos 97-106

**Locais de N-miristoilação:** aminoácidos 17-23; 49-55; 74-80; 118-124

**Local de amidação:** aminoácidos 21-25

FIGURA 9

CAACTGCACCTCGTTCTATCGATAGCCACCAGCGAACATGACAGTGAAGAGACCCCTGCATGGCCCAGCCAT  
GGTCAAGTACTTGCTGCTGCGATATTGGGGCTTGCCTTCTGAGTGAGGCGGCAGCTCGGAAAATCCCCA  
AAGTAGGACATACTTTTCCAAAAGCCTGAGAGTTGCCCGCTGTGCCAGGAGGTAGTATGAAGCTTGAC  
ATTGGCATCATCAATGAAAACCAGCGCGTTCCATGTCACGTAACATCGAGAGCCGCTCCACCTCCCCCTG  
GAATTACACTGTCACTTGGGACCCCAACCGGTACCCCTCGGAAGTTGTACAGGCCAGTGTAGGAACCTGG  
GCTGCATCAATGCTCAAGGAAAGGAAGACATCTCCATGAATTCCGTTCCATCCAGCAAGAGACCCCTGGTCGTC  
CGGAGGAAGCACCAAGGCTGCTCTGTTCTTCCAGTTGGAGAAGGTGCTGGTGA  
CGTCACCCCTGTCATCCACCATGTGCAGTAAGAGGTGCATATCCACTCAGCTGAAGAAG

FIGURA 10

MTVKTLHGPAMVKYLLLSILGLAFLSEAAARKIPKVGHFFQKPESCPPPGGSMKLDIGIINENQRVSMS  
RNIESRSTSPWNYTWTWDPNRYPSEVVQAQCRLGCINAQGKEDISMNSVPIQQETLVVRRKHQGCSVSFQ  
LEKVLVTVGCTCVTPVIHHVQ

Sequência de sinal: aminoácidos 1-30

Local de N-glicosilação: aminoácidos 83-86

Locais de N-miristoilação: aminoácidos 106-111; 136-141

FIGURA 11

CCGGCGGATGTCGCTCGTGTGCTAAGCCTGGCCGCGTGTGCAAGGAGGCCGTACCCCGAGAGGCCGACCGT  
TCAATGTGGCTCTGAAACTGGGCCATCTCCAGAGTGGATGCTACAACATGATCTAATCCCCGGAGACTTGAG  
GGGACCTCCGAGTAGAACCTGTTACAACACTAGTGTGCAACAGGGGACTATTCAATTGATGAATGTAAGC  
TGGGTACTCCGGGCAGATGCCAGCATCCGCTTGTGAAGGCCACCAAGATTGTGACGGGCAAAGCAA  
CTTCCAGTCCTACAGCTGTGAGGGTCAATTACACAGAGGCCCTCCAGACTCAGACCAGACCCCTCTGGTG  
GTAAATGGACATTTCTACATCGGCTTCCCTGTAGAGCTGAACACAGTCTATTCAATTGGGGCCATAAT  
ATTCCTAATGCAAATATGAATGAAGATGGCCCTTCCATGTCCTGTGAATTTCACCTCACCGCTGCCTAGA  
CCACATAATGAAATATAAAAAAAAGTGTGCAAGGCCGAAGCCTGTGGGATCCGAAACATCACTGCTTGTA  
AGAAGAATGAGGAGACAGTAGAAGTGAAACTTCACAACCCTCCCTGGAAACAGATAACATGGCTCTTATC  
CAACACAGCACTATCATCGGGTTTCTCAGGTGTTGAGCCACACCAAGAAGAAACAAACGGCGAGCTCAGT  
GGTGAATCCAGTGACTGGGATAGTGAAGGTGCTACGGTGAGCTGACTCCATATTTCCTACTTGTGGCA  
GCCACTGCATCCGACATAAGGAACAGTTGTGCTCTGCCACAAACAGGCCTTCCCTGTGGCACATGGGTGCTGGT  
AACAAAAGCAAGCCGGAGGCTGGCTGCCCTCTCCCTGTCTGTGGCACATGGGTGCTGGT  
GGCAGGGATCTATCTAATGTGGAGGCACGAAAGGATCAAGAAGACTTCCTTCTACCACCAACTGC  
CCCCCATTAAAGGTCTGTGGTTACCCATCTGAAATATGTTCCATCACACAATTGTTACTTCACTGAA  
TTTCTTCAAAACCATTGCAAGTGAGGTCACTCTGAAAAGTGGCAGAAAAGAAAATAGCAGAGATGGG  
TCCAGTGCACTGGCTTGCCACTCAAAGAAGGCAGCAGACAAAGTCGTTCCCTTCCATGACGTCA  
ACAGTGTGCGATGGTACCTGTGCAAGAGCGAGGGCAGTCCAGTGAGAACTCTAAGACCTTCCCC  
CTTGCCTTAACCTTCTGCAGTGATCTAAGAAGCCAGATTCTGACAAATACGTGGGTCTACTT  
TAGAGAGATTGATACAAAAGACGATTACAATGCTCTCAGTGCTGCCCAAGTACCAACCTCATGAAGGATG  
CCACTGCTTCTGTGCAAGAACCTCTCCATGTCAAGCAGCAGGTGTCAGCAGGAAAAGATCACAGCCTGC  
CACGATGGCTGCTGCCCTGTAG

**FIGURA 12**

MSLVLLSIAALCRSAVPREPTVQCGSETGPSPEWMLQHDLIPGDLRDLRVEPVTTSVATGDYSILMNVS梧  
LRADASIRLLKATKICVTGKSNFQSYSCVRCNYTEAFQTQTRPSGGKWTFSYIGFPVELNTVYFIGAHNIP  
NANMNEGDPSMSVNFTSPGCLDHIMKYKKKCVKAGSLWDPNITACKNEETVEVNFTTPLGNRYMALIQH  
STIIGFSQVFEPHQKKQTRASVVIPTVGDSEGATVQLTPYFPTCGSDCIRHKGTVVLCPQTGVFPFLDNNK  
SKPGGWLPLLLLSLLVATWVLVAGIYLMWRHERIKKTSFSTTLLPPIKVLVVYPSEICFHHTICYFTEFL  
QNHCRCSEVILEKWQKKKIAEMGPVQWLATQKKAADKVVFLSNDVNSVCDGTCGKSEGSPSENSQDLFPLA  
FNLFCSDLRSQIHLHKYVVVYFREIDTKDDYNALSVCPKYHLMKDATAFCAELLHVKQQVSAGKRSQACHD  
GCCSL

**Sequência de sinal:** aminoácidos 1-14

**Domínio transmembranar:** aminoácidos 290-309

**Locais de N-glicosilação:** aminoácidos 67-70; 103-106; 156-  
159; 183-186; 197-200; 283-286

**Locais de fosforilação de proteína-quinase dependente de GMPc e AMPc:**  
aminoácidos 228-231; 319-322

**Local de N-miristoilação:** aminoácidos 116-121

**Local de amidação:** aminoácidos 488-491

FIGURA 13

ACACTGGCAAACAAAAACGAAAGCACTCCGTGCTGGAAGTAGGAGGAGTCAGGACTCCCAGGACAGAG  
AGTCACAAACTACCCAGCACAGCCCCCTCCGCCCCCTCTGGAGGCTGAAGAGGGATTCCAGCCCCCTGCCA  
CCCACAGACACGGGCTGACTGGGTGCTGCCCCCTTGGGGGGGGCAGCACAGGGCTCAGGCCGGT  
GCCACCTGGCACCTAGAAGATGCCCTGTGCCCTGGTCTTGCTGTCCCTGGCACTGGCCGAAGCCCAGTGG  
TCCCTCTCTGGAGAGGCTTGTGGGCCTCAGGACGCTACCCACTGCTCTCCGGCCTCTCCTGCCGCCTC  
TGGGACAGTGAACATACTCTGCCTGCCTGGGACATCGTGCCTGCTCCGGGCCCTGCTGGGCCTACGCA  
CCTGCAGACAGAGCTGGTGCTGAGGTGCCAGAAGGAGACCGACTGTGACCTCTGTCTGCGTGTGGCTGTCC  
ACTTGGCGTGCATGGCACTGGGAAGGCCTGAAGATGAGGAAAAGTTGGAGGAGCAGTGAACAGGG  
GTGGAGGAGCCTAGGAATGCCCTCTCCAGGCCAAGTCGTGCTCTCCTCCAGGCCCTACCCACTGCCCG  
CTGCGTCTGCTGGAGGTGCAAGTGCCTGCTGCCCTGTGCAAGTTGGTCAGTCTGTGGCTCTGTGGTATAT  
GAATGCTTCAGGCTGCCCTAGGAGTGAGGTACGAATCTGGCTCTACTCAGCCAGGTACGAGAAGGA  
ACTCAACCACACACAGCAGCTGCCCTGCCCTGGCTCAACGTGTCAGCAGATGGTACAACGTGCATC  
TGGTCTGAATGCTCTGAGGAGCAGCACTCCGGCTCTCCCTGACTGGAATCAGGTCCAGGGCCCCCA  
AAACCCGGTGGCACAAAACCTGACTGGACCGCAGATCATTACCTGAACCACACAGACCTGGTTCC  
CCTCTGTATTAGGTGTGGCCTCTGGAACCTGACTCCGTTAGGACGAACATCTGCCCTCAGGGAGGACC  
CCCGCGCACACCAGAACCTCTGCAAGCCGCCGACTGCGACTGCTGACCCCTGCAGAGCTGGCTGCTGGAC  
GCACCGTGCCTGCCCTGCCCGAGAACCGGCACTGTGCTGGGGCTCCGGTGGGACCCCTGCCAGCCACT  
GGTCCCACCGCTTCCGGAGAACGTCACTGTGGACAAGGTTCTCGAGGTTCCATTGCTGAAAGGCCACC  
CTAACCTCTGTGTTCAAGGTGAAACAGCTGGAGAACGCTGAGCTGCAAGGAGTGCTGTGGCTGACTCCCTG  
GGGCTCTCAAAGACGATGTGCTACTGTTGGAGACACGAGGGCCCCAGGACAACAGATCCCTCTGTGCC  
GGAACCCAGTGGCTGACTTCACTACCCAGCAAAGCCTCCACGGGAGCTGCGCTGGGAGGAGTACTTAC  
TACAAGACCTGCACTGAGGCCAGTGTCTGCACTGAGCTATGGGACGATGACTTGGGAGCGCTATGGGCTGCC  
ATGGACAATACATCCACAAGCGCTGGGCCCTCGTGTGGCTGGCTGCTACTCTTGCGCTGCCCTTC  
CCTCATCTCCTCTCAAAAGGATCACGGAAAGGTGGCTGAGGCTCTTGAAACAGGACGTCCGCTCG  
GGCGGCCGCCAGGGGCCGCGCCTGCTCTGAGCTGCCGCTGCCGCTGGCGTAGACCTGTGGAGGCCGCTGGT  
GGCGCCCTGGCGTGGCCCTGTCAGCTGCCGCTGCCGCTGGCGTAGACCTGTGGAGGCCGCTGGT  
GAGCGCGAGGGGCCGTGGCTGGCTTACCGCGAGCGGCCAGACCCCTGCAAGGAGGGCGGCGTGGT  
TCTTGCTCTCTCCGGTGCCTGGCGCTGTGCACTGAGCTACAGGATGGGAGTCCGGGCC  
GCGCACGGCCGCAGCACGCCCTCCGCCCTGCCGCTGCACTGAGCTGCTGCCGACTTCTTGCA  
GCCGGCAGCTACGGGGGGCTGCTTCAACTGCCCTCCAACTGCCAGACTTCTGGGGCCCTGCA  
CGTCCGGCGGCTCCAAGAGAGAGCGGAGCAAGTGTCCGGCCCTCAGCCAGCCCTGGATAGCTACTT  
CCATCCCCGGGACTCCCGCAGCGGGACGCGGGTGGGACCAGGGCGGGACCTGGGCGGGGACGGGA  
CTTAAATAAAGGAGACGCTGTTTCTAAAAAA

**FIGURA 14**

MPVPWFLLSIALGRSPVVLSLERLVGPQDATHCSPGLSCRLWDSDILCLPGDIVPAPGPVLAPTHLQTELV  
LRCQKETDCDLCLRVAVHLAVHGHWEPEDEEKFGGAADSGVEEPRNASLQAQVVLFSQAYPTARCVLLEV  
QVPAALVQFGQSVGSVYDCFEAALGSEVRIWSYTQPRYEKELNHTQQLPALPWLNVSADGDNVHLVLNVS  
EEQHFGLSLYWNQVQGPPKPRWHKNLTGPQIITLNHTDLVPLCIQVWPLEPDSVRTNICPFREDPRAHQN  
LWQAARLRLLLTLQSWLLDAPCSLPAEAALCWRAPIGGDPCQPLVPPSWENVTVDKVLEFPPLLKGHPNLCVQ  
VNSSEKLQLQECILWADSLGPLKDDVLLLETGPQDNRSLSALEPSGCTSLPSKASTRAARLGEYLLQDLQS  
GQCLQLWDDDLGALWACPMDKYIHKRWALVWLACLLFAAALSLLLLKKDHAKGWLRLKQDVRSAGAARG  
RAALLLYSADDSGFERLGVGALASALCQLPLRVAVDILWSRRELSAQGPVAVFHAQRQTLQEGGVVVLLFSP  
GAVALCSEWLQDGVSQPGAHGPDAFRASLSCVLPDFLQGRAPGSYVGACFDRLLHPDAVPALFRTVPVFT  
LPSQLPDLGALQQPRAPRSGRILQERAEQVSRALQPALDSYFHPPGT PAPGRGVGPGAGPGAGDGT

**Sequência de sinal:** aminoácidos 1-20

**Domínio transmembranar:** aminoácidos 453-473

**Locais de N-glicosilação:** aminoácidos 118-121; 186-189; 198-201;  
211-214; 238-241; 248-251; 334-337;  
357-360; 391-394

**local de fixação de glicosaminoglicano:** aminoácidos 583-586

**Local de fosforilação de proteína-quinase dependente de GMPc e AMPc:**  
aminoácidos 552-555

**Locais de N-miristoilação:** aminoácidos 107-112; 152-157; 319-324;  
438-443; 516-521; 612-617; 692-697;  
696-701; 700-705

FIGURA 15

CGAGGGCTCCTGCTGGTACTGTGTCGCTGCTCACAGCAAGGCCCTGCCACCCACCTCAGGCCATGCAG  
CCATGTTCCGGGAGCCCTAATTGACAGAAGCCATGGGAGCTCCAGACTGGCAGCCCTGCTCCTGCCCTC  
TCCTCCTCATAGTCATGACCTCTCTGACTCTGCTGGGATGGCTTCGCCACCTGCCCACTGGAAACACC  
CGCTGTCCCTGGCCTCCCACACGGATGACAGTTCACTGGAAGTTCTGCCATATCCCTGCCGACCTG  
GTGGGCCCTCTCCACAAAGCCTGGTGTGCGAGTCTGCCTGTTGCCAGACATCTGC  
TGTCAGGTGGCTCAGGTCTCAACGGGCCCTTCCACCTCTGGTGCAGAAATCCAAAAGTCTTCCACA  
TTCAAGTCTATAGGAGACACAAGATGCCAGCACCTGCTCAGAGGAAGCTGCTGCCCTGTCACCTGTC  
TGAGAAGAGCCATCACATTCCATCCCCCTCCCCAGACATCTCCACAAGGACTTCGCTCTAAAGGACCC  
AACCTTCCGATCCAGAGACATGGGAAAGTCTTCCAGATTGGACTCACAAAGGCATGGAGGACCCGAGTTC  
TCCTTGATTGCTGCCCTGAGGCCGGCTATTGGGTGACCATATTCAGGCCCTGAGGTGAGCGTGCG  
TCTTGTCACCACTGGCACTGGAGTGTGAAGAGCTGAGCAGTCCCTATGATGTCAGAAAATTGTC  
GGGGCCACACTGTAGAGCTGCCCTATGAATTCTTCTGCCCTGCTGCAAGAGGCATCCTACCTGCAA  
GAGGACACTGTGAGGCAGAAAAATGTCCTTCCAGAGCTGCCAGAACGCTATGGCTGGACTTCTGGAA  
GTCAGTGCACCCACTGACTACAGCCAGCACACTCAGATGGTATGCCCTGACACTCCGCTGCCACTGA  
AGCTGGAAGCTGCCCTCTGCCAGAGGCACGGCATACCCCTTGCAAAAGACCTCCGAATGCCACGGCT  
CGAGAGTCAGATGGGGTATGTTGGAGAAGGTGGACCTGCAACCCCGCTGCTCAAGTCTCTT  
TGGAAACAGCAGCCATGTTGAATGCCCTTCCAGAGACTGGGTCTCTCACATCCTGGAATGTAAGCATGGATA  
CCAAGCCAGCAGCTGATTCTCACTTCTCTCAAGAATGCATGCCACCTCAGTGCCTGGAGCCTC  
CCAGGCTGGGCAGGACACTTGGTGCCTGGCTGTACACTGTCAGGCCAGGCCGGGCTCAAGCCAGT  
GTCACTAGACCTCATTCCTTCTGAGGCCAGGGTGTGTGCTGGTGTGGGGTCAGATGTCAGT  
TTGCTGGAAGCACCTCTGTCAGATGTCCTTACAGACACCTGGGCTTGTGATCCTGCCACTGCTG  
GCCCTCTCACCCCTACTGGGTGTTGTCCTGCCCTCACCTGCCGGCAGCAGGCCCTGGTGGAGGCGCTGGCTGAAC  
GCGGCCAGTGTCTCTCTGCACGCCGGACTCGAGGCCAGCGGCCCTGGTGGAGGCGCTGGCTGAAC  
TGCTACGGCAGCGCTGGCGGGCGACCTGATCGTGACCTGTGGACCTGTGGAGGGAGGCACGTGGCGCGT  
GGGCCCGCTGCCGTGGCTCTGGCGCGGGACGCCGCGTAGCGCGGGAGCAGGGACTGTGCTGCTGT  
GGAGCGCGCCGACCTTCGCCGGTCAGCGGCCCGACCCCGCGCCGCCAGTCAGGCCGGGCC  
GCTGCCCTGCCCTGCCGCTACCCCTGCTGCCGACCTGCCGCGTCTGCTGCCAGGCCAGATCCCCCGCC  
CTTTCGAGAGGCCACAGCTGGGCCCTGGGCGCCAGCGCAGGCCAGAGCCCTAGAGCTGTG  
AGCCGGCTGAACGAGAGGCCAGCTGAGACCTAGGTTGAGCAGAGCTCCACCGCAGTCCGGTGTCT

**FIGURA 16**

MGSSRLAALLPPLLIVIDLSAGIGFRHLPHWNTRCPLASHTDDSFHGSSAYIPCRTWWALFSTKPWCV  
 RVWHCSRCCLCQHLLSGGSGLQRGLFHLLVQKSKKSTFKFYRRHKMPAPAQRKLLPRRHLSEKSHHISIPS  
 PDISHKGRLSKRTQPSDPETWESLPRLDSQRHGGPEFSFDLLPEARAIRVTISSGPEVSRLCHQWALECE  
 ELSSPYDVQKIVSGGHTVELPYEFLLPCLCIEASYLQEDTVRRKKCPFQSWPEAYGSDFWKSVHFTDYSQH  
 TQMVMAITLRCPLKLEAACQRHDWHTLCKDLPNATARESDGWYVLEKVDLHPQLCFKFSFGNSSHVECPH  
 QTGSLTWNVSMDTQAQQLILHFSSRMHATFSAAWSLPGLGQDTLVPPVYTVSQARGSSPVSDLIIPFLR  
 PGCCVLUWRSDVQFAWKHLLCPDVSYRHLGLLALLALLTLLGVVIALTCRRPQSGPGPARPVILLHAAD  
 SEAQRRLVGALAEALLRAALGGGRDVIVDLWEGRHVARVGPLPWLAARTRVAREQGTVLLWSGADLRPVS  
 GPDPRAAPLLALLHAAPRPLLAYFSRLCAKGDIPPLRALPRYRLLRDLPRLLRALDARPFAEATSWGR  
 LGARQRQRSRLELCRLEREARLADLG

<b>Péptido de sinal:</b>	aminoácidos 1-23
<b>Domínio transmembranar:</b>	aminoácidos 455-472
<b>Locais de N-glicosilação:</b>	aminoácidos 318-322; 347-351; 364-368;
<b>local de fixação de glicosaminoglicano:</b>	aminoácidos 482-486
<b>Local de fosforilação de proteína-quinase dependente de GMPC e AMPc:</b>	aminoácidos 104-108; 645-649
<b>Local de fosforilação de tirosina-quinase:</b>	aminoácidos 322-329
<b>Locais de N-miristoilação:</b>	aminoácidos 90-96; 358-364; 470-476
<b>Proteínas de ligação a cobalamina eucariota:</b>	aminoácidos 453-462

FIGURA 17

GCCAGGCCCTATCTCCCTGCCAGGAGGCCGGAGTGGGGGAGGTCAAGACGGGGCGGTGGAGGGGGAGGGAT  
GCCACGCGCTCTGCCCTCAGGTGTTCTGCCTGCTGTTGTCACTGGAGAGCAGGGAGTGGGGCCAGCCAGCA  
GAAAACAGTGGGCTGTACAACATCACCTCAAATATGACAATTGTACCACTACTTGAATCCAGTGGGAAG  
CATGTGATTGCTGACGCCAGAATATCACCATCAGCCAGTATGCTTGCCATGACCAAGTGGCAGTCACCAC  
TCTTTGGTCCCCAGGGGCCCTCGGCATCGAATTCTGAAAGGATTTGGGTAATACTGGAGGAGCTGAAGT  
CGGAGGAAGACAGTCACAACACTGATTCTAAAGGATCCGAAGCAGCTAACAGTAGCTTCAAAAGAACT  
GGAATGGAATCTCAACCTTCTGAAATATGAAATTGAAACGGATTATTCGTAAGGTTGCCCCCTTCC  
TTCCCATTAAGAAGCAATTACCAACCTTCTTCTTCTAGAACCCGAGCCTGTGACCTGTTACAGC  
CGGACAATCTAGCTGAAACCTCTGGAAAGCCTCGAACCTGAACATCAGCCAGCAGTCGGACATGC  
AGGTGCTTCGACCACGCACCGCATGGCTCGACATGCAGGTGTCCTCGACCACGCACCGCACACTTC  
GGCTTCCGTTCTTCTATCTTCACTACAAGCTCAAGCACGAAGGACCTTCAAGCGAAAGACCTGTAAGCA  
GGAGCAAACACTACAGAGATGACCAGCTGCCTCCTTCAAATGTTCTCAGGGATTATATAATTGAGCTGG  
TGGATGACACTAACACAACAGAAAAGTGTGATTATGCTTAAAGCCAGTGCACCTCCCGTGGCCGGG  
CCCATCAGAGCCGTGCCATCACAGTGCCTGCTGCTTCAAAGGATGTTCTCAGGGATTATATAATTGAGCTGG  
GTGCGCAAGAACACAAGAAAATATATTACATTTAGATGAAGAGAGCTCTGAGTCTTCCACATACA  
CTGCAGCACTCCCAAGAGAGAGGCTCCGGCCCGCGCGAACGGTCTTCTGCTATTCCAGTAAAGATGGC  
CAGAACATGAATGCGCCAGTGTTCGCTACTTCCTCCAGGACTCTGAGTGTGAGGTGGCT  
GGACCTGTGGGAAGACTTCAGCCTCTGTAGAGAAGGGCAGAGAGAACGGTCTTCTGCTATTCCAGTAAAGATCCACGAGT  
CCCAGTTCATATTGGTTGTTCAAAGGTATGAAGTACTTGTGGACAAGAACACTAACACACAAA  
GGAGGTGGCCGAGGCTGGGGAAAGGAGAGCTTCTGGTGGCGGTGTCAGCCATTGCCAAAAGCTCC  
CCAGGCCAAGCAGAGTCTCGCCGGCGCTCAGCAAGTTATGCCGTCTACTTGATTATTCTCGAGG  
GAGACGTCCCCGGTATCTAGACCTGAGTACCAAGTACAGACTCATGGACAATCTCCTCAGCTGTGTTCC  
CACTGCACTCCCGAGAACACGGCCCTCCAGGAGCCGGGAGCACACGGCAGCAGAACAGGAAC  
CTTCCGGAGCAAGTCAGGCCGGTCTTACAGTGCCTGCAACATGCACAGCTTATTGACGGAGGAGC  
CCGACTGGTCGAAAGCAGTTGCTCCCTTCCATCCTCCACTGCCCTACCGGAGCCAGTCTGGAG  
AAATTGATTCGGCTGGTTAAATGATGTCATGTGCAAACCCAGGGCTGAGAGTGAATTCTGCCTAAA  
GGTAGAGGGCGGCTGTTCTGGGGCAACCGGACCAGCCGACTCCCAGCAGAGAGTCAGCATGGGGCCTGG  
ACCAAGACGGGGAGGCCGGCTGCCCTGACGGTAGCGCCGCTGCAACCCCTGCTGCACACGGTAAA  
GCCGGCAGCCCTCGGACATGCCGGGACTCAGGCATCTATGACTCGTCTGTGCCCTCATCCGAGCTGTC  
TCTGCCACTGATGGAAGGACTCTCGACGGGACAGACAGAACAGTCTCCCTGACGGAGAGCGTGTCCCTCCT  
CTTCAGGCCCTGGGTGAGGAGGAACCTCTGCCCCCTTCAAGCTCTCTTCTGGTCTGGTCAAGCTTCA  
GATCTTGGTTGCCAGCTACACTGATGAACTCCAGGCCGTCGCCCTTGTAAACAAAAGAAAAGACTA  
AGCATTGCCACTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

**FIGURA 18**

MPRASASGVPAFLVSGEQGVGPASRNNSGLYNITFKYDNCTTYLNPGVKHVIADAQNITISQYACHDQVAVT  
 ILWSPGALGIEFLKGFRVILEELKSEGRQCQQLILKDPKQLNSSFKRTGMESQPFLNMKFETDYFVKVVPF  
 PSIKNESNYHPFFFRTRACDLLLQPDNLACKPFWKPRNLNISQHGSMDMQVSDHAPHGSMDMQVSDHAPHN  
 FGFRFFYLHYKLKHEGPFKRKTCKEQTTEMTSCLLQNVSPGDYIIELVDDTNTRKVMHYALKPVHSPWA  
 GPIRAVAITVPLVVISAFATLFTVCMRKKQQENIYSHLDEESSESSTYTAALPRERLPRPKVFLCYSSKD  
 GQNHMNVVQCFAYFLQDFCGCEVALDLWEDFSLCREGQREWVIQKIHESQFIIIVVCSKGMKYFVDKKNYKH  
 KGGGRGSGKGELFLVAVSAIAEKLROAKQSSSAALSKFIAVYFDYSCEDVPGIILDLSTKYRLMDNLPQLC  
 SHLHSRDHGLQEPGQHTRQGSRRNYFRSKSGRSLYVAICNMHQFIDEEPDWFEKQFVPFHPPPLRYREPVL  
 EKFDSSGLVNDVMCKPGPESDFCLKVEAAVLGATGPADSQHESQHGLDQGEARPALDGSAAALQPLLHTV  
 KAGSPSDMPRDSGIYDSSVPSSELSLPLMEGLSTDQTESSLTEVSSSSGLGEEEPPALPSKLSSGSCK  
 ADLGCRSYTDELHAVAPL

<b>Dominio transmembranar:</b>	aminoácidos 283-307
<b>Locais de N-glicosilação:</b>	aminoácidos 31-34; 38-41; 56-59; 113-116; 147-150; 182-185; 266-269
<b>locais de fixação de glicosaminoglicano:</b>	aminoácidos 433-436; 689-692
<b>Local de fosforilação de proteína-quinase dependente de GMPc e AMPc:</b>	aminoácidos 232-235
<b>Locais de fosforilação de tirosina-quinase:</b>	aminoácidos 312-319; 416-424
<b>Locais de N-miristoilação:</b>	aminoácidos 19-24; 375-380; 428-433; 429-434; 432-437; 517-522; 574-579; 652-657; 707-712

19

FIG. 20

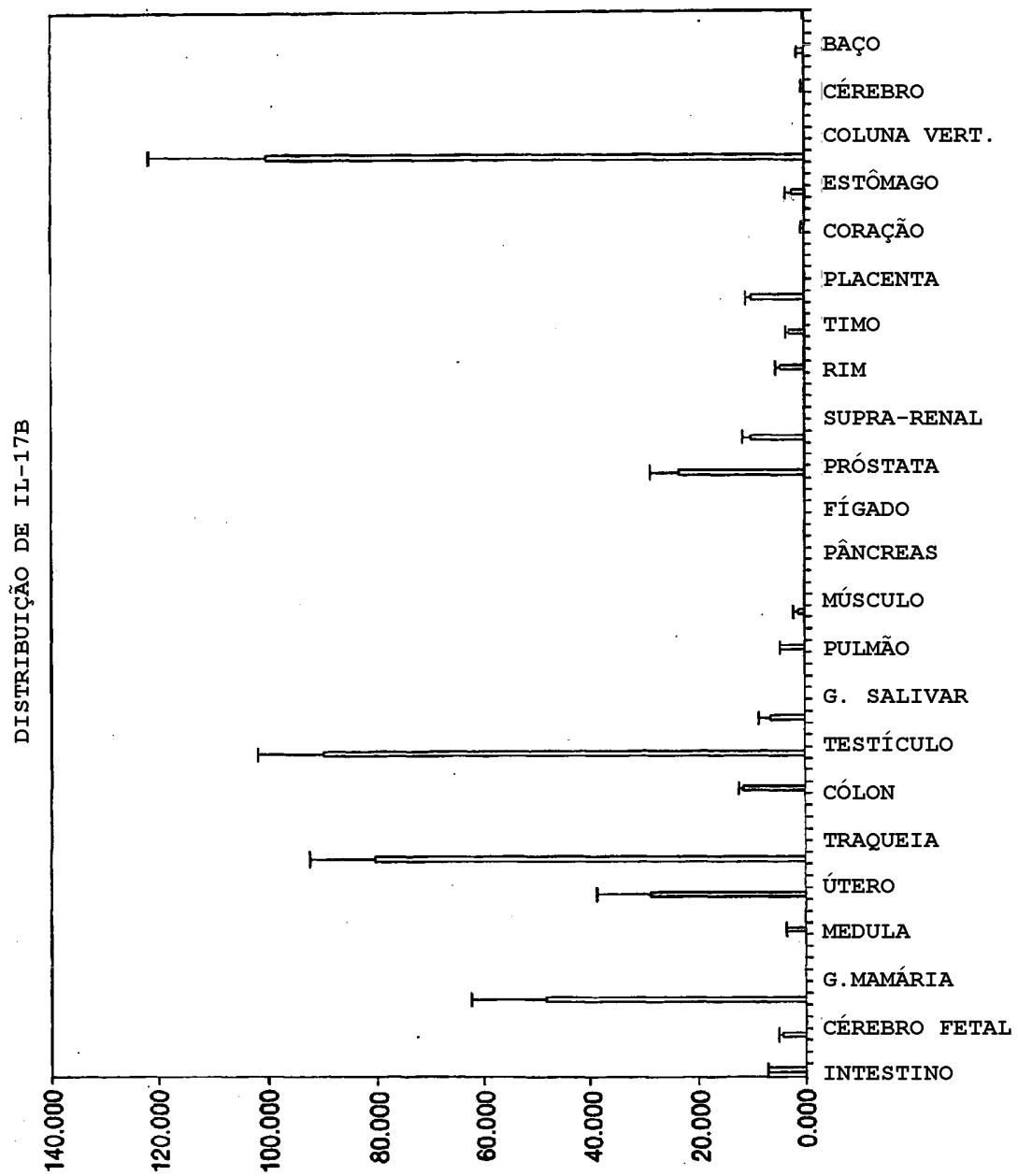


FIG. 21

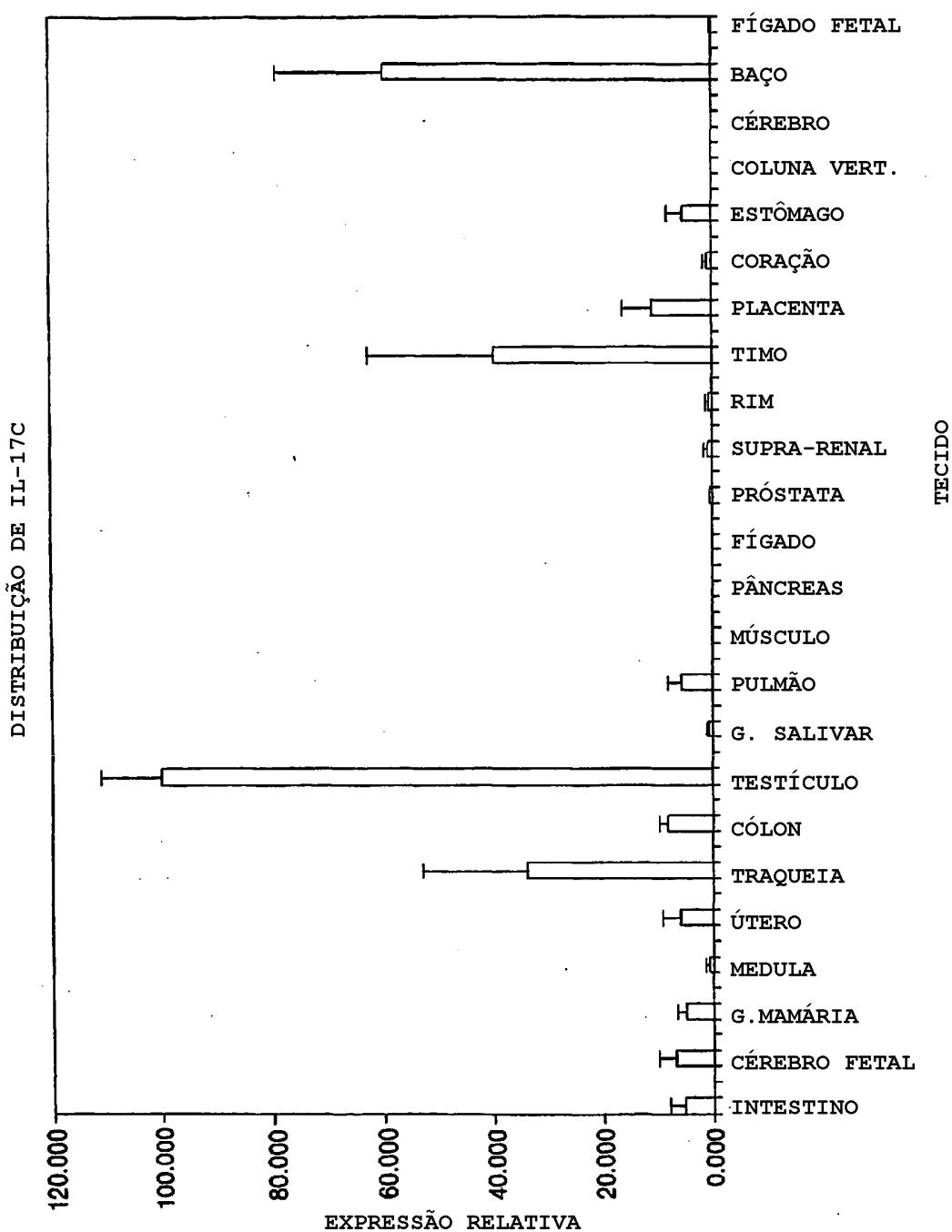
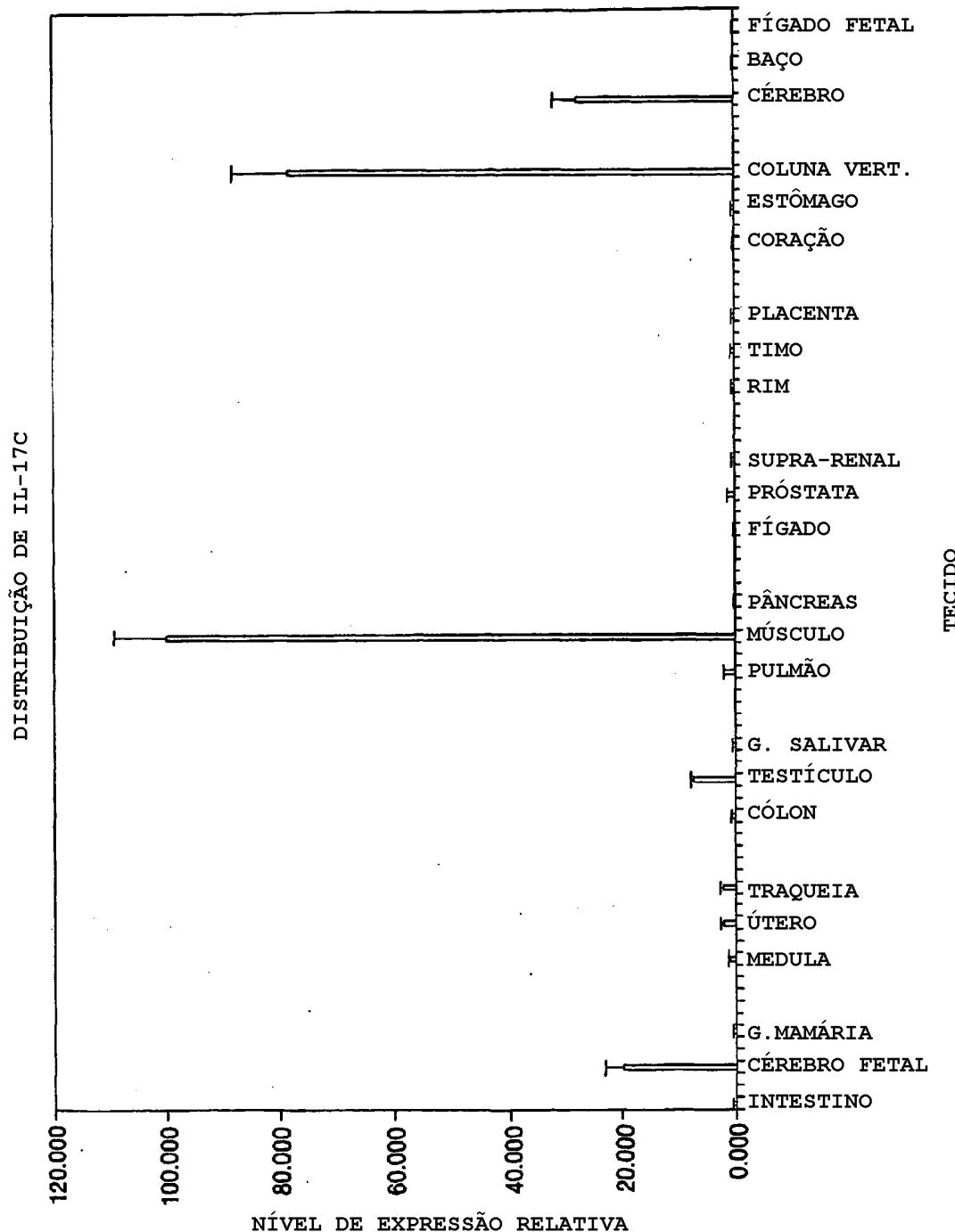


FIG. 22



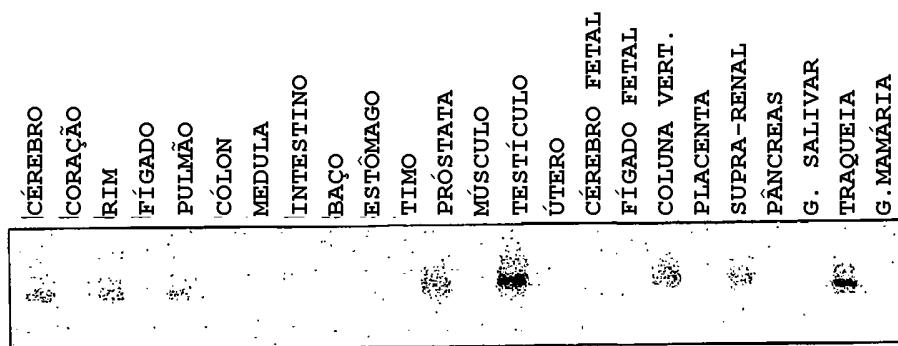


FIG. 23

FIG. 24

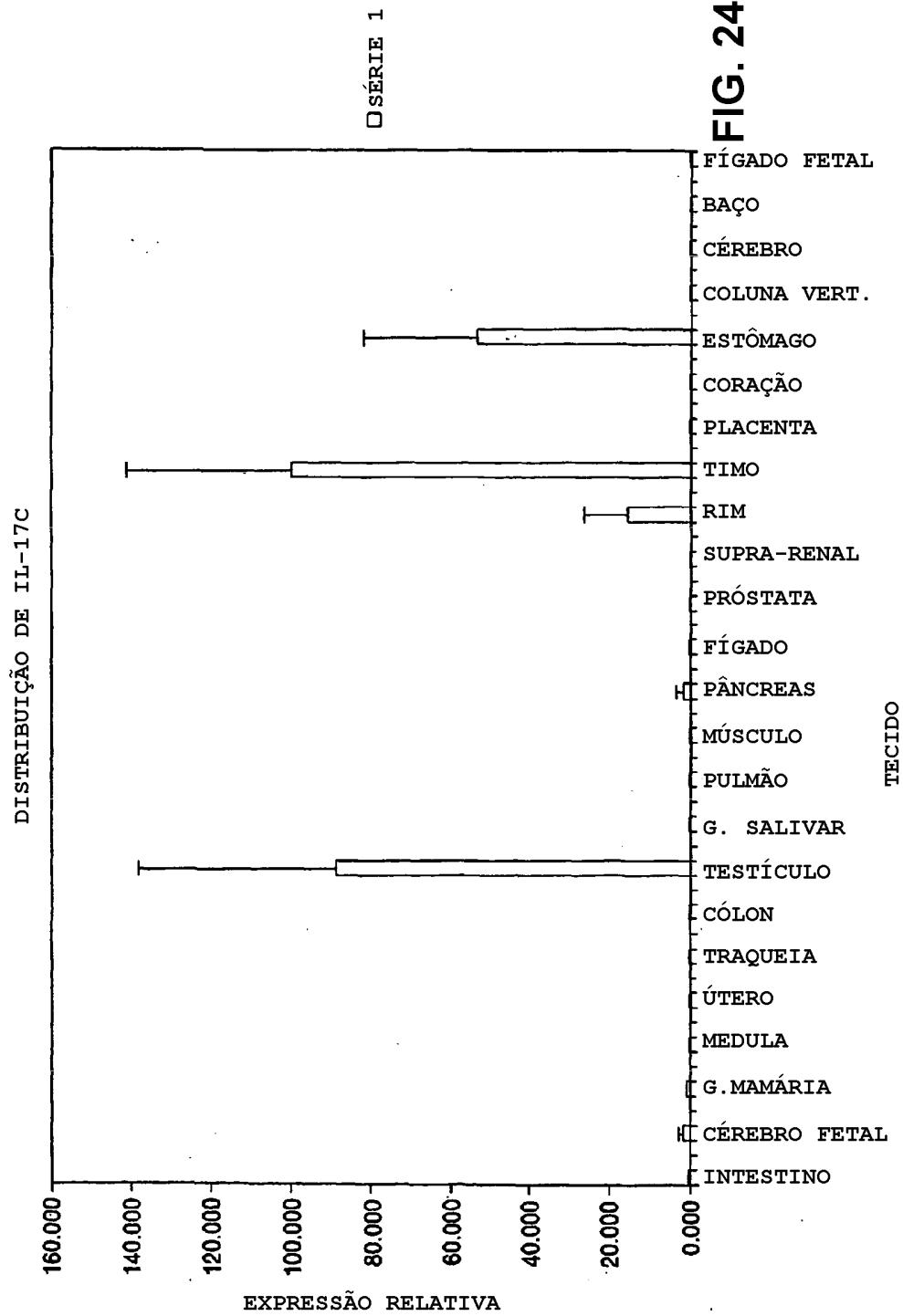
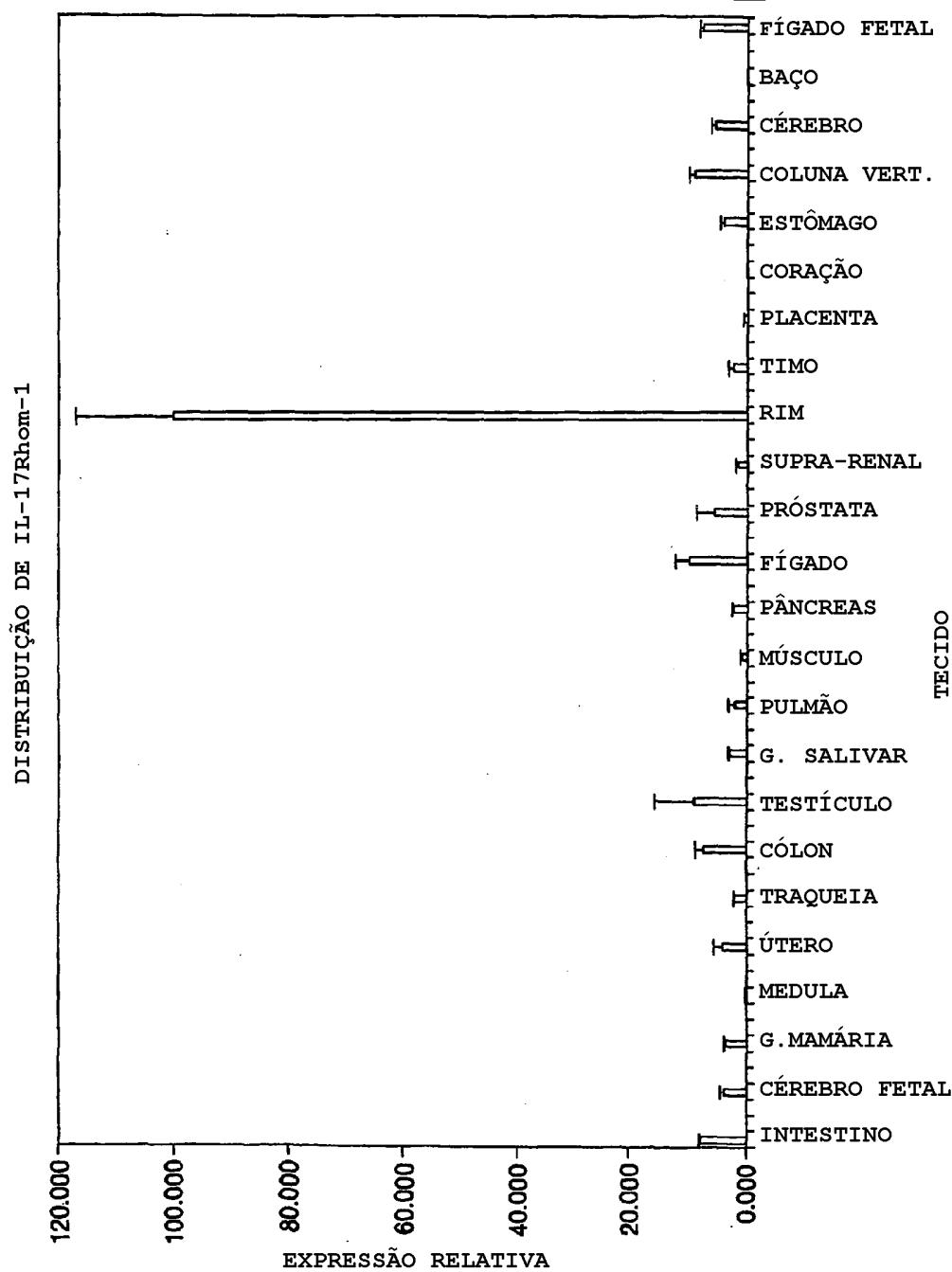
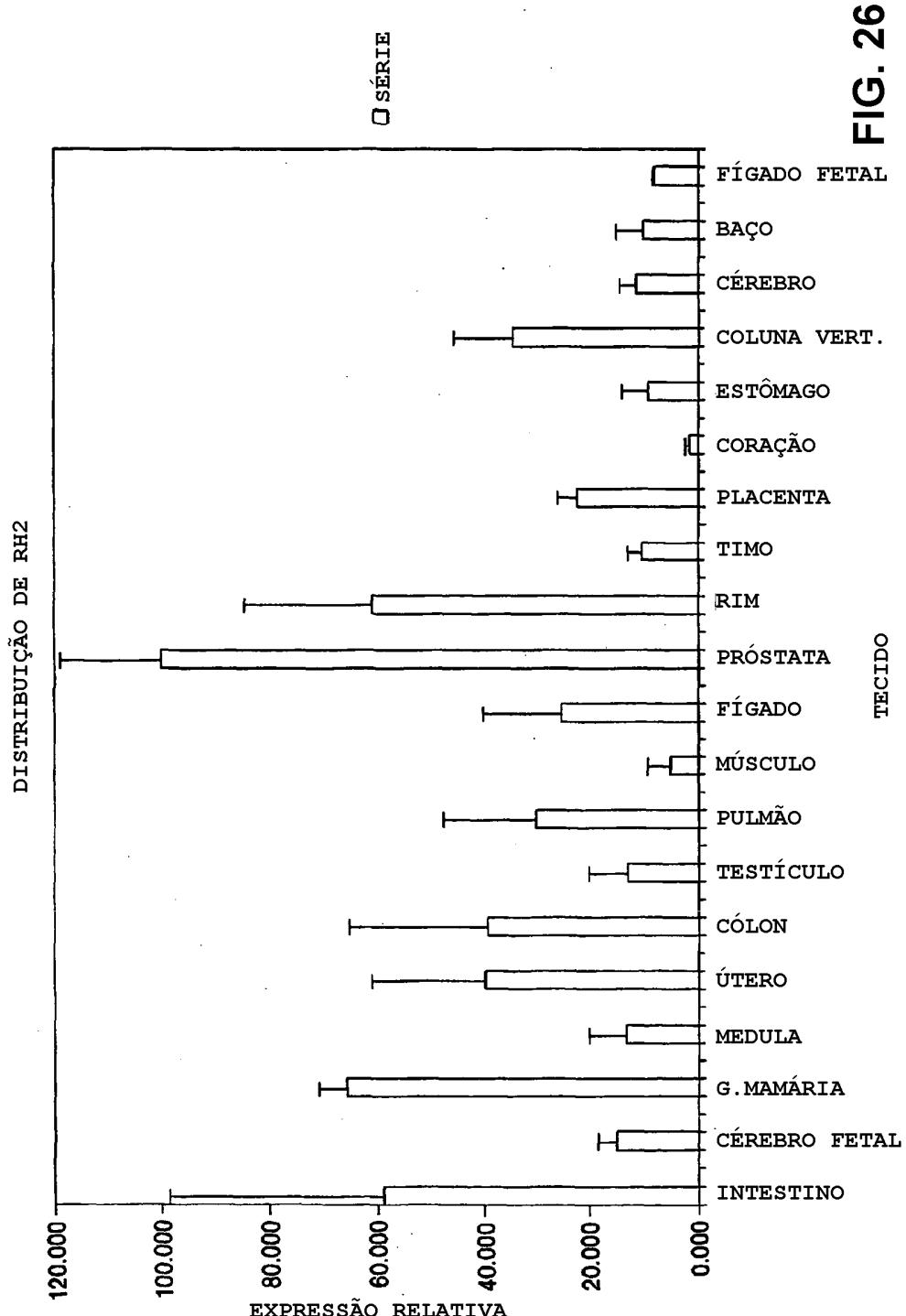


FIG. 25





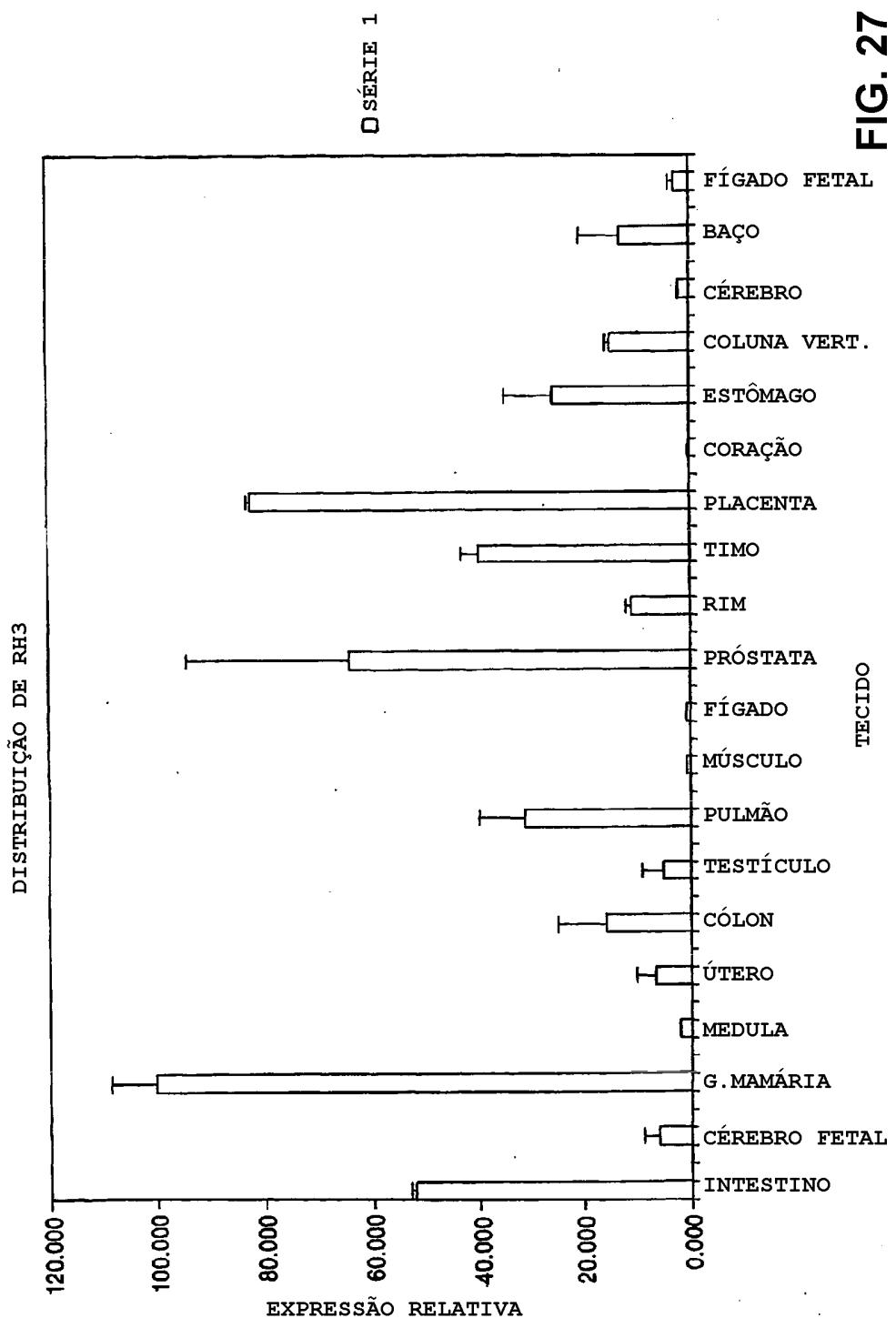
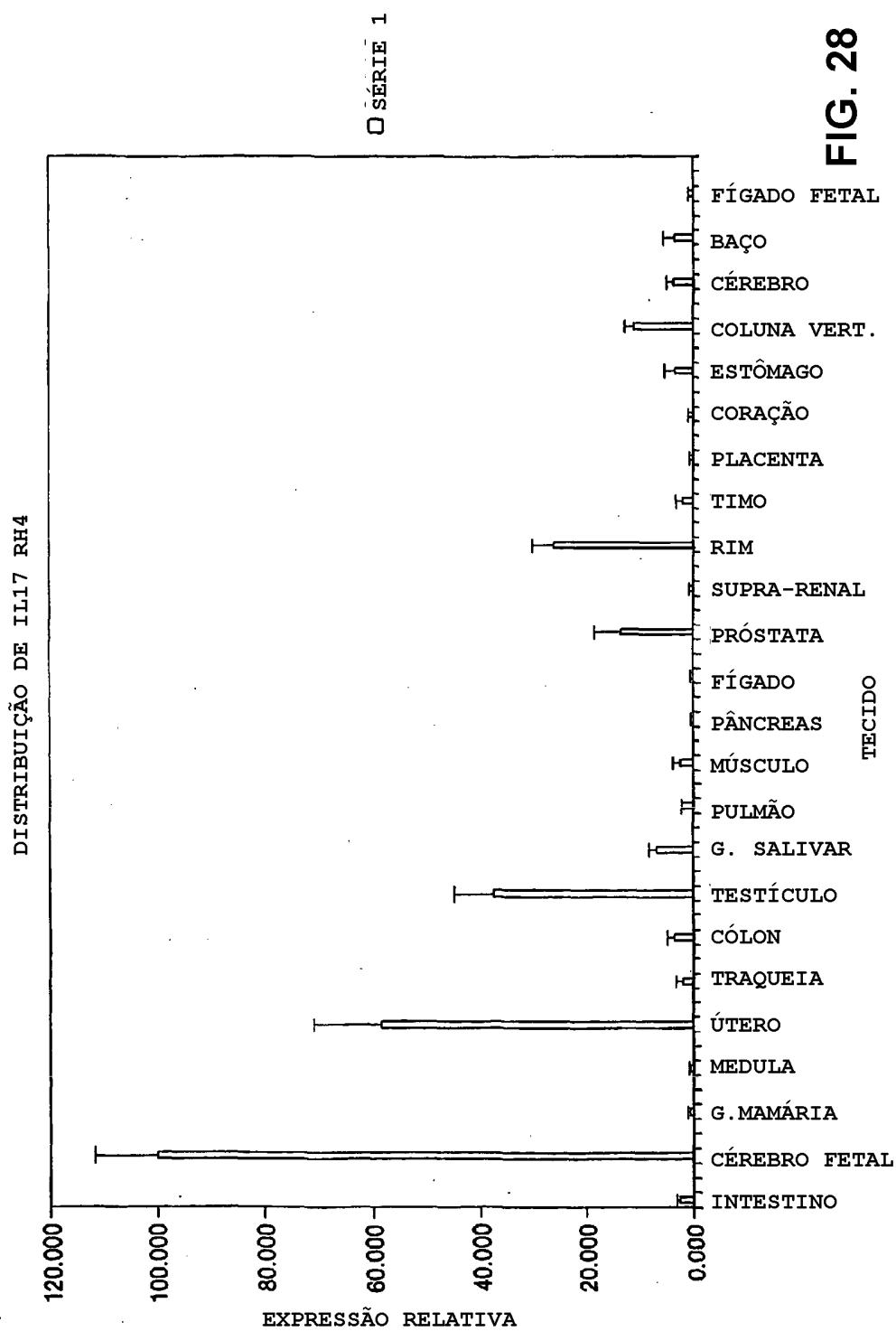


FIG. 27

FIG. 28



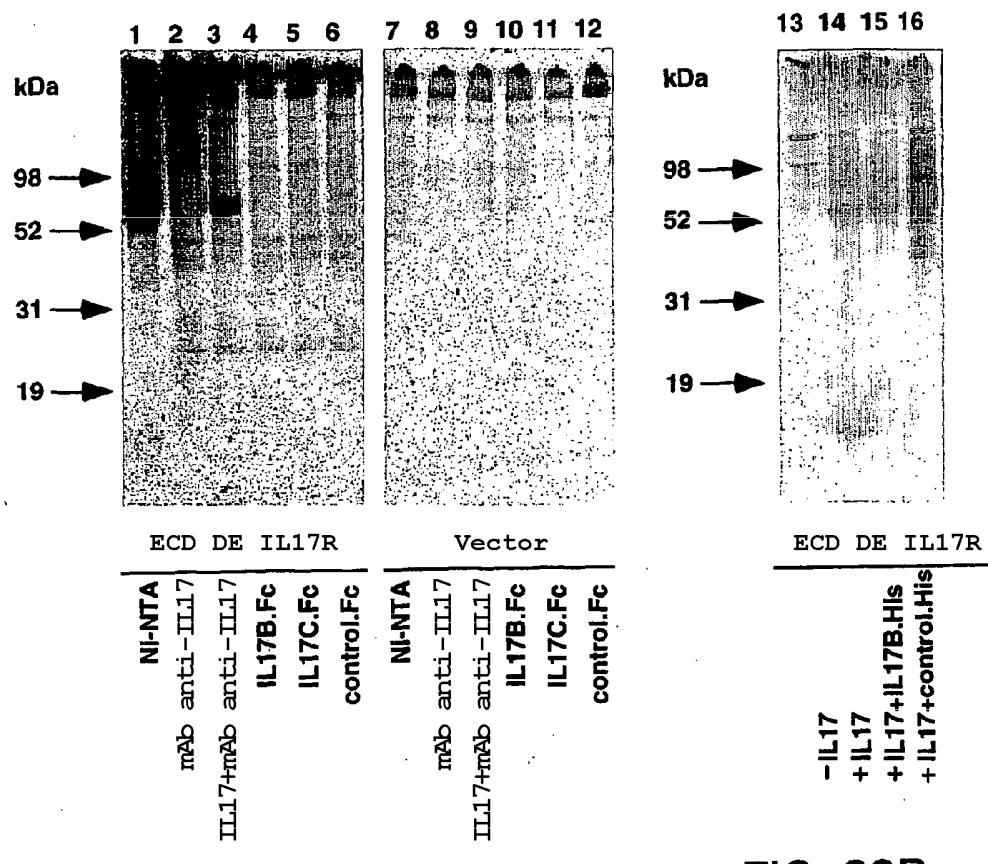
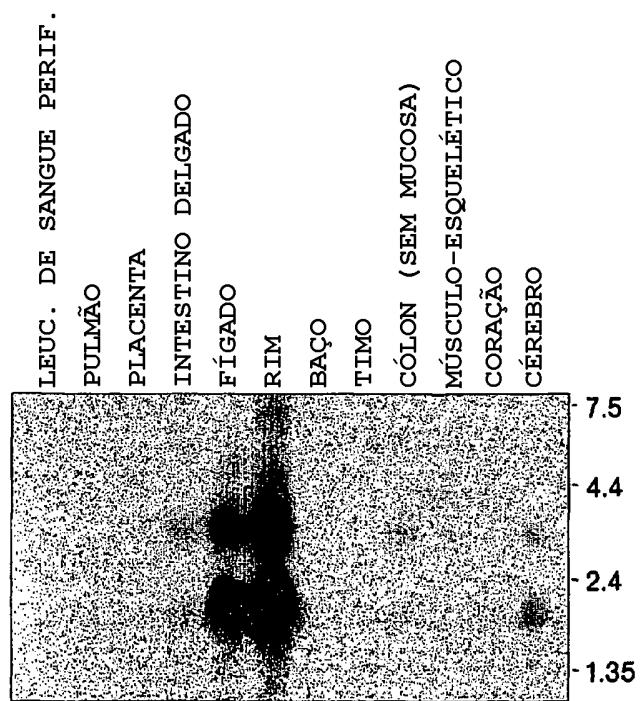


FIG. 30



**FIG. 31A**

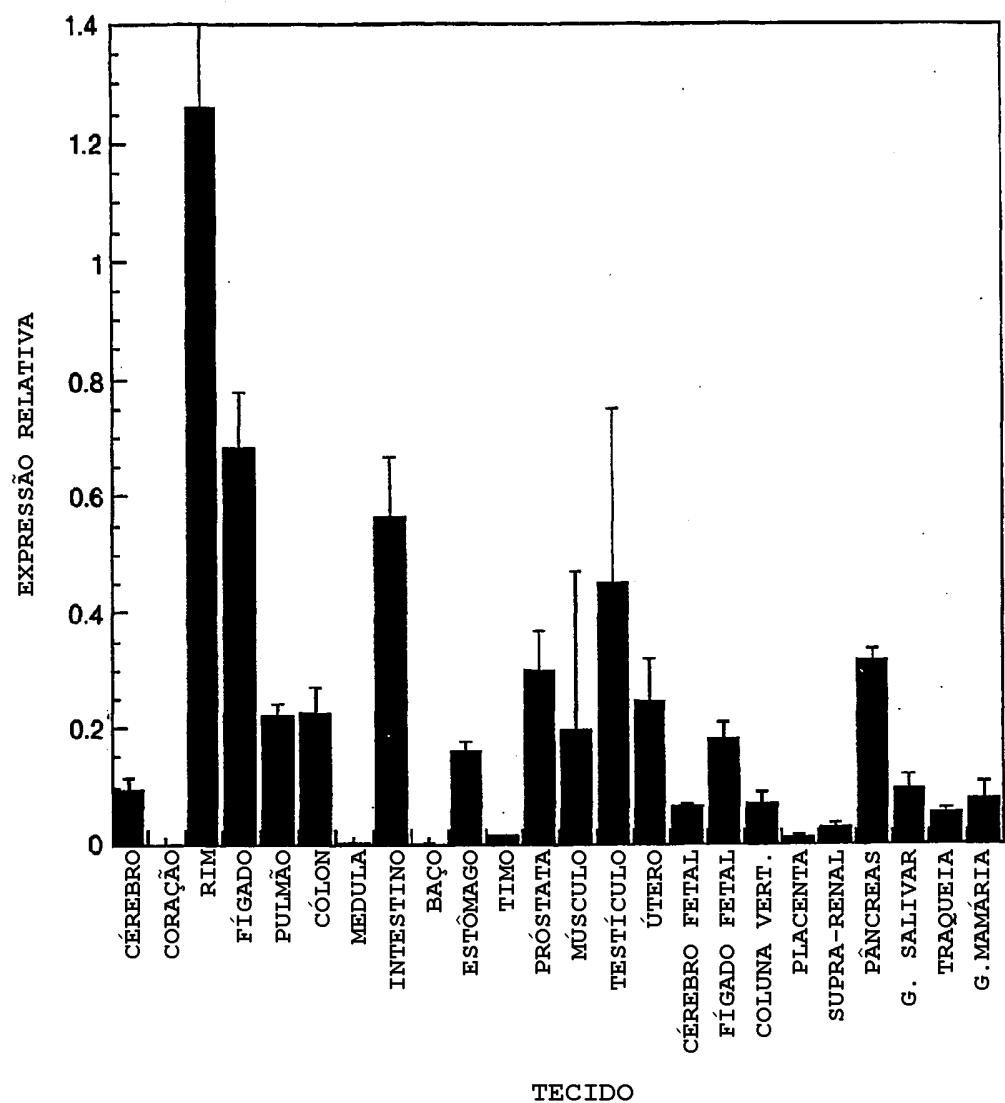


FIG. 31B

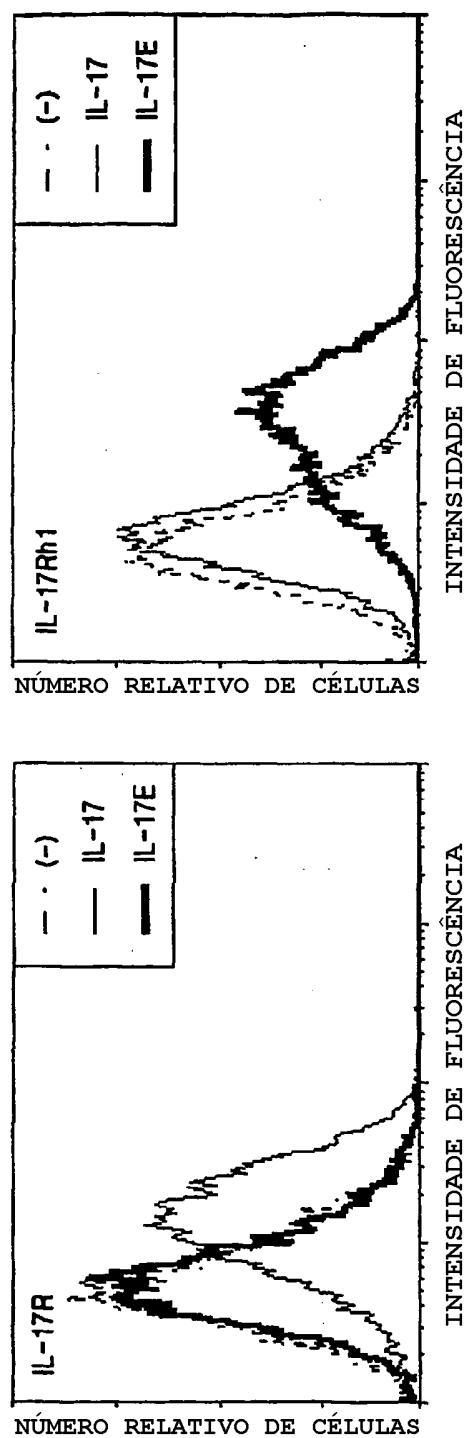
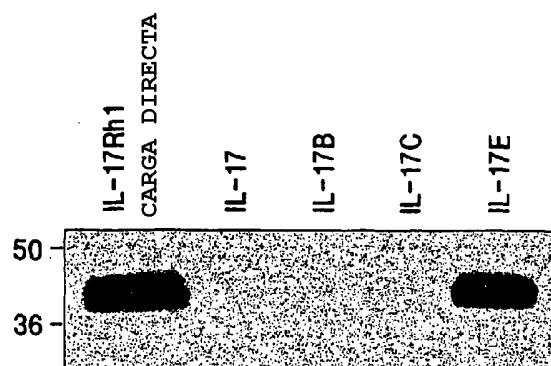
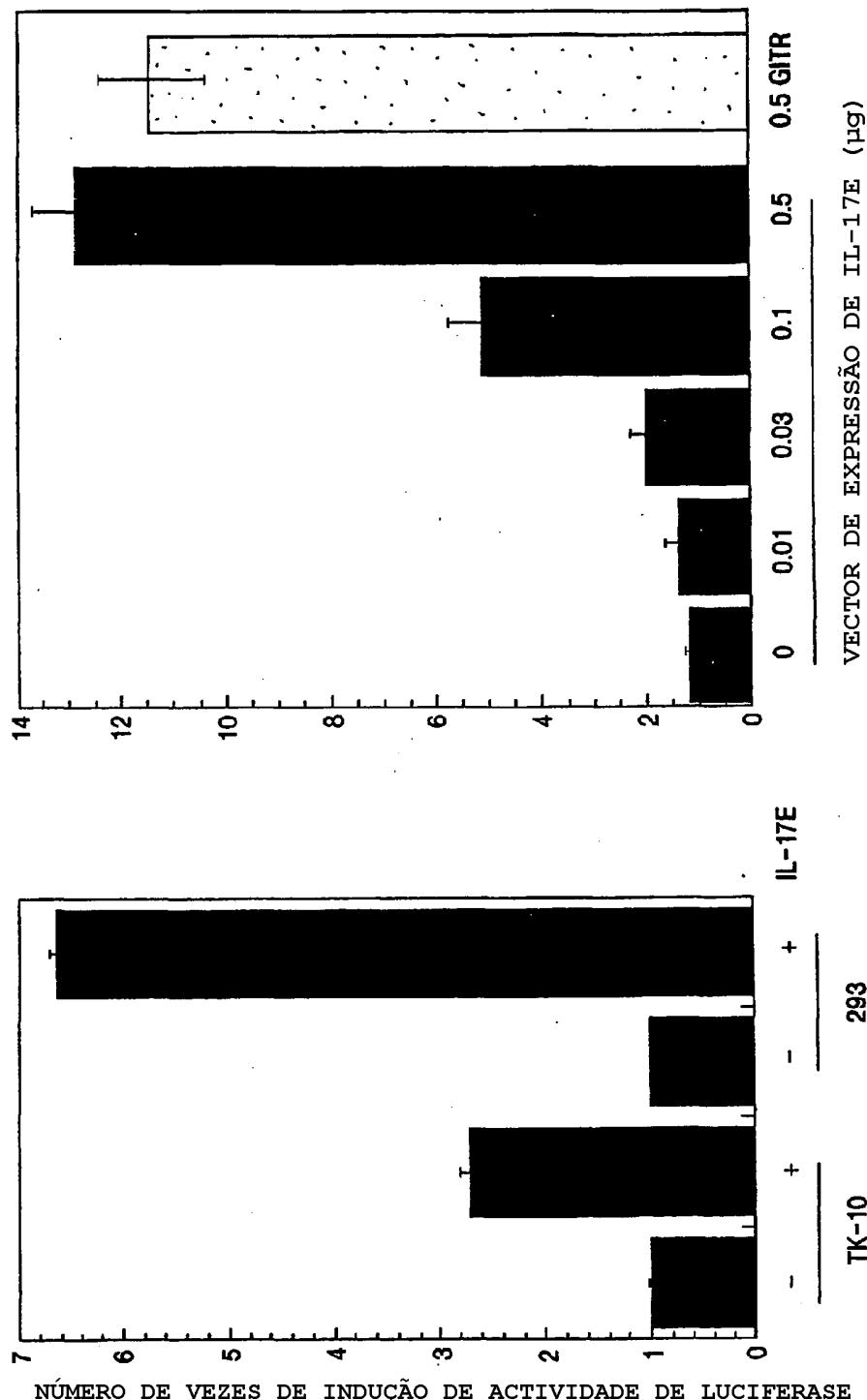


FIG. 32A



**FIG. 32B**



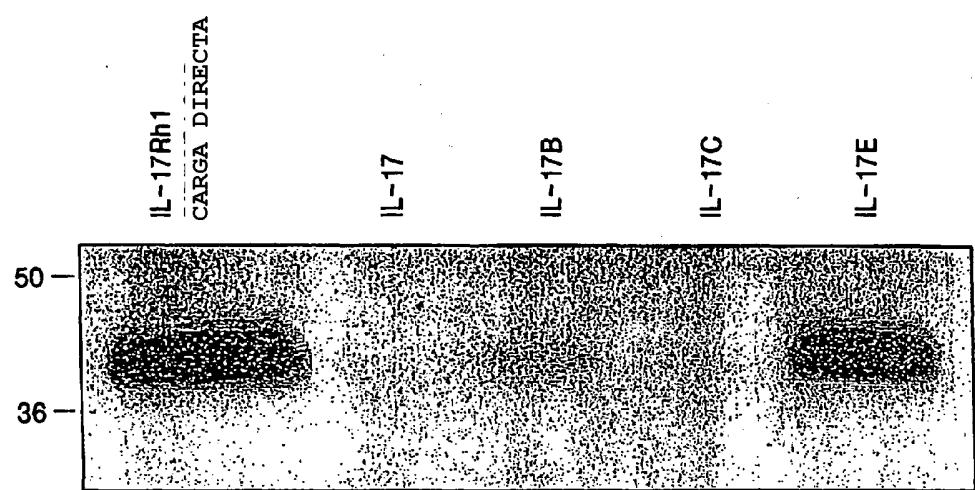


FIG. 34

A FAMÍLIA DE CITOQUINAS DA IL-17 POSSUI UM PADRÃO COMPLEXO DE ESPECIFICIDADES RECEPTOR-LIGANDO SOBREPOSTAS

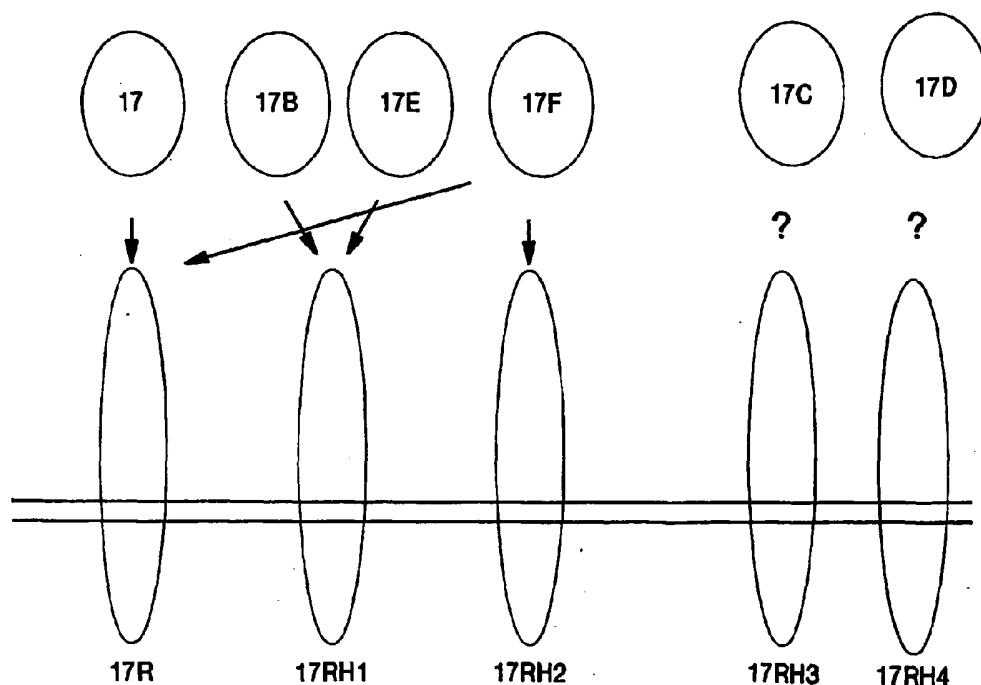


FIG. 35

## CÉLULAS HFF

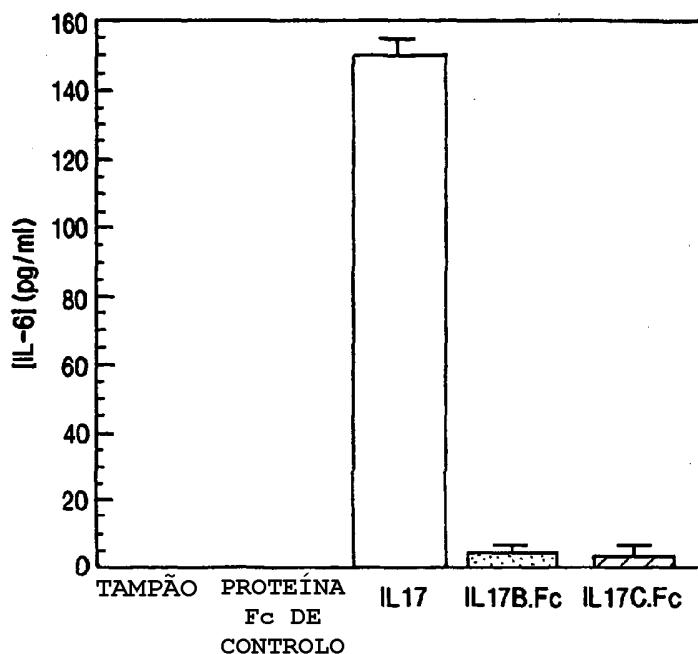


FIG. 36A

## CÉLULAS THP1

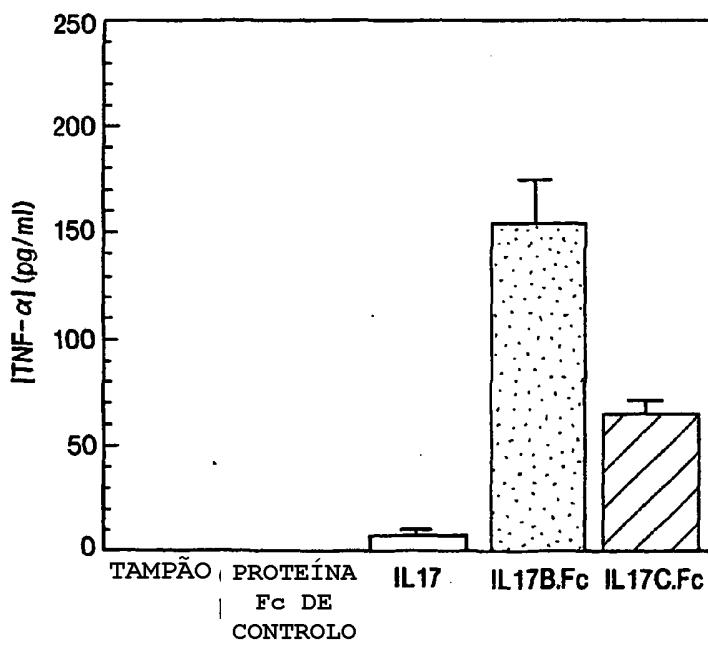
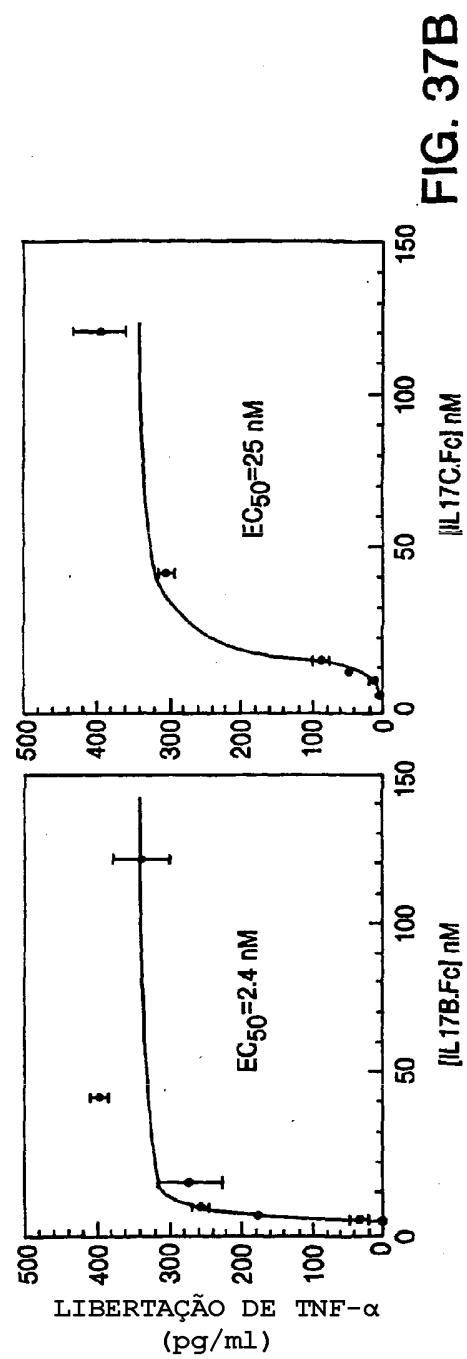
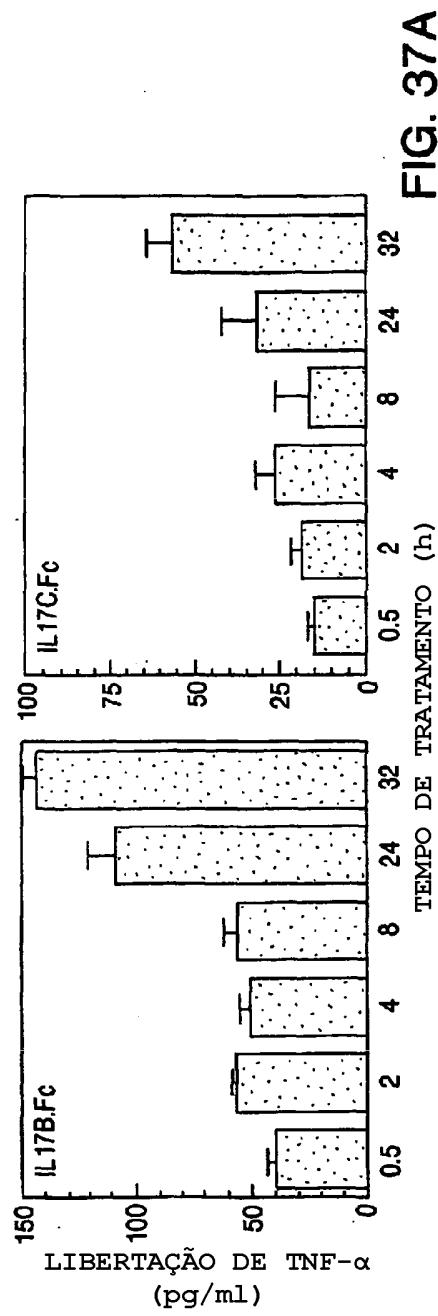
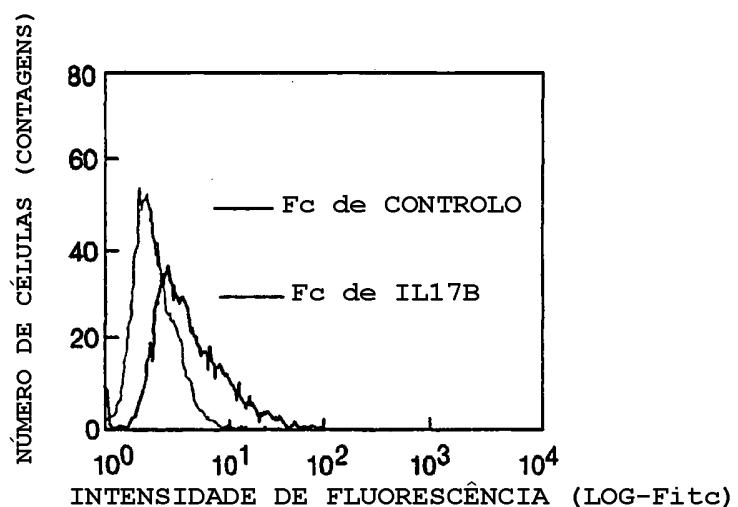
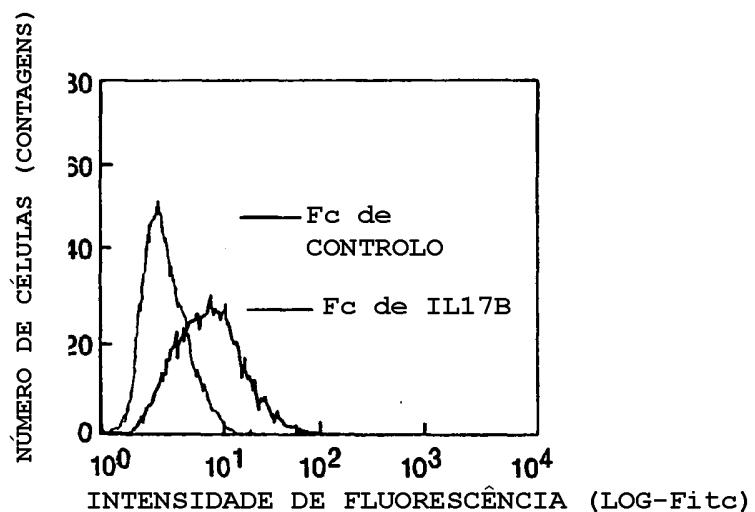


FIG. 36B





**FIG. 38A**



**FIG. 38B**

## IL-17 INDUZ A QUEBRA E INIBE A SÍNTSESE DE MATRIZ DE CARTILAGEM

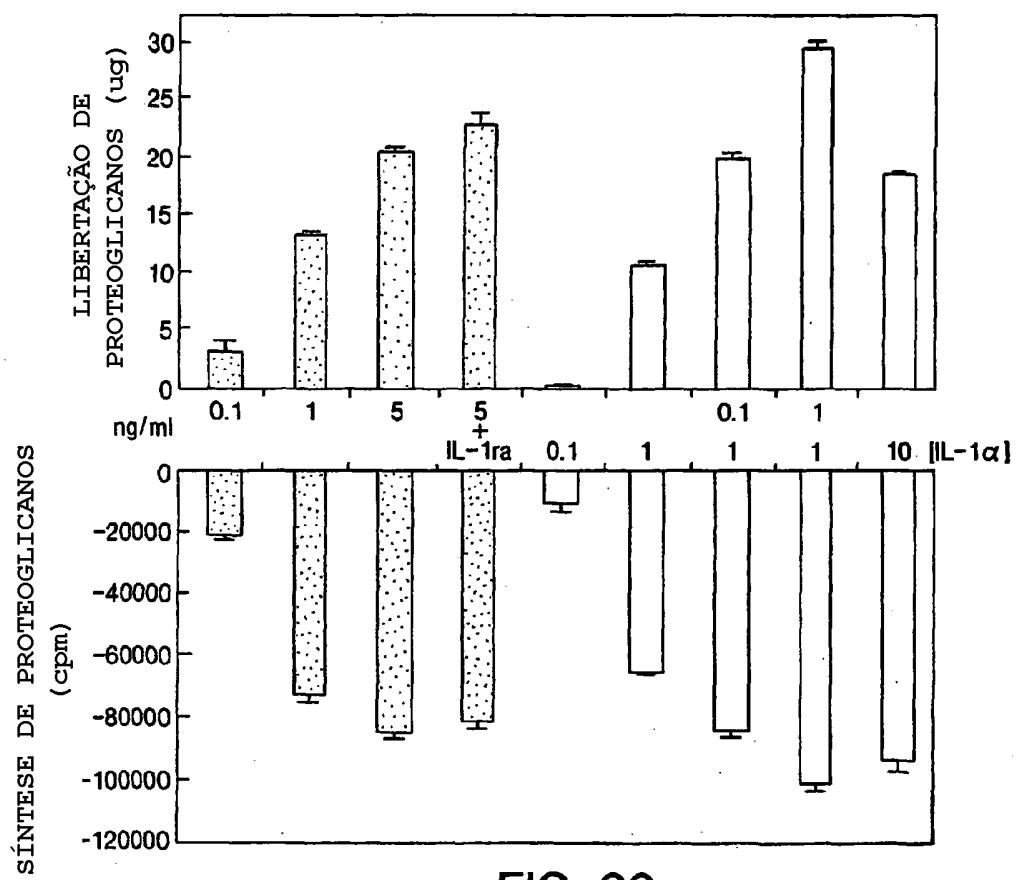


FIG. 39

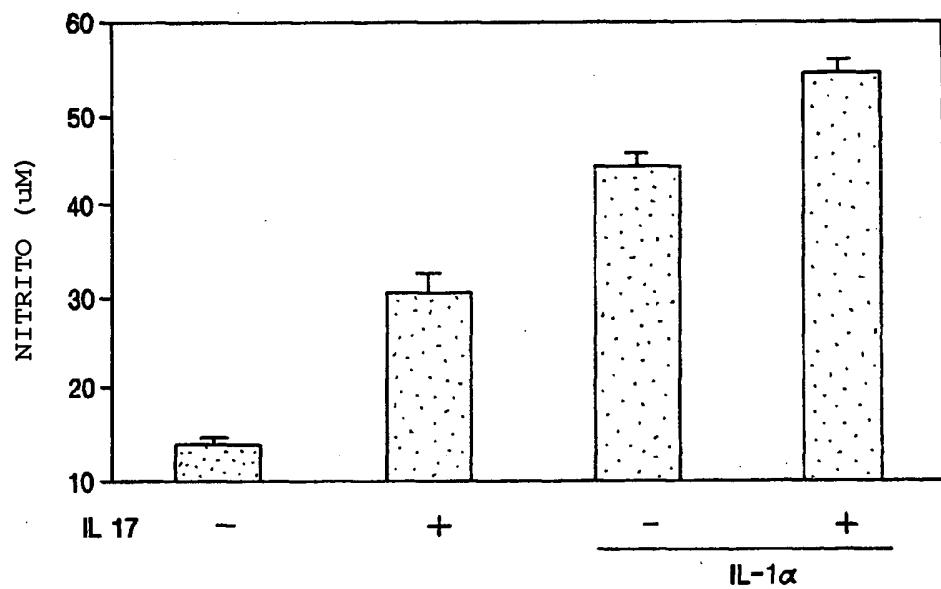
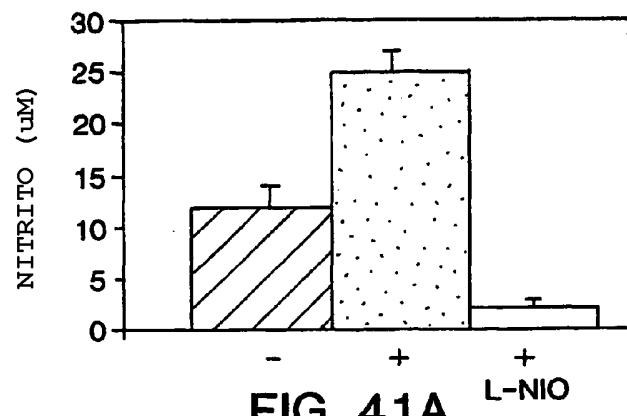
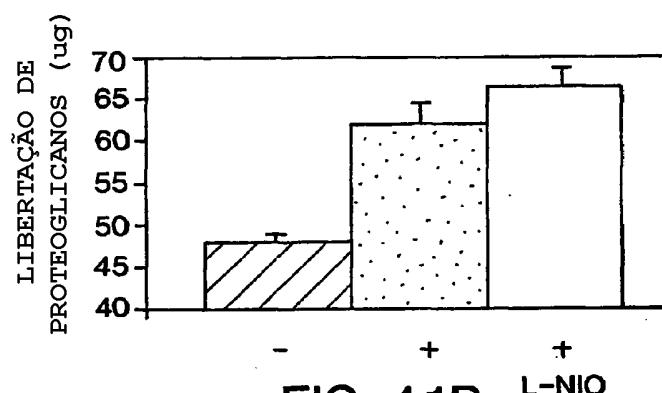
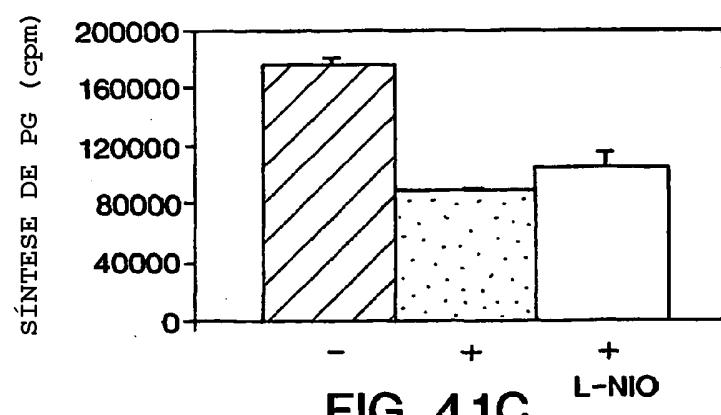
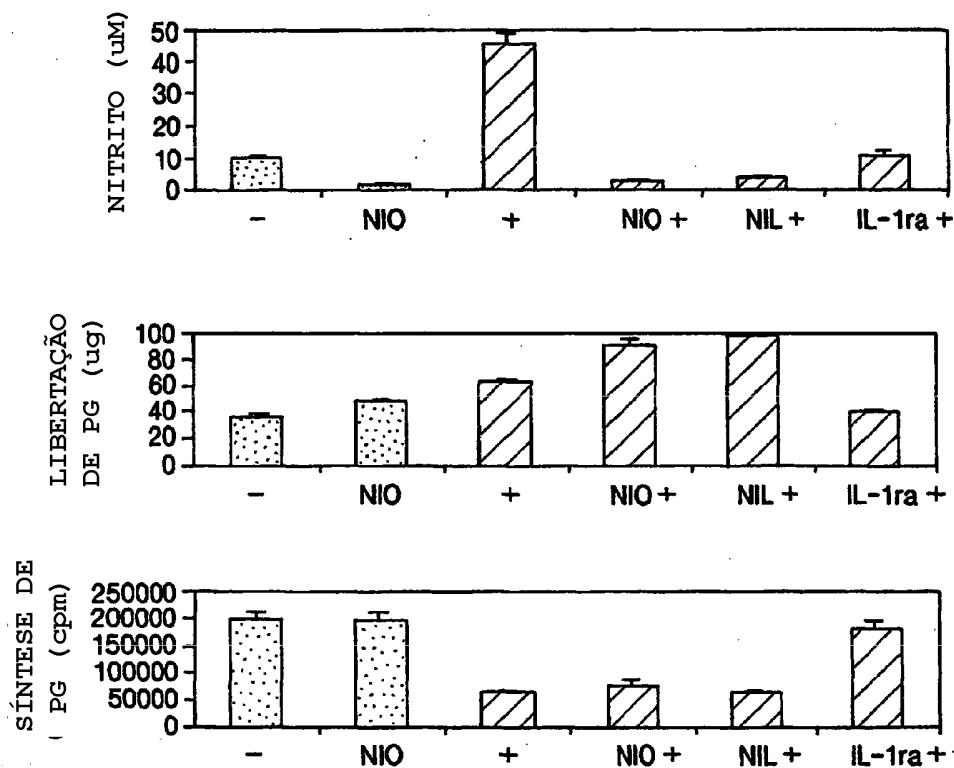
IL-17 AUMENTA A LIBERTAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO BASAL E INDUZIDA POR IL-1 $\alpha$ 

FIG. 40

**A INIBIÇÃO DA LIBERTAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NÃO BLOQUEIA OS EFEITOS PREJUDICIAIS DA IL-17 SOBRE A QUEBRA OU SÍNTESE DA MATRIZ**

**FIG. 41A****FIG. 41B****FIG. 41C**

A INIBIÇÃO DA AUSÊNCIA DE LIBERTAÇÃO AUMENTA A  
QUEBRA DE MATRIZ INDUZIDA POR IL-1 $\alpha$  MAS NÃO A  
SÍNTESE DA MATRIZ



**FIG. 42**

## EFEITOS DETRIMENTAIS DA IL-17C SOBRE CARTILAGEM ARTICULAR

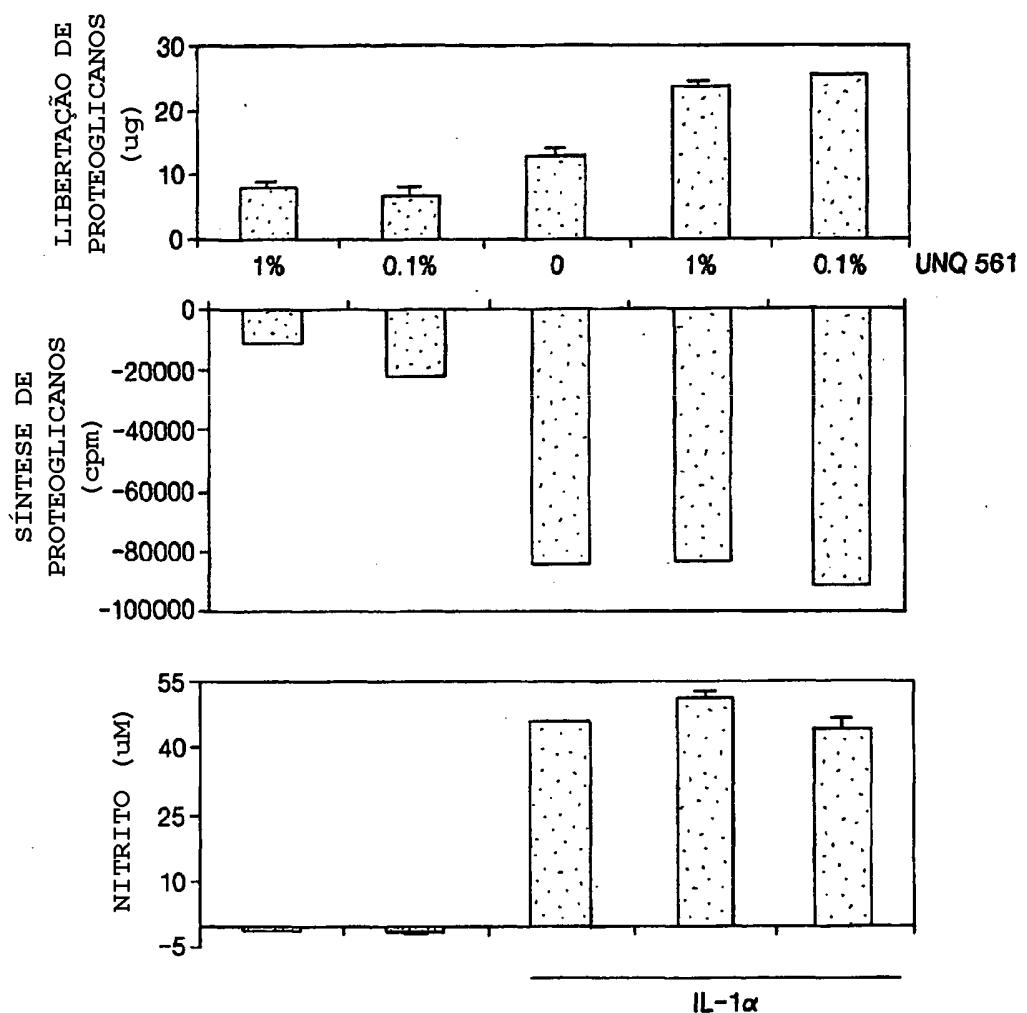


FIG. 43

DOENÇA INFLAMATÓRIA DO INTESTINO:  
EXPRESSÃO DA FAMÍLIA DA IL-17 EM MODELO DE  
RATINHO DE DII

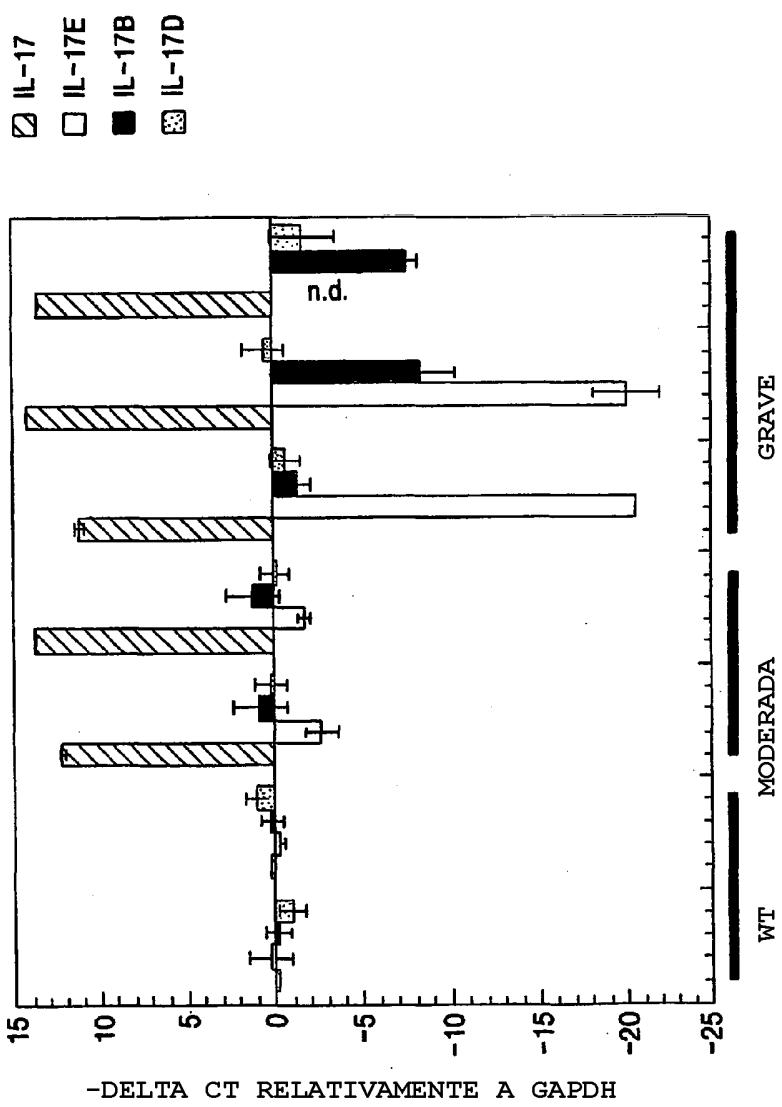
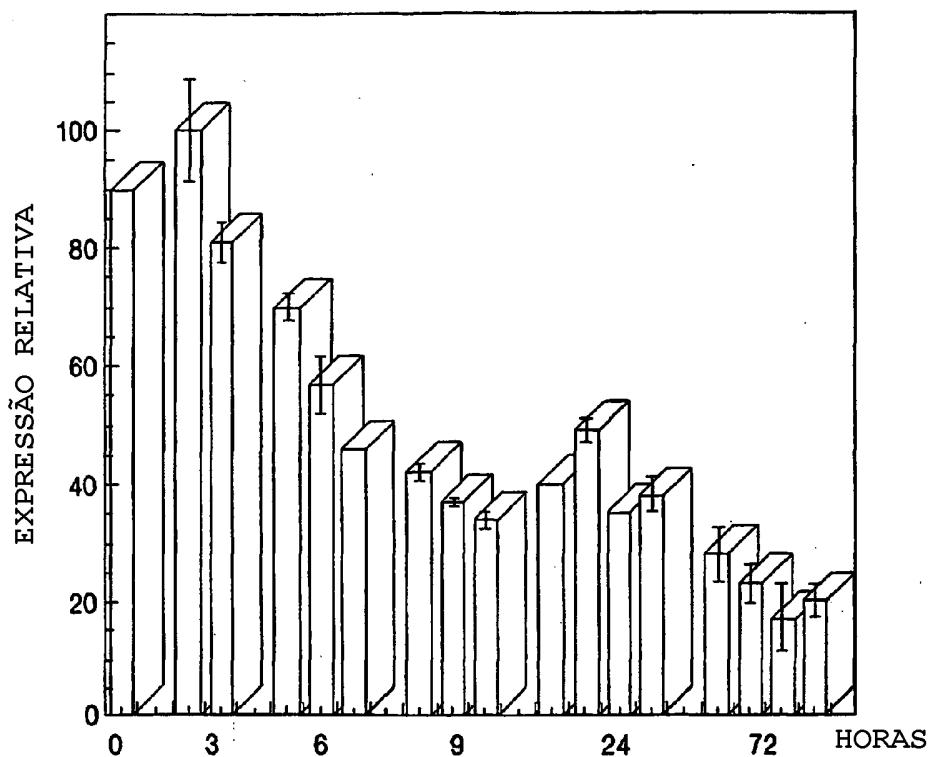


FIG. 44

A IL-17D, PRESENTE NO CÉREBRO, DIMINUI RAPIDAMENTE APÓS O ICTO



**FIG. 45**