



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

(21) PI 0807635-9 A2



(22) Data de Depósito: 22/02/2008
(43) Data da Publicação: 03/06/2014
(RPI 2265)

(51) Int.Cl.:
C12Q 1/68

(54) Título: MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE
DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 22/02/2007 US 60/891,196,
13/11/2007 US 60/987,752, 28/01/2008 US 61/024,170, 22/02/2007
US 60/891,196, 22/02/2007 US 60/891,196, 13/11/2007 US
60/987,752

(73) Titular(es): Genentech, Inc.

(72) Inventor(es): Kenneth Flanagan, Lauri Diehl, Lian Mao

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2008054805 de
22/02/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/103962de
28/08/2008

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODOS
PARA DETECÇÃO DE DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL"**.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a perfis de expressão gênica na
5 patogênese da doença inflamatória intestinal. Esta descoberta encontra uso
na detecção e diagnóstico da doença inflamatória intestinal.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Doença inflamatória intestinal (IBD), um distúrbio inflamatório
crônico do trato gastrointestinal sofrido por aproximadamente um milhão de
10 pacientes nos Estados Unidos, é composta de dois grupos principais de do-
ença: colite ulcerativa (UC) e Doença de Crohn (CD). Em ambas as formas
de IBD, micróbios intestinais podem iniciar a doença em indivíduos geneti-
camente suscetíveis. UC muitas vezes é restrigente ao cólon, enquanto CD
tipicamente ocorre no íleo do intestino delgado e no cólon. (Podolsky, D.K.,
15 N. Engl. J. Med. 347:417-429 (2002). Perfil de expressão gênica do tecido de
pacientes com IBD forneceu alguma percepção de alvos possíveis para te-
rapia e/ou diagnóstico (vide, por exemplo, Dieckgraefe, B.K. *et al.*, *Physiol.*
Genomics 4:1-11 (2000); Lawrance I.C. *et al.*, *Hum Mol Genet.* 10:445-456
(2001); Dooley T.P. *et al.*, *Inflamm. Bowel Dis.* 10:1-14 (2004); e Uthoff S.M.,
20 *Int J Oncol.* 19:803-810 (2001)). Investigações adicionais da desregulação
gênica em pacientes experimentando doença inflamatória intestinal incluem,
ou por exemplo, Lawrance, I.C. *et al.*, que descreveram perfis de expressão
gênica distintos para vários genes em UC e CD (Lawrance, I.C. *et al.*, *Hu-*
man Mol. Genetics 10(5):445-456 (2001)). Uthoff, S.M.S. *et al.* descreveram
25 a identificação de genes candidatos para UC e CD usando análise de micro-
arranjo (Uthoff, S.M.S. *et al.*, *Int'l. J. Oncology* 19:803-810 (2001). Dooley,
T.P. *et al.* descreveram a correlação da expressão gênica em IBD com tra-
tamento com fármaco para distúrbio (Dooley, T.P. *et al.*, *Inflamm. Bowel Dis.*
10 (1):1-14 (2004).

30 Há uma necessidade de identificação de marcadores biológicos
adicionais da doença inflamatória intestinal para uso em diagnóstico desta
doença crônica. A presente descrição preenche essa necessidade.

Os conteúdos completos de todas as referências citadas aqui estão por meio deste incorporados por referência.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Descrito aqui é o achado único que membros da superfamília de genes LY6 estão regulados para cima na superfície de células epiteliais intestinais (IEC) em modelos murinos de colite e no tecido intestinal de pacientes humanos experimentando IBD, genes os quais não são expressos em IEC saudáveis. A maioria dos membros da família LY6 são glicoproteínas de superfície celular ancoradas em GPI com ampla distribuição em células de origem hematopoiética, e expressão mais limitada em células não-hematopoiéticas. Embora largamente usadas como marcadores de diferenciação de células imunes (Sunderkotter, C. *et al.*, J. Immunol. 172:4410-4417 (2004)), as funções que a família LY6 possui foram difíceis de elucidar (Shevach, E.M. and P.E. Kory, Immunol. Today 10:195-200 (1989)). Relatos mostraram que moléculas LY6 estão envolvidas em uma matriz diversa de funções incluindo ativação de célula T (Zhang, Z.X. *et al.*, Eur. J. Immunol. 32:1584-1592 (2002) e Henderson, S.C. *et al.* J. Immunol. 168:118-126 (2002), olfação (Chou, J.H. *et al.*, Genetics 157:211-224 (2001) e adesão celular (Jaakkola, I. *et al.*, J. Immunol. 170:1283-1290 (2003)).

No sentido mais amplo, a invenção fornece um método para detecção da expressão aumentada de genes da família gênica LY6 humana em tecido intestinal no tecido intestinal de um primeiro mamífero experimentando um distúrbio intestinal em relação a um mamífero de controle. Em um sentido mais direcionado, espera-se que o método seja aplicável ao diagnóstico de distúrbios relacionados o distúrbios intestinais associados com expressão de LY6H, LYPD1, LYPD3 e LYPD5 humanos, distúrbios os quais incluem sem limitação, doença inflamatória intestinal (IBD), tal como colite ulcerativa (UC) e Doença de Crohn (CD). Em uma modalidade, o método da invenção é útil para detectar respondedores e não respondedores de tratamento terapêutico para IBD. Em uma modalidade, a IBD é colite ulcerativa (UC). Em uma modalidade, a IBD é Doença de Crohn (CD). Em uma modalidade, o tecido intestinal é tecido de cólon. Em uma modalidade, o tecido de

cólon é cólon sigmoide. Em uma modalidade, a expressão gênica de LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5 está aumentada no tecido intestinal (tal como tecido de cólon) em uma IBD, UC ou CD de mamífero em relação ao intestinal normal (tal como tecido de cólon normal) de um mamífero não experimentando IBD, CD ou UC. Em uma modalidade, o gene LY6H compreende o ácido nucleico da SEQ ID NO:1 e codifica o polipeptídeo LY6H compreendendo a SEQ ID NO:2. Em uma modalidade, o gene LYPD1 compreende o ácido nucleico das SEQ ID NOS:3 ou 4 e codifica o polipeptídeo LYPD1 compreendendo a SEQ ID NO:5. Em uma modalidade, o gene LYPD3 compreende o ácido nucleico da SEQ ID NO:6 e codifica o polipeptídeo LYPD3 compreendendo a SEQ ID NO:7. Em uma modalidade, o gene LYPD5 compreende o ácido nucleico das SEQ ID NOS:8 ou 9 e codifica o polipeptídeo LYPD5 compreendendo SEQ ID NO:10.

Em uma modalidade, o método da invenção compreende a obtenção de uma amostra de tecido de um mamífero de teste suspeito de experimentar um distúrbio intestinal, contactando o tecido com um agente detectável que interage com as proteínas LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5 ou com o ácido nucleico que codifica LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5 e determinação do nível de expressão de LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5 em relação a um tecido de controle. Em uma modalidade, expressão aumentada de LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5 em relação ao controle é indicativa de IBD no mamífero de teste. Em uma modalidade, a expressão aumentada de LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5 no tecido intestinal de teste em relação ao tecido intestinal de controle é indicativa de UC no mamífero de teste. Em uma modalidade, a expressão aumentada de LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5 no teste de tecido intestinal em relação ao tecido intestinal de controle é indicativa do CD no mamífero de teste.

Em uma modalidade, o tecido ou as células do mamífero de controle e teste são do cólon.

Em uma modalidade, a expressão de LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5 é determinada pela detecção da expressão gênica, tal como pela detecção de mRNA que codifica LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5 em

uma amostra de tecido ou células. Em uma modalidade, uma amostra de controle é uma amostra de tecido ou células do mesmo tecido ou tipo celular obtido de um mamífero conhecido que não esteja experimentando um distúrbio gastrointestinal, tal como IBD, UC ou CD. Em uma modalidade, uma amostra de controle é um padrão universal compreendendo RNA de vários tecidos normais ou de múltiplas linhagens celulares. Na análise por microarranjo, tais padrões universais são úteis para monitoração e controle da variação intra e interexperimental. Em uma modalidade, um padrão universal (ou RNA de Referência Universal (URR) é preparado conforme fornecido em Novoradovskaya, N. *et al.*, (2004) BMC Genomics 5:20, referência a qual é incorporada por meio deste por referência em sua totalidade. Em uma modalidade, para uso como um controle na análise de microarranjo de RNA de camundongo, o URR é um RNA de Referência de Camundongo Universal de Stratagene® (número de catálogo 740100, Stratagene®, La Jolla, CA). Em uma modalidade, para uso como um controle na análise de microarranjo de RNA humano, o URR é um RNA de Referência Humano Universal de Stratagene® (número de catálogo 740000). Em uma modalidade, para uso como um controle na análise de microarranjo de RNA de rato, o URR é um RNA de Referência de Rato Universal de Stratagene® (número de catálogo 740200). Em uma modalidade, onde o RNA é RNA de camundongo, as linhagens celulares das quais o RNA total é extraído compreendem linhagens celulares derivadas de embrião, fibroblasto embrionário, rim, hepatócito de fígado, macrófago alveolar de pulmão, linfócito B, linfócito T (timo), glândula mamária, mioblasto muscular, pele e testículo. Em uma modalidade, onde o RNA é RNA humano, as linhagens celulares das quais o RNA total é extraído compreendem linhagens celulares derivadas de adenocarcinoma de glândula mamária, hepatoblastoma de fígado, adenocarcinoma de cérvix, carcinoma embrionário ou testículo, glioblastoma cerebral, melanoma, lipossarcoma, linfoma histiocítico (macrófago, histiócito), leucemia linfoblástica de linfoblasto T, melanoma plasmacitoma de linfócito B. Em uma modalidade, onde o RNA é RNA de rato, as linhagens celulares das quais o RNA total é extraído compreendem linhagens celulares derivadas de leucemia basofílica

sanguínea, linfoma de linfócito T sanguíneo, hibridoma de linfoblasto B sanguíneo, glioma cerebral, carcinoma de saco vitelínico embrionário, fibroblasto normal embrionário, rim normal, hepatoma de fígado, macrófago alveolar normal de pulmão, macrófago tipo II alveolar normal de pulmão, adenocarcinoma de glândula mamária, mioblasto muscular, pele normal e tumor de célula de Leydig de testículo.

Em um aspecto, a invenção refere-se a um artigo de produção compreendendo um recipiente e uma composição da matéria contida no recipiente, em que a composição da matéria compreende um ácido nucleico que codifica LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5 ou seus complementos, e/ou um anticorpo ou anticorpos anti LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5, ou fragmentos de ligação anti LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5 dos mesmos, em que os ácidos nucleicos e/ou anticorpos são detectáveis. Em uma modalidade, a composição da matéria compreende agentes de detecção para detectar ligação de ácido nucleico, tal como sem limitação ácidos nucleicos que codificam LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5 ou seus complementos, para ácido nucleico de LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5 em uma amostra de tecido de um mamífero de teste suspeito de experimentar um distúrbio intestinal. Em uma modalidade, as composições da matéria compreendem agentes de detecção para detectar a ligação de anticorpo a, por exemplo, LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5 em uma amostra de tecido de um mamífero de teste suspeito de experimentar um distúrbio intestinal. Em uma modalidade, o anticorpo da composição é detectavelmente marcado. Em uma modalidade, o anticorpo da composição é detectável por um segundo anticorpo, segundo anticorpo o qual é detectável ou marcado detectavelmente. O artigo pode compreender ainda opcionalmente um marcador afixado ao recipiente, ou inserção de pacote incluída com o recipiente, que refere-se ao uso do ácido nucleico de LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5 ou seu complemento e/ou o anticorpo antiLY6H, anti-LYPD1, anti-LYPD3 e/ou anti-LYPD5 ou fragmento de ligação a LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5 dos mesmos na detecção da expressão aumentada de LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5 em tecido intestinal, incluindo sem limitação, tecido de cólon. Em uma moda-

lidade, o distúrbio intestinal é IBD. Em uma modalidade, o distúrbio intestinal é UC ou CD. Em uma modalidade o polipeptídeo LYPD1 e o anticorpo anti-LYPD1 são um anticorpo como descrito na Patente U.S. 7.157.558 e Patente U.S. 7.144.990, respectivamente.

5 Em um aspecto, a presente invenção refere-se a um método de diagnóstico da presença de um distúrbio intestinal em um mamífero, compreendendo detecção do nível de expressão de um gene que codifica o polipeptídeo LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5 (a) em uma amostra de teste de tecido ou células obtidas do dito mamífero, e (b) em uma amostra de controle de células normais conhecidas de um mamífero não experimentando um distúrbio intestinal de mesma origem ou tipo de tecido, em que um nível maior de expressão do polipeptídeo LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5 na amostra de teste, quando comparado à amostra de controle, é indicativo da presença de um distúrbio intestinal no mamífero a partir do qual a amostra de teste foi obtida. Em uma modalidade, o distúrbio intestinal é IBD. Em uma modalidade, a IBD é UC. Em uma modalidade, a IBD é CD. Em uma modalidade, a detecção é pelo contato de um anticorpo ao polipeptídeo LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5, ou fragmento de ligação do anticorpo, com as amostras de teste e controle e determinando a quantidade relativa da formação de complexo anticorpo-polipeptídeo. Um nível maior de formação do complexo de anticorpo-polipeptídeo na amostra de teste em relação à amostra de controle é indicativo de distúrbio intestinal, tal como IBD, UC ou CD, no mamífero de teste. O anticorpo da invenção é marcado detectavelmente ou, alternativamente, o anticorpo é detectado pela ligação subsequente de um segundo anticorpo que é detectável.

Ainda em uma modalidade adicional, a presente invenção refere-se a um método de diagnóstico da presença de um distúrbio intestinal em um mamífero, compreendendo (a) contatar uma amostra de teste compreendendo tecido ou células obtidas a partir do mamífero de teste com um oligonucleotídeo que hibridiza em alta estrringência a ácido nucleico de LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5 (ou seu complemento) ou um anticorpo que se liga especificamente ao polipeptídeo LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5 e

(b) detecção de formação de um complexo entre o oligonucleotídeo ou anticorpo e ácido nucleico de LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5 (ou seu complemento) ou polipeptídeo LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5, respectivamente, na amostra de teste, em que a formação de mais de tal complexo na amostra de teste em relação a uma amostra de controle é indicativa da presença de um distúrbio intestinal (tal como IBD, UC ou CD) no mamífero de teste. Em uma modalidade, o distúrbio intestinal é IBD. Em uma modalidade, o distúrbio é UC. Em uma modalidade, o distúrbio é CD. Em uma modalidade, o tecido dos mamíferos de teste e controle é tecido de cólon. Opcionalmente, o anticorpo de ligação ao polipeptídeo LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5 ou oligonucleotídeo de hibridização gênica a LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5 empregado pelo método da invenção é detectável, marcado detectavelmente, ligado a um suporte sólido, ou similares, e/ou amostra de teste de tecido ou células é obtida a partir de um indivíduo suspeito de experimentar um distúrbio intestinal, em que o distúrbio é IBD, tal como sem limitação, UC ou CD.

Ainda em uma modalidade adicional, a presente invenção refere-se ao uso de (a) um polipeptídeo LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5, (b) um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5 ou um vetor ou célula hospedeira compreendendo o ácido nucleico de (a), (c) um anticorpo polipeptídico antiLY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5, ou (d) um oligopeptídeo de ligação a LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5, na preparação de um medicamento útil para a detecção diagnóstica de um distúrbio intestinal, incluindo sem limitação, IBD, CD ou UC, em um tecido intestinal de um mamífero, incluindo sem limitação o tecido de cólon.

Em um aspecto, a invenção compreende um método de detecção de uma resposta a fármaco terapêutica em um mamífero tratado com um agente terapêutico para IBD, em que o método compreende determinação da expressão de LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5 no tecido gastrointestinal de um mamífero de teste em relação a um tecido gastrointestinal controle de um mamífero de controle, onde um nível maior de expressão de LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5 em um tecido de teste em relação a um

tecido de controle indica um estado de doença ou continuação do estado de doença. Uma diferença na expressão de LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5 no tecido de teste que não é significativamente maior do que os níveis de expressão de controle normais ou estão em uma faixa de níveis de expressão normais de LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5 em uma população de mamíferos indica melhora ou resolução da distúrbio intestinal, em que melhora ou resolução as quais podem ser atribuídas ao agente terapêutico. Em uma modalidade, uma resposta terapêutica é determinada quando os níveis de expressão de LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5 em tecidos ou células gastrointestinais ou do cólon do mamífero tratado com um agente terapêutico são diferentes (expressão é mais similar ao controle normal, isto é, níveis de LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5 estão menores do que eram os níveis de expressão de LY6H, LYPD1, LYPD3 e/ou LYPD5 no mamífero antes do tratamento).

Modalidades ainda adicionais da presente invenção serão evidentes para o versado em uma leitura do presente pedido de patente.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

As Figuras 1A e 1B representam a sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO:1) de codificação do polipeptídeo LY6H humano e a sequência de aminoácidos do polipeptídeo LY6H humano (SEQ ID NO:2).

As Figuras 2A e 2B representam sequências de ácidos nucleicos (SEQ ID NOS:3 e 4) de codificação do polipeptídeo LYPD1 humano e a sequência de aminoácidos do polipeptídeo LYPD1 humano mostrado na Figura 2C (SEQ ID NO:5).

As Figuras 3A e 3B representam a sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO:6) de codificação do polipeptídeo LYPD3 humano e a sequência de aminoácidos do polipeptídeo LYPD3 humano (SEQ ID NO:7).

As Figuras 4A e 4B representam sequências de ácido nucleico (SEQ ID NOS:8 e 9) de codificação do polipeptídeo LYPD5 humano e a sequência de aminoácidos do polipeptídeo LYPD5 humano mostrado na Figura 4C (SEQ ID NO:10).

As Figuras 5A e 5B representam a sequência de ácido nucleico

(SEQ ID NO:11) de codificação do polipeptídeo LY6D humano e a sequência de aminoácidos do polipeptídeo LY6D humano (SEQ ID NO:12).

As Figuras 6A e 6B representam a sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO:13) de codificação do polipeptídeo LY6E humano e a sequência de aminoácidos do polipeptídeo LY6E humano (SEQ ID NO:14).

As Figuras 7A e 7B representam a sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO:15) de codificação do polipeptídeo LYPD2 humano e a sequência de aminoácidos do polipeptídeo LYPD2 humano (SEQ ID NO:16).

As Figuras 8A a 8H representam sequências de moléculas GLG-1 (ESL-1): (A-B) Número de Acesso U64791, sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO:17) de codificação do polipeptídeo GLG-1 humano (ESL-1) (SEQ ID NO:18); (C-D) Número de Acesso NM_012201, sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO:19) de codificação do polipeptídeo GLG-1 humano (ESL-1) (SEQ ID NO:20); (E-F) Número de Acesso AK172806, sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO:21) de codificação do polipeptídeo GLG-1 humano (ESL-1) (SEQ ID NO:22); e Número de Acesso AK131501, sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO:23) de codificação do polipeptídeo GLG-1 humano (ESL-1) (SEQ ID NO:24).

As Figuras 9A e 9B representam a sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO:25) de codificação do polipeptídeo LY6A murino e a sequência de aminoácidos do polipeptídeo LY6A murino (SEQ ID NO:26).

As Figuras 10A e 10B representam a sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO:27) de codificação do polipeptídeo LY6C murino e a sequência de aminoácidos do polipeptídeo LY6C murino (SEQ ID NO:28).

As Figuras 11A e 11B representam a sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO:29) de codificação do polipeptídeo murino LY6D e a sequência de aminoácidos do polipeptídeo LY6D murino (SEQ ID NO:30).

As Figuras 12A e 12B representam a sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO:31) de codificação do polipeptídeo LY6E murino e a sequência de aminoácidos do polipeptídeo LY6E murino (SEQ ID NO:32).

As Figuras 13A e 13B representam a sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO:33) de codificação do polipeptídeo LY6F murino e a sequência

cia de aminoácidos do polipeptídeo LY6F murino (SEQ ID NO:34).

As Figuras 14A e 14B representam a sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO:35) de codificação do polipeptídeo LY6I murino e a sequência de aminoácidos do polipeptídeo LY6I murino (SEQ ID NO:36).

5 As Figuras 15A e 15B representam a sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO:37) de codificação do polipeptídeo LY6K murino e a sequência de aminoácidos do polipeptídeo LY6K murino (SEQ ID NO:38).

As Figuras 16A e 16B representam a sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO:45) de codificação do polipeptídeo LYPD3 murino e a sequência de aminoácidos do polipeptídeo LYPD3 murino (SEQ ID NO:46).

As Figuras 17A e 17B representam a sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO:47) de codificação do polipeptídeo LY6H murino e a sequência de aminoácidos do polipeptídeo LY6H murino (SEQ ID NO:48).

As Figuras 18A e 18B representam a sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO:49) de codificação do polipeptídeo LYPD1 murino e a sequência de aminoácidos do polipeptídeo LYPD1 murino (SEQ ID NO:50).

As Figuras 19A e 19B representam a sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO:51) de codificação do polipeptídeo LYPD2 murino e a sequência de aminoácidos do polipeptídeo LYPD2 murino (SEQ ID NO:52).

20 As Figuras 20A e 20B representam a sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO:53) de codificação do polipeptídeo LY6g5c murino e a sequência de aminoácidos do polipeptídeo LY6g5c murino (SEQ ID NO:54).

As Figuras 21A e 21B representam a sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO:55) de codificação do polipeptídeo LY6g6c murino e a sequência de aminoácidos do polipeptídeo LY6g6c murino (SEQ ID NO:56).

As Figuras 22A e 22B representam a sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO:57) de codificação do polipeptídeo SLURP2/LYNX1 murino e a sequência de aminoácidos do polipeptídeo SLURP2/LYNX1 murino (SEQ ID NO:58).

30 A Figura 23 mostra que os membros da família LY6 são regulados para cima em IEC em modelos murinos de colite. IEC em ambos IL10^{-/-} (Figura 23A) e modelo de colite de transferência de CD45RB^{Hi} (Figura 23B)

foram isolados por LCM e o RNA foi purificado. Análise por microarranjo foi realizada e analisada como descrito nos Exemplos. Os números representam a média da modificação de vezes comparada a um RNA-padrão universal de camundongos colíticos sobre camundongos saudáveis. Os números
5 abaixo do mapa de calor indicam o escore de inflamação do camundongo individual.

As Figuras 24A a 24D mostram que a expressão superficial de moléculas LY6 é regulada para cima em IEC no modelo IL10-/- de colite. Camundongos de tipo selvagem (Figura 24A) ou IL10-/- (Figura 24B) foram
10 corados para expressão superficial de LY6A (verde, com contracoração por DAPI). Similarmente, camundongos de tipo selvagem (Figura 24C) ou IL10-/- (Figura 24D) foram corados para expressão superficial de LY6C.

As Figuras 25A a 25I mostram que a expressão superficial de LY6A e LY6C são reguladas para cima em resposta a citocinas inflamatórias, particularmente IFN γ . Células YAMC foram tratadas com a citocina
15 indicada por 15 horas e coradas para a expressão superficial de LY6C (Figura 25A) e LY6A (Figura 25B). Células YAMC foram cultivadas por 15 horas na presença de doses crescentes de IFN γ e analisadas por citometria de fluxo para expressão de LY6C (Figura 25C) e LY6A (Figura 25D). Células
20 YAMC estimuladas por IFN γ foram coletadas em vários pontos de tempo, como indicado, e analisadas por citometria de fluxo para expressão de LY6C (Figura 25E) e LY6A (Figura 25F). Expressão de IL-22 regulada para cima em ambos LY6C (Figura 25G) e LY6A (Figura 25H). Os níveis de ambos de LY6A e LY6C foram regulados para cima na linhagem murino de IEC,
25 CMT93 em resposta ao tratamento com IFN γ (Figura 25I).

Figuras 26A a 26E A depleção de jangada lipídica resulta em uma inibição da produção de quimiocina mediada por LY6C. Células YAMC com colesterol depletado (barras escuras) ou não depletado (barras abertas) foram incubadas com anti-KLH ou antiLY6C ligados à placa como indicado por 15 horas. O RNA foi coletado e os níveis de expressão de CXCL2,
30 CXCL5 e CCL7 foram determinados (Figuras 26A a 26C). Níveis superficiais de LY6A (Figura 26D) e LY6C (Figura 26E) foram reduzidos em resposta à

depleção de colesterol.

As Figuras 27A a 27D mostram que a ligação cruzada de LY6C, mas não LY6A, induz regulação para cima da expressão superficial de LY6A e LY6C. Células YAMC foram incubadas por 24 horas em placas recobertas com o controle anti-KLH, antiLY6A ou antiLY6C e analisadas por citometria de fluxo para expressão de LY6C (Figura 27A) ou LY6A (Figura 27B). Células foram pré-tratadas por 12 horas com 100 U/ml de IFN γ e do mesmo modo plaqueadas em placas recobertas com anticorpo e analisadas para expressão de LY6C (Figura 27C) ou LY6A (Figura 27D).

As Figuras 28A a 28C mostram que a ligação cruzada a LY6C, mas não LY6A, induz secreção de quimiocinas. Figura 28A: Células YAMC foram pré-incubadas ou não, como indicado, com 100 U/ml de IFN γ por 15 horas e cultivadas em placas recobertas de 10 μ g/ml de antiLY6A (barras pretas) ou antiLY6C (barras hachuradas) ou controle anti-KLH (barras abertas). O RNA foi isolado em 24 (esquerda), 48 (centro) e 72 (direita) horas e analisado para expressão de CXCL5 ou CCL7 (A). Os dados indicam que a média $\pm$ DP da modificação de vezes (como determinado pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$) comparada às células com ligação cruzada isotípica não-tratadas. Figura 28B: Sobrenadantes foram coletados em 48 horas nas células com ligação cruzada, como acima, com 1, 5 ou 10 μ g/ml (como indicado) de anticorpo e a secreção de CXCL5 no sobrenadante foi determinada por ELISA. * $<0,05$. Figura 28C: Os níveis de ambos CXCL5 e CXCL2 em resposta à ligação cruzada a LY6C foram diminuídos quando os níveis de expressão de LY6C foram reduzidos com siRNA.

As Figuras 29A a 29B mostram que IEC na colite possuem um padrão de expressão gênica de quimiocina similar. IEC em ambos IL10 $^{-/-}$ (Figura 29A) e no modelo de colite de transferência de CD45RB Hi (Figura 29B) foram isolados por LCM e o RNA foi purificado. A análise por microarranjo foi realizada e analisada como descrito nos Exemplos. Os números representam a média da modificação de vezes comparada ao RNA-padrão universal de camundongos colíticos sobre camundongos saudáveis. Os números abaixo do mapa de calor indicam o escore de inflamação do camun-

dongo individual.

As Figuras 30A a 30C mostram que a expressão de genes da família LY6 humana é regulada para cima em células do cólon tratadas com citocinas. Células Colo-205 humanas foram tratadas com as citocinas indicadas, ou combinações de citocinas, por 18 ou 24 horas. O aumento de vezes na expressão do LY6H humano (Figura 30A), LYPD3 humano (Figura 30B) e LYPD5 humano (Figura 30C) é mostrado em relação ao controle β -actina humana.

As Figuras 31A a 31B mostram que os pacientes com Doença de Crohn tiveram níveis elevados de LYPD1 (Figura 31A) e LYPD5 (Figura 31B) no cólon. Amostras de tecido a partir de pacientes humanos com IBD foram obtidas e a expressão gênica LYPD1 e LYPD5 foi determinada. Aumentos estatisticamente significantes na expressão de LYPD1 e LYPD5 foram observados no tecido inflamado de pacientes com CD. Um aumento estatisticamente significativo na expressão de LYPD5 também foi observado no tecido inflamado de pacientes com UC. Os valores do eixo Y refletem a expressão gênica em relação a um RNA-padrão universal.

As Figuras 32A e 32B mostram células COS não-transfectadas (A), e (B) células COS transfectadas com o polipeptídeo GLG-1 (ESL-1) e marcadas com a proteína LYPD5-Fc.

A Figura 33A representa a estrutura de GLG-1 ou ESL-1 e vários fragmentos adequados para caracterização da ligação de LYPD5 e a Figura 33B mostra os resultados de um estudo de coimunoprecipitação que caracteriza a ligação de LYPD5 e um ligante de LYPD5.

A Figura 34A representa a estrutura de GLG-1 ou ESL-1 e vários fragmentos adequados para caracterização da ligação de LYPD5 e a Figura 34B mostra os resultados de um estudo de coimunoprecipitação que caracteriza a ligação de LYPD5 e um ligante de LYPD5.

A Figura 35A representa a estrutura de GLG-1 ou ESL-1 e vários fragmentos adequados para caracterização da ligação de LYPD5 e a Figura 35B mostra os resultados de um estudo de coimunoprecipitação que caracteriza a ligação de LYPD5 e um ligante de LYPD5.

As Figuras 36A e 36B representam a sequência de ácido nucleico (SEQ ID NO: 68) de codificação da integrina humana, beta 7, e a sequência de aminoácidos da integrina humana, polipeptídeo beta 7 (SEQ ID NO: 69).

5 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Definições

"Doença inflamatória intestinal" ou "IBD" é usada intercambiavelmente aqui para referir-se a doenças do intestino que causam a inflamação e/ou ulceração e inclui sem limitação doença de Crohn e colite ulcerativa.

"Doença de Crohn (CD)" ou "colite ulcerativa (UC)" são doenças inflamatórias intestinais crônicas de etiologia desconhecida. Doença de Crohn, diferentemente da colite ulcerativa, pode afetar qualquer parte do intestino. A mais proeminente característica da doença de Crohn é o espessamento granular, edematoso avermelhado-purpúreo da parede intestinal. Com o desenvolvimento da inflamação, estes granulomas muitas vezes perdem suas bordas circunscritas e integram-se com o tecido circundante. Diarreia e obstrução de intestino são as características clínicas predominantes. Conforme a colite ulcerativa, o curso da doença de Crohn pode ser contínuo ou com recaída, brando ou severo, mas diferentemente da colite ulcerativa, a doença de Crohn não é curável pela ressecção do segmento envolvido do intestino. A maioria dos pacientes com doença de Crohn necessitam de cirurgia em algum momento, mas a recaída subsequente é comum e o tratamento médico contínuo é usual.

A doença de Crohn pode envolver qualquer parte do trato alimentar a partir da boca ao ânus, embora tipicamente apareça nas regiões ileocólica, do intestino delgado e ou cólon-anorretal. Histopatologicamente, a doença manifesta por granulomas descontínuos, abscessos de cripta, fissuras e úlceras aftosas. A infiltração inflamatória é mista, composta de linfócitos (ambas as células T e B), células plasmáticas, macrófagos e neutrófilos. Há um aumento desproporcional nas células plasmáticas secretoras de IgM e IgG, macrófagos e neutrófilos.

Fármacos anti-inflamatórios sulfassalazina e ácido 5-aminossalicílico (5-ASA) são úteis para tratamento da doença de Crohn colônica suavemente ativa e são comumente prescritos para manter a remissão da doença. Metroidazol e ciprofloxacina são similares em eficácia à sulfassalazina e parecem ser particularmente úteis para tratamento da doença perianal. Em casos mais severos, corticosteroides são eficazes no tratamento de exacerbações ativas e podem até manter a remissão. Azatioprina e 6-mercaptopurina também mostraram sucesso em pacientes que necessitam de administração crônica de corticoesteroides. É também possível que estes fármacos possam desempenhar um papel na profilaxia a longo prazo. Infelizmente, pode haver um atraso muito longo (até seis meses) antes do início da ação em alguns pacientes.

Fármacos antidiarreicos também podem fornecer alívio sintomático em alguns pacientes. Terapia nutritiva ou dieta elementar podem melhorar a condição nutricional dos pacientes e induzir melhora sintomática da doença aguda, mas não induz remissões clínicas sustentadas. Antibióticos são usados no tratamento de crescimento bacteriano excessivo secundário no intestino delgado e no tratamento de complicações piogênicas.

"Colite ulcerativa (UC)" aflige o intestino grosso. O curso da doença pode ser contínuo ou com recaída, brando ou severo. A lesão inicial é uma infiltração inflamatória com formação de abscesso na base das criptas de Lieberkühn. A coalescência destas criptas distendidas e rompidas tende a separar a mucosa subjacente do seu aporte sanguíneo, levando à ulceração. Sintomas da doença incluem espasmos, dor abdominal inferior, hemorragia retal, e diarreias frequentes, consistindo principalmente em sangue, pus e muco com partículas fecais escassas. Uma colectomia total pode ser necessária para a colite ulcerativa aguda, severa ou crônica, não remittente.

As características clínicas de UC são altamente variáveis, e o início pode ser insidioso ou abrupto, e pode incluir diarreia, tenesmo e hemorragia retal recorrente. Com o envolvimento fulminante do cólon inteiro, megacólon tóxico, uma emergência com risco de morte, pode ocorrer. Manifestações extraintestinais incluem artrite, pioderma gangrenoso, uveíte e eri-

tema nodoso.

O tratamento para UC inclui sulfassalazina e fármacos relacionados contendo salicilato para casos brandos e fármacos corticosteroides em casos severos. Administração tópica de salicilatos ou de corticosteroides é algumas vezes eficaz, particularmente quando a doença está limitada ao intestino distal, e está associada com efeitos colaterais reduzidos comparados com o uso sistêmico. Medidas de suporte, tais como administração de ferro e agentes antidiarreicos são algumas vezes indicadas. Azatioprina, 6-mercaptopurina e metotrexato são algumas vezes também prescritos para uso em casos refratários dependentes de corticosteroides.

Como usado aqui, "membro da família gênica LY6" ou "super-membro da família gênica LY6" é usado intercambiavelmente aqui para referir-se a um gene que tem homologia a membros da família gênica LY6, a maioria daqueles membros da família gênica são glicoproteínas de superfície celular ancoradas a GPI com ampla distribuição em células de origem hematopoiética e expressão mais limitada em células não-hematopoiéticas. Membros desta família gênica são usados como marcadores de diferenciação de células imunes (Sunderkotter, C. *et al.*, J. Immunol. 172:4410-4417 (2004)). Genes da família LY6 foram examinados (Shevach, E.M. and P.E. Korty, Immunol. Today 10:195-200 (1989)) e funções incluem ativação de célula T (Zhang, Z.X. *et al.*, Eur. J. Immunol. 32:1584-1592 (2002) e Henderson, S.C. *et al.*, J. Immunol. 168:118-126 (2002), olfação (Chou, J.H. *et al.*, Genetics 157:211-224 (2001) e adesão celular (Jaakkola, I. *et al.*, J. Immunol. 170:1283-1290 (2003)). Membros da família gênica LY6 incluem sem limitação, membros da família gênica LY6 de mamífero, tais como os genes de família LY6 de camundongo ou de ser humano. Como usado aqui, "gene LY6" refere-se a um membro da família gênica LY6 e "polipeptídeo LY6" refere-se ao polipeptídeo codificado por um gene LY6. Membros da família gênica LY6 murino incluem, sem limitação, LY6A (NM_010738, ácido nucleico da SEQ ID NO:25 que codifica o polipeptídeo da SEQ ID NO:26), LY6C (NM_010741, ácido nucleico da SEQ ID NO:27 que codifica o polipeptídeo da SEQ ID NO:28), LY6D (NM_003695, ácido nucleico da SEQ ID NO:29

que codifica o polipeptídeo da SEQ ID NO:30), LY6E (NM_002346, ácido nucleico da SEQ ID NO:31 que codifica o polipeptídeo da SEQ ID NO:32), LY6F (NM_008530, ácido nucleico da SEQ ID NO:33 que codifica o polipeptídeo da SEQ ID NO:34), LY6I (NM_020498, ácido nucleico da SEQ ID NO:35 que codifica o polipeptídeo da SEQ ID NO:36) e LY6K (NM_017527, ácido nucleico da SEQ ID NO:37 que codifica o polipeptídeo da SEQ ID NO:38). Os membros da família gênica LY6 humana incluem, sem limitação, LY6H (NM_002347, ácido nucleico da SEQ ID NO:1 que codifica o polipeptídeo da SEQ ID NO:2), LYPD1 (NM_144586, ácido nucleico das SEQ ID NOS:3 ou 4 que codifica o polipeptídeo da SEQ ID NO:5), LYPD3 (NM_014400, ácido nucleico da SEQ ID NO:6 que codifica o polipeptídeo da SEQ ID NO:7), LYPD5 (NM_182573, ácido nucleico das SEQ ID NOS:8 ou 9 que codifica o polipeptídeo da SEQ ID NO:10), LY6D (NM_003695, ácido nucleico da SEQ ID NO:11 que codifica o polipeptídeo da SEQ ID NO:12), LY6E (NMNM_002346, ácido nucleico da SEQ ID NO:13 que codifica o polipeptídeo da SEQ ID NO:14), LYPD2 (NM_205545, ácido nucleico da SEQ ID NO:15 que codifica o polipeptídeo da SEQ ID NO:16). Em modalidades, o polinucleotídeo de cada membro da família gênica LY6 descrito aqui compreende pelo menos 15, pelo menos 25, pelo menos 50, pelo menos 100, pelo menos 250, pelo menos 500, pelo menos 750, pelo menos 1000, pelo menos 1250, pelo menos 1500, pelo menos 1750, pelo menos 2000, ou pelo menos 2040 nucleotídeos contíguos das SEQ ID NOS:1, 3, 4, 6, 8, 9, 11, 13, 15, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 45, 47, 49, 51, 53, 55 ou 57, ou o polinucleotídeo membro da família gênica LY6 compreende as SEQ ID NOS:1, 3, 4, 6, 8, 9, 11, 13, 15, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 45, 47, 49, 51, 53, 55 ou 57. Em uma modalidade, um polinucleotídeo que se liga a um polinucleotídeo membro da família gênica LY6 (SEQ ID NOS:1, 3, 4, 6, 8, 9, 11, 13, 15, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 45, 47, 49, 51, 53, 55 ou 57), ou fragmento do mesmo, tem identidade de sequência de pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, pelo menos 99% ou de 100% com o polipeptídeo LY6 ou fragmento do mesmo. Em uma modalidade, o polipeptídeo membro da família gênica LY6 compre-

ende pelo menos 10, pelo menos 25, pelo menos 50, pelo menos 75, pelo menos 100, pelo menos 125, pelo menos 150, pelo menos 175, pelo menos 200, pelo menos 225, pelo menos 250, pelo menos 275, pelo menos 300, ou pelo menos 325 aminoácidos contíguos das SEQ ID NOs:2, 5, 7, 10, 12, 14, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 46, 48, 50, 52, 54, 56 ou 58, ou o polipeptídeo da família gênica LY6 compreende as SEQ ID NOs:2, 5, 7, 10, 12, 14, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 46, 48, 50, 52, 54, 56 ou 58).

Uma "sequência polipeptídica natural" de quaisquer dos membros da família gênica LY6 compreende um polipeptídeo que tem a mesma sequência de aminoácidos conforme o polipeptídeo membro da família gênica LY6 correspondente derivado da natureza. Tais sequências polipeptídicas de LY6 naturais podem ser isoladas da natureza ou podem ser produzidas por meios recombinantes ou sintéticos. O termo "sequência polipeptídica de LY6 natural" especificamente abrange formas truncadas ou secretadas do polipeptídeo LY6 específico que ocorrem naturalmente (por exemplo, uma sequência de domínio extracelular), formas de variantes que ocorrem naturalmente (por exemplo, formas de junção ("splicing") alternativa)) e as variantes alélicas do polipeptídeo que ocorrem naturalmente. Em um aspecto específico, a sequência natural dos polipeptídeos LY6 descritos aqui são polipeptídeos de sequência natural de tamanho total ou maduros correspondendo às sequências nas Figuras 1 a 7 e SEQ ID NOs:2, 5, 7, 10, 12, 14, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 46, 48, 50, 52, 54, 56 ou 58.

Como usado aqui, uma "variante polipeptídica de LY6" significa que um polipeptídeo LY6, preferencialmente formas biologicamente ativas do mesmo, como definido aqui, tendo identidade de sequência de aminoácido de pelo menos aproximadamente 80% com uma sequência polipeptídica LY6 de sequência natural de tamanho total, como descrito aqui, e formas variantes da mesma sem o peptídeo sinal, um domínio extracelular, ou qualquer outro fragmento de uma sequência polipeptídica de LY6 natural de tamanho total, tais como aquelas referenciadas aqui. Tais polipeptídeos variantes incluem, por exemplo, polipeptídeos em que um ou mais resíduos de aminoácidos são adicionados, ou deletados, no N- ou C- terminal da se-

quência de aminoácidos naturais de tamanho total. Em um aspecto específico, tais polipeptídeos variantes terão identidade de sequência de aminoácido de pelo menos aproximadamente 80%, alternativamente identidade de sequência de aminoácido de pelo menos aproximadamente 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%, a uma sequência polipeptídica de LY6 da sequência polipeptídica natural de tamanho total, como descrito aqui, e formas variantes dos mesmos sem um peptídeo sinal, um domínio extracelular, ou qualquer outro fragmento de uma sequência polipeptídica de LY6 natural de tamanho total, tal como aquelas descritas aqui.

"Porcentagem (%)" de identidade de sequência de aminoácido" com respeito a uma sequência polipeptídica de LY6 identificada aqui é definida como a porcentagem de resíduos de aminoácidos em uma sequência candidata que são idênticos aos resíduos de aminoácidos na sequência polipeptídica de LY6 específica, após alinhamento das sequências e introdução de lacunas, se necessário, para alcançar a identidade de sequência de porcentagem máxima, e não considerando qualquer substituição conservativa como parte da identidade de sequência. Alinhamento para objetivos de determinação da porcentagem de identidade de sequência de aminoácido pode ser realizado de vários modos que estão dentro do conhecimento na técnica, por exemplo, usando programa de computador disponível publicamente, tal como programa BLAST, BLAST 2, ALIGN ou Megalign (DNASTAR). Aqueles versados na técnica podem determinar parâmetros apropriados para mensurar o alinhamento, incluindo quaisquer algoritmos necessários para alcançar alinhamento máximo no tamanho total das sequências que são comparadas. Para os objetivos aqui, entretanto, os valores da % de identidade de sequência de aminoácidos são gerados usando programa de computador de comparação de sequência ALIGN-2, em que o código fonte completo para o programa ALIGN-2 é fornecido na Tabela 1 abaixo. O programa de computador de comparação de sequência ALIGN-2 foi criado pela Genentech, Inc. e o código fonte mostrado na Tabela 1 abaixo foi arquivado com a documentação do usuário no Escritório Americano de Direitos autorais, Washington

D.C., 20559, onde está registrado sob Registro Americano de Direitos Autorais Número TXU510087. O programa ALIGN-2 está publicamente disponível através de Genentech, Inc, South San Francisco, California ou pode ser compilado a partir do código fonte fornecido na Tabela 1 abaixo. O programa

5 ALIGN-2 deve ser compilado para uso em um sistema operacional UNIX, preferencialmente UNIX digital V4.0D. Todos os parâmetros de comparação de sequência são definidos pelo programa ALIGN-2 e não variam.

Como usado aqui "polinucleotídeo variante de LY6" ou "sequência de ácido nucleico variante de LY6" ou "gene LY6" referem-se a uma mo-

10 lécula de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo membro da família gênica LY6, preferencialmente a forma biologicamente ativa da mesma, como definido aqui, e que têm a identidade de sequência de ácido nucleico de pelo menos aproximadamente 80% com uma sequência de ácido de nucleotídeo que codifica uma sequência natural de tamanho total sequência polipeptídica

15 LY6 identificada aqui, ou qualquer outro fragmento da respectiva sequência polipeptídica LY6 de tamanho total como identificada aqui (tal como aqueles codificados por um ácido nucleico que representa somente uma porção da sequência de codificação completa de um polipeptídeo LY6 de de tamanho total). Ordinariamente, tais polinucleotídeos variantes terão identidade de

20 sequência de ácido nucleico de pelo menos aproximadamente 80%, alternativamente pelo menos aproximadamente identidade de sequência de ácido nucleico de 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% com uma sequência de ácido nucleico que codifica a respectiva sequência polipeptídica natural de ta-

25 manho total sequência polipeptídica de LY6 ou qualquer outro fragmento da respectiva sequência polipeptídica de LY6 de tamanho total identificada aqui. Tais polinucleotídeos variantes não abrangem a sequência nucleotídica natural.

Geralmente, tais polinucleotídeos variantes variam pelo menos

30 aproximadamente 50 nucleotídeos no tamanho da sequência polipeptídica natural, alternativamente a variação pode ser pelo menos aproximadamente 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135,

140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990 ou 1000 nucleotídeos no tamanho, em que neste contexto o termo "aproximadamente" significa o tamanho de sequência nucleotídica referida mais ou menos 10% daquele tamanho referido.

10 "Porcentagem (%) de identidade de sequência de ácido nucleico" com respeito a uma sequência de ácido nucleico de codificação do polipeptídeo do gene LY6 identificada aqui é definida como a porcentagem de nucleotídeos em uma sequência candidata que são idênticos aos nucleotídeos na sequência de ácido nucleico do gene LY6 de interesse, respectivamente, após alinhamento das sequências e introdução de lacunas, se necessário, para alcançar a máxima porcentagem de identidade de sequência. O alinhamento com objetivos de determinar a porcentagem de identidade de sequência de ácido nucleico pode ser realizado de várias maneiras que estão dentro do conhecimento na técnica, por exemplo, usando programa de computador disponível publicamente, tal como programa BLAST, BLAST-2, 20 ALIGN ou Megalign (DNASTAR). Para os objetivos aqui, entretanto, valores de % da identidade de sequência de ácidos nucleicos são gerados usando o programa de computador de comparação de sequência ALIGN-2, em que o código fonte completo do programa ALIGN-2 é fornecido na Tabela 1 abaixo.

25 O programa de computador ALIGN-2 de comparação de sequência foi criado por Genentech, Inc. e o código fonte mostrado na Tabela 1 abaixo foi arquivado com documentação do usuário no Escritório Americano de Direitos autorais, Washington D.C., 20559, onde está registrado sob o Número de Registro Americano de Direitos Autorais TXU510087. O programa ALIGN-2 está publicamente disponível através de Genentech, Inc, South San Francisco, 30 Califórnia ou pode ser compilado a partir do código fonte fornecido na Tabela 1 abaixo. Programa ALIGN-2 deve ser compilado para uso em um sistema

operacional UNIX, preferencialmente UNIX digital V4.0D. Todos os parâmetros de comparação de sequência são definidos por programa ALIGN-2 e não variam.

Em situações onde ALIGN-2 é empregado para comparações de
 5 sequência de ácidos nucleicos, a % de identidade de sequência de ácido nucleico de uma dada sequência de ácido nucleico C para a, com, ou contra uma dada sequência de ácido nucleico dada D (que pode alternativamente ser expressa como uma dada sequência de ácido nucleico C que tem ou compreende uma certa % de identidade de sequência de ácido nucleico a,
 10 com, ou contra uma dada sequência de ácido nucleico D) é calculada como se segue:

100 vezes a fração W/Z

onde W é o número de nucleotídeos classificados como combinações idênticas pelo programa de alinhamento de sequência ALIGN-2 naqueles programas de alinhamento de C e D, e onde Z é o número total de nucleotídeos em D. Será apreciado que onde o tamanho da sequência de ácido nucleico C não é igual ao tamanho da sequência de ácido nucleico D, a % de identidade de sequência de ácido nucleico de C para D não será igual à % de identidade de sequência de ácido nucleico de D para C. Como os exemplos de cálculos de % de identidade de sequência de ácidos nucleicos, as Tabelas 4 e
 20 5, demonstram como calcular a % de identidade de sequência de ácido nucleico da sequência de ácido nucleico designada "DNA de Comparação" para a sequência de ácido nucleico designado "REF-DNA", em que "REF-DNA" representa uma sequência de ácido nucleico de codificação do gene LY6
 25 hipotética de interesse, "DNA de Comparação" representa a sequência nucleotídica de uma molécula de ácido nucleico contra a qual a molécula de ácido nucleico "REF-DNA" de interesse está sendo comparada, e "N", "L" e "V" cada um representam nucleotídeos hipotéticos diferentes. A menos que especificamente afirmado de outra maneira, todos os valores de % de identidade de sequência de ácidos nucleicos usados aqui são obtidos como descrito no parágrafo imediatamente precedente usando programa de computador ALIGN-2.
 30

Em outras modalidades, polinucleotídeos variantes do gene LY6 são moléculas de ácido nucleico que codificam o polipeptídeo LY6, respectivamente, e que são capazes de hibridização, preferencialmente sob condições estridentes de hibridização e lavagem, a sequências nucleotídicas que
5 codificam um polipeptídeo LY6 de tamanho total, respectivamente, como descrito aqui. Tais polipeptídeos variantes podem ser aqueles que são codificados por tais polinucleotídeos variantes.

"Isolado", quando usado para descrever vários polipeptídeos LY6 descritos aqui, significa o polipeptídeo que foi identificado e separado
10 e/ou recuperado a partir de um componente de seu ambiente natural. Componentes contaminantes de seu ambiente natural são materiais que tipicamente interfeririam em usos diagnósticos ou terapêuticos do polipeptídeo e podem incluir enzimas, hormônios e outro solutos proteicos ou não-proteicos. Em modalidades preferenciais, tais polipeptídeos serão purificados
15 dos (1) a um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos da sequência de aminoácidos interna ou N-terminal pelo uso de um sequenciador de copo giratório, ou (2) para homogeneidade por SDS-PAGE sob condições não-redutoras ou redutoras usando coloração por azul de Coomassie ou, preferencialmente, prata. Tais polipeptídeos isolados incluem os polipeptí-
20 deos correspondentes *in situ* nas células recombinantes, uma vez que pelo menos um componente do polipeptídeo LY6 a partir de seu ambiente natural não estará presente. Geralmente, entretanto, tais polipeptídeos isolados serão preparados por pelo menos uma etapa de purificação.

Um ácido nucleico LY6 "isolado" que codifica o polipeptídeo é
25 uma molécula de ácido nucleico que é identificada e separada de pelo menos uma molécula de ácido nucleico contaminante com a qual está geralmente associada na fonte natural do ácido nucleico que codifica o polipeptídeo. Qualquer uma das moléculas de ácido nucleico isolada acima é diferente da forma ou configuração em que é encontrada na natureza. Quaisquer
30 moléculas de ácido nucleico, por isso, são distintas da molécula de ácido nucleico específica que codifica o polipeptídeo como existe em células naturais.

O termo "sequências controle" refere-se a sequências de DNA necessárias para a expressão de uma sequência de codificação operacionalmente ligada em um determinado organismo hospedeiro. As sequências de controle que são adequadas para procariontes, por exemplo, incluem um
 5 promotor, opcionalmente uma sequência operadora, e um sítio de ligação ribossomal. Células eucarióticas são conhecidas por utilizar promotores, sinais de poliadenilação, e potencializadores.

O ácido nucleico está "operacionalmente ligado" quando é colocado em uma relação funcional com outra sequência de ácido nucleico. Por
 10 exemplo, DNA de uma pré-sequência ou líder secretório está operacionalmente ligado ao DNA de um polipeptídeo se for expresso como uma pré-proteína que participa na secreção do polipeptídeo; um promotor ou potencializador está operacionalmente ligado a uma sequência de codificação se afeta a transcrição da sequência; ou um sítio de ligação ribossomal está o-
 15 peracionalmente ligado a uma sequência de codificação se estiver posicionada para facilitar a tradução. Geralmente, "operacionalmente ligado" significa que as sequências de DNA que são ligadas são contíguas, e, no caso de um líder secretório, contíguas e na fase de leitura. Entretanto, potencializadores não têm que ser contíguos. A ligação é efetuada pela ligação a sítios
 20 de restrição convenientes. Se tais sítios não existem, os adaptadores de oligonucleotídeo sintéticos ou ligadores são usados conforme a prática convencional.

Como usada aqui, "expressão" quando aplicada à expressão gênica, refere-se à transcrição de um gene que codifica uma proteína para
 25 produzir mRNA bem como a tradução do mRNA para produzir a proteína codificada pelo gene. Dessa maneira, expressão aumentada ou reduzida refere-se à transcrição aumentada ou reduzida de um gene e/ou tradução aumentada ou reduzida de mRNA resultante da transcrição.

"Estringência" das reações de hibridização é prontamente de-
 30 terminável por um versado ordinário na técnica, e geralmente é um cálculo empírico dependente do tamanho de sonda, temperatura de lavagem e concentração de sal. Em geral, sondas mais longas requerem temperaturas

maiores para anelamento adequado, enquanto sondas menores requerem menores temperaturas. A hibridização geralmente depende da capacidade do DNA desnaturado reanelar quando as fitas complementares estão presentes em um ambiente abaixo de sua temperatura de fusão. Quanto maior o grau de homologia desejada entre a sonda e a sequência hibridizável, maior temperatura relativa que pode ser usada. Como resultado, daí resulta que as temperaturas relativas mais altas tenderiam a fazer as condições de reação mais estrigentes, enquanto menores temperaturas menos ainda. Para detalhes e explicação adicionais da estringência das reações de hibridização, vide Ausubel *et al.* Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

"Condições estrigentes" ou "condições de alta estringência", como definido aqui, podem ser identificadas por aquelas que: (1) empregam baixa força iônica e alta temperatura da lavagem, por exemplo, cloreto de sódio a 0,015 M/citrato de sódio a 0,0015 M/dodecil sulfato de sódio a 0,1% a 50 EC; (2) empregam durante a hibridização 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 a 50mM em pH 6,5 com cloreto de sódio a 750 mM, citrato de sódio a 75 mM a 42EC; ou (3) hibridização durante a noite em uma solução que emprega formamida a 50%, SSC 5x (NaCl a 0,75 M, citrato de sódio a 0,075 M), fosfato de sódio a 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sódio a 0,1%, solução de Denhardt 5x, DNA de esperma de salmão sonificado (50 µg/ml), SDS a 0,1% e sulfato de dextrana a 10% em 42EC, com uma lavagem de 10 minutos a 42EC em SSC 0,2 x (cloreto de sódio/citrato de sódio) seguida por lavagem de alta estringência por 10 minutos consistindo em SSC 0,1 x contendo EDTA a 55EC.

"Condições moderadamente estrigentes" podem ser identificadas como descrito por Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e inclui o uso de solução de lavagem e condições de hibridização (por exemplo, temperatura, força iônica e % de SDS) menos estrigentes que os descritos acima. Um exem-

plo de condições moderadamente estridentes é a incubação durante a noite a 37EC em uma solução compreendendo: formamida a 20%, SSC 5 x (NaCl a 150 mM, citrato trissódico a 15 mM), fosfato de sódio a 50 mM (pH 7,6), solução de Denhardt 5 x, sulfato de dextrana a 10%, e 20 mg/ml de DNA de
 5 esperma de salmão desnaturado cortado, seguido por lavagem dos filtros em SSC 1 x a aproximadamente 37 a 50EC. O versado ordinariamente reconhecerá como ajustar a temperatura, força iônica, *etc.* segundo a necessidade de acomodar fatores, tais como tamanho de sonda e similares.

O termo "epitopo marcado" quando usado aqui refere-se a um
 10 polipeptídeo quimérico compreendendo um polipeptídeo LY6, ou agente de ligação a polipeptídeo LY6 fusionado "a um polipeptídeo de marcação". O polipeptídeo de marcação tem resíduos suficientes para fornecer um epitopo contra o qual um anticorpo pode ser feito, ainda é bastante curto tal que não interfere na atividade do polipeptídeo ao qual está fusionado. O polipeptídeo
 15 de marcação preferencialmente também é suficientemente único de forma que que anticorpo não reaja cruzadamente substancialmente com outros epitopos. Polipeptídeos de marcação adequados geralmente têm pelo menos seis resíduos de aminoácidos e normalmente entre aproximadamente 8 e 50 resíduos de aminoácidos (preferencialmente, entre aproximadamente
 20 10 e 20 resíduos de aminoácidos).

"Ativo" ou "atividade" para os objetivos aqui refere-se à forma(s) de polipeptídeos que conservam uma atividade biológica e/ou imunológica do polipeptídeo natural ou que ocorre naturalmente, em que a atividade "biológica" refere-se a uma função biológica (inibitória ou estimulatória) causada
 25 por um polipeptídeo natural ou que ocorre naturalmente diferente da capacidade de induzir a produção de um anticorpo contra um epitopo antigênico possuída por um polipeptídeo natural ou que ocorre naturalmente, e uma atividade "imunológica" refere-se à capacidade de induzir a produção de um anticorpo contra um epitopo antigênico possuído por um polipeptídeo natural
 30 ou que ocorre naturalmente. Um polipeptídeo ativo, como usado aqui, é um antígeno que é diferencialmente expresso, de uma perspectiva qualitativa ou quantitativa, em tecido de IBD, em relação à sua expressão em tecido similar

que não está afligido por IBD.

O termo "antagonista" é usado no sentido mais amplo, e inclui qualquer molécula que bloqueia, inibe ou neutraliza parcialmente ou totalmente uma atividade biológica de um polipeptídeo natural descrito aqui. Moléculas antagonistas adequadas incluem especificamente anticorpos de ou fragmentos de anticorpos antagonistas, fragmentos ou sequências de aminoácidos variantes de polipeptídeos naturais, peptídeos, oligonucleotídeos antissenso, pequenas moléculas orgânicas, etc. Métodos para identificação de antagonistas podem compreender contato de um polipeptídeo, incluindo uma célula que o expressa, com um agonista candidato ou molécula antagonista e mensuração de uma modificação detectável em uma ou mais atividades biológicas normalmente associadas com tal polipeptídeo.

"Tratar" ou "tratamento" ou "alívio" refere-se a ambas medidas de tratamento terapêutico e profilático ou preventivo, em que o objetivo é prevenir ou diminuir a velocidade (moderar) a progressão de uma doença. Tratamento também pode referir-se à modificação da progressão de uma IBD.

"Diagnosticar" refere-se ao processo de identificação ou determinação das características distintas de uma doença incluindo, sem limitação, IBD, UC e/ou Doença de Crohn. O processo de diagnóstico muitas vezes também é expresso como estadiamento ou classificação da doença com base na gravidade ou progressão da doença bem como na posição (tal como, por exemplo, posição dentro de ou ao longo do trato gastrointestinal no qual a inflamação e/ou expressão gênica alterada é encontrada).

Indivíduos em necessidade de diagnóstico incluem aqueles que já sofrem com expressão aberrante de LY6 bem como aqueles propensos a ter ou aqueles em que a expressão aberrante de LY6 deve ser prevenida. Consequentemente, um aspecto da invenção é a detecção de uma resposta terapêutica a fármaco em um mamífero tratado com um agente terapêutico para o tratamento de IBD, em que o método compreende determinação da expressão de lh LY6 no tecido gastrointestinal de um mamífero de teste em relação a um de controle e a determinação daqueles níveis de expressão de

LY6 são não significativamente diferentes dos níveis de expressão normais do controle. Em uma modalidade, uma resposta terapêutica é determinada quando os níveis de expressão de LY6 do mamífero tratado com um agente terapêutico são diferentes (expressão é mais similar ao controle normal, isto é, os níveis de expressão de LY6 são menores que os níveis de expressão de LY6 no mamífero antes do tratamento).

Os parâmetros acima para avaliação do tratamento bem-sucedido e melhora na doença são prontamente mensuráveis por procedimentos de rotina familiares a um médico. Para a terapia de IBD, a eficácia pode ser medida, por exemplo, pela avaliação do tempo de progressão da doença (TTP) e/ou determinação da taxa de resposta (RR). Biópsias podem ser feitas para avaliar a expressão gênica e observar a histopatologia do tecido gastrointestinal do paciente. A invenção descrita aqui relativa ao processo de prognóstico e/ou diagnóstico envolve a determinação e a avaliação da regulação para cima da expressão gênica de LY6.

"Mamífero" ou "indivíduo mamífero" para objetivos de tratamento, alívio dos sintomas ou diagnóstico de uma IBD referem-se a qualquer animal classificado como um mamífero, incluindo seres humanos, animais domésticos e de fazenda, e animais de zoológico, esportes ou estimação, tais como cães, gatos, gado, cavalos, ovelhas, porcos, cabras, coelhos, furões, etc. Preferencialmente, o mamífero é ser humano.

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

"Veículos" como usado aqui incluem veículos, excipientes ou estabilizadores farmacêuticamente aceitáveis que são não-tóxicos para célula ou mamífero que é exposto a eles nas dosagens e concentrações empregadas. Muitas vezes, o veículo fisiologicamente aceitável é uma solução aquosa de pH tamponado. Exemplos de veículos fisiologicamente aceitáveis incluem tampões, tais como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico; polipeptídeo de baixo peso molecular (menos de aproximadamente 10 resíduos); proteínas, tais como albumina

sérica, gelatina, ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tais como glicina, glutamina, asparagina, arginina ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos incluindo glicose, manose, ou dextrinas; agentes quelantes, tais como EDTA; álcoois de açúcar, tais como manitol ou sorbitol; contraíons formadores de sal, tais como sódio; e/ou tensoativos não-iônicos, tais como TWEEN7, polietileno glicol (PEG), e PLURONICS7.

Por "fase sólida" ou "suporte sólido" é indicada uma matriz não-aquosa à qual um polipeptídeo, ácido nucleico, anticorpo ou agente de ligação a LY6 pode se aderir ou ligar. Exemplos de fases sólidas abrangidas aqui incluem aquelas formadas parcialmente ou inteiramente de vidro (por exemplo, vidro de poro controlado), polissacarídeos (por exemplo, agarose), poliacrilamidas, poliestireno, álcool polivinílico e silicones. Em certas modalidades, dependendo do contexto, a fase sólida pode compreender o poço de uma placa de ensaio; em outros é uma coluna de purificação (por exemplo, uma coluna de cromatografia por afinidade). Este termo também inclui uma fase sólida descontínua de partículas discretas, tais como aquelas descritas na Patente Norte-americana Número 4.275.149.

Um "lipossoma" é uma pequena vesícula composta de vários tipos de lipídios, fosfolipídios e/ou tensoativo que é útil para a entrega de um fármaco a um mamífero. Os componentes do lipossoma são comumente arranjados em uma formação de bicamada, similar ao arranjo lipídico de membranas biológicas.

Uma "pequena molécula" ou "pequena molécula orgânica" é definida aqui tendo um peso molecular abaixo de aproximadamente 500 Dáltons.

Uma "quantidade eficaz" de um agente antagonista é uma quantidade suficiente para ocasionar um efeito fisiológico, tal como sem limitação para inibir, parcialmente ou inteiramente, a função do gene ou sua proteína codificada. Uma "quantidade eficaz" pode ser determinada empiricamente e de uma maneira rotineira, em relação a este objetivo.

O termo "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a um

antagonista ou outro fármaco eficaz para "tratar" uma doença ou distúrbio em um indivíduo ou mamífero. No caso de IBD, a quantidade terapeuticamente eficaz do fármaco restituirá a expressão aberrante de LY6 a níveis fisiológicos normais; reduzirá a inflamação gastrointestinal; reduzirá o número de lesões gastrointestinais; e/ou aliviará até certo ponto um ou mais dos sintomas associados com IBD, UC e/ou CD. Ver definição aqui de "tratamento".

Uma "quantidade inibitória de crescimento" de um antagonista é uma quantidade capaz de inibir o crescimento de uma célula, especialmente tumor, por exemplo, célula de câncer, *in vitro* ou *in vivo*. Para objetivos de inibir o crescimento de célula neoplásica, tal quantidade pode ser determinada empiricamente e de uma maneira rotineira.

Uma "quantidade citotóxica" de um antagonista é uma quantidade capaz de causar a destruição de uma célula, especialmente uma célula proliferativa, por exemplo, célula de câncer, *in vitro* ou *in vivo*. Para objetivos de inibição do crescimento celular neoplásico pode ser determinada empiricamente e de uma maneira rotineira.

O termo "anticorpo" é usado no sentido mais amplo e especificamente cobre, por exemplo, anticorpos monoclonais antiLY6 (incluindo anticorpos antagonista e de neutralização), composições de anticorpo antiLY6 com especificidade poliepitópica, anticorpos policlonais, anticorpos de cadeia única antiLY6, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, biespecíficos) e fragmentos de ligação a antígeno (veja abaixo) de todos os anticorpos acima listados enquanto exibem a atividade biológica ou imunológica desejada. O termo "imunoglobulina" (Ig) é usado intercambiavelmente com o anticorpo aqui.

Um anticorpo "isolado" é aquele que foi identificado e separado e/ou recuperado a partir de um componente de seu ambiente natural. Componentes contaminantes de seu ambiente natural são materiais que interfeririam em usos diagnósticos ou terapêuticos para o anticorpo, e podem incluir enzimas, hormônios, e outro solutos proteicos ou não-proteicos. Em modalidades preferenciais, o anticorpo será purificado (1) para o maior que 95%

por peso do anticorpo como determinado pelo método de Lowry, e ainda mais preferencialmente mais de 99% por peso, (2) a um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos da sequência de aminoácido N-terminal ou interna pelo uso de um sequenciador de copo giratório, ou (3) à homogeneidade por SDS-PAGE sob condições redutoras ou não-redutoras usando coloração por azul de Coomassie ou, preferencialmente, prata. O anticorpo isolado inclui o anticorpo *in situ* em células recombinantes uma vez que pelo menos um componente do ambiente natural do anticorpo não estará presente. Geralmente, entretanto, o anticorpo isolado será preparado por pelo menos uma etapa de purificação.

A unidade de anticorpo de 4 cadeias básicas é uma glicoproteína heterotetramérica composta de duas cadeias leves idênticas (L) e duas cadeias pesadas idênticas (H) (um anticorpo IgM é composto de 5 unidades heterotetraméricas básicas junto com um polipeptídeo adicional chamado cadeia J, e por isso contém 10 sítios de ligação a antígeno, enquanto anticorpos IgA secretados podem polimerizar para formar junções polivalentes compreendendo de 2 a 5 das unidades de 4 cadeias básicas junto com a cadeia J). No caso de IgGs, a unidade de 4 cadeias é geralmente de aproximadamente 150.000 daltons. Cada cadeia L é ligada a uma cadeia H por uma ligação covalente dissulfeto, enquanto duas cadeias H são ligadas uma à outra por uma ou mais ligações dissulfeto dependendo do isotipo da cadeia H. Cada cadeia H e L também têm pontes dissulfeto intracadeia regularmente espaçadas. Cada cadeia H tem no N-terminal, um domínio variável (V_H) seguido por três domínios constantes (C_H) para cada uma das cadeias α e γ e quatro domínios C_H de isotipos μ e ϵ . Cada cadeia L tem no N-terminal, um domínio variável (V_L) seguido por um domínio constante (C_L) em sua outra extremidade. A V_L é alinhada com V_H e C_L é alinhada com o primeiro domínio constante da cadeia pesada (C_H1). Acredita-se que determinados resíduos de aminoácidos formam uma interface entre domínios variáveis da cadeia leve e cadeia pesada. A junção de uma V_H e V_L em conjunto forma um sítio de ligação a antígeno único. Para a estrutura e propriedades das classes diferentes de anticorpos, ver, por exemplo, *Basic and Clinical*

cal Immunology, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 e Capítulo 6.

A cadeia L de qualquer espécie vertebrada pode ser destinada a um dos dois tipos claramente distintos, chamados kappa e lambda, com base nas sequências de aminoácidos de seus domínios constantes. Dependendo da sequência de aminoácidos do domínio constante de suas cadeias pesadas (C_H), as imunoglobulinas podem ser destinadas a classes ou isotipos diferentes. Há cinco classes de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, tendo as cadeias pesadas designadas α , δ , ϵ , γ , e μ , respectivamente. As classes γ e α são ainda divididas em subclasses com base em diferenças relativamente menores na sequência C_H e função, por exemplo, seres humanos expressam as seguintes subclasses: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

O termo "variável" refere-se ao fato que certos segmentos dos domínios variáveis se diferenciam extensivamente na sequência entre anticorpos. O domínio V medeia a ligação a antígeno e define a especificidade de um anticorpo particular por seu antígeno particular. Entretanto, a variabilidade não é exatamente distribuída através de aproximadamente 110 aminoácidos de extensão dos domínios variáveis. Em vez disso, as regiões V consistem em intervalos relativamente invariáveis chamados regiões conservadas (FRs) de 15 a 30 aminoácidos separados por regiões mais curtas de extrema variabilidade chamadas "regiões hipervariáveis" que são cada uma de comprimento de 9 a 12 aminoácidos. Os domínios variáveis das cadeias pesadas e leves naturais cada uma compreende quatro FRs, basicamente adotando uma configuração de folha β , conectada por três regiões hipervariáveis, que formam alças de conexão, e em alguns casos que fazem parte da estrutura da folha β . As regiões hipervariáveis em cada cadeia são mantidas próximas pelas FRs e, com as regiões hipervariáveis de outra cadeia, contribuem para a formação do sítio de ligação a antígeno de anticorpos (vide Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Os do-

mínios constantes não estão envolvidos diretamente na ligação de um anticorpo a um antígeno, mas exibem várias funções efetoras, tais como a participação do anticorpo na citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC).

5 O termo "região hipervariável" quando usado aqui refere-se aos resíduos de aminoácidos de um anticorpo que são responsáveis pela ligação ao antígeno. A região hipervariável geralmente compreende resíduos de aminoácidos de uma "região de determinação de complementaridade" ou "C-DR" (por exemplo, por volta de aproximadamente 24 a 34 resíduos Kabat
10 (L1), 50 a 56 (L2) e 89 a 97 (L3) no V_L, e por volta de aproximadamente 31 a 35B resíduos Kabat (H1), 50 a 65 (H2) e 95 a 102 (H3) no V_H (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) e/ou aqueles resíduos "de uma alça hipervariável" (por exemplo, por volta de aproximadamente
15 26 a 32 resíduos Chothia (L1), 50 a 52 (L2) e 91 a 96 (L3) na V_L, e 26 a 32 (H1), 52A a 55 (H2) e 96 a 101 (H3) na V_H (Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))).

O termo "anticorpo monoclonal" como usado aqui refere-se a um anticorpo a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, isto é, os anticorpos individuais compreendendo a população são
20 idênticos e/ou ligam-se ao mesmo epitopo(s), exceto por possíveis variantes que podem surgir durante a produção do anticorpo monoclonal, tais variantes geralmente estão presentes em menores quantidades. Tal anticorpo monoclonal inclui tipicamente um anticorpo compreendendo uma sequência
25 polipeptídica que se liga a um alvo, em que a sequência polipeptídica de ligação ao alvo foi obtida por um processo que inclui a seleção de uma sequência polipeptídica de ligação ao alvo único de uma pluralidade de sequências polipeptídicas. Por exemplo, o processo de seleção pode ser a seleção de um único clone a partir de uma pluralidade de clones, tal como um
30 agrupamento de clones de hibridoma, clones de fago ou clones de DNA recombinante. Deve ser entendido que a sequência de ligação ao alvo selecionado pode ser ainda alterada, por exemplo, para melhorar a afinidade

pelo alvo, para humanizar sequência de ligação ao alvo, para melhorar sua produção em cultura celular, para reduzir sua imunogenicidade *in vivo*, para criar um anticorpo multiespecífico, *etc.*, e que um anticorpo compreendendo a sequência de ligação ao alvo alterada é também um anticorpo monoclonal desta invenção. Em contraste a preparações de anticorpo policlonais que tipicamente incluem diferentes anticorpos direcionados contra diferentes determinantes (epitopos), cada anticorpo monoclonal de uma preparação de anticorpo monoclonal é direcionado contra um único determinante em um antígeno. Além de sua especificidade, as preparações de anticorpo monoclonal são vantajosas em que são tipicamente não contaminadas por outras imunoglobulinas. O modificador "monoclonal" indica o caráter do anticorpo como sendo obtido a partir de uma população substancialmente homogênea de anticorpos, e não deve ser interpretado como requerimento da produção do anticorpo por nenhum método particular. Por exemplo, os anticorpos monoclonais usados de acordo com a presente invenção podem ser feitos por uma variedade de técnicas, incluindo, por exemplo, o método de hibridoma (por exemplo, Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975); Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Press, 2nd ed. 1988); Hammerling *et al.*, em: *Monoclonal Antibodies e T-cell Hybridomas* 563-681, (Elsevier, N.Y., 1981)), métodos de DNA recombinante (vide, por exemplo, Patente Norte-americana Número 4.816.567), tecnologias de exposição de fago (vide, por exemplo, Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338 (2):299-310 (2004); Lee *et al.* *J. Mol. Biol.* 340 (5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101 (34):12467-12472 (2004); e Lee *et al.* *J. Immunol. Methods* 284 (1-2):119-132 (2004), e tecnologias para produção de anticorpos humanos ou similares a humanos em animais que têm partes ou todos os loci da imunoglobulina humana ou genes que codificam sequências de imunoglobulina humana (vide, por exemplo, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); Patentes U.S. Números

5.545.806; 5.569.825; 5.591.669 (todos da GenPharm); 5.545.807; WO 1997/17852; Patentes U.S. Números 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; e 5.661.016; Marks *et al.*, Bio/Technology, 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, Nature, 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature, 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, Nature Biotechnology, 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology, 14: 826 (1996); e Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol., 13: 65-93 (1995).

Anticorpos "quiméricos" (imunoglobulinas) têm uma porção da cadeia pesada e/ou leve idêntica ou homóloga a sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma determinada espécie ou pertencendo a uma determinada classe ou subclasse de anticorpo, enquanto o resto da cadeia(s) é idêntico ou homólogo a sequências correspondentes em anticorpos derivados de outras espécies ou pertencendo a outra classe ou subclasse de anticorpo, bem como fragmentos de tais anticorpos, contanto que exibam a atividade biológica desejada (Patente Norte-americana Número 4.816.567; e Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)). Anticorpo humanizado como usado aqui é um subconjunto de anticorpos quiméricos.

Formas "humanizadas" de anticorpos não-humanos (por exemplo, murino) são anticorpos quiméricos que contêm a sequência mínima derivada da imunoglobulina não-humana. Em sua maioria, anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo recipiente ou aceptor) em que os resíduos da região hipervariável do recipiente são substituídos por resíduos da região hipervariável de uma espécie não-humana (anticorpo doador), tais como camundongo, rato, coelho ou primata não-humano tendo a especificidade, afinidade, e capacidade desejadas. Em alguns exemplos, os resíduos da estrutura de Fv (FR) da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não-humanos correspondentes. Além disso, anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo recipiente ou no anticorpo doador. Estas modificações são feitas para refinamento adicional do desempenho do anticorpo, tal como afinidade de ligação. Geralmente, o anticorpo humanizado compreenderá substanci-

almente todos de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, nos quais todas ou substancialmente todas as alças hipervariáveis correspondem àquelas de uma imunoglobulina não-humana e todas ou substancialmente todas as regiões conservadas são aquelas de uma sequência de imunoglobulina humana embora as regiões conservadas possam incluir uma ou mais substituições de aminoácidos que melhoram a afinidade de ligação. O número destas substituições de aminoácidos na estrutura é tipicamente não mais do que 6 na cadeia H, e na cadeia L, não mais do que 3. O anticorpo humanizado opcionalmente também compreenderá pelo menos uma porção de uma região constante da imunoglobulina (Fc), tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana. Para detalhes adicionais, vide Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Reichmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

"Fragmentos de anticorpo" compreendem uma porção de um anticorpo intacto, preferencialmente a região de ligação a antígeno ou variável do anticorpo intacto. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem Fab, Fab', F(ab')₂, e fragmentos Fv; diácorpos; anticorpos lineares (vide Patente Norte-americana Número 5.641.870, Exemplo 2; Zapata *et al.*, *Protein Eng.* 8 (10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticorpo de cadeia única; e anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpo.

A digestão por papaína de anticorpos produz dois fragmentos de ligação a antígeno idêntico, chamados fragmentos "Fab", e um fragmento "Fc" residual, uma designação que reflete a capacidade de cristalizar-se prontamente. O fragmento Fab consiste em uma cadeia L inteira junto com o domínio de região variável da cadeia H (VH), e o primeiro domínio constante de uma cadeia pesada (C_H1). Cada fragmento Fab é monovalente com respeito à ligação ao antígeno, isto é, tem um sítio de ligação único ao antígeno. O tratamento por pepsina de um anticorpo produz um grande fragmento F(ab')₂ único que a grosso modo corresponde a dois fragmentos Fab ligados por dissulfeto que têm atividade divalente de ligação ao antígeno e é ainda capaz de ligação cruzada com antígeno. Fragmentos Fab' diferenciam-se de fragmentos Fab por terem poucos resíduos adicionais no terminal

carbóxi do domínio C_{H1} incluindo uma ou mais cisteínas da região de dobra-
 diça do anticorpo. Fab'-SH é a designação aqui de Fab' em que o resíduo(s)
 de cisteína dos domínios constantes carregam um grupo tiol livre. Fragmentos
 de anticorpo $F(ab')_2$ originalmente foram produzidos como pares de
 5 fragmentos Fab' que têm cisteínas de dobradiça entre eles. Outras ligações
 químicas de fragmentos de anticorpo também são conhecidas.

O fragmento Fc compreende as porções carbóxi-terminais de
 ambas cadeias H mantidas juntas por dissulfetos. As funções efetoras de
 anticorpos são determinadas por sequências na região Fc, região a qual
 10 também é parte reconhecida pelos receptores de Fc (FcR) encontrados em
 certos tipos de células.

"Fv" é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um sítio
 completo de reconhecimento e de ligação ao antígeno. Este fragmento con-
 sistem em um dímero e de um domínio de região variável da cadeia leve e
 15 pesada em associação estreita, não-covalente. A partir da dobra destes dois
 domínios originam-se seis alças hipervariáveis (3 alças cada uma da cadeia
 H e L) que contribuem com os resíduos de aminoácidos para ligação ao an-
 tígeno e conferem especificidade de ligação ao antígeno para o anticorpo.
 Entretanto, até um domínio variável único (ou porção de um Fv compreen-
 20 dendo somente três CDRs específicas para um antígeno) tem a capacidade
 de reconhecer e ligar-se ao antígeno, embora em uma menor afinidade do
 que o sítio de ligação inteiro.

"Cadeia única Fv" também abreviada como "sFv" ou "scFv" são
 fragmentos de anticorpo que compreendem os domínios de anticorpo V_H e
 25 V_L conectados em uma cadeia polipeptídica única. Preferencialmente, o po-
 lipeptídeo sFv compreende ainda um ligador polipeptídico entre os domínios
 V_H e V_L que permite ao sFv formar a estrutura desejada para ligação ao an-
 tígeno. Para uma revisão de sFv, vide Pluckthun *em The Pharmacology of*
Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-
 30 Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, *infra*.

Como usado aqui "polipeptídeo de ligação a LY6" é um oligopep-
 tídeo que se liga, preferencialmente especificamente, a um polipeptídeo li-

gante ou componente de sinalização LY6, respectivamente, ou uma porção de ligação a LY6 ou fragmento do mesmo. Tais oligopeptídeos podem ser quimicamente sintetizados usando metodologia de síntese de oligopeptídeo conhecida ou podem ser preparados e purificados usando tecnologia recombinante. Tais oligopeptídeos são normalmente de pelo menos aproximadamente 5 aminoácidos em tamanho, alternativamente pelo menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, ou 100 aminoácidos em tamanho ou mais. Tais oligopeptídeos podem ser identificados sem experimentação indevida usando técnicas bem-conhecidas. Neste sentido, é observado que as técnicas para selecionar bibliotecas de oligopeptídeos que são capazes de ligação especificamente a um polipeptídeo-alvo são bem-conhecidas na técnica (vide, por exemplo, Patente Norte-americana Número 5.556.762, 5.750.373, 4.708.871, 4.833.092, 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689, 5.663.143; Publicação PCT Números WO 84/03506 e WO84/03564; Geysen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984); Geysen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985); Geysen *et al.*, em Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen *et al.*, J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987); Schoofs *et al.*, J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirla, S. E. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378 (1990); Lowman, H.B. *et al.* Biochemistry, 30:10832 (1991); Clackson, T. *et al.* Nature, 352: 624 (1991); Marks, J. D. *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581 (1991); Kang, A.S. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363 (1991), e Smith, G. P., Current Opin. Biotechnol., 2:668 (1991).

Um antagonista de LY6 (por exemplo, anticorpo, polipeptídeo, oligopeptídeo ou pequena molécula) "que se liga" a um antígeno-alvo de interesse, por exemplo, LY6 é aquele que se liga ao alvo com afinidade suficiente para ser um agente diagnóstico, prognóstico e/ou terapêutico útil no direcionamento a uma célula ou tecido expressando antígeno, e não reage

cruzadamente significativamente com outras proteínas. A extensão de ligação a um marcador polipeptídico não desejado será menos de aproximadamente 10% da ligação ao determinado alvo desejado, como determinável por técnicas comuns, tais como análise por sorteamento de células com fluorescência ativada (FACS) ou radioimunoprecipitação (RIA).

Além disso, o termo "ligação específica" ou "liga-se especificamente a" ou é "específico para" um determinado polipeptídeo LY6 ou um epitopo em um determinado polipeptídeo-LY6 alvo significa ligação que é mensuravelmente diferente de uma interação não-específica. A ligação específica pode ser medida, por exemplo, pela determinação da ligação de uma molécula comparada com a ligação de uma molécula controle, que geralmente é uma molécula de estrutura similar que não tem atividade de ligação. Por exemplo, ligação específica pode ser determinada pela competição com uma molécula controle que é similar ao alvo, por exemplo, um excesso de alvo não-marcado. Neste caso, a ligação específica é indicada se a ligação do alvo marcado a uma sonda for competitivamente inibida pelo excesso de alvo não-marcado. Em uma modalidade, tais termos referem-se à ligação onde uma molécula se liga a um polipeptídeo ou epitopo particular em um determinado polipeptídeo sem ligar-se substancialmente a qualquer outro polipeptídeo ou epitopo polipeptídico. Alternativamente, tais termos podem ser descritos por uma molécula tendo um Kd para o alvo de pelo menos aproximadamente 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M, ou maior.

Uma célula ou tecido gastrointestinal que "superexpressa" LY6 se aquela célula ou tecido mostra ter ácido nucleico de codificação de LY6 aumentado em células ou se aquela célula ou tecido superproduzem e secretam a proteína LY6, comparado a uma célula gastrointestinal normal ou tecido do mesmo tipo tecidual. Tal superexpressão pode resultar de amplificação gênica ou pela transcrição ou tradução aumentadas. São conhecidos vários ensaios diagnósticos ou prognósticos que medem níveis de expressão alterados resultando em níveis aumentados ou reduzidos na superfície celular ou níveis aumentados ou reduzidos da proteína secretada e incluem

sem limitação, ensaio imuno-histoquímico usando anticorpos antiLY6, análise por FACS, etc. Alternativamente, os níveis de ácido nucleico de codificação de LY6 ou mRNA podem ser medidos na célula, por exemplo, através de hibridização *in situ* fluorescente usando uma sonda baseada em ácido nucleico correspondendo a um ácido nucleico de codificação de LY6 ou complemento do mesmo; (FISH; vide WO98/45479 publicado em outubro de 1998), técnicas de Southern blotting, Northern blotting ou reação da polimerase em cadeia (PCR), tais como PCR quantitativa em tempo real (RT-PCR). Alternativamente, a superexpressão de polipeptídeo LY6 é determinável pela mensuração do antígeno presente em um fluido biológico, tal como soro, por exemplo, usando ensaios baseados em anticorpo (vide também, por exemplo, Patente Norte-americana Número 4.933.294 emitida em 12 de junho de 1990; WO91/05264 publicado em 18 de abril de 1991; Patente Norte-americana Número 5.401.638 emitida em 28 de março de 1995; e Sias *et al.*, J. Immunol. Methods 132:73-80 (1990)). Além dos ensaios acima, vários ensaios *in vivo* estão disponíveis para o profissional versado. Por exemplo, ele pode expor células no corpo do paciente a um anticorpo que é opcionalmente marcado com um marcador detectável, por exemplo, um isótopo radioativo, e a ligação do anticorpo às células no paciente pode ser avaliada, por exemplo, pela varredura externa da radioatividade ou pela análise de uma biópsia tomada de um paciente anteriormente exposto ao agente terapêutico.

Como usado aqui, o termo "imunoadesina" indica moléculas similares a anticorpo que combinam a especificidade de ligação de uma proteína heteróloga (uma "adesina") com as funções efetoras de domínios constantes da imunoglobulina. Estruturalmente, as imunoadesinas compreendem uma fusão de uma sequência de aminoácidos com a especificidade de ligação desejada que é diferente do sítio de reconhecimento e ligação ao antígeno de um anticorpo (*isto é*, é "heterólogo"), e uma sequência do domínio constante da imunoglobulina. A parte adesina de uma molécula de imunoadesina tipicamente é uma sequência de aminoácido contígua compreendendo pelo menos o sítio de ligação de um receptor ou um ligante. A sequência

do domínio constante da imunoglobulina na imunoadesina pode ser obtida a partir de qualquer imunoglobulina, tal como subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3, ou IgG-4, IgA (incluindo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD ou IgM.

A palavra "marcador" quando usada aqui refere-se a um composto ou composição detectável que é conjugada diretamente ou indiretamente ao anticorpo, oligopeptídeo ou outra molécula orgânica para gerar um anticorpo, oligopeptídeo ou outra molécula orgânica "marcada". O marcador pode ser detectável por si mesmo (por exemplo, marcadores de radioisótopos ou marcadores fluorescentes) ou, em caso de um marcador enzimático, pode catalisar a alteração química de um composto ou composição de substrato que é detectável.

O termo "agente citotóxico" como usado aqui refere-se a uma substância que inibe ou previne a função de células e/ou causa destruição de células. O termo é destinado a incluir isótopos radioativos (por exemplo, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} e isótopos radioativos de Lu), agentes quimioterápicos, enzimas e fragmentos dos mesmos, tais como enzimas nucleolíticas, antibióticos e toxinas, tais como toxinas de moléculas pequenas ou toxinas enzimaticamente ativas de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, incluindo fragmentos e/ou variantes dos mesmos, e vários agentes antitumorais ou anticâncer descritos abaixo. Outros agentes citotóxicos são descritos abaixo. Um agente tumoricida causa destruição de células tumorais.

Um "agente quimioterápico" ou "agente terapêutico" é um composto químico útil no tratamento de um distúrbio ou doença. Exemplos de agentes quimioterápicos ou terapêuticos para o tratamento de IBD incluem sem limitação fármacos anti-inflamatórios sulfassalazina e ácido 5-aminossalicílico (5-ASA); metroidazol e ciprofloxacina são similares em eficácia a sulfassalazina e parecem ser particularmente úteis para o tratamento doença perianal; em casos mais severos, corticosteroides são eficazes no tratamento de exacerbações ativas e podem até manter a remissão; azatioprina, 6-mercaptopurina e metotrexato têm também mostrado êxito em pacientes que requerem administração crônica de corticoesteroides; fármacos

antidiarreicos podem também fornecer alívio sintomático em alguns pacientes; terapia nutricional ou dieta elementar podem melhorar a condição nutricional de pacientes e induzir melhora sintomática da doença aguda; antibióticos são usados no tratamento de crescimento excessivo secundário bacteriano no intestino delgado e no tratamento de complicações piogênicas. Agentes quimioterápicos para IBD incluem ainda agentes biológicos e outros como segue: anticorpos anti-beta7 (vide, por exemplo, WO2006026759), anticorpos anti-alfa4 (tais como ANTEGEN[®]), anticorpo anti-TNF (REMICADE[®]) ou compostos não-protéicos incluindo sem limitação os compostos de 5-ASA ASACOL[®], PENTASA[®], ROWASA[®], COLAZAL[®], e outros compostos, tais como Purinetol e esteroides, tais como prednisona. Exemplos de agentes quimioterápicos para tratamento de câncer incluem hidroxiureia taxanos (tal como paclitaxel e doxetaxel) e/ou antibióticos antraciclina; agentes alquilantes, tais como tiotepa e CYTOXAN7 ciclosfosfamida; alquil sulfonatos, tais como bussulfano, improssulfano e pipossulfano; aziridinas, tais como benzydopa, carboquona, meturedopa, e uredopa; etileniminas e metilamelaminas incluindo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida e trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina e bulatacinona); delta-9-tetra-hidrocanabinol (dronabinol, MARINOL7); betalapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; uma camptotequina (incluindo o análogo sintético topotecano (HYCAMTIN7), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR7), acetilcamptotequina, escopolectina, e 9-aminocamptotequina); briostatina; calistatina; CC 1065 (incluindo seus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina e bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; teniposídeo; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 e criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluindo os análogos sintéticos KW 2189 e CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; uma sarcodictina; espongistatina; mostardas nitrogenadas, tais como clorambucil, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreto de óxido de mecloretamina, melfalan, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, uracil mostarda; nitrosureias, tais como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina e ranimustina; antibióticos, tais como os antibióticos

enedina (por exemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gama II e caliqueamicina ômega II (vide, por exemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluindo dinemicina A; uma esperamicina; bem como neocarzinostatina cromófora e antibióticos cromóforos relacionados a cromoproteína enedina), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina ADRIAMICINA7 (incluindo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina e deoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, tal como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabólitos, tais como metotrexato e 5-fluorouracil (5-FU); análogos de ácido fólico, tais como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tais como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, tais como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, encitabina, floxuridina; andrógenos, tais como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenais, tais como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; repositor de ácido fólico, tal como ácido frolínico; aceglatona; glicosídeo de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracil; ansacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptínio; uma epotilona; etoglucide; nitrato de gálio; hidroxiiureia; lentinan; lonidainina; maitansinoides, tais como maitansina e ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazina; complexo polissacarídico PSK7 (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofiran; espirogermânio; ácido tenuazônico; triaziquona; 2,2',2''-triclortrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A e anguidina); uretana; vindesina (ELDISINA7, FILDESINA7); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol;

pipobromano; gacitosina; arabinosídeo ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por exemplo, TAXOL⁷ paclitaxel (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANETM livre de Cremophor, formulação de paclitaxel em nanopartícula projetada em albumina (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), e TAXOTERE⁷ doxetaxel (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); clorambucil; gencitabina (GEMZAR⁷); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platina, tais como cisplatina e carboplatina; vinblastina (VELBAN⁷); platina; etoposídeo (VP-16); ifosfamida; mitoxantona; vincristina (ONCOVIN⁷); oxaliplatina; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINE⁷); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inibidor de topoisomerase RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides, tais como ácido retinoico; capecitabina (XELODA⁷); sais, ácidos ou derivados farmacêuticamente aceitáveis de quaisquer dos acima; bem como combinações de dois ou mais dos acima, tal como CHOP, uma abreviação para uma terapia combinada de ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisolona, e FOLFOX, uma abreviatura para um regime de tratamento com oxaliplatina (ELOXATINTM) combinado com 5-FU e leucovovin.

O termo "citoquina" é um termo genérico para proteínas liberadas por uma população celular que atuam em outras células como mediadores intercelulares. Exemplos de tais citoquinas são linfocinas, monocinas e hormônios polipeptídicos tradicionais. Incluídos entre as citoquinas estão o hormônio de crescimento, tal como hormônio de crescimento humano, hormônio de crescimento humano N-metionil, e hormônio de crescimento bovino; hormônio da paratiróide; tiroxina; insulina; pró-insulina; relaxina; prorelaxina; hormônios glicoproteicos, tais como hormônio estimulante de folículo (FSH), hormônio estimulante da tireóide (TSH) e hormônio luteinizante (LH); fator de crescimento hepático; fator de crescimento de fibroblasto; prolactina; lactogênio placentário; fator de necrose tumoral α e β ; substância inibidora mulleriana; peptídeo associado à gonadotropina de camundongo; inibina; ativina; fator de crescimento endotelial vascular; integrina; trombopoietina (TPO); fatores de crescimento nervosos, tais como NGF- β ; fator de crescimento plaquetário; fatores de transformação de crescimento (TGFs), tais

como TGF- α e TGF- β ; fator de crescimento similar a insulina -I e -II; eritropoietina (EPO); fatores osteoindutivos; interferons, tais como interferon - α , - β e - γ ; fatores estimulantes de colônia (CSFs), tais como CSF de macrófago (M-CSF); CSF de granulócito e macrófago (GM-CSF); e CSF de granulócito (G-CSF); interleucinas (ILs), tais como IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; um fator de necrose tumoral, tal como TNF- α ou TNF- β ; e outros fatores polipeptídicos incluindo LIF e ligante a kit (KL). Como usado aqui, o termo citocina inclui proteínas de fontes naturais ou de cultura de célula recombinante e equivalentes biologicamente ativos das citocinas de sequência natural.

O termo "inserção de pacote" é usado para referir-se a instruções habitualmente incluídas em pacotes comerciais de produtos terapêuticos, que contêm informação sobre as indicações, uso, dosagem, administração, contra-indicações e/ou avisos acerca do uso de tais produtos terapêuticos.

"Epitélios", "epitelial" e "epitélio" referem-se à cobertura celular de superfícies corporais internas e externas (cutânea, mucosa e serosa), incluindo as glândulas e outras estruturas derivadas das mesmas, por exemplo, corneana, esofageana, epidérmica, e células epiteliais do folículo capilar. Outro tecido epitelial exemplar inclui: epitélio olfatório - o epitélio pseudoestratificado de revestimento da região olfatória da cavidade nasal, e contendo os receptores para o sentido do olfato; epitélio glandular - o epitélio composto de células epiteliais escamosas secretoras; epitélio escamoso - o epitélio compreendendo uma ou mais camadas celulares, a mais superficial das quais é composta de células achatadas, similares a uma escala ou similares a uma placa. O epitélio também pode referir-se ao epitélio transicional, como aquele que é caracteristicamente encontrado revestindo órgãos ocos que estão sujeitos a grandes modificações mecânicas devido à contração e distensão, por exemplo, tecido que representa uma transição entre o epitélio escamoso estratificado e colunar.

O "estado de crescimento" de uma célula refere-se à taxa da proliferação da célula e/ou o estado da diferenciação da célula. Um "estado

de crescimento alterado" é um estado de crescimento caracterizado por uma taxa anormal de proliferação, por exemplo, uma célula que exibe uma taxa de proliferação aumentada ou reduzida em relação a uma célula normal.

5 O termo "LY6" ou "polipeptídeo LY6" é usado aqui para referir-se genericamente a qualquer dos homólogos mamíferos da família gênica LY6 mamífera. O termo "LY6" pode ser usado para descrever proteína ou ácido nucleico.

10 O termo "superexpressão" como usado aqui, refere-se a níveis de expressão gênica celular de um tecido que é maior que os níveis de expressão normais daquele tecido. O termo "subexpressão" como usado aqui, refere-se a níveis de expressão gênica celular de um tecido que é menor que os níveis de expressão normais para aquele tecido. No caso, a expressão maior ou menor é significativamente diferente da expressão normal sob condições controladas do estudo.

15 Um "controle" inclui uma amostra obtida para uso na determinação expressão de base ou normal ou atividade em um mamífero que não está experimentando IBD. Consequentemente, uma amostra de controle pode ser obtida por vários meios incluindo a partir de tecido ou células não afetadas por inflamação e/ou IBD, UC ou CD (como determinado por técnicas-padrão); células ou tecido não-IBD, por exemplo, de células de um indivíduo
20 não experimentando IBD; de indivíduos que não têm uma IBD, doença de Crohn ou distúrbio de colite ulcerativa; de indivíduos não-suspeitos de estar em risco de uma IBD, CD ou UC; ou de células ou linhagens celulares derivadas de tais indivíduos. Um controle também inclui um padrão anteriormente
25 estabelecido. Para ensaios, tais como ensaios de mRNA, incluindo ensaios de microarranjo, um controle pode ser um controle universal. Tal controle universal refere-se à informação da expressão de RNA de um determinado gene LY6 obtido a partir de RNA isolado de uma mistura de tecidos saudáveis ou de uma mistura de linhagens celulares derivadas de vários tecidos
30 tais como, sem limitação, RNAs de referência universais descritos aqui. Consequentemente, qualquer teste ou ensaio conduzido de acordo com a invenção pode ser comparado com padrão estabelecido e pode não ser ne-

cessário obter uma amostra de controle para comparação cada tempo.

Tabela 1

Table 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 */ {2,0,-2,0,0,-4,1,-1,-1,0,-1,-2,-1,0,_M,1,0,-2,1,1,0,0,-6,0,-3,0},
/* B */ {0,3,-4,3,2,-5,0,1,-2,0,0,-3,-2,2,_M,-1,1,0,0,0,0,-2,-5,0,-3,1},
/* C */ {-2,-4,15,-5,-5,-4,-3,-3,-2,0,-5,-6,-5,-4,_M,-3,-5,-4,0,-2,0,-2,-8,0,0,-5},
/* D */ {0,3,-5,4,3,-6,1,1,-2,0,0,-4,-3,2,_M,-1,2,-1,0,0,0,-2,-7,0,-4,2},
/* E */ {0,2,-5,3,4,-5,0,1,-2,0,0,-3,-2,1,_M,-1,2,-1,0,0,0,-2,-7,0,-4,3},
/* F */ {-4,-5,-4,-6,-5,9,-5,-2,1,0,-5,2,0,-4,_M,-5,-5,-4,-3,-3,0,-1,0,0,7,-5},
/* G */ {1,0,-3,1,0,-5,5,-2,-3,0,-2,-4,-3,0,_M,-1,-1,-3,1,0,0,-1,-7,0,-5,0},
/* H */ {-1,1,-3,1,1,-2,-2,6,-2,0,0,-2,-2,2,_M,0,3,2,-1,-1,0,-2,-3,0,0,2},
/* I */ {-1,-2,-2,-2,-2,1,-3,-2,5,0,-2,2,2,-2,_M,-2,-2,-2,-1,0,0,4,-5,0,-1,-2},
/* J */ {0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,_M,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0},
/* K */ {-1,0,-5,0,0,-5,-2,0,-2,0,5,-3,0,1,_M,-1,1,3,0,0,0,-2,-3,0,-4,0},
/* L */ {-2,-3,-6,-4,-3,2,-4,-2,2,0,-3,6,4,-3,_M,-3,-2,-3,-3,-1,0,2,-2,0,-1,-2},
/* M */ {-1,-2,-5,-3,-2,0,-3,-2,2,0,0,4,6,-2,_M,-2,-1,0,-2,-1,0,2,-4,0,-2,-1},
/* N */ {0,2,-4,2,1,-4,0,0,-2,0,1,-3,-2,2,_M,-1,1,0,1,0,0,-2,-4,0,-2,1},
/* O */ {_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M},
0,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M},
/* P */ {1,-1,-3,-1,-1,-5,-1,0,-2,0,-1,-3,-2,-1,_M,6,0,0,1,0,0,-1,-6,0,-5,0},
/* Q */ {0,1,-5,2,2,-5,-1,3,-2,0,1,-2,-1,1,_M,0,4,1,-1,-1,0,-2,-5,0,-4,3},
/* R */ {-2,0,-4,-1,-1,-4,-3,2,-2,0,3,-3,0,0,_M,0,1,6,0,-1,0,-2,2,0,-4,0},
/* S */ {1,0,0,0,0,-3,1,-1,-1,0,0,-3,-2,1,_M,1,-1,0,2,1,0,-1,-2,0,-3,0},
/* T */ {1,0,-2,0,0,-3,0,-1,0,0,0,-1,-1,0,_M,0,-1,-1,1,3,0,0,-5,0,-3,0},
/* U */ {0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,_M,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0},
/* V */ {0,-2,-2,-2,-2,-1,-1,-2,4,0,-2,2,2,-2,_M,-1,-2,-2,-1,0,0,4,-6,0,-2,-2},
/* W */ {-6,-5,-8,-7,-7,0,-7,-3,-5,0,-3,-2,-4,-4,_M,-6,-5,-2,-2,-5,0,-6,17,0,0,-6},
/* X */ {0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,_M,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0},
/* Y */ {-3,-3,0,-4,-4,7,-5,0,-1,0,-4,-1,-2,-2,_M,-5,-4,-4,-3,-3,0,-2,0,10,-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.1)

```

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Tabela 1(cont.2)

```

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

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

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

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

```

Tabela 1 (cont.3)

```

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

    dx = (struct diag *)g_calloc("to get diag", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DJNS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DJNS1 : 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.4)

```

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.5)

```

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

```

Tabela 1 (cont.6)

```

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

#include "nw.h"

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

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

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

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

```

Tabela1(cont.7)

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)
int lx, ly; /* "core" (minus endgaps) */
int firstgap, lastgap; /* leading trailing overlap */
{
    int nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char outx[32];
    double pct;
    register n0, n1;
    register char *p0, *p1;

    /* get total matches, score
     */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;

    nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--;
        }
        else if (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--;
        }
        else {
            if (xbm[*p0-'A'] & xbm[*p1-'A'])
                nm++;
            if (n0++ == pp[0].x[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0++];
            if (n1++ == pp[1].x[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1++];
            p0++;
            p1++;
        }
    }

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

```

Tabela 1 (cont.8)

```

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

    fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
    if (gapy) {
        (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
            ngapy, (dna)? "base": "residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
        fprintf(fx, "%s", outx);
    }
}
if (dna)
    fprintf(fx,
        "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
        smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
else
    fprintf(fx,
        "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
        smax, PINS0, PINS1);
if (endgaps)
    fprintf(fx,
        "<endgaps penalized, left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
        firstgap, (dna)? "base": "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
        lastgap, (dna)? "base": "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
else
    fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}

static      nm;          /* matches in core -- for checking */
static      lmax;        /* lengths of stripped file names */
static      ij[2];       /* jmp index for a path */
static      nc[2];       /* number at start of current line */
static      ni[2];       /* current elem number -- for gapping */
static      siz[2];
static char *ps[2];      /* ptr to current element */
static char *po[2];      /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINE]; /* output line */
static char star[P_LINE]; /* set by stars() */
/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
pr_align( )
{
    int      nn;          /* char count */
    int      more;
    register i;

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = strlen(name[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];
    }
}

```

...getmat

pr_align

Tabela 1 (cont.9)

```

for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
         * do we have more of this sequence?
         */
        if (!*ps[i])
            continue;

        more++;

        if (pp[i].spc) { /* leading space */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i]++ = '-';
            siz[i]--;
        }
        else { /* we're putting a seq element
            */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
            po[i]++;
            ps[i]++;

            /*
             * are we at next gap for this seq?
             */
            if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                /*
                 * we need to merge all gaps
                 * at this location
                 */
                siz[i] = pp[i].n[ij[i]]++;
                while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                    siz[i] += pp[i].n[ij[i]]++;
            }
            ni[i]++;
        }
    }
    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock( );
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nm = 0;
    }
}

/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align( )
 */
static
dumpblock( )
{
    register i;
    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';
}

```

...pr_align

dumpblock

Tabela 1 (cont.10)

```

(void) puts('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 == '\n')
            *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 = *py;
            i++;
        }
    }
    *pn = '\0';
    nc[ix] = i;
    for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void) puts(*pn, fx);
    (void) puts("n", fx);
}

/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock( )
 */
static
putline(ix)
int ix;
{
    num
    putline

```

Tabela 1 (cont.11)

```

int          i;
register char *px;

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

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

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

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

    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {
            if (xbm[*p0-'A'] && xbm[*p1-'A']) {
                cx = '*';
                nm++;
            }
            else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                cx = '.';
            else
                cx = ' ';
        }
        else
            cx = ' ';
        *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}

```

...putline

stars

Tabela 1 (cont.12)

```

/*
 * 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));
}

```

stripname

Tabela 1 (cont.13)

```

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

char    *jname = "/tmp/homgXXXXXX";      /* tmp file for jimps */
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';
}

```

Page 1 of nwsubr.c

Tabela 1 (cont.14)

```

py = pseq + 4;
*len = tlen;
rewind(fp);

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

char *
g_calloc(msg, nx, sz)                                g_calloc
char *msg;
int nx, sz;
/* program, calling routine */
/* 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( )
{
    int fd = -1;
    int siz, i0, i1;
    register i, j, xx;

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

```

Tabela 1 (cont.15)

```

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

/* reverse the order of jumps
*/
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.16)

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw( )
 */
writejumps(ix)
int ix;
{
    char *mktemp( );
    if (!fj) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp( ) %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
        if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
        }
    }
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}

```

Tabela 2

Referência	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	(Tamanho = 15 aminoácidos)
5	Proteína de Comparação XXXXXYYYYYYY	(Tamanho = 12 aminoácidos)

% identidade da sequência de aminoácidos =

(o número de resíduos de aminoácidos identicamente combinados entre as duas sequências polipeptídicas como determinado por ALIGN-2) dividido
10 (pelo número total de resíduos de aminoácidos do polipeptídeo de referência)

= 5 dividido por 15 = 33,3%

Tabela 3

Referência	XXXXXXXXXXX	(Tamanho = 10 aminoácidos)
15	Proteína de Comparação XXXXXYYYYYYYZZYZ	(Tamanho = 15 aminoácidos)

% identidade da sequência de aminoácidos =

(número de resíduos de aminoácidos identicamente combinados entre as
20 duas sequências polipeptídicas como determinado por ALIGN-2) dividido
(pelo número total de resíduos de aminoácidos do polipeptídeo de referência)

= 5 dividido por 10 = 50%

Tabela 4

25	DNA de referência	NNNNNNNNNNNNNNNN (Tamanho = 14 nucleotí-
----	-------------------	--

deos)

DNA de comparação NNNNNNLLLLLLLLLL (Tamanho = 16 nucleotídeos)

% identidade da sequência de ácido nucleico =

- 5 (número de nucleotídeos identicamente combinados entre as duas sequências de ácidos nucleicos como determinado por ALIGN-2) dividido (pelo número total de nucleotídeos do DNA da sequência de referência de ácido nucleico)

= 6 dividido por 14 = 42,9%

10 Tabela 5

DNA de referência NNNNNNNNNNNN (Tamanho = 12 nucleotídeos)

DNA de comparação NNNNLLLVV (Tamanho = 9 nucleotídeos)

- 15 % identidade da sequência de ácido nucleico =

(número de nucleotídeos identicamente combinados entre as duas sequências de ácidos nucleicos como determinado por ALIGN-2) dividido (pelo número total de nucleotídeos do DNA da sequência de referência de ácido nucleico)

- 20 = 4 dividido por 12 = 33,3%

Métodos Diagnósticos da Invenção

- É ainda contemplado que o uso de agentes terapêuticos para IBD pode ser especificamente direcionado o distúrbios onde o tecido e/ou células afetados exibindo expressão aumentada de LY6 em relação ao controle. Consequentemente, é contemplado que a detecção da expressão aumentada de LY6 pode ser usada para detectar IBD, tal como CD ou UC, no tecido gastrointestinal de um mamífero e/ou identificar tecidos e distúrbios que se beneficiarão particularmente do tratamento com um agente terapêutico para IBD, incluindo um agente quimioterápico, útil para melhorar IBD, UC e/ou CD em um paciente humano.

Em modalidades preferenciais, níveis de expressão de LY6 são detectados, pela detecção direta do transcrito gênico ou por detecção de

níveis ou atividade proteicos. Transcritos podem ser detectados usando qualquer uma de uma ampla faixa de técnicas que dependem principalmente de hibridização ou sondas para os transcritos de mRNA de LY6, para cDNAs sintetizados a partir desse ponto, ou ao DNA onde a amplificação gênica de LY6 está presente. Técnicas bem-conhecidas incluem Northern blotting, PCR por transcriptase reversa e análise por microarranjo dos níveis de transcrito. Métodos para detecção dos níveis de proteína LY6 incluem Western blotting, imunoprecipitação, eletroforese em gel de poliacrilamida em duas dimensões (2D SDS-PAGE - preferencialmente comparado contra um padrão em que a posição das proteínas LY6 foram determinadas), e espectroscopia de massa. Espectroscopia de massa pode ser ligada a uma série de etapas de purificação para permitir identificação de alto rendimento de muitos níveis proteicos diferentes em uma amostra particular. Espectroscopia de massa e 2D SDS-PAGE também podem ser usadas para identificar modificações pós-transcricionais em proteínas incluindo eventos proteolíticos, ubiquitinação, fosforilação, modificação lipídica, etc. A atividade de LY6 também pode ser avaliada pela análise da ligação ao DNA substrato ou ativação transcricional *in vitro* de promotores alvo. Ensaio de mobilidade em gel, ensaios de footprinting de DNA e ensaios de ligação cruzada DNA-proteína são todos métodos que podem ser usados para avaliar a presença de uma proteína capaz de ligação a sítios de ligação Gli no DNA. J Mol. Med 77 (6):459-68 (1999); Cell 100 (4): 423-34 (2000); Development 127 (19): 4923-4301 (2000).

Em certas modalidades, os níveis de transcrito de LY6 são medidos, e tecidos doentes ou desordenados que mostram significativamente níveis elevados de LY6 em relação ao controle são tratados com um composto terapêutico para IBD. Consequentemente, níveis de expressão de LY6 são uma medida diagnóstica potente para determinação se um paciente está experimentando IBD e se aquele paciente deveria receber um agente terapêutico para IBD.

Composições de Anticorpo para Uso nos Métodos da Invenção

A. Anticorpos AntiLY6

Em uma modalidade, a presente invenção fornece o uso de anticorpos antiLY6, que podem encontrar uso aqui como agentes terapêuticos, diagnósticos e/ou prognósticos na determinação da existência, gravidade e/ou prognóstico do curso de doença de uma doença inflamatória intestinal, tal como UC. Anticorpos exemplares que podem ser usados com tais objetivos incluem anticorpos policlonais, monoclonais, humanizados, biespecíficos, e heteroconjugados. O termo "anticorpos" algumas vezes também inclui fragmentos de ligação ao antígeno. Anticorpos antiLY6 estão disponíveis comercialmente, tal como por exemplo, de R&D Systems, Minneapolis, MN. Anticorpos que ligam-se especificamente à LY6 como antígeno podem ser obtidos comercialmente ou preparados por métodos padrão conhecidos na técnica de química de anticorpo e proteína para uso no método da invenção. Anticorpos para LYPD1 são descritos, por exemplo, na Patente Norte-americana 7.144.990, a patente descritas por meio deste é incorporada por referência em sua totalidade.

1. Anticorpos Policlonais

Anticorpos policlonais são preferencialmente construídos em animais por injeções múltiplas subcutâneas (sc) ou intraperitoniais (ip) do antígeno relevante e um adjuvante. Pode ser útil conjugar o antígeno relevante (especialmente quando peptídeos sintéticos são usados) a uma proteína que é imunogênica na espécie a ser imunizada. Por exemplo, o antígeno pode ser conjugado a hemocianina do molusco *Keyhole limpet* (KLH), albumina sérica, tiroglobulina bovina, ou inibidor de tripsina de soja, usando um agente bifuncional ou de derivatização, por exemplo, éster maleimido-benzoil sulfosuccinimida (conjugação através de resíduos de cisteína), N-hidroxysuccinimida (através de resíduos de lisina), glutaraldeído, anidrido succínico, SOCl_2 , ou $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, onde R e R^1 são diferentes grupos alquila.

Animais são imunizados contra o antígeno, conjugados imunogênicos, ou derivados por combinação, por exemplo, 100 μg ou 5 μg da proteína ou conjugado (para coelhos ou camundongos, respectivamente) com 3 volumes de adjuvante completo de Freund e injetando a solução intradermicamente em múltiplos sítios. Um mês depois, os animais são estimulados

com 1/5 a 1/10 da quantidade original do peptídeo ou conjugado em adjuvante completo de Freund pela injeção subcutânea em múltiplos sítios. Sete a 14 dias depois, os animais são sangrados e o soro é analisado para título de anticorpo. Animais são estimulados até os platôs de título. Conjugados
5 também podem ser feitos em cultura celular recombinante como fusões proteicas. Além disso, agentes de agregação, tais como alume são apropriadamente usados para aumentar a resposta imune.

2. Anticorpos Monoclonais

Anticorpos monoclonais podem ser construídos usando o método de hibridoma descrito primeiro por Kohler *et al.*, Nature, 256:495 (1975),
10 ou podem ser contruídos por métodos de DNA recombinante (Patente Norteamericana Número 4.816.567).

No método de hibridoma, camundongo ou outro animal hospedeiro apropriado, tal como um hamster, é imunizado como descrito acima
15 para obter linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que ligar-seão especificamente à proteína usada para imunização. Alternativamente, linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Após imunização, linfócitos são isolados e logo fusionados com uma linhagem celular de mieloma usando um agente de fusão adequado, tal como polietileno glicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)).
20

As células de hibridoma preparadas dessa forma são semeadas e cultivadas em um meio de cultura adequado meio o qual preferencialmente contém uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou sobrevivência das células de mieloma não-fusionadas, parentais (também referida como parceiro de fusão). Por exemplo, se as células de mieloma parentais sem enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferase (HGPRT ou HPRT), meio de cultura seletivo para hibridomas tipicamente incluirá hipoxantina, aminopterina, e timidina (meio HAT), substâncias que previnem o crescimento de células deficientes em HGPRT.
25
30

Células de mieloma de parceiro de fusão preferenciais são aquelas que se fusionam eficientemente, suportam alto nível de produção estável

do anticorpo por células produtoras de anticorpo selecionadas, e são sensíveis a um meio seletivo que seleciona contra as células parentais não-fusionadas. Linhagens celulares de mieloma preferenciais são linhagens de mieloma murino, tais como aquelas derivadas de tumores de camundongo MOPC-21 e MPC-11 disponíveis em Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, e SP-2 e derivados, por exemplo, células X63-Ag8-653 disponíveis em American Type Culture Collection, USA. Linhagens celulares de mieloma humano e de heteromieloma camundongo-humano também foram descritas para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); e Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc, New York, 1987)).

Meio de cultura no qual células de hibridoma estão crescendo é analisado para produção de anticorpos monoclonais dirigidos contra o antígeno. Preferencialmente, a especificidade de ligação de anticorpos monoclonais produzidos por células de hibridoma é determinada por imunoprecipitação ou por um ensaio de ligação *in vitro*, tal como radioimunoensaio (RIA) ou ensaio imunoabsorvente de ligação enzimática (ELISA).

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

Uma vez que células de hibridoma que produzem anticorpos de especificidade, afinidade e/ou atividade desejadas são identificadas, os clones podem ser subclonados por procedimentos de diluição limitante e cultivados por métodos padrão (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). Meios de cultura adequados com esta finalidade incluem, por exemplo, meio D-MEM ou RPMI-1640. Além disso, as células de hibridoma podem ser cultivadas *in vivo* como tumores ascíticos em um animal, por exemplo, pela injeção i.p. das células em camundongos.

Os anticorpos monoclonais secretados pelos subclones são apropriadamente separados do meio de cultura, fluidos ascíticos ou soro por

procedimentos de purificação de anticorpo convencionais tais como, por exemplo, cromatografia por afinidade (por exemplo, usando proteína A ou proteína G-Sefarose) ou cromatografia de troca iônica, cromatografia por hidroxilapatita, eletroforese em gel, diálise, *etc.*

5 DNA de codificação dos anticorpos monoclonais é prontamente isolado e sequenciado usando procedimentos convencionais (por exemplo, usando sondas de oligonucleotídeo que são capazes de ligação especificamente a genes que codificam as cadeias pesadas e leves de anticorpos murinos). As células de hibridoma servem como uma fonte preferencial de tal
10 DNA. Uma vez isolado, o DNA pode ser colocado em vetores de expressão, que são então transfectados em células hospedeiras, tais como células de *E. coli*, células COS símias, células de Ovário de Hamster Chinês (CHO), ou células de mieloma que não produzem de outra maneira proteína de anticorpo, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. Artigos de revisão em expressão recombinante em bactérias do DNA que codifica o anticorpo incluem Skerra *et al.*, Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262 (1993) e Plückthun, Immunol. Revs. 130:151-188 (1992).

Em uma modalidade adicional, anticorpos monoclonais ou fragmentos de anticorpo podem ser isolados a partir de bibliotecas de fago de anticorpo geradas usando técnicas descritas em McCafferty *et al.*, Nature, 348:552-554 (1990). Clackson *et al.*, Nature, 352:624-628 (1991) e Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) descrevem o isolamento de anticorpos murinos e humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fago. Publicações subsequentes descrevem a produção de anticorpos humanos de alta
20 afinidade (faixa nM) pela mistura de cadeias (Marks *et al.*, Bio/Technology, 10:779-783 (1992)), bem como infecção combinatória e recombinação *in vivo* como uma estratégia para construção de bibliotecas de fagos muito grandes (Waterhouse *et al.*, Nuc. Acids. Res. 21:2265-2266 (1993)). Dessa maneira, estas técnicas são alternativas viáveis para técnicas de hibridoma para anticorpo monoclonal tradicional de isolamento de anticorpos monoclonais.
30

O DNA de codificação do anticorpo pode ser modificado para

produzir polipeptídeos quiméricos ou de fusão a anticorpo, por exemplo, por substituição das sequências do domínio constante da cadeia pesada e cadeia leve humana (C_H e C_L) por sequências murinos homólogas (Patente Norte-americana Número 4.816.567; e Morrison, *et al.*, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)), ou por fusão da sequência de codificação da imunoglobulina com toda ou parte da sequência de codificação de um polipeptídeo não-imunoglobulina (polipeptídeo heterólogo). As sequências polipeptídicas não-imunoglobulina podem substituir pelos domínios constantes de um anticorpo, ou são substituídos pelos domínios variáveis de um sítio combinante de antígeno de um anticorpo para criar um anticorpo bivalente quimérico compreendendo um sítio de combinação a antígeno tendo especificidade por um antígeno e outro sítio de combinação a antígeno tendo especificidade por um antígeno diferente.

3. Anticorpos Humanos e Humanizados

Os anticorpos antiLY6 úteis na prática da invenção podem compreender ainda anticorpos humanizados ou anticorpos humanos. Formas humanizadas de anticorpos não-humanos (por exemplo, murinos) são imunoglobulinas quiméricas, cadeias de imunoglobulina ou fragmentos das mesmas (tais como Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ ou outras subsequências de anticorpos de ligação ao antígeno) que contêm a sequência mínima derivada a partir da imunoglobulina não-humana. Anticorpos humanizados incluem imunoglobulinas humanas (anticorpo recipiente) no qual os resíduos de uma região de determinação de complementariedade (CDR) do recipiente são substituídos por resíduos de uma CDR de uma espécie não-humana (anticorpo doador), tais como camundongo, rato ou coelho tendo a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Em alguns exemplos, os resíduos da estrutura Fv da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não-humanos correspondentes. Anticorpos humanizados também podem compreender resíduos que não são encontrados nem no anticorpo recipiente nem na CDR importada ou sequências da estrutura. Em geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todos de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, nos quais todas ou substancialmente

todas as regiões CDR correspondentes àquelas de uma imunoglobulina não-humana e todas ou substancialmente todas as regiões de FR são aquelas de uma sequência consenso à imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado otimamente também compreenderá pelo menos uma porção de uma
 5 região constante da imunoglobulina (Fc), tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana [Jones *et al.*, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332:323-329 (1988); e Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)].

Métodos para humanização de anticorpos não-humanos são
 10 bem-conhecidos na técnica. Geralmente, um anticorpo humanizado tem um ou mais resíduos de aminoácidos introduzidos nele a partir de uma fonte que é não-humana. Estes resíduos de aminoácidos não-humanos muitas vezes são referidos como resíduos "de importação", que são tipicamente tomados de um domínio variável "de importação". Humanização pode ser essencial-
 15 mente realizada seguindo 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)), pela substituição das CDRs ou sequências de CDR de roedores pelas sequências correspondentes de um anticorpo humano. Consequentemente, tais anticorpos "humani-
 20 zados" são anticorpos quiméricos (Patente Norte-americana Número 4.816.567), em que substancialmente menos que um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente de uma espécie não-humana. Na prática, anticorpos humanizados são anticorpos tipicamente humanos nos quais alguns resíduos de CDR e possivelmente alguns resí-
 25 duos de FR são substituídos por resíduos de sítios análogos em anticorpos de roedores.

A escolha de domínios variáveis humanos, ambos leve e pesado, para serem usados na criação dos anticorpos humanizados é muito importante para reduzir antigenicidade e resposta HAMA (anticorpo antica-
 30 mundongo humano) quando o anticorpo é destinado para uso terapêutico humano. De acordo com o chamado método de melhor ajuste ("best-fit"), a sequência do domínio variável de um anticorpo de roedor é classificada con-

tra a biblioteca inteira de sequências conhecidas de domínio variável humano. A sequência de domínio V humano que é muito próxima àquela do roedor é identificada e a estrutura humana (FR) aceita pelo anticorpo humanizado (Sims *et al.*, J. Immunol. 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 196:901 (1987)). Outro método usa uma estrutura particular derivada da sequência consenso de todos os anticorpos humanos de um subgrupo particular de cadeias leves ou pesadas. A mesma estrutura pode ser usada para vários anticorpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol. 151:2623 (1993)).

É ainda importante que anticorpos sejam humanizados com retenção da alta afinidade de ligação ao antígeno e outras propriedades biológicas favoráveis. Para alcançar esta meta, de acordo com um método preferencial, os anticorpos humanizados são preparados por um processo de análise das sequências parentais e vários produtos humanizados conceituais usando modelos tridimensionais das sequências parentais e humanizadas. Modelos de imunoglobulina tridimensionais são comumente disponíveis e são familiares para aqueles versados na técnica. Programas de computador estão disponíveis nos quais ilustram e expõem estruturas conformacionais tridimensionais prováveis de sequências de imunoglobulina candidatas selecionadas. Inspeção destas exposições permite análise do papel provável dos resíduos no funcionamento da sequência de imunoglobulina candidata, isto é, análise de resíduos que influem na capacidade da imunoglobulina candidata de ligar-se a seu antígeno. Deste modo, resíduos de FR podem ser selecionados e combinados a partir do recipiente e sequências de importação de modo que a característica de anticorpo desejada, tal como afinidade aumentada para o antígeno(s)-alvo, seja alcançada. Em geral, os resíduos de região hipervariável estão diretamente e ainda mais substancialmente envolvidos na influência da ligação à antígeno.

Várias formas de anticorpos de anticorpo humanizado antiLY6 são contempladas. Por exemplo, o anticorpo humanizado pode ser um fragmento de anticorpo, tal como um Fab, que é opcionalmente conjugado com um ou mais agente(s) citotóxico a fim de gerar um imunoconjugado. Alternativa-

tivamente, o anticorpo humanizado pode ser um anticorpo intacto, tal como um anticorpo IgG1 intacto.

Como uma alternativa para humanização, anticorpos humanos podem ser gerados. Por exemplo, é possível agora produzir animais trans-
 5 gênicos (por exemplo, camundongos) que são capazes, na imunização, de produção de um repertório total de anticorpos humanos na ausência de produção de imunoglobulina endógena. Por exemplo, foi descrito que a deleção homozigota do gene da região de junção da cadeia pesada de anticorpo (J_H) em camundongos mutantes de linhagem germinativa e quimérica resulta na
 10 inibição completa da produção de anticorpo endógena. Transferência da matriz gênica de imunoglobulina de linhagem germinativa humana em tais camundongos mutantes de linhagem germinativa resultará na produção de anticorpos humanos no desafio de antígeno. Ver, por exemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*,
 15 362:255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immuno.* 7:33 (1993); Patentes U.S. Números 5.545.806, 5.569.825, 5.591.669 (todas de GenPharm); 5.545.807; e WO 97/17852.

Alternativamente, tecnologia de exposição de fago (McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-553 (1990)) pode ser usada para produzir anticorpos e
 20 fragmentos de anticorpo humanos *in vitro*, a partir de repertórios gênicos de domínio variável (V) da imunoglobulina a partir de doadores não-imunizados. De acordo com esta técnica, genes do domínio V do anticorpo são clonados na estrutura em um maior ou menor gene de revestimento proteico de um bacteriófago filamentosos, tal como M13 ou fd, e expostos como fragmentos
 25 de anticorpos funcionais na superfície da partícula do fago. Como a partícula filamentosa contém uma cópia de DNA de fita simples do genoma de fago, seleções baseadas nas propriedades funcionais do anticorpo também resultam na seleção do gene de codificação do anticorpo exibindo aquelas propriedades. Dessa forma, o fago mimetiza algumas das propriedades da célula B. Exposição de fago pode ser realizada em uma variedade de formatos,
 30 revisados em, por exemplo, Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Várias fontes de seg-

mentos de gene de V podem ser usadas para exposição de fago. Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) isolaram uma matriz diversa de anticorpos anti-oxazolona de uma pequena biblioteca combinatória randômica de genes de V derivados dos baços de camundongos imunizados. Um repertório de genes de V de doadores humanos não-imunizados pode ser construído e anticorpos para uma matriz diversa de antígenos (incluindo autoantígenos) podem ser isolados essencialmente após as técnicas descritas por Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), ou Griffith *et al.*, *EMBO J.* 12:725-734 (1993). Ver, também, Patentes U.S. Números 5.565.332 e 5.573.905.

Como discutido acima, anticorpos humanos também podem ser gerados por células B ativadas *in vitro* (vide Patentes U.S. Números 5.567.610 e 5.229.275).

4. Fragmentos de Anticorpo

Em certas circunstâncias, há vantagens do uso de fragmentos de anticorpo, em vez de anticorpos inteiros. O tamanho menor dos fragmentos leva em conta rápida depuração, enquanto mantém especificidade de ligação ao antígeno similar da molécula de tamanho total correspondente, e pode levar a acesso melhorado a tumores sólidos.

Várias técnicas foram desenvolvidas para a produção de fragmentos de anticorpo. Tradicionalmente, estes fragmentos foram derivados através de digestão proteolítica de anticorpos intactos (vide, por exemplo, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); e Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985)). Entretanto, estes fragmentos podem ser produzidos agora diretamente por células hospedeiras recombinantes. Fragmentos de anticorpo Fab, Fv e scFv podem ser todos expressos e secretados por *E. coli*, dessa forma permitindo a fácil produção de grandes quantidades destes fragmentos. Fragmentos de anticorpo podem ser isolados de bibliotecas de fago de anticorpo discutidas acima. Alternativamente, fragmentos Fab'-SH podem ser diretamente recuperados de *E. coli* e quimicamente ligados para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). De acordo com outra abordagem, fragmentos F(ab')₂ podem ser isolados diretamente da cultura celular hospedeira

recombinante. Fragmento Fab e $F(ab')_2$ com meia-vida aumentada in vivo compreendendo resíduos de epítipo de ligação a receptor de salvamento são descritos na Patente Norte-americana Número 5.869.046. Outras técnicas para a produção de fragmentos de anticorpos serão evidentes para o profissional versado. Em outras modalidades, o anticorpo de escolha é um

5 fragmento de Fv de cadeia única (scFv). Ver WO 93/16185; Patente Norte-americana Número 5.571.894; e Patente Norte-americana Número 5.587.458. Fv e sFv são as únicas espécies com sítios de combinação intactos que são destituídos de regiões constantes; dessa forma, são adequadas

10 para ligação não-específica reduzida durante uso in vivo. Proteínas de fusão sFv podem ser construídas para produzir fusão de uma proteína efetora no terminal amino ou carboxi de um sFv. Ver *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, supra. O fragmento de anticorpo também pode ser um "anticorpo linear", por exemplo, como descrito na Patente Norte-americana Número

15 5.641.870, por exemplo. Tais fragmentos lineares de anticorpo podem ser monoespecíficos ou biespecíficos.

5. Anticorpos Biespecíficos

Anticorpos biespecíficos são anticorpos que têm especificidades de ligação a pelo menos dois epítopos diferentes. Anticorpos biespecíficos

20 exemplares podem ligar-se a antígenos separados ou ligar-se a dois epítopos diferentes de um determinado polipeptídeo LY6 descrito aqui. Outros anticorpos podem combinar o sítio de ligação LY6 acima com um sítio de ligação de outra proteína. Onde o anticorpo biespecíficos é útil no método diagnóstico da invenção, o segundo braço de anticorpo pode ligar-se a um

25 polipeptídeo detectável. Anticorpos biespecíficos podem ser preparados como anticorpos de tamanho total ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, anticorpos biespecíficos $F(ab')_2$).

Métodos para construir anticorpos biespecíficos são conhecidos na técnica. Produção tradicional de anticorpos biespecíficos de tamanho to-

30 tal é baseada na coexpressão de dois pares de cadeia levecadeia pesada de imunoglobulina, onde as duas cadeias têm especificidades diferentes (Mills-tein et al., *Nature* 305:537-539 (1983)). Por causa da classificação randômi-

co das cadeias pesadas e leves da imunoglobulina, estes hibridomas (quadrômas) produzem uma mistura potencial de 10 moléculas de anticorpo diferentes, das quais só uma tem a estrutura biespecífica correta. Purificação da molécula correta, que é normalmente feita por etapas de cromatografia por afinidade, é bastante trabalhosa, e os rendimentos de produto são baixos. Procedimentos similares são descritos em WO 93/08829, e em Traunecker *et al.*, EMBO J. 10:3655-3659 (1991).

De acordo com uma abordagem diferente, domínios variáveis de anticorpo com as especificidades de ligação desejadas (sítios de combinação antígeno-anticorpo) são fusionados a sequências de domínio constante da imunoglobulina. Preferencialmente, a fusão é com um domínio constante da cadeia pesada de Ig, compreendendo pelo menos parte das regiões de dobradiça, C_H2 e C_H3. É preferencial ter a primeira região constante da cadeia pesada (C_H1) contendo o sítio necessário para ligação da cadeia leve, presente em pelo menos uma das fusões. DNAs de codificação das fusões da cadeia pesada da imunoglobulina, se desejada, a cadeia leve da imunoglobulina, são inseridos em vetores de expressão separados, e são cotransfectados em uma célula hospedeira adequada. Isto fornece maior flexibilidade no ajuste das proporções mútuas dos três fragmentos polipeptídicos em modalidades quando razões desiguais das três cadeias polipeptídicas usadas na construção fornecem o rendimento ótimo do anticorpo biespecífico desejado. É, entretanto, possível inserir as sequências de codificação para duas ou três cadeias polipeptídicas em um vetor de expressão único quando a expressão de pelo menos duas cadeias polipeptídicas em razões iguais resulta em altos rendimentos ou quando as razões não afetam significativamente o rendimento da combinação de cadeia desejada.

Em uma modalidade preferencial desta abordagem, os anticorpos biespecíficos são compostos de uma cadeia pesada da imunoglobulina híbrida com uma primeira especificidade de ligação em um braço, e um par de cadeia levecadeia pesada da imunoglobulina híbrida (fornecimento de uma segunda especificidade de ligação) em outro braço. Foi encontrado que esta estrutura assimétrica facilita a separação do composto biespecífico de-

sejado a partir de combinações de cadeia da imunoglobulina não-desejadas, já que a presença de uma cadeia leve da imunoglobulina em somente uma metade da molécula biespecífica fornece uma maneira fácil de separação. Esta abordagem é descrita em WO 94/04690. Para detalhes adicionais para
5 ra geração de anticorpos biespecíficos ver, por exemplo, Suresh *et al.*, Methods in Enzymology 121:210 (1986).

De acordo com outra abordagem descrita na Patente Norte-americana Número 5.731.168, a interface entre um par de moléculas de anticorpo pode ser projetado para maximizar a porcentagem de heterodímeros
10 que são recuperados a partir da cultura celular recombinante. A interface preferencial compreende pelo menos uma parte do domínio C_H3. Neste método, uma ou mais cadeias laterais menores de aminoácido da interface da primeira molécula de anticorpo são substituídas com cadeias laterais maiores (por exemplo, tirosina ou triptofano). "Cavidades" compensatórias de tamanho
15 idêntico ou similar à grande cadeia(s) lateral são criadas na interface da segunda molécula de anticorpo pela substituição de grandes cadeias laterais de aminoácido com menores (por exemplo, alanina ou treonina). Isto fornece um mecanismo para aumento do rendimento do heterodímero sobre outros produtos finais não desejados, tais como homodímeros.

20 Anticorpos biespecíficos incluem anticorpos de ligação cruzada ou "heteroconjugados". Por exemplo, um dos anticorpos no heteroconjugado pode ser ligado à avidina, o outro à biotina. Tais anticorpos, por exemplo, foram propostos para direcionar células do sistema imune a células não-desejadas (Patente Norte-americana Número 4.676.980), e para tratamento
25 da infecção por HIV (WO 91/00360, WO 92/200373, e EP 03089). Anticorpos heteroconjugados também encontram uso no presente método da invenção pelo fornecimento de múltiplos marcadores detectáveis (diferentes ou os mesmos) em cada anticorpo para ensaio de detecção melhorado. Anticorpos heteroconjugados podem ser feitos usando quaisquer métodos de ligação
30 cruzada adequado. Agentes de ligação cruzada adequados são bem conhecidos na técnica, e são descritos na Patente Norte-americana Número 4.676.980, junto com diversas técnicas de ligação cruzada.

Técnicas para geração de anticorpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticorpo também foram descritas na literatura. Por exemplo, anticorpos biespecíficos podem ser preparados usando ligação química. Brennan *et al.*, Science 229:81 (1985) descrevem um procedimento em que os anticorpos intactos são proteoliticamente clivados para gerar fragmentos F(ab')₂. Estes fragmentos são reduzidos na presença do agente complexante ditiol, arsenito de sódio, para estabilizar ditióis vicinais e prevenir a formação de dissulfeto intermolecular. Os fragmentos Fab' gerados então são convertidos em derivados de tionitrobenzoato (TNB). Um dos derivados Fab'-TNB então é reconvertido no Fab'-tioI pela redução com mercaptoetilamina e é misturado com uma quantidade equimolar de outro derivado Fab'-TNB para formar o anticorpo biespecífico. Os anticorpos biespecíficos produzidos podem ser usados como agentes para a imobilização seletiva de enzimas.

Progresso recente facilitou a recuperação direta de fragmentos de Fab'-SH de *E. coli*, que pode ser ligado quimicamente para formar anticorpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, J. Exp. Med. 175: 217-225 (1992) descrevem a produção de uma molécula de anticorpo biespecífico totalmente humanizado F(ab')₂. Cada fragmento de Fab' foi separadamente secretado a partir de *E. coli* e submetido à ligação química dirigida *in vitro* para formar o anticorpo biespecífico. O anticorpo biespecífico dessa maneira formado foi capaz de ligar-se a células que superexpressam o receptor de ErbB2 e células T humanas normais, bem como provocam a atividade lítica de linfócitos citotóxicos humanos contra alvos de tumor de mama humano.

Várias técnicas para construção e isolamento de fragmentos de anticorpo biespecífico diretamente a partir da cultura celular recombinante também foram descritas. Por exemplo, anticorpos biespecíficos foram produzidos usando zíperes de leucina. Kostelny *et al.*, J. Immunol. 148 (5):1547-1553 (1992). Os peptídeos de zíper de leucina a partir de proteínas Fos e Jun foram ligados às porções de Fab' de dois anticorpos diferentes por fusão gênica. Os homodímeros de anticorpo foram reduzidos na região de dobradiça para formar monômeros e então reoxidado para formar os heterodímeros de anticorpo. Este método também pode ser utilizado para produção de

homodímeros de anticorpo. A tecnologia "diacorpo" descrita por Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993) forneceu um mecanismo alternativo para construção de fragmentos de anticorpo biespecífico. Os fragmentos compreendem um V_H unido a um V_L por um ligador que é muito

5 curto para permitir união entre os dois domínios na mesma cadeia. Consequentemente, os domínios V_H e V_L de um fragmento são forçados a juntar-se com os domínios V_H e V_L complementares de outro fragmento, por meio disso formando dois sítios de ligação ao antígeno. Outra estratégia para produção de fragmentos de anticorpo biespecífico pelo uso de dímeros de cadeia

10 única Fv (sFv) também foi relatada. Ver Gruber *et al.*, J. Immunol., 152:5368 (1994).

Anticorpos com mais de duas valências são contemplados. Por exemplo, anticorpos triespecíficos podem ser preparados. Tutt *et al.*, J. Immunol. 147:60 (1991).

15 6. Anticorpos Multivalentes

Um anticorpo multivalente pode ser internalizado (e/ou catabolizado) mais rápido do que um anticorpo bivalente por uma célula que expressa um antígeno ao qual os anticorpos ligam-se. Os anticorpos da presente invenção podem ser anticorpos multivalentes (que são diferentes da classe

20 IgM) com três ou mais sítios de ligação ao antígeno (por exemplo anticorpos tetravalentes), que podem ser prontamente produzidos pela expressão recombinante de ácido nucleico que codifica as cadeias polipeptídicas do anticorpo. O anticorpo multivalente pode compreender um domínio de dimerização e três ou mais sítios de ligação ao antígeno. O domínio de dimerização

25 preferencial compreende (ou consistem em) uma região Fc ou uma região de dobradiça. Neste cenário, o anticorpo compreenderá uma região Fc e três ou mais sítios de ligação a antígenos amino-terminal para a região Fc. O anticorpo multivalente preferencial aqui compreende (ou consistem em) três a aproximadamente oito, mas preferencialmente quatro, sítios de ligação ao

30 antígeno. O anticorpo multivalente compreende pelo menos uma cadeia polipeptídica (e preferencialmente duas cadeias polipeptídicas), em que a cadeia(s) polipeptídica compreende dois ou mais domínios variáveis. Por e-

xemplo, a cadeia(s) polipeptídica pode compreender $vD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$, em que VD1 é um primeiro domínio variável, VD2 é um segundo domínio variável, Fc é uma cadeia polipeptídica de uma região Fc, X1 e X2 representam um aminoácido ou polipeptídeo, e n é 0 ou 1. Por exemplo, a cadeia(s)

5 polipeptídica pode compreender: região de cadeia VH-CH1-ligador flexível-VH-CH1-Fc; ou região de cadeia VH-CH1-VH-CH1-Fc. O anticorpo multivalente aqui preferencialmente ainda compreende pelo menos dois (e preferencialmente quatro) polipeptídeos de domínio variável da cadeia leve. O anticorpo multivalente aqui pode compreender, por exemplo, de aproxima-

10 damente dois a aproximadamente oito polipeptídeos de domínio variável de cadeia leve. Os polipeptídeos de domínio variável da cadeia leve contemplados aqui compreendem um domínio variável da cadeia leve e, opcionalmente, compreendem um domínio CL adicional.

7. Construção da Função Efetora

15 Pode ser desejável modificar o anticorpo da invenção com respeito à função efetora, por exemplo, para aumentar a citotoxicidade mediada por célula dependente de antígeno (ADCC) e/ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC) do anticorpo. Isto pode ser alcançado pela introdução de uma ou mais substituições de aminoácido em uma região Fc do anti-

20 corpo. Alternativamente ou adicionalmente, resíduo(s) de cisteína pode ser introduzido na região Fc, por meio disso permitindo formação de ligação intercadeia de dissulfeto nesta região. O anticorpo homodimérico gerado dessa forma pode ter melhorado a capacidade de internalização e/ou aumentado a morte celular mediada por complemento e citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). Ver Caron *et al.*, J. Exp Med. 176:1191-1195

25 (1992) e Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992). Anticorpos homodiméricos com atividade antitumoral aumentada também podem ser preparados usando ligadores cruzados heterobifuncionais como descrito em Wolff *et al.* Cancer Research 53:2560-2565 (1993). Alternativamente, um anticorpo

30 pode ser projetado tendo regiões Fc duais e pode ter aumentado por meio disso capacidade de lise por complemento e ADCC. Ver Stevenson *et al.*, Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989). Para aumentar a meia-vida séri-

ca do anticorpo, cada um pode incorporar um epitopo de ligação a receptor de salvamento no anticorpo (especialmente um fragmento de anticorpo) como descrito na Patente U.S. 5.739.277, por exemplo. Como usado aqui, o termo "epitopo de ligação a receptor de salvamento" refere-se a um epitopo da região Fc de uma molécula IgG (por exemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, ou IgG₄) que é responsável por aumentar a meia-vida sérica *in vivo* da molécula IgG.

8. Imunoconjugados

A invenção também faz parte de imunoconjugados compreendendo um anticorpo conjugado a um agente citotóxico, tal como um agente quimioterápico, um agente inibitório de crescimento, uma toxina (por exemplo, uma toxina enzimaticamente ativa de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, ou fragmentos da mesma), ou um isótopo radioativo (*isto é*, um radioconjugado) e/ou um marcador detectável.

a. Agentes Quimioterápicos

Agentes quimioterápicos úteis na geração de tais imunoconjugados foram descritos acima. Toxinas enzimaticamente ativas e fragmentos das mesmas que podem ser usadas incluem cadeia diftérica A, fragmentos ativos de não-ligação da toxina diftérica, cadeia de exotoxina A (*a partir de Pseudomonas aeruginosa*), cadeia de ricina A, cadeia de abrina A, cadeia de modecina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, e PAP-S), inibidor de mordica charantia, curcina, crotina, inibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, e os tricotecenos. Uma variedade de radionuclídeos estão disponíveis para a produção de anticorpos radioconjugados. Exemplos incluem ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y, e ¹⁸⁶Re. Conjugados do anticorpo e agente citotóxico são feitos usando uma variedade de agentes de ligação de proteína bifuncional, tais como n-succinimidil-3-propionato (2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como dimetil adipimidato HCL), ésteres ativos (tais como disuccinimidil suberato), aldeídos (tais como glutaraldeído), compostos bis-azida (tal como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazônio (tais como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), di-isocianatos

(tais como tolieno 2,6-di-isocianato) e compostos de flúor bis ativos (tais como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por exemplo, uma imunotoxina ricina pode ser preparada como descrito em Vitetta *et al.*, Science, 238: 1098 (1987). O ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno triaminopenta-acético (MX-DTPA) marcado com carbono-14 é um agente quelante exemplar para
 5 conjugação de radionucleotídeo ao anticorpo. Ver WO94/11026.

Conjugados de um anticorpo e uma ou mais toxinas de molécula pequena, tais como uma caliqueamicina, maitansinoides, um tricoteno, e CC1065, e os derivados destas toxinas que têm atividade de toxina, também
 10 são contemplados aqui.

B. Oligopeptídeos de Ligação à LY6

Oligopeptídeos de ligação à LY6 da presente invenção são oligopeptídeos que ligam-se, preferencialmente especificamente, a um polipeptídeo LY6 como descrito aqui. Oligopeptídeos de ligação à LY6 podem ser
 15 quimicamente sintetizados usando metodologia de síntese de oligopeptídeo conhecida ou podem ser preparados e purificados usando tecnologia recombinante. Oligopeptídeos de ligação à LY6 são normalmente de pelo menos aproximadamente 5 aminoácidos em tamanho, alternativamente pelo menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22,
 20 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, ou 100 aminoácidos em tamanho ou mais, em que tais oligopeptídeos que são capazes
 25 de ligação, preferencialmente especificamente, a um polipeptídeo LY6 como descrito aqui. Oligopeptídeos de ligação à LY6 podem ser identificados sem experimentação indevida usando técnicas bem-conhecidas. Neste sentido, é observado que as técnicas para selecionar bibliotecas de oligopeptídeo para oligopeptídeos que são capazes de ligar-se especificamente a um alvo polipeptídico são bem-conhecidas na técnica (vide, por exemplo, Patentes U.S. Números 5.556.762, 5.750.373, 4.708.871, 4.833.092, 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689, 5.663.143; Números de Publicação PCT. WO 84/03506 e
 30

WO84/03564; Geysen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984); Geysen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985); Geysen *et al.*, em Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen *et al.*, J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987); Schoofs *et al.*, J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirla, S. E. *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378; Lowman, H.B. *et al.* (1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T. *et al.* (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. *et al.* (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A.S. *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363, e Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:688).

10 Neste sentido, exposição de bacteriófago (fago) é uma técnica bem-conhecida que permite selecionar grandes bibliotecas de oligopeptídeo para identificar membro(s) daquelas bibliotecas que são capazes de ligar-se especificamente a um alvo polipeptídico. Exposição de fago é uma técnica pela qual os polipeptídeos variantes são expostos como proteína de fusão na proteína de revestimento na superfície de partículas bacteriófagas (Scott, J.K. e Smith, G. P. (1990) Science 249: 386). A utilidade da exposição de fago está situada no fato que as grandes bibliotecas de variantes proteicas randomizadas seletivamente (ou cDNAs clonados randomicamente) podem ser rapidamente e eficientemente classificadas por aquelas sequências que ligam-se a uma molécula-alvo com alta afinidade. Exposição de bibliotecas de peptídeo (Cwirla, S. E. *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378) ou proteína (Lowman, H.B. *et al.* (1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T. *et al.* (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. *et al.* (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A.S. *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363) em fago foram usadas para selecionar milhões de polipeptídeos ou oligopeptídeos com propriedades de ligação específicas (Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2). Sorteamento de bibliotecas de fago de mutantes randômicos necessita de uma estratégia para construção e propagação de um grande número de variantes, um procedimento para purificação por afinidade usando o receptor-alvo, e um meio de avaliação dos resultados de enriquecimentos de ligação. Patentes U.S. Números 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689, e 5.663.143.

Embora a maioria dos métodos de exposição de fago tenham usado fago filamentoso, sistemas de exposição de fago lambdoide (WO 95/34683; Patente U.S. 5.627.024), sistemas de exposição de fago T4 (Ren *et al.*, Gene, 215: 439 (1998); Zhu *et al.*, Cancer Research, 58 (15): 3209-3214 (1998); Jiang *et al.*, Infection & Immunity, 65 (11): 4770-4777 (1997); Ren *et al.*, Gene, 195 (2):303-311 (1997); Ren, Protein Sci., 5: 1833 (1996); Efimov *et al.*, Virus Genes, 10: 173 (1995)) e sistemas de exposição de fago T7 (Smith and Scott, Methods in Enzymology, 217: 228-257 (1993); Patente U.S. 5.766.905) também são conhecidos.

Muitas outras melhorias e variações do conceito de exposição de fago básico foram desenvolvidas agora. Estas melhorias aumentam a capacidade de sistemas de exposição para selecionar bibliotecas peptídicas para ligação a moléculas-alvo selecionadas e expor proteínas funcionais com potencial de selecionar esta proteína para propriedades desejadas. Dispositivos de reação combinatórios para reações de exposição de fago foram desenvolvidos (WO 98/14277) e as bibliotecas de exposição de fago foram usadas para analisar e controlar interações bimoleculares (WO 98/20169; WO 98/20159) e propriedades de peptídeos helicoidais constrito (WO 98/20036). WO 97/35196 descreve um método de isolamento de um ligante de afinidade no qual uma biblioteca de exposição de fago é contatada com uma solução na qual o ligante ligar-se-á a uma molécula-alvo e uma segunda solução na qual o ligante de afinidade não ligar-se-á à molécula-alvo, para isolar seletivamente ligantes de ligação. WO 97/46251 descreve um método de seleção por afinidade de uma biblioteca de exposição de fago randômico com um anticorpo purificado por afinidade e então isolando fago de ligação, seguido por um processo de microseleção de fago por afinidade usando poços de microplaca para isolar fago de ligação de alta afinidade. O uso de proteína A de *Staphylococcus aureus* como um marcador de afinidade também foi relatado (Li *et al.* (1998) Mol Biotech., 9). WO 97/47314 descreve o uso de bibliotecas de subtração de substrato para distinguir especificidades enzimáticas usando uma biblioteca combinatória que pode ser uma biblioteca de exposição de fago. Um método para seleção de enzimas ade-

quadas para uso em detergentes usando exposição de fago é descrito em WO 97/09446. Métodos adicionais de seleção de proteína de ligação específica são descritos nas Patentes U.S. Números 5.498.538, 5.432.018, e WO 98/15833.

5 Métodos para geração de bibliotecas de peptídeo e seleção destas bibliotecas também são descritos nas Patentes U.S. Números 5.723.286, 5.432.018, 5.580.717, 5.427.908, 5.498.530, 5.770.434, 5.734.018, 5.698.426, 5.763.192, e 5.723.323.

No aspecto, a presente invenção refere-se a ligantes do polipeptídeo LYPD5. A figura 32 demonstra isso mostrando células COS não-transfectadas (A) e células COS transfectadas com GLG-1 e marcadas com a proteína LYPD5-Fc. Em uma modalidade, o ligante de LYPD5 é a glicoproteína 1 localizada no complexo golgi (GLG-1) ou polipeptídeo e-selectina 1 (ESL-1) como mostrado nas SEQ ID NOS:18, 20, 22, ou 24, codificadas pelo ácido nucleico mostrado como SEQ ID NOS:17, 19, 21, ou 23, respectivamente. Em outra modalidade, o polinucleotídeo codificação de um polipeptídeo GLG-1 compreende pelo menos 15, pelo menos 25, pelo menos, pelo menos 50, pelo menos 100, pelo menos 250, pelo menos 500, pelo menos 750, pelo menos 1000, pelo menos 1250, pelo menos 1500, pelo menos 1750, pelo menos 2000, pelo menos 2040, pelo menos 2090, pelo menos 2150, pelo menos 2200, pelo menos 2300, pelo menos 2400, pelo menos 2500, pelo menos 2600, pelo menos 2700, pelo menos 2800, pelo menos 2900, pelo menos 3000, pelo menos 3100, pelo menos 3200, pelo menos 3300, pelo menos 3400, pelo menos 3500, pelo menos 3600, pelo menos 3700, ou pelo menos 3720 nucleotídeos contíguos das SEQ ID NOS 17, 19, 21, ou 23, ou o polinucleotídeo de codificação de um GLG-1 compreende SEQ ID NOS:17, 19, 21, ou 23. Em uma modalidade, um polinucleotídeo que se liga a um polinucleotídeo de codificação de um GLG-1 (SEQ ID NOS:17, 19, 21, ou 23), ou fragmento do mesmo, tem identidade de sequência de pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 97%, de pelo menos 99% ou de 100% com o polipeptídeo GLG-1 ou fragmento do mesmo. Em uma modalidade, o polipeptí-

deo GLG-1 compreende pelo menos 10, pelo menos 25, pelo menos 50, pelo menos 75, pelo menos 100, pelo menos 125, pelo menos 150, pelo menos 175, pelo menos 200, pelo menos 225, pelo menos 250, pelo menos 275, pelo menos 300, pelo menos 325, pelo menos 350, pelo menos 400, pelo menos 450, pelo menos 500, pelo menos 550, pelo menos 600, pelo menos 650, pelo menos 700, pelo menos 750, pelo menos 800, pelo menos 850, pelo menos 900, pelo menos 950, pelo menos 1000, pelo menos 1050, pelo menos 1100, pelo menos 1150, ou pelo menos 1200 aminoácidos contíguos das SEQ ID NOS: 18, 20, 22, ou 24, ou o polipeptídeo GLG-1 compreende as SEQ ID NOS: 18, 20, 22, ou 24. GLG-1 ou ESL-1 são expressos em neutrófilos, acredita-se estar envolvidos no extravasamento de neutrófilos em tecidos, e pensa-se que desempenham um papel importante na inflamação (vide Hidalgo *et al.* (2007) *Immunity*, 26 (4): 477-489 incorporado aqui por referência em sua totalidade). GLG-1 ou ESL-1 têm 14 domínios de GLG1 ricos em cisteína. O domínio extracelular (ECD) é longo e como descrito abaixo, e variantes ou fragmentos do ECD de GLG-1 foram encontrados tendo capacidade de ligar-se a LYPD5.

Em outra modalidade, o ligante de LYPD5 é uma variante ou fragmento de uma molécula GLG-1 ou ESL-1 descrita aqui. Como mostrado na Figura 33A a B, GLG-1 ou ESL-1 podem ser vistos como fragmentos 1, 2, 3 e 4 e como descrito no Exemplo 11, qualquer um dos 4 fragmentos são suficientes para a ligação à LYPD5.

Em outra modalidade, o ligante de LYPD5 é uma variante ou fragmento de GLG-1 ou ESL-1 que é um domínio GLG-1 único. Como mostrado na Figura 34A a B, GLG-1 é composto de múltiplos domínios GLG-1 e como descrito no Exemplo 11, os domínios GLG-1 únicos são suficientes para a ligação à LYPD5.

Em outra modalidade, o ligante de LYPD5 é uma variante ou fragmento de GLG-1 ou ESL-1 que é específico para LYPD5. Como mostrado na Figura 35A a B, GLG-1 inclui domínios de 26 a 114, domínio 115, e domínio 150 e como descrito no Exemplo 11, o domínio 115 se liga a LYPD5 mas os domínios de 26 a 114 não ligam-se à LYPD5.

A presente invenção contempla variantes de GLG-1 na mesma maneira que contempla variantes de membros da família LY6.

C. Variantes Polipeptídicas

Além dos polipeptídeos, anticorpos e polipeptídeos de ligação à LY6 descritos aqui, é contemplado que as variantes de tais moléculas podem ser preparadas para uso com a invenção aqui. Tais variantes podem ser preparadas pela introdução de modificações nucleotídicas apropriadas no DNA de codificação, e/ou pela síntese do anticorpo ou polipeptídeo desejado. Aqueles versados na técnica apreciarão que modificações de aminoácido pode alterar processos pós-traducionais destas moléculas, tais como modificação do número ou posição de sítios de glicosilação ou alteração das características de ancoragem à membrana.

Variações na sequência de aminoácido podem ser feitas, por exemplo, usando quaisquer das técnicas e diretrizes de mutações conservativas e não-conservativas apresentadas, por exemplo, na Patente Norteamericana Número 5.364.934. Variações podem ser uma substituição, deleção ou inserção de um ou mais códons que codificam a sequência de aminoácidos e resultam em uma modificação na sequência de aminoácidos quando comparado com a sequência natural. Opcionalmente a variação é pela substituição de pelo menos um aminoácido com qualquer outro aminoácido em um ou mais dos domínios da sequência de aminoácido de interesse. A orientação na determinação a qual resíduo de aminoácido pode ser inserido, substituído ou deletado sem afetar adversamente a atividade desejada pode ser considerado pela comparação da sequência da sequência de aminoácidos de interesse com moléculas de proteína conhecidas homólogas e minimizando o número de modificações de sequência de aminoácido feitas em regiões de alta homologia. Substituições de aminoácido podem ser o resultado da substituição de um aminoácido com outro aminoácido que tem propriedades estruturais e/ou químicas similares, tal como a substituição de uma leucina por uma serina, isto é, substituições de aminoácido conservativas. Inserções ou deleções podem estar opcionalmente na faixa de aproximadamente 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 para a atividade exibida pela sequência natural de tamanho total ou madura.

Os fragmentos dos vários polipeptídeos são fornecidos aqui.

- 5 Tais fragmentos podem ser truncados no N-terminal ou C-terminal, ou podem perder resíduos internos, por exemplo, quando comparado com um anticorpo ou proteína natural de tamanho total. Tais fragmentos que perderam resíduos de aminoácidos que não são essenciais para uma atividade biológica desejada são também úteis com os métodos descritos.

- 10 Os fragmentos polipeptídicos acima podem ser preparados por qualquer uma das diversas técnicas convencionais. Fragmentos peptídicos desejados podem ser quimicamente sintetizados. Uma abordagem alternativa envolve geração de tais fragmentos por digestão enzimática, por exemplo, pelo tratamento da proteína com uma enzima conhecida por clivar proteí-
- 15 nas em sítios definidos por determinados resíduos de aminoácidos, ou pela digestão do DNA com enzimas de restrição adequadas e isolamento do fragmento desejado. Ainda outra técnica adequada envolve o isolamento e a amplificação de um fragmento de DNA de codificação do fragmento desejado pela reação de polimerase em cadeia (PCR). Oligonucleotídeos que definem os terminais desejados do fragmento de DNA são empregados nos iniciadores 5' e 3' na PCR. Preferencialmente, tais fragmentos compartilham
- 20 pelo menos uma atividade biológica e/ou imunológica com a molécula de tamanho total correspondente.

- Em determinadas modalidades, substituições conservativas do
- 25 interesse são mostradas na Tabela 6 sob o título de substituições preferenciais. Se tais substituições resultam em uma modificação na atividade biológica, então modificações mais substanciais, denominadas substituições exemplares na Tabela 6, ou como ainda descrito abaixo em referência a classes de aminoácidos, são introduzidas e os produtos selecionados a fim de
- 30 identificar a variante desejada.

Resíduo	Substituições	Substituições
Original	Exemplares	Preferenciais
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp, Gln	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine	Leu
Leu (L)	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucine	Leu

- Modificações substanciais na função ou identidade imunológica do polipeptídeo LY6 são realizadas pela seleção de substituições que se
- 5 diferenciam significativamente no seu efeito na manutenção (a) a estrutura do esqueleto polipeptídico na área da substituição, por exemplo, como uma conformação em folha ou helicoidal, (b) a carga ou hidrofobicidade da molécula no sítio-alvo, ou (c) o volume da cadeia lateral. Os resíduos que ocorrem naturalmente são divididos em grupos com base nas propriedades co-
- 10 muns de cadeia lateral:
- (1) hidrofóbico: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
 - (2) neutro hidrofílico: Cys, Ser, Thr; Asn; Gln
 - (3) ácido: Asp, Glu;
 - (4) básico: His, Lys, Arg;
 - 15 (5) resíduos que influenciam na orientação da cadeia: Gly, Pro; e
 - (6) aromático: Trp, Tyr, Phe.

Substituições não-conservativas envolverão a troca de um membro de uma destas classes por outra classe. Tais resíduos substituídos também podem ser introduzidos nos sítios de substituição conservativa ou, mais preferencialmente, em sítios remanescente (não-conservados).

5 As variações podem ser feitas usando métodos conhecidos na técnica tais como mutagênese mediada por oligonucleotídeo (sítio dirigida), varredura de alanina, e mutagênese por PCR. Mutagênese sítio dirigida (Carter *et al.*, Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller *et al.*, Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)), mutagênese de cassete (Wells *et al.*, Gene, 34:315
10 (1985)), mutagênese por seleção de restrição (Poços *et al.*, Philos. Trans. R. Soc. London Sera, 317:415 (1986)) ou outras técnicas conhecidas podem ser realizadas no DNA clonado para produzir a molécula antiLY6.

 Análise por varredura de aminoácido também pode ser empregada para identificar um ou mais aminoácidos ao longo de uma sequência
15 contígua. Entre os aminoácidos preferenciais para varredura, estão aminoácidos relativamente pequenos, neutros. Tais aminoácidos incluem alanina, glicina, serina, e cisteína. Alanina é tipicamente um aminoácido de varredura preferencial entre este grupo porque elimina a cadeia lateral além do carbono beta e menos provavelmente altera a conformação de cadeia principal do
20 variante (Cunningham and Wells, Science, 244:1081-1085 (1989)). Alanina também é tipicamente preferencial porque é o aminoácido mais comum. Além disso, é frequentemente encontrada em ambas as posições enterrada e exposta (Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co, N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976)). Se a substituição de alanina não produzir quantida-
25 des adequadas do variante, um aminoácido isotérico pode ser usado.

 Qualquer resíduo de cisteína não-envolvido na manutenção da conformação própria do polipeptídeo LY6 também pode ser substituído, geralmente por serina, para melhorar a estabilidade oxidativa da molécula e prevenir ligação cruzada aberrante. De modo inverso, ligação(ões) de cisteína
30 na pode ser adicionada a tal molécula para melhorar sua estabilidade (particularmente onde o anticorpo é um fragmento de anticorpo, tal como um fragmento Fv).

Um tipo particularmente preferencial de variante substituinte envolve a substituição de um ou mais resíduos da região hipervariável de um anticorpo parental (por exemplo, um anticorpo humanizado ou humano). Geralmente, a variante (s) resultante selecionada para desenvolvimento adicional terá propriedades biológicas melhoradas em relação ao anticorpo parental a partir do qual são gerados. Uma maneira conveniente para gerar tais variantes substituintes envolve maturação de afinidade usando exposição de fago. Resumidamente, vários sítios de região hipervariável (por exemplo, 6 a 7 sítios) são mutados para gerar todas as substituições amino possíveis em cada sítio. As variantes de anticorpo geradas dessa forma são expostas de uma maneira monovalente a partir de partículas de fago filamentosas como fusões ao produto do gene III de M13 empacotado em cada partícula. As variantes expostas em fago então são selecionadas por sua atividade biológica (por exemplo, afinidade de ligação) como descrito aqui. A fim de identificar sítios da região hipervariável candidatos para modificação, mutagênese por varredura de alanina pode ser realizadas para identificar resíduos da região hipervariável que contribuem significativamente para a ligação ao antígeno. Alternativamente, ou adicionalmente, pode ser benéfico para analisar uma estrutura cristalina do complexo anticorpo-antígeno identificar pontos de contato entre o anticorpo e o polipeptídeo-alvo. Tais resíduos de contato e os resíduos vizinhos são candidatos para substituição de acordo com as técnicas elaboradas aqui. Uma vez que tais variantes são geradas, o painel de variantes é submetido à seleção como descrito aqui e os anticorpos com propriedades superiores em um ou mais ensaios relevantes podem ser selecionados para desenvolvimento adicional.

Moléculas de ácidos nucleicos que codificam as variantes de sequência de aminoácido dos polipeptídeos LY6 são preparadas por uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Estes métodos incluem, mas não são limitados a, isolamento a partir de uma fonte natural (no caso de variantes de sequência de aminoácido que ocorrem naturalmente) ou preparação por mutagênese mediada por oligonucleotídeo (ou sítio dirigida), mutagênese por PCR, e mutagênese de cassete de uma sequência natural ou

uma variante preparada mais anteriormente.

D. Modificações de Polipeptídeos

Polipeptídeos e/ou anticorpos que foram covalentemente modificados também podem ser adequados para uso dentro do escopo desta invenção. Um tipo de modificação covalente inclui reação de resíduos de aminoácidos direcionados de tais anticorpos e polipeptídeos com um agente derivatizante orgânico que é capaz de reação com cadeias laterais selecionadas ou resíduos N- ou C-terminais de tais anticorpos e polipeptídeos. Derivatização com agentes bifuncionais é útil, por exemplo, para ligação cruzada das moléculas precedentes a uma matriz de suporte aquoso insolúvel ou superfície para uso em purificação. Agentes de ligação cruzada comumente usados incluem, por exemplo 1,1-bis (diazacetil)-2-feniletano, glutaraldeído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por exemplo, ésteres com ácido 4-azidossalicílico, imidoésteres homobifuncionais, incluindo ésteres disuccinimidil, tais como 3,3'-ditiobis (succinimidilpropionato), maleimidos 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 de glutaminila e asparaginila para os resíduos de glutamila e aspartila correspondentes, respectivamente, hidroxilação de prolina e lisina, fosforilação de grupos hidroxila de resíduos serila ou treonila, metilação dos grupos α -amino das cadeias laterais de 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 do grupo N-terminal e amidação de qualquer carboxila do C-terminal.

Outro tipo de modificação covalente dos polipeptídeos ou anticorpos compreende a alteração do padrão de glicosilação natural do anticorpo ou polipeptídeo. "Alteração do modelo de glicosilação natural" é destinado para os objetivos aqui a significar deleção de uma ou mais porções de carboidratos encontradas na sequência natural (pela remoção do sítio de glicosilação subjacente ou pela deleção da glicosilação por meios químicos e/ou enzimáticos), e/ou adição de um ou mais sítios de glicosilação que não

estão presentes na respectiva sequência natural. Além disso, a frase inclui modificações qualitativas na glicosilação das proteínas naturais, envolvendo uma modificação na natureza e proporções das várias porções de carboidrato presentes.

5 Glicosilação de anticorpos e outros polipeptídeos é tipicamente N-ligada ou O-ligada. N-ligada refere-se à ligação da porção de carboidrato à cadeia lateral de um resíduo asparagina. As sequências tripeptídicas de asparagina-X-serina e asparagina-X-treonina, onde X é qualquer aminoácido exceto prolina, são as sequências de reconhecimento da ligação enzimática
10 da porção de carboidrato à cadeia lateral de asparagina. Dessa forma, a presença de qualquer destas sequências tripeptídicas em um polipeptídeo cria um potencial sítio de glicosilação. Glicosilação O-ligado refere-se à ligação de um dos açúcares N-acetilgalactosamina, galactose ou xilose a um ácido hidroxiamina, mais comumente serina ou treonina, embora 5-
15 hidroxiprolina ou 5-hidroxilisina também possam ser usados.

Adição de sítios de glicosilação pode ser realizada pela alteração da sequência de aminoácidos tal que contenha uma ou mais das sequências tripeptídicas descritas acima (para sítios de glicosilação N-ligados). A alteração também pode ser feita pela adição ou substituição, de um ou
20 mais resíduos serina ou treonina da sequência do anticorpo ou polipeptídeo original (para sítios de glicosilação O-ligados). Tal sequência anticorpo ou polipeptídica pode ser opcionalmente alterada através de modificações ao nível de DNA, particularmente pela mutação do DNA de codificação ads sequências de aminoácidos precedentes em bases pré-selecionadas tal que
25 códons que são gerados traduzirão os aminoácidos desejados.

Outro meio de aumentar o número de porções de carboidrato é pela ligação química ou enzimática de glicosídeos ao polipeptídeo. Tais métodos são descritos na técnica, por exemplo, em WO 87/05330 publicado em 11 de setembro de 1987, e em Aplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem.,
30 pp. 259-306 (1981).

Remoção de porções de carboidrato pode ser realizada quimicamente ou enzimaticamente ou pela substituição mutacional dos códons de

codificação dos resíduos de aminoácidos que servem como alvo para glicosilação. Técnicas deglicosilação químicas são conhecidas na técnica e descritas, por exemplo, por Hakimuddin, *et al.*, *Arc. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987) e por Edge *et al.*, *Anal. Biochem.*, 118:131 (1981). Clivagem enzimática de porções de carboidratos em polipeptídeos pode ser realizada pelo uso de várias endo- e exo-glicosidases como descrito por Thotakura *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 138:350 (1987).

Outro tipo de modificação covalente compreende ligação a um de vários dos polímero não-protéicos, por exemplo, polietileno glicol (PEG), polipropileno glicol, ou polioxiálkilenos, da maneira apresentada nas Patentes U.S. Números 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ou 4.179.337. O polipeptídeo LY6 também pode ser capturado em microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial (por exemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulose ou gelatina e microcápsulas de poli(metilmetacilato), respectivamente), em sistemas de entrega de fármaco coloidais (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas), ou em macroemulsões. Tais técnicas são descritas em Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oslo, A., ed., (1980).

Modificações na formação de moléculas quiméricas resultam de fusões de um polipeptídeo ao outro, polipeptídeo heterólogo ou sequência de aminoácido são contemplados para uso com os presentes métodos.

Em uma modalidade, uma molécula quimérica compreende uma fusão de um polipeptídeo com um polipeptídeo marcador que fornece um epitopo ao qual um anticorpo antimarcador pode ligar-se seletivamente. O epitopo marcador é geralmente colocado nos terminais amino ou carboxila de tal anticorpo ou polipeptídeo. A presença de tais formas com epitopo marcado de tais anticorpos ou polipeptídeos podem ser detectadas usando um anticorpo contra o polipeptídeo marcador. Além disso, fornecimento do epitope marcado permite a tais anticorpos ou polipeptídeos ser prontamente purificados pela purificação por afinidade usando um anticorpo antimarcador ou outro tipo da matriz de afinidade que se liga ao epitopo marcador. Vários

polipeptídeos marcadores e seus respectivos anticorpos são bem-conhecidos na técnica. Exemplos incluem marcadores poli-histidina (poli His) ou poli-histidina-glicina (poli-his-gly); polipeptídeo marcador de influenza HA e seu anticorpo 12CA5 (Field *et al.*, Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)); o

5 marcador de c-myc e os anticorpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 e 9E10 do mesmo (Evan *et al.*, Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)); e o marcador glicoproteína D do vírus de Herpes Simplex (gD) e seu anticorpo (Paborsky *et al.*, Protein Engineering, 3 (6):547-553 (1990)). Outros polipeptídeos marcadores incluem o peptídeo marcador (Hopp *et al.*, Biotechnology,

10 6:1204-1210 (1988)); o peptídeo do epitopo KT3 (Martin *et al.*, Science, 255:192-194 (1992)); um peptídeo do epitopo α -tubulina (Skinner *et al.*, J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)); e o marcador peptídico da proteína do gene T7 10 (Lutz-Freyermuth *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)).

15 Em uma modalidade alternativa, a molécula quimérica pode compreender uma fusão de um polipeptídeo com uma imunoglobulina ou uma determinada região de uma imunoglobulina. Para uma forma bivalente da molécula quimérica (também referida como um "imunoadesina"), tal fusão poderia ser à região Fc de uma molécula IgG. As fusões de Ig preferencial-

20 mente incluem a substituição de uma forma solúvel (domínio transmembrana deletado ou inativado) de um anticorpo ou polipeptídeo precedente no lugar de pelo menos uma região variável em uma molécula de Ig. Em uma modalidade particularmente preferencial, a fusão de imunoglobulina inclui a regiões de dobradiça, CH₂ e CH₃, ou dobradiça, CH₁, CH₂ e CH₃ da molécula de

25 IgG1. Para a produção de fusões de imunoglobulina vide também Patente Norte-americana Número 5.428.130 emitido em 27 de junho de 1995.

E. Preparação de Polipeptídeos

A descrição abaixo refere-se principalmente à produção de polipeptídeos pelo cultivo de células transformadas ou transfectadas com um

30 vetor contendo ácido nucleico de tais anticorpos, polipeptídeos e oligopeptídeos. O termo "polipeptídeos" pode incluir anticorpos, polipeptídeos e oligopeptídeos. É, naturalmente, contemplado que métodos alternativos, que são

bem-conhecidos na técnica, podem ser empregados para preparar tais anticorpos, polipeptídeos e oligopeptídeos. Por exemplo, a sequência de aminoácidos apropriada, ou porções da mesma, pode ser produzida pela síntese peptídica direta usando técnicas de fase sólida [ver, por exemplo, Stewart *et al.*, Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154 (1963)]. Síntese proteica *in vitro* pode ser realizada usando técnicas manuais ou pela automação. Síntese automatizada pode ser realizada, por exemplo, usando um Sintetizador de Peptídeo da Applied Biosystems (Foster City, CA) usando instruções do fabricante. Várias porções de tais anticorpos, polipeptídeos ou oligopeptídeos podem ser quimicamente sintetizadas separadamente e combinadas usando métodos químicos ou enzimáticos para produzir o produto desejado.

1. Isolamento de DNA de Codificação de um Polipeptídeo

O DNA de codificação de um polipeptídeo pode ser obtido a partir de uma biblioteca de cDNA preparada a partir do tecido acreditado possuir mRNA de tal anticorpo, polipeptídeo ou oligopeptídeo e expressá-lo a um nível detectável. Consequentemente, o DNA de codificação de tais polipeptídeos pode ser convenientemente obtido a partir de uma biblioteca de cDNA preparada de tecido humano, uma biblioteca genômica ou por procedimentos sintéticos conhecidos (por exemplo, síntese de ácido nucleico automatizada).

Bibliotecas podem ser selecionadas com sondas (tais como oligonucleotídeos de pelo menos aproximadamente 20 a 80 bases) desenhadas para identificar o gene de interesse ou a proteína codificada por ele. Seleção da biblioteca de cDNA ou genômica com a sonda selecionada pode ser conduzida usando procedimentos-padrão, tal como descrito em Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: a Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Alternativamente, a metodologia de PCR pode ser usada. [Sambrook *et al.*, *supra*; Dieffenbach *et al.*, PCR Primer: a Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Técnicas para seleção de uma biblioteca de cDNA são bem-

conhecidas na técnica. As sequências de oligonucleotídeo selecionadas como sondas devem ser de tamanho suficiente e suficientemente inequívocas que falsos positivos sejam minimizados. O oligonucleotídeo é preferencialmente marcado tal que possa ser detectado na hibridização ao DNA na biblioteca que é selecionada. Métodos de marcação são bem-conhecidos na técnica, e incluem uso de radiomarcadores como ATP marcado com ^{32}P , biotinilação ou marcação enzimática. Condições de hibridização, incluindo estringência moderada e alta estringência, são fornecidas em Sambrook *et al.*, supra.

As sequências identificadas em tais métodos de seleção de biblioteca podem ser comparadas e alinhadas a outras sequências conhecidas depositadas e disponíveis em bancos de dados públicos, tais como GenBank ou outros bancos de dados de sequência privados. A identidade de sequência (no nível de aminoácido ou nucleotídico) dentro de regiões definidas da molécula ou através da sequência de tamanho total pode ser determinada usando métodos conhecidos na técnica e como descrito aqui.

O ácido nucleico tendo a sequência de codificação de proteína pode ser obtido pela seleção de bibliotecas de cDNA ou genômicas selecionadas usando a sequência de aminoácido deduzida descritas aqui pela primeira vez, e, se necessário, usando procedimentos de extensão com iniciador convencionais como descrito em Sambrook *et al.*, supra, para detectar precursores e processadores intermediários de mRNA que podem não ter sido transcrito reversamente em cDNA.

2. Seleção e Transformação de Células Hospedeiras

Células hospedeiras são transfectadas ou transformadas com vetores de expressão ou clonagem descritos aqui para a produção de polipeptídeo LY6 e cultivado em meios nutritivos convencionais modificados como apropriado para induzir promotores, selecionar transformantes, ou amplificar os genes de codificação das sequências desejadas. As condições de cultura, tais como meios, temperatura, pH e similares, podem ser selecionadas pelo versado na técnica semexperimentação indevida. Em geral, princípios, protocolos e as técnicas práticas para maximizar a 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.

Métodos de transfecção celular eucariótica e transformação celular procariótica são conhecidos ao versado na técnica ordinariamente, por exemplo, CaCl_2 , CaPO_4 , mediado por lipossoma e eletroporação. Dependendo da célula hospedeira usada, a transformação é realizada usando técnicas-padrão apropriadas para tais células. O tratamento com cálcio empregando cloreto de cálcio, como descrito em Sambrook *et al.*, supra, ou eletroporação é geralmente usada para procariontes. Infecção com *Agrobacterium tumefaciens* é usada para transformação de certas células vegetais, como descrito por Shaw *et al.*, Gene, **23**:315 (1983) e WO 89/05859 publicado em 29 de junho de 1989. Para células de mamífero sem tais paredes celulares, o método de precipitação por fosfato de cálcio de Graham e van der Eb, Virology, **52**:456-457 (1978) pode ser empregado. Aspectos gerais de sistema de transfecções de célula hospedeira de mamífero foram descritos em Patente Norte-americana Número 4.399.216. Transformações em levedura são tipicamente realizadas de acordo com os métodos de Van Solingen *et al.*, J. Bact., **130**:946 (1977) e Hsiao *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), **76**:3829 (1979). Entretanto, outros métodos para introdução de DNA em células, tal como pela microinjeção nuclear, eletroporação, fusão protoplástica bacteriana com células intactas, ou policações, por exemplo, polibreno, poliornitina, também podem ser usados. Para várias técnicas para transformação de células de mamífero, vide Keown *et al.*, Methods in Enzymology, **185**:527-537 (1990) e Mansour *et al.*, Nature, **336**:348-352 (1988).

Células hospedeiras adequadas para clonagem ou expressão de DNA nos vetores aqui incluem procariotas, levedura, ou células eucariotas superiores. Procariontes adequados incluem mas não são limitados a eubactéria, tais como organismos Gram-negativos ou Gram-positivos, por exemplo, Enterobacteriaceae, tal como *E. coli*. Várias cepas de *E. coli* estão publicamente disponíveis, tais como a cepa *E. coli* K12 MM294 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); cepa de *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) e K5

772 (ATCC 53.635). Outras células hospedeiras procarióticas adequadas incluem Enterobacteriaceae, tal como *Escherichia*, por exemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por exemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por exemplo, *Serratia marcescans*, e *Shigella*, bem como *Bacilli*, tais como *B. subtilis* e *B. licheniformis* (por exemplo, *B. licheniformis* 41P descrito em DD 266.710 publicado em 12 de abril de 1989), *Pseudomonas*, tais como *P. aeruginosa*, e *Streptomyces*. Estes exemplos são ilustrativos em vez de limitativos. A cepa W3110 é um hospedeiro particularmente preferencial ou hospedeiro parental porque é uma cepa hospedeira comum para fermentações de produto de DNA recombinante. Preferencialmente, a célula hospedeira secreta quantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por exemplo, a cepa W3110 pode ser modificada para efetuar uma mutação genética nos genes que codificam proteínas endógenas no hospedeiro, com exemplos de tais hospedeiros incluindo *E. coli* W3110 cepa 1A2, que tem o genótipo completo *tonA*; cepa de *E. coli* W3110 9E4, que tem o genótipo completo *tonA ptr3*; cepa de *E. coli* W3110 27C7 (ATCC 55.244), que tem o genótipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kan^r*; cepa de *E. coli* W3110 37D6, que tem o genótipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r*; cepa de *E. coli* W3110 40B4, que é a cepa 37D6 com uma mutação de deleção *degP* resistente não a kanamicina; e uma cepa de *E. coli* que tem uma protease periplasmática mutante descritas em Patente Norte-americana Número 4.946.783 emitida em 7 de agosto de 1990. Alternativamente, em métodos de clonagem *in vitro*, por exemplo, PCR ou outras reações de polimerase de ácidos nucleicos, são adequados.

Anticorpo de tamanho total, os fragmentos de anticorpo, e a proteína de fusão de anticorpo podem ser produzidos em bactérias, especialmente quando a glicosilação e função efetora de Fc não são necessárias, tal como quando o anticorpo terapêutico é conjugado a um agente citotóxico (por exemplo, uma toxina) e o imunoc conjugado por si mesmo mostra a eficácia na destruição de célula tumoral. Anticorpos de tamanho total têm a maior meia-vida na circulação. A produção em *E. coli* é mais rápida e com custo

mais eficiente. Para a expressão de fragmentos de anticorpo e polipeptídeos em bactérias, ver, por exemplo, Patente U.S. 5.648.237 (Carter *et al.*), Patente U.S. 5.789.199 (Joly *et al.*), e Patente U.S. 5.840.523 (Simmons *et al.*) que descrevem a região de iniciação de tradução (TIR) e sequências de sinal para otimizar a expressão e a secreção, estas patentes incorporadas aqui por referência. Após expressão, o anticorpo é isolado a partir de pasta celular de *E. coli* em uma fração solúvel e pode ser purificada através de, por exemplo, uma coluna de proteína A ou G dependendo do isotipo. Purificação final pode ser realizada similar ao processo de purificação do anticorpo expresso em células adequadas (por exemplo, células CHO).

Além de procariontes, micróbios eucarióticos, tais como fungos filamentosos ou leveduras são hospedeiros adequados para clonagem ou expressão de vetores de codificação dos polipeptídeos desejados. *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo hospedeiro eucariótico inferior comumente usado. Outros incluem *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; EP 139.383 publicada em 2 de maio de 1985); hospedeiros *Kluyveromyces* (Patente Norte-americana Número 4.943.529; Fleer *et al.*, Bio/Technology, 9:968-975 (1991)) tal como, por exemplo, *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. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilum* (ATCC 36.906; Van den Berg *et al.*, Bio/Technology, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans*, e *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070; Sreekrishna *et al.*, J. Basic Microbiol. 28:265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces*, tais como *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394.538 publicado em 31 de outubro de 1990); e fungos filamentosos tais como, por exemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357 publicado em 10 de janeiro de 1991), e hospedeiros *Aspergillus*, tais como *A. nidulans* (Ballance *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983]; Tilburn *et al.*, Gene, 26:205-221 [1983]; Yelton *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474

[1984]) e *A. Niger* (Kelly and Hynes, EMBO J., 4:475-479 [1985]). Leveduras metilotrópicas são adequadas aqui e incluem, mas não são limitadas a, levedura capaz de crescimento em metanol selecionado a partir dos gêneros compostos de *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, e *Rhodotorula*. Uma lista de espécies específicas que são exemplares desta classe de leveduras pode ser considerada em C. Anthony, The Biochemistry of Metilotrophs, 269 (1982).

Células hospedeiras adequadas para expressão da produção de de polipeptídeos glicosilados são derivadas de organismos multicelulares.

Exemplos de células de invertebrados incluem células de inseto, tais como *Drosophila* S2 e *Spodoptera* Sf9, bem como células vegetais, tais como culturas celulares de algodão, milho, batata, soja, petúnia, tomate, e tabaco. Numerosas cepas baculovirais e variantes e células hospedeiras de inseto permissivas correspondentes a partir de hospedeiros, tais como *Spodoptera frugiperda* (lagarta), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de fruta), e *Bombyx mori* foram identificadas. Uma variedade de cepas virais para transfecção estão publicamente disponíveis, por exemplo, a variante I-1 de *Autographa californica* NPV e a cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, e tais vírus podem ser usados como o vírus aqui de acordo com a presente invenção, particularmente para a transfecção de células de *Spodoptera frugiperda*.

Entretanto, o interesse foi ainda maior em células de vertebrados, e a propagação de cultura de células de vertebrados (cultura de tecido) tornou-se um procedimento de rotina. Exemplos de linhagens celulares hospedeira de mamíferos úteis são linhagem CV1 de rim de macaco transformada por SV40 (COS 7, ATCC CRL 1651); linhagem de rim embrionário humana (células 293 ou 293 subclonadas para crescimento em cultura em suspensão, Graham *et al.*, J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células de rim de hamster bebê (BHK, ATCC CCL 10); células de ovário de hamster chinês/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); células de sertoli de camundongo (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de rim de macaco (CV1 ATCC CCL 70); células de rim de

macaco verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de rim canina (MDCK, ATCC CCL 34); células de fígado de rato búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmão humano (W138, ATCC CCL 75); células de fígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamário de camundongo (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; e uma linhagem de hepatoma humano (Hep G2).

Células hospedeiras são transformadas com vetores de clonagem ou expressão descritos acima para produção de polipeptídeo desejado e cultivadas em meios nutritivos convencionais modificados como apropriado para indução de promotores, seleção de transformantes, ou amplificação de genes de codificação das sequências desejadas.

3. Seleção e Uso de um Vetor Replicável

O ácido nucleico (por exemplo, cDNA ou DNA genômico) de codificação do respectivo polipeptídeo LY6 pode ser inserido em um vetor replicável para clonagem (amplificação do DNA) ou para a expressão. Vários vetores estão publicamente disponíveis. Vetor, por exemplo, pode estar na forma de um plasmídeo, cosmídeo, partícula viral, ou fago. A sequência de ácido nucleico apropriada pode ser inserida no vetor por vários procedimentos. Em geral, o DNA é inserido em um sítio(s) de restrição de endonuclease usando técnicas conhecidas de limitação apropriadas conhecidas na técnica. Componentes de vetor geralmente incluem, mas não são limitados a, uma ou mais de uma sequência sinal, uma origem de replicação, um ou mais marcadores gênicos, um elemento potencializador, um promotor, e uma sequência de terminação de transcrição. A construção de vetores adequados contendo um ou mais destes componentes emprega técnicas de ligação padrão que são conhecidas ao versado na técnica.

O polipeptídeo desejado pode ser produzido recombinantemente não só diretamente, mas também como um polipeptídeo de fusão com um polipeptídeo heterólogo, que pode ser uma sequência sinal ou outro polipeptídeo tendo um sítio de clivagem específico no N-terminal da proteína ou po-

lipeptídeo maduros. Em geral, a sequência sinal pode ser um componente do vetor, ou pode ser uma parte do DNA de codificação da sequência madura que é inserido no vetor. A sequência sinal pode ser uma sequência sinal procariótica selecionada, por exemplo, a partir dos líderes do grupo fosfatase alcalina, penicilinase, lpp, ou enterotoxina II estável ao calor. Para secreção de levedura, a sequência sinal pode ser, por exemplo, o líder invertase de levedura, líder de fator alfa (incluindo líderes de fator α *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*, o último descrito em Patente Norte-americana Número 5.010.182), ou líder de fosfatase ácida, o líder de glicoamilase de *C. albicans* (EP 362.179 publicada em 4 de abril de 1990), ou o sinal descrito em WO 90/13646 publicado em 15 de novembro de 1990. Na expressão de célula de mamífero, sequências de sinal de mamífero podem ser usadas para direcionar a secreção da proteína, tal como sequências de sinal a partir de polipeptídeos secretados das mesma ou espécie relacionada, bem como líderes secretórios virais.

Ambos vetores de expressão e clonagem contêm uma sequência de ácido nucleico que permite ao vetor replicar-se em uma ou mais células hospedeiras selecionadas. Tais sequências são bem-conhecidas por várias bactérias, levedura, e vírus. A origem de replicação do plasmídeo p-BR322 é adequada para a maioria das bactérias Gram-negativas, a origem do plasmídeo 2 μ é adequada para a levedura, e várias origens virais (SV40, poliovírus, adenovírus, VSV ou BPV) são úteis para vetores de clonagem em células de mamíferos.

Vetores de expressão e clonagem conterão tipicamente um gene de seleção, também chamado um marcador selecionável. Genes de seleção típicos codificam proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou outras toxinas, por exemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, ou tetraciclina, (b) complemento a deficiências auxotróficas, ou (c) fornece nutrientes críticos não-disponíveis a partir meios complexos, por exemplo, o gene de codificação da racemase D-alanina de Bacilli.

Um exemplo de marcadores selecionáveis adequados para células de mamíferos são aqueles que permitem a identificação de células com-

petentes em iniciar a codificação de ácido nucleico da proteína desejada, tal como DHFR ou timidina quinase. Uma célula hospedeira apropriada quando DHFR de tipo selvagem é empregada é a linhagem celular CHO deficiente na atividade DHFR, preparada e propagada como descrito por Urlaub *et al.*,
 5 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980). Um gene de seleção adequado para uso em levedura é o gene *trp1* presente no plasmídeo de levedura YRp7 [Stinchcomb *et al.*, Nature, 282:39 (1979); Kingsman *et al.*, Gene, 7:141 (1979); Tschemper *et al.*, Gene, 10:157 (1980)]. O gene *trp1* fornece um marcador de seleção para uma cepa mutante da levedura sem capaci-
 10 dade de crescer em triptofano, por exemplo, ATCC N. 44076 ou PEP4-1 [Jones, Genetics, 85:12 (1977)].

Expressão e vetores de clonagem normalmente contêm um promotor operacionalmente ligado à sequência de ácido nucleico de codificação da sequência de aminoácido desejada, a fim de direcionar a síntese
 15 mRNA. Promotores reconhecidos por uma variedade de células hospedeiras potenciais são bem-conhecidos. Promotores adequados para uso com hospedeiros procarióticos incluem os sistemas promotores de β -lactamase e lactose [Chang *et al.*, Nature, 275:615 (1978); Goeddel *et al.*, Nature, 281:544 (1979)], fosfatase alcalina, um sistema de promotor de triptofano
 20 (*trp*) [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36.776], e promotores híbridos, tais como o promotor tac [deBoer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)]. Promotores para uso em sistemas bacterianos também conterão um sequência Shine-Dalgarno (S.D.) operacionalmente ligada ao DNA de codificação da sequência proteica desejada.

25 Exemplos de sequências promotoras adequadas para uso com leveduras hospedeiras 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,
 30 hexoquinase, piruvato decarboxilase, fosfofrutoquinase, glucose-6-fosfato isomerase, 3-fosfoglicerato mutase, piruvato quinase, triosefosfato isomerase, fosfoglicose isomerase, e glicoquinase.

Outros promotores de levedura, que são promotores induzíveis tendo vantagem adicional de transcrição controlada por condições de cultivo, são as regiões promotoras da álcool desidrogenase 2, isocitocromo C, fosfatase ácida, enzimas degradativas associadas com o metabolismo de nitrogênio, metalotioneína, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, e enzimas responsáveis pela utilização de maltose e galactose. Vetores e promotores adequados para uso na expressão de levedura são ainda descritos em EP 73.657.

A transcrição de DNA em células hospedeiras mamíferas é controlada, por exemplo, por promotores obtidos a partir dos genomas de vírus, tais como poliovírus, poxvírus (Patente Britânica 2.211.504 publicada em 5 de julho de 1989), adenovírus (tais como Adenovírus 2), papilomavírus bovino, vírus de sarcoma aviário, citomegalovírus, um retrovírus, vírus de hepatite-B e Vírus Simian 40 (SV40), a partir de promotores mamíferos heterólogos, por exemplo, o promotor de actina ou um promotor de imunoglobulina, e de promotores de choque do calor, contanto que tais promotores sejam compatíveis com os sistemas da célula hospedeira.

A transcrição de um DNA de codificação do polipeptídeo desejado pode ser aumentada inserindo uma sequência potencializadora no vetor. Elementos potencializadores são elementos de atuação cis do DNA, normalmente aproximadamente de 10 a 300 bp, que atuam em um promotor para aumentar sua transcrição. Muitas sequências potencializadoras são conhecidas agora para genes de mamíferos (globina, elastase, albumina, α -fetoproteína, e insulina). Tipicamente, entretanto, cada um usará um potencializador para um vírus de célula eucariótica. Exemplos incluem potencializador SV40 no lado tardio da origem de replicação (bp 100 a 270), o potencializador do promotor precoce do citomegalovírus, o potencializador de poliovírus no lado tardio da origem de replicação, e potencializador de adenovírus. O potencializador pode ser unido ao vetor na posição 5' ou 3' à sequência de codificação das sequências de aminoácidos precedentes, mas é preferencialmente localizado em um sítio 5' do promotor.

Vetores de expressão usados em células hospedeiras eucarióti-

cas (levedura, fungos, inseto, planta, animal, humano, ou células nucleadas de outros organismos multicelulares) também conterão sequências necessárias para a terminação da transcrição e para estabilização do mRNA. Tais sequências estão comumente disponíveis a partir de 5' e, ocasionalmente 3',
 5 regiões não-traduzidas de DNAs ou cDNAs eucarióticos ou virais. Estas regiões contêm segmentos nucleotídicos transcritos como fragmentos poliadenilados na porção não-traduzida do mRNA de codificação do respectivo anticorpo, polipeptídeo ou oligopeptídeo descrito nesta seção.

Ainda em outros métodos, vetores, e células hospedeiras adequadas para a adaptação à síntese do respectivo anticorpo, polipeptídeo ou oligopeptídeo na cultura celular de vertebrado recombinante são descritos em Gething *et al.*, Nature, 293:620-625 (1981); Mantei *et al.*, Nature, 281:40-46 (1979); EP 117.060; e EP 117.058.

4. Cultivo de Células Hospedeiras

15 As células hospedeiras usadas para produzir o polipeptídeo LY6 podem ser cultivadas em uma variedade de meios. Os meios comercialmente disponíveis, tais como Ham's F10 (Sigma), Meio Essencial Mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), e Dulbecco's Modified Eagle's Medium ((DMEM), Sigma) são adequados para cultivo de células hospedeiras.
 20 Além disso, qualquer dos meios descritos em Ham *et al.*, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes *et al.*, Anal. Biochem. 102:255 (1980), Patentes U.S. Números 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; ou 5.122.469; WO 90/03430; WO 87/00195; ou Patente U.S. Re. 30.985 podem ser usadas como meios de cultura para células hospedeiras. Quaisquer destes meios podem ser su-
 25 plementado quando necessário com hormônios e/ou outros fatores de crescimento (tais como insulina, transferrina, ou fator de crescimento epidérmico), sais (tais como cloreto de sódio, cálcio, magnésio, e fosfato), tampões (tais como HEPES), nucleotídeos (tais como adenosina e timidina), antibióticos (tais como fármaco GENTAMICINAJ), elementos traço (definidos como
 30 compostos inorgânicos normalmente apresentam em concentrações finais na faixa de micromolar), e glicose ou uma fonte de energia equivalente. Quaisquer outros suplementos necessários também podem ser incluídos em

concentrações apropriadas que seriam conhecidas por aqueles versados na técnica. As condições de cultura, tais como temperatura, pH e similares, são aquelas anteriormente usadas com a célula hospedeira selecionada para expressão, e serão evidentes para ao versado ordinariamente.

5. Detecção da Amplificação/Expressão Gênica

Amplificação genética e/ou expressão pode ser medida em uma amostra diretamente, por exemplo, por Southern blotting, Northern blotting convencionais para quantificar a transcrição de mRNA [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)], Dot blotting (análise de DNA), ou hibridização *in situ*, usando uma sonda apropriadamente marcada, com base nas sequências fornecidas aqui. Alternativamente, anticorpos podem ser empregados que podem reconhecer duplexes específicos, incluindo duplexes de DNA, duplexes de RNA, e duplexes híbridos de DNA-RNA ou duplexes DNA-proteína. Os anticorpos por sua vez podem ser marcados e o ensaio pode ser realizado onde o dúplice é ligado a uma superfície, para que na formação de dúplices na superfície, a presença de anticorpo ligado ao dúplice possa ser detectada.

Expressão gênica, alternativamente, pode ser medida por métodos imunológicos, tais como marcação imuno-histoquímica de células ou seções de tecido e ensaio de cultura celular ou fluidos corporais, para quantificar diretamente a expressão do produto gênico. Anticorpos úteis para marcação e/ou ensaio imuno-histoquímico de amostras fluidas podem ser monoclonais ou policlonais, e podem ser preparados em qualquer mamífero. Convenientemente, os anticorpos adequados para o presente método podem ser preparados contra um polipeptídeo ou oligopeptídeo de sequência natural, ou contra a sequência exógena fusionada a DNA e de codificação de um epitopo de anticorpo específico de um polipeptídeo ou oligopeptídeo.

6. Purificação Proteica

Polipeptídeos podem ser recuperados do meio de cultura ou lisados da célula hospedeira. Se ligada à membrana, pode ser liberada da membrana usando uma solução detergente adequada (por exemplo Triton-X 100) ou por clivagem enzimática. Células empregadas na expressão da pre-

cedente podem ser rompidas por vários meios físicos ou químicos, tais como ciclo congelamento-descongelamento, sonicação, rompimento mecânica, ou agentes de lise celular.

5 Pode ser desejável para purificar a precedente a partir de proteí-
nas ou polipeptídeos de célula recombinante. Os seguintes procedimentos
são exemplares de procedimentos de purificação adequados: por fraciona-
mento em uma coluna de troca iônica; precipitação de etanol; HPLC em fase
reversa; cromatografia em sílica ou em uma resina de troca catiônica, tal
como DEAE; cromatofocalização; SDS-PAGE; precipitação em sulfato de
10 amônio; gel de filtração usando, por exemplo, Sephadex G-75; colunas Se-
pharose em proteína A para remover contaminantes, tais como IgG; e colu-
nas quelantes metálicas para ligar-se a formas marcadas de epitopo das
moléculas desejadas. Vários métodos de purificação proteica podem ser
empregados e tais métodos são conhecidos na técnica e descritos por e-
15 xemplo em Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990); Escopes, *Prote-
in Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York (1982). A
etapa(s) de purificação selecionada dependerá, por exemplo, da natureza do
processo de produção usado e anticorpo, polipeptídeo ou oligopeptídeo par-
ticular produzidos pelos métodos reivindicados.

20 Usando técnicas recombinantes, o polipeptídeo LY6 pode ser
produzido intracelularmente, no espaço periplasmático, ou secretado direta-
mente no meio. Se tais moléculas forem produzidas intracelularmente, como
uma primeira etapa, os debris particulados, células hospedeiras ou fragmen-
tos lisados, são removidos, por exemplo, por centrifugação ou ultrafiltração.
25 Carter *et al.*, Bio/Technology 10:163-167 (1992) descrevem um procedimen-
to para isolar anticorpos que são secretados no espaço periplasmático de *E.
coli*. Resumidamente, a pasta celular é descongelada na presença de aceta-
to de sódio (pH 3,5), EDTA, e fenilmetilssulfonilfluoreto (PMSF) por aproxi-
madamente 30 minutos. Debris celulares podem ser removidos por centrifu-
30 gação. Onde o anticorpo é secretado no meio, sobrenadantes de tais siste-
mas de expressão são geralmente primeiro concentrados usando um filtro
de concentração de proteína comercialmente disponível, por exemplo, uma

unidade de ultrafiltração Amicon ou Millipore Pellicon. Um inibidor de protease, tal como PMSF pode ser incluído em qualquer das etapas precedentes para inibir a proteólise e antibióticos podem ser incluídos para prevenir o crescimento de contaminantes adventícios.

5 A purificação pode ocorrer usando, por exemplo, cromatografia em hidroxilapatita, eletroforese em gel, diálise, e cromatografia por afinidade, com a cromatografia por afinidade sendo a técnica de purificação preferencial. A conveniência da proteína A como um ligante de afinidade depende da espécie e do isotipo de qualquer domínio de Fc da imunoglobulina que este-
 10 ja presente no anticorpo. A Proteína A pode ser usada para purificar anticorpos que são baseados a cadeias pesadas humanas $\gamma 1$, $\gamma 2$ ou $\gamma 4$ (Lindmark *et al.*, J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). A Proteína G é recomendada para todos os isotipos de camundongo e para $\gamma 3$ humana (Guss *et al.*, EMBO J. 5:1567-1575 (1986)). A matriz à qual o ligante de afinidade é ligado é muitas
 15 vezes agarose, mas outras matrizes estão disponíveis. Matrizes mecanicamente estáveis, tais como vidro de poro controlado ou poli(estireno-divinil) benzeno considera velocidades de fluxo mais rápidas e tempos menores de processamento mais curtos do que pode ser realizado com agarose. Onde o anticorpo compreende um domínio C_H3 , a resina Bakerbond ABX_J (J. T. Ba-
 20 ker, Phillipsburg, NJ) é útil para purificação. Outras técnicas de purificação proteica, tais como fracionamento em uma coluna de troca iônica, precipitação em etanol, HPLC em Fase Reversa, cromatografia em sílica, cromatografia em heparina SEPHAROSEJ cromatografia em uma resina de troca catiônica ou aniônica (tais como uma coluna de ácido poliaspártico), cromato-
 25 focalização, SDS-PAGE, e precipitação em sulfato de amônio estão também disponíveis dependendo do anticorpo a ser recuperado.

Após qualquer etapa de purificação preliminar, a mistura compreendendo o anticorpo de interesse e contaminantes pode ser submetida a cromatografia de interação hidrofóbica em baixo pH usando um tampão de eluição em um pH entre aproximadamente 2,5 e 4,5, preferencialmente realizado em baixas concentrações de sal (por exemplo, de aproximadamente 0 a 0,25M de sal).

H. Formulações Farmacêuticas

As formulações terapêuticas ("agente terapêutico") usado conforme a presente invenção podem ser preparadas para armazenamento pela mistura de agente(s) terapêutico tendo o grau desejado da pureza com veículos, excipientes ou estabilizadores farmaceuticamente aceitáveis opcionais (Remington: The Science of Practice of Pharmacy, 20ª edição, Gennaro, A. *et al.*, Ed., Philadelphia College of Pharmacy and Science (2000)), na forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Veículos, excipientes ou estabilizadores aceitáveis são não-tóxicos a recipientes nas dosagens e concentrações empregadas, e incluem tampões, tais como acetato, Tris, fosfato, citrato, e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de amônio de octadecildimetilbenzil; cloreto de hexametônio; cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio; fenol, álcool butílico ou benzílico; alquilparabenos, tais como metil ou propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipeptídeos de baixo peso molecular (menos de aproximadamente 10 resíduos); proteínas, tais como albumina sérica, gelatina, ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos incluindo glicose, manose, ou dextrinas; agentes quelantes, tais como EDTA; modificadores de tonicidade, tais como trehalose e cloreto de sódio; açúcares, tais como sacarose, manitol, trehalose ou sorbitol; tensoativos, tais como polissorbato; contra-íons formadores de sal, tais como sódio; complexos metálicos (por exemplo, complexos de Zn-proteína); e/ou tensoativos não-iônicos, tais como TWEEN7, PLURONICS7 ou polietileno glicol (PEG). O anticorpo preferencialmente compreende o anticorpo em uma concentração entre 5 a 200 mg/ml, preferencialmente entre 10 a 100 mg/ml.

As formulações aqui também podem conter mais de um composto ativo segundo a necessidade de determinada indicação sendo tratada, preferencialmente aqueles com atividades complementares que não afetam adversamente um ao outro. Por exemplo, além do agente(s) terapêutico pre-

cedente, pode ser desejável incluir na formulação, um anticorpo adicional, por exemplo, um segundo agente terapêutico, ou um anticorpo a qualquer outro alvo, tal como um fator de crescimento que afeta o crescimento do glioma. Alternativamente, ou adicionalmente, a composição pode compreender
 5 ainda um agente quimioterápico, agente citotóxico, citoquina, agente inibidor de crescimento, agente anti-hormonal, e/ou cardioprotetor. Tais moléculas estão adequadamente presentes em combinação em quantidades que são eficazes com o objetivo destinado.

Os ingredientes ativos também podem ser capturados em micro-
 10 cápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial, por exemplo, hidroximetilcelulose ou microcápsulas de gelatina e microcápsulas de poli(metilmetakrilato), respectivamente, em sistemas de entrega de fármaco coloidais (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em
 15 macroemulsões. Tais técnicas são descritas em Remington: The Science and Practice of Pharmacy, *supra*.

Preparações de liberação sustentada podem ser preparadas. Exemplos adequados de preparações de liberação sustentada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos contendo anticorpo,
 20 matrizes as quais estão na forma de artigos formados, por exemplo, filmes, ou microcápsulas. Exemplos do matrizes de liberação sustentada incluem o poliéster, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), ou poli(vinilálcool)), poliolactídeos (Patente Norte-americana Número 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e γ etil-L-glutamato, acetato de etilenovinil
 25 não-degradável, copolímeros de ácidos láctico-ácidos glicólico degradáveis, tais como o LUPRON DEPOT7 (microesferas injetáveis compostas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolida), e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

As formulações a serem usadas em administração *in vivo* devem
 30 ser estéreis. Isto é prontamente realizado pela filtração através membranas de filtração estéreis.

Métodos para Diagnóstico e/ou Tratamento de Doença Inflamatória Intestinal

Para determinar a expressão LY6 em tecido ou células gastrointestinais de um mamífero, tais como um mamífero experimentando IBD, vários ensaios diagnósticos estão disponíveis. Em uma modalidade, a super-expressão de polipeptídeo LY6 pode ser analisada por RT-PCR, em hibridização *in situ*, análise por microarranjo e/ou imuno-histoquímica (IHC). Seções de tecido frescas, congeladas e/ou incluídas em parafina a partir de uma biópsia gastrointestinal (tal como do cólon ou, mais especificamente, do cólon sigmoide) de um mamífero (tal como sem limitação um ser humano) podem ser submetidas à RT-PCR, hibridização *in situ*, análise por microarranjo e/ou ensaio de IHC.

Alternativamente, ou adicionalmente, ensaios de FISH, tais como o INFORM7 (vendido por Ventana, Arizona) ou PATHVISION7 (Vysis, Illinois) podem ser realizados em tecido fixado com formalina, e incluído em parafina e para determinar a extensão da expressão de LY6 (se houver) e/ou regulação para cima em uma amostra de tecido ou biópsia.

Expressão de LY6 pode ser avaliada usando um ensaio de diagnóstico *in vivo*, por exemplo, pela administração de uma molécula (tal como um anticorpo, oligopeptídeo ou molécula orgânica) que se liga à molécula para ser detectada e é marcada com um marcador detectável (por exemplo, um isótopo radioativo ou um marcador fluorescente) e rastreado externamente no paciente para localização do marcador.

Atualmente, dependendo do estágio da IBD, o tratamento envolve um ou uma combinação das seguintes terapias: cirurgia para remoção do tecido intestinal afetado, administração de agentes terapêuticos, incluindo sem limitação quimioterapia; modificações dietéticas, e administração do estilo de vida. Agentes terapêuticos ou agentes quimioterápicos úteis no tratamento de IBD são conhecidos na técnica e agentes terapêuticos e quimioterápicos representativos e são descritos aqui.

Em particular, terapia de combinação com palictaxel e derivados modificados (vide, por exemplo, EP0600517) é contemplada. O anticorpo, polipeptídeo, oligopeptídeo ou molécula orgânica precedente será administrada com uma dose terapeuticamente eficaz do agente quimioterápico. Em

outra modalidade, tal anticorpo, polipeptídeo, oligopeptídeo ou molécula orgânica é administrada em conjunto com a quimioterapia para aumentar a atividade e eficácia do agente quimioterápico, por exemplo, paclitaxel. O Physician's Desk Reference(PDR) revela dosagens destes agentes que foram usados no tratamento de vários cânceres. O regime de dosagem e as doses destes fármacos quimioterápicos supracitados que são terapeuticamente eficazes dependerão do câncer particular sendo tratado, extensão da doença e outros fatores familiares ao médico versado na técnica e pode ser determinada pelo médico.

Agentes terapêuticos ou agentes quimioterápicos são administrados a um paciente humano, de acordo com métodos conhecidos, tais como administração intravenosa, por exemplo, como um bolus ou pela infusão contínua durante o período de tempo, por vias intracraniana, intracerebrospinal, intra-articular, intratecal, intravenosa, intra-arterial, subcutâneo, oral, tópica, ou inalatória.

A presente invenção fornece métodos que envolvem uma etapa de diagnóstico e uma etapa de tratamento terapêutico. Em uma modalidade, a presente invenção fornece métodos de detecção de doença inflamatória intestinal (IBD) em um indivíduo mamífero que incluem as etapas de (1) detecção do nível da expressão de um ácido nucleico ou um gene de codificação de um polipeptídeo LY6 (a) em uma amostra de teste de tecido ou células obtidas do indivíduo, e (b) em uma amostra de controle onde um maior nível da expressão do ácido nucleico ou gene de LY6 na amostra de teste, quando comparada com a amostra de controle, indica a presença de uma IBD no indivíduo do qual a amostra de teste foi obtida; e (2) administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um agente terapêutico para IBD. Em uma modalidade, o agente terapêutico para IBD é um antagonista de outra molécula associada à IBD. A presente invenção contempla várias moléculas associadas à IBD que são diferencialmente expressas em IBD. Em uma modalidade, a molécula associada à IBD é uma molécula que é diferencialmente expressa em uma IBD. Em outra modalidade, a molécula associada à IBD está superexpressa em uma IBD. Ainda em outra modalidade, a

molécula associada à IBD superexpressa é uma integrina. Em uma outra modalidade, a molécula associada à IBD é integrina, beta 7 (ITGB2) (vide WO 2006/026759, que está incorporado aqui por referência em sua totalidade) o termo "agente terapêutico para IBD" como usado aqui refere-se a um

5 antagonista de uma molécula associada à IBD. Em uma modalidade, o agente terapêutico para IBD é antagonista de um integrina. Em outra modalidade, o agente terapêutico para IBD é antagonista de ITGB7. Em ainda outra modalidade, o agente terapêutico para DII é antagonista do polipeptídeo conhecido como SEQ ID NO: 69 codificado pela sequência de ácido nucleico

10 mostrada como SEQ ID NO: 68.

J. Artigos de Produção e Conjuntos

Para aplicações diagnósticas, o artigo de produção compreende um recipiente e uma marca ou inserção no pacote ou associado ao recipiente indicando um uso para detecção e expressão de LY6 (tal como, sem limitação LY6, LYPD1, LYPD3, e/ou LYPD5) em um tecido gastrointestinal ou

15 célula de um mamífero. Em uma modalidade, o mamífero é ser humano. Em uma modalidade, o tecido ou célula é tecido ou célula gastrointestinal. Em uma modalidade, detecção inclui quantificação em relação a uma amostra de controle. Em uma modalidade, recipiente, marca ou inserção de pacote

20 indica que o tecido ou células gastrointestinais são do cólon de um mamífero. Em uma modalidade, recipiente, marca ou inserção no pacote indicando a expressão de LY6 aumentada em relação a uma amostra de controle é indicativa de IBD, incluindo sem limitação CD e/ou UC, no mamífero. Recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos, seringas, etc. Os

25 recipientes podem ser formados de vários materiais, tais como vidro ou plástico. Adicionalmente, o artigo de produção pode compreender ainda um segundo recipiente compreendendo um tampão ou outro reagente (tal como marcador detectável) útil para realizar a detecção. Pode incluir ainda outros materiais desejáveis de um ponto de vista comercial e do usuário, incluindo

30 outros tampões, diluentes, filtros, e corantes.

Para isolamento e purificação do polipeptídeo LY6, o conjunto pode conter o reagente de ligação à LY6 ligado a contas (por exemplo, contas de

sefarose). Os conjuntos que podem ser fornecidos contêm tais moléculas da detecção e quantificação do polipeptídeo LY6 *in vitro*, por exemplo, em um ELISA ou um Western blot. Como com o artigo de produção, o conjunto compreende um recipiente e uma marca ou inserção no pacote ou associado
5 ao recipiente. O recipiente mantém uma composição compreendendo pelo menos um anticorpo, oligopeptídeo ou molécula orgânica de ligação à LY6 usável com a invenção. Os recipientes adicionais podem ser incluídos contendo, por exemplo, diluentes e tampões, anticorpos controle. A marca ou inserção no pacote podem fornecer uma descrição da composição bem como instruções para o uso *in vitro* ou diagnóstico desejado.
10

K. Ácidos Nucleicos de Senso e Antissenso que Codificação de LY6

Moléculas que seriam esperadas ligar-se a ácidos nucleicos codificadores de um gene LY6 incluem oligonucleotídeos de senso e antissenso, que compreendem uma sequência de ácido nucleico de fita simples
15 (RNA ou DNA) capaz de ligação às sequências de DNA ou mRNA de LY6 alvo. Oligonucleotídeos senso ou antissenso, segundo a presente invenção, compreendem um fragmento da região de codificação do DNA de LY6 ou seu complemento. A capacidade de derivar um oligonucleotídeo antissenso ou senso, baseado em uma sequência de cDNA de codificação uma dada proteína é descrita em, por exemplo, Stein and Cohen (*Cancer Res.*
20 *48:2659*, 1988) e van der Krol *et al.* (*BioTechniques* *6:958*, 1988).

Os oligonucleotídeos senso e/ou antissenso hibridizáveis a um gene de LY6 são úteis, por exemplo, para detecção da presença do DNA ou mRNA de LY6 em uma amostra de tecido ou células gastrointestinais de
25 mamífero de acordo com a invenção. Os compostos de senso ou antissenso usados de acordo com esta invenção podem ser convenientemente e rotineiramente feitos através de técnica bem-conhecida de síntese em fase sólida. Equipamento de tal síntese é vendido por vários vendedores incluindo, por exemplo, Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Quaisquer outros meios
30 para tais sínteses conhecida na técnica pode ser adicionalmente ou alternativamente empregados. É bem-conhecido usar técnicas similares para preparar oligonucleotídeos, tais como fosforotioatos e derivados alquilados. Os

compostos da invenção também podem ser misturados, encapsulados, conjugados ou de outra maneira associados a outras moléculas, estruturas moleculares ou misturas de compostos, como por exemplo, lipossomas, moléculas direcionadas ao receptor, formulações orais, retais, tópicas ou outras, para auxiliar na ingestão, distribuição e/ou absorção. Patentes que ensinam a preparação de tais formulações que auxiliam na ingestão, distribuição e/ou absorção incluem, mas não são limitadas a, Patentes U.S. Números 5.108.921; 5.354.844; 5.416.016; 5.459.127; 5.521.291; 5.543.158; 5.547.932; 5.583.020; 5.591.721; 4.426.330; 4.534.899; 5.013.556; 5.108.921; 5.213.804; 5.227.170; 5.264.221; 5.356.633; 5.395.619; 5.416.016; 5.417.978; 5.462.854; 5.469.854; 5.512.295; 5.527.528; 5.534.259; 5.543.152; 5.556.948; 5.580.575; e 5.595.756, tal que cada uma está incorporada aqui por referência.

Oligonucleotídeos senso ou reverso incluem sem limitação iniciadores e sondas úteis em PCR, RT-PCR, métodos de hibridização, hibridização *in situ*, e similares.

Outros exemplos de oligonucleotídeos senso ou reverso incluem aqueles oligonucleotídeos que são covalentemente ligados a porções orgânicas, tais como aquelas descritas em WO 90/10048, e outras porções que aumentam a afinidade do oligonucleotídeo de uma sequência de ácido nucleico-alvo, tal como poli-(L-lisina). Mais ainda, agentes intercalantes, tais como elipticina, e agentes alquilantes ou complexos metálicos podem ser ligados aos oligonucleotídeos senso ou antissenso para modificar as especificidades de ligação do oligonucleotídeo senso ou antissenso à sequência nucleotídica alvo.

Moléculas de RNA ou DNA de antissenso ou senso são geralmente pelo menos aproximadamente 5 nucleotídeos em tamanho, alternativamente pelo menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390,

400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 5 ou 1000 nucleotídeos em tamanho, em que neste contexto o termo aproximadamente significa o tamanho da sequência nucleotídica referido mais ou menos 10% daquele tamanho referido.

EXEMPLOS

Os seguintes exemplos não-limitantes são fornecidos com objetivos ilustrativos e não são destinados para limitar o escopo da invenção. Reagentes comercialmente disponíveis mencionados nos exemplos foram usados de acordo com instruções do fabricante a menos que indicado de outra maneira. A fonte daquelas linhagens celulares identificadas nos exemplos seguintes, e/ou em todas as partes do pedido de patente, por números 10 de acesso ATCC é a American Type Culture Collection, Manassas, VA.

Exemplo 1: Materiais e Métodos

Reagentes, células e camundongos: IFN γ , TNF α , e IL1 β foram obtidos de Peprotech[®] (Rocky Hill, NJ). IFN α foi obtido de Hycult Biotechnology[®] (The Netherlands). Para experimentos de ligação cruzada, anticorpo 20 anti-KLH controle, antiLY6A (clone E13-161.7 ou D7) foram obtidos de Pharmingen[®] (San Diego, Ca). AntiLY6C (clone HK1.4) foi obtido de Southern Biotech[®] (Birmingham, AL).

Colite de transferência de CD45RB^{alta} crônica foi induzida como descrito anteriormente em camundongos SCID em um contexto Balb/c (Powrie, F. *et al.*, (1994) *Immunity* 1:553-562). Camundongos IL10-/- (Kuhn, R. *et al.*, (1993) *Cell* 75:263-274) em uma procedência 129, que desenvolvem colite espontânea, foram sacrificados entre 11 e 13 semanas de idade. Os cólons foram instantaneamente congelados em OCT até o uso nos experimentos como descrito. O cólon proximal, cólon médio, cólon distal e reto foram 25 classificados usando uma escala de 0 a 5 (0 = intestino normal, 5 = doença severa). Os escores foram somado para alcançar um escore de severidade de colite total de cada animal.

A linhagem celular de colonócito de camundongo adulto jovem (YAMC) (fornecido por Robert Whitehead, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN) foi derivada do Immortomouse[®] um animal transgênico contendo um antígeno T sensível à temperatura (tsTag) sob controle de um promotor dependente de interferon γ , como previamente descrito (Whitehead, R.H. et al, (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90:587-591). Células YAMC proliferam sob condições permissivas de 32°C na presença de 5 unidades/ml de IFN- γ (Peprotech[®], New Jersey), mas não proliferam na remoção de IFN- γ em 37°C (condições não-permissivas).

Células YAMC foram cultivadas em RPMI contendo SFB 5%, L-glutamina 2 mM, penicilina/estreptomicina, IFN γ 5 U/ml e suplemento N-2 (Invitrogen[®], Carlsbad, CA). Células foram cultivadas sob condições não-permissivas por 24 horas antes dos experimentos, e na duração dos experimentos.

Células CMT93 foram obtidas de ATCC (ATCC Número[®] CCL-223, ATCC, Manassas, VA) cultivado em DMEM contendo 10% de SFB, L-glutamina 2 mM, e penicilina/estreptomicina.

Microscopia de captura por laser e purificação de RNA: Seções 10 a 12 μ m foram aplicadas na membrana de lâminas LCM (Molecular Machines[®], Glattbrugg, Switzerland). As lâminas foram submetida a uma coloração por H&E abreviada (tempo total de aproximadamente cinco minutos) antes das células das criptas epiteliais foram histologicamente identificadas e dissecadas usando um microscópio MMI Cellcut[®] (Molecular Machines, Glattbrugg, a Suíça). RNA foi purificado das células dissecadas usando o conjunto de purificação de RNA Arcturus[®] Picopure[®] e protocolos do fabricante (Arcturus[®], Sunnyvale, CA) e quantificado utilizando espectrofotômetro NanoDrop ND-1000[®] (NanoDrop Technologies[®], Wilmington, DE).

Hibridização de microarranjo e análise dos dados: a quantidade e a qualidade de amostras de RNA total de entrada foram determinadas usando espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop[®] Technologies, Montchanin, DE) e Bioanalyzer 2100[®] (Agilent[®] Technologies, Palo Alto, CA), respectivamente. O método para preparação de cRNA marcado com corante e a hibri-

dização do arranjo foi fornecida por Agilent® Technologies (Palo Alto, CA). Resumidamente, o RNA total da amostra foi convertido em cDNA dupla fita e então em cRNA marcado usando um conjunto Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification® (Agilent®, Número de Produto 5184-3523). O cRNA

5 marcado foi purificado usando o miniconjunto RNeasy® (Qiagen®, San Diego, CA) e logo quantificado utilizando espectrofotômetro ND-1000® (Nanodrop® Technologies). A incorporação do corante Cy foi determinada pela corrida do cRNA marcado em um gel de TBE-uréia Novex® (Invitrogen®, Carlsbad, CA) seguido pela varredura em gel em um scanner TYphoon® (GE HealthCare®, Piscataway, NJ). Para determinar a quantidade de contagem fluorescente do corante Cy, as imagens de gel foram analisadas usando o programa ImageQuant® (GE HealthCare®). Aproximadamente contagens

10 500.000 cRNA marcado com corante Cy foram fragmentados e hibridizado ao arranjo genômico de camundongo total de Agilent como descrito no conjunto de hibridização *in situ* da Agilent (Agilent®, Número do Produto 5184-3568). Amostras de LCM foram marcadas com corante de Cy5 e hibridizadas contra a referência a camundongo universal marcada com corante Cy3 (Stratagene®, La Jolla, CA). Seguinte a hibridização, os arranjos foram lavados, secos com acetonitrila e escaneados em um scanner de microarranjo

15 de DNA Agilent®. Os arquivos de imagem do arranjo foram analisados usando programa da Agilent® Feature Extraction® 7.5 e análise de dados adicional foi realizada usando Resolver® (Merck®, Seattle, WA).

O dado foi analisado usando programa Rosetta Resolver® (Rosetta Biosoftware®, Seattle, WA). Resumidamente, amostras saudáveis e

25 colíticas foram agrupadas separadamente e sondas que passaram por anova bicaudal ($p < 0,05$) foram selecionadas. Estas sondas foram analisadas ainda para sondas que demonstraram uma mudança de duas vezes ou maior em amostras colíticas versus amostras saudáveis.

RT-PCR quantitativa em tempo real: RT-PCR foi realizada em

30 RNA extraído usando o conjunto Taqman® Gold® RT-PCR e reagentes (Applied Biosystems®, Foster City, CA). Todas as amostras foram corridas com iniciadores gene-específicos usando sondas internas marcadas 5'-FAM e 3'-

TAMRA. A análise foi realizada comparada ao gene endógeno, SPF31, iniciadores específicos pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ como descrito (Livak, K.J., and T.D. Schmittgen (2001) *Methods* 25:402-408). Iniciadores e sondas foram desenhados usando o programa Primer3[®] (Rozen, S., and H. Skaletsky (2000) *Methods Mol Biol* 132:365-386) ou obtidos comercialmente de (Applied Biosystems[®]). Iniciadores e sondas usadas para estes ensaios foram os seguintes, mostrados na direção 5'-3':

LY6A:

Sentido direto: CTT ACC CAT CTG CCC TCC TA (SEQ ID NO:39)
 10 Antissenso: CCT CCA TTG GGA ACT GCT AC (SEQ ID NO:40)
 Sonda: TCC TGT TGC CAG GAA GAC CTC TGC (SEQ ID NO:41)

LY6C:

Sentido direto: ACT TCC TGC CCA GCA GTT AC (SEQ ID NO:42)
 Antissenso: GGC ACT GAC GGG TCT TTA GT (SEQ ID NO:43)
 15 Sonda: CTG CCG CGC CTC TGA TGG (SEQ ID NO:44)

Marcação Imunofluorescente: tecidos congelados foram cortados em seções de 5 μ m e marcados com antiLY6C biotinilado (Southern Biotech[®], Birmingham, AL) ou anti-SCA-1 a 2,5 ng/ml (R&D Systems[®], Minneapolis, MN). As lâminas foram lavadas e marcadas com Alexa Fluor[®] 488 conjugado a estreptavidina, usando montada Prolong Gold[®] com DAPI (Invitrogen[®], Carlsbad, CA) e visualizado em microscopia confocal.

Ligação cruzada de Moléculas LY6: a capacidade de polipeptídeo LY6 ligado cruzadamente para efetuar a produção de quimiocina foi testada pela incubação de células YAMC com anticorpos ligados à placa antiLY6C ou anti-KLH (controle) e medindo a produção das quimiocinas CXCL2, CXCL5, e CCL7. Porque a formação de jangadas lipídicas na membrana celular é requerida para ligação cruzada, a produção de quimiocina foi testada sob condições de formação de jangada normal (não-depleção de colesterol) e sob condições de depleção de colesterol.

30 Para ligação cruzada usando anticorpos ligados à placa, 100 μ l de anticorpo antiLY6C ou anti-KLH (controle) em concentração de 5 μ g/mL foi adicionado a uma placa 96 poços, ou 2 mL foram adicionados a uma pla-

ca de 60 mm² e permitido ligar à placa por 15 horas a 4 °C. Células YAMC, cultivadas no em condições de depleção ou não-depleção de colesterol (conforme Exemplo 5, aqui) foram incubadas com os anticorpos ligados à placa por 15 horas a 32°C sob condições de não-depleção de colesterol RNA foi coletado e níveis de expressão de CXCL2, CXCL5, e CCL7 foram determinados. O ensaio é ainda descrito e os resultados são mostrados no Exemplo 5, aqui.

Inibição por siRNA: siRNA individual direcionado contra LY6C murino foram obtidos de Dharmacon (Lafayette, CO). SiRNA foi transfectado em células YAMC usando lipofectamina 2000 (Invitrogen) e protocolos-padrão. 72 horas após transfecção, as células foram coletadas para determinar a eficiência da redução da expressão. Um siRNA foi escolhido para experimentos de ligação cruzada com base na eficiência de redução da expressão superior (95% de inibição por RT-PCR quantitativa).

Secreção de CXCL5: Sobrenadantes CXCL5 foram coletados no ponto de tempo indicado de células estimuladas e concentrações de citoquina foram determinadas por ELISA usando um conjunto comercialmente disponível de R&D Systems® e os protocolos de fabricante. O nível da detecção foi 15 pg/ml de CXCL5.

Depleção de colesterol: células YAMC foram cultivadas por 72 horas em meio livre de soro a 37°C na presença de lovastatina 4 µM e mevalonato 250 µM (Sigma). Células foram plaqueadas e mantidas em lovastatina e mevalonato em todas as partes do experimento.

Estatística: o teste de t de Student foi usado para comparação entre grupos (* indica p <0,05).

Exemplo 2: padrões de expressão gênica de IEC são alterados durante colite

Estudos indicaram que os padrões de expressão gênica de IEC estão significativamente alterados nos modelos de colite em camundongo, bem como IBD humana (Fahlgren, A., *et al.* (2004) *Clin Exp Immunol* 137:379-385; Brand, S. *et al.* (2006) *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290:G827-838; Ruiz, P.A. *et al.* (2005) *Immunol J* 174:2990-2999). Neste

exemplo, os padrões de expressão gênica avaliados em IEC de camundongos saudáveis e colíticos foram examinados a fim de iluminar novos genes e vias alteradas em IBD.

A identificação de genes envolvidos na imunopatologia de IBD foi buscada pela avaliação de células epiteliais intestinais (IEC) a partir do modelo de colite de camundongo e transferência de célula T CD45RB^{Hi} bem como o modelo de camundongo IL10^{-/-}, ambos dos quais resultam da desregulação Th1 e compartilham muitas características da doença de Crohn humana (Elson, C.O. *et al.* (2005) *Immunol Rev* 206:260-276; Bouma, G., and W. Strober (2003) *Nat Rev Immunol* 3:521-533). Microdissecção de captura por laser (LCM) foi usada para isolar as cripta de IEC dos cólons de camundongos saudáveis e colíticos nos dois modelos de IBD murino. RNA foi extraído destas amostras e analisado por tecnologia de microarranjo como descrito aqui no Exemplo 1. O perfil de expressão gênica de IEC de camundongos colíticos no modelo de colite de transferência identificou 1770 sondas com modificações de expressão > 2 vezes comparado aos camundongos controle, enquanto o modelo IL10^{-/-} identificou 1140 sondas. Sobrepondo ambos os modelos, houve 540 sondas com modificações na expressão > 2 vezes, correspondente a aproximadamente 400 genes diferentes (dados não-mostrados).

Exemplo 3: Vias e Genes Afetados em IEC Durante Colite

Dos aproximadamente 400 genes afetados em ambos os modelos, os genes envolvidos na apresentação de antígeno, de sinalização de TLR e migração celular foram superexpressos (Tabela 7). Na Tabela 7, os números representam a média com desvio-padrão da modificação de vezes comparada ao RNA-padrão universal de camundongos colíticos contra camundongos saudáveis no modelo IL10^{-/-} de colite ou no modelo CD45RB^{Hi} de colite, como indicado. Os resultados indicaram que alguns genes expressos em IEC alteraram os padrões de expressão em modelos de IBD murino. Muitos destes genes, incluindo TLR2, CCL7, CXCL5 e ICAM-1 foram descritos previamente como tendo expressão epitelial aumentada durante a colite (Breider, M.A. *et al.* (1997) *Vet Pathol* 34:598-604; Uguccioni, M. *et al.* (1999)

Am J Pathol 155:331-336; Z'Graggen, K. *et al.* (1997) *Gastroenterology* 113:808-816; Singh, J.C. *et al.* (2005) *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288:G514-524), sugerindo que o padrão de expressão gênico obtido nestes microarranjos são uma reflexão exata da biologia de IEC na colite.

5 Tabela 7

Modificação de vezes (valor de p)

Migração Celular	Modelo IL10 -/-	Modelo CD45RBhi
CXCL1	+3,89 (<0,0001)	+2,09 (<0,0001)
CXCL5	+21,82 (<0,0001)	+23,34 (<0,0001)
CXCL13	+3,01 (<0,0001)	+2,85 (<0,0001)
CCL6	-3,47 (<0,0001)	-2,5 (<0,0001)
CCL7	+4,2 (<0,0001)	+5,54 (<0,0001)
CCL11	-3,43 (<0,0001)	-3,6 (<0,0001)

Sinalização de TLR

TLR2	+2,15 (<0,0001)	+2,68 (<0,0001)
Fos	+3,64 (<0,0001)	+2,03 (<0,0001)
LBP	+2,34 (<0,0001)	+2,57 (<0,0001)
NFKBIA	+2,37 (<0,0001)	+2,15 (<0,0001)

Apresentação de Antígeno

H2-D1	+2,77 (<0,0001)	+2,23 (<0,0001)
HLA-A	+2,83 (<0,0001)	+2,40 (<0,0001)
HLA-B	+2,71 (<0,0001)	+2,44 (<0,0001)
HLA-E	+2,31 (<0,0001)	+2,34 (<0,0001)
ICAM-1	+2,51 (<0,0001)	+2,587 (<0,0001)
PSMB8	+8,10 (<0,0001)	+3,09 (<0,0001)
PSMB9	+6,61 (<0,0001)	+2,72 (<0,0001)
TAP1	+4,05 (<0,0001)	+4,10 (<0,0001)
TAP2	+2,08 (<0,0001)	+2,18 (<0,0001)

- 10 IEC pode funcionar como APC não-profissional (Snoeck, V. *et al.*, (2005) *Microbes infect* 7:997-1004; e Shao, L *et al.*, (2005) *Immunol Rev* 206:160-176), e o padrão de expressão gênico obtido nestes microarranjos

indica que estas funções estão aumentadas durante a colite pela regulação para cima nos genes associados ao processamento de antígeno, tais como LMP7 e TAP1, bem como genes de MHC de classe I e II que serviriam para aumentar a apresentação de antígenos na superfície da IEC.

5 Os dados do microarranjo apoiam o conceito que IEC colítica atrai células imunes para cólon através da expressão alterada de quimiocinas, e podem apresentar antígeno para células T infiltrantes pela regulação para cima da expressão de genes associados com a apresentação de antígeno.

10 Exemplo 4: Expressão de Membros da Família LY6 é Fortemente Regulada para Cima na Superfície de IEC Colítica

Membros da família de moléculas LY6 de camundongo foram superrepresentadas em número bem como grau de regulação para cima em ambos modelo de colite de transferência de camundongo e modelo de camundongo IL10-/- (Figuras 23A e 23B). Estes resultados foram confirmados por RT-PCR quantitativa em tempo real do RNA de IEC agrupado e amplificado no modelo de colite de transferência (dado não-mostrado). A expressão dos membros da família LY6 foi única para o estado de doença, portanto nenhum camundongo saudável expressou níveis apreciáveis de algum destes membros da família LY6.

20 Enquanto a expressão de moléculas de LY6 murinos na superfície de células de origem hematopoiética é conhecida, a expressão em IEC não foi anteriormente descrita (Bamezai, A. (2004) *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 52:255-266; e Rock, K.L. *et al.* (1989) *Immunol Rev* 111:195-224). A expressão de LY6A e LY6C murino é detectável em muitas células não-epiteliais presentes no cólon, tais como células T e granulócitos. Marcação imunofluorescente foi realizada para ambos LY6A e LY6C murino em colons saudáveis e colíticos. Os níveis de LY6A e LY6C murino foram mínimos ou ausentes na superfície de IEC saudável (Figura 24A e 24C, respectivamente).

25 A expressão de ambas LY6A e LY6C murino foi detectável na superfície de IEC em todas as partes do cólon de camundongos colíticos (Figura 24B e 24D, respectivamente). Não houve evidência de polarização de LY6A ou

30

LY6C, e marcação esteve presente e mambas membranas apical e basolateral, fazendo moléculas de LY6 potencialmente acessíveis aos ligantes em qualquer superfície. Estes resultados indicam que os resultados de análise por microarranjo mostrando a regulação para cima de LY6A e LY6C murino em modelos colíticos murinos não foi devido ao influxo de células imunes contaminantes.

Exemplo 4: Transcrição de genes LY6 é estimulada por citocinas inflamatórias

A expressão de LY6 em células T é induzida e aumentada por ambos os IFNs tipo I e tipo II (Khodadoust, M.M., K.D. Khan, e A.L. Bothwell. 1999. Complex Regulation of Ly-6E Gene Transcription in the Cells by IFNs. *J Immunol* 163:811-819). Além disso, a expressão de diversas citocinas, está elevada no cólon durante a colite ativa (Niessner, M., e B.A. Volk. 1995. Citocina Th1/Th2 alterada nos perfis na mucosa intestinal de paciente com doença inflamatória intestinal como avaliado através da transcrição reversa quantitativa-reação em cadeia polimerase (RT-POR) Altered Th1/Th2 Cytokine in the profiles in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease as assessed by quantitative reversed transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR). *Clin Exp Immunol* 101:428-435).

Para determinar se citocinas presentes durante a colite afetam a transcrição de membros da família LY6 em IEC, tratamos células YAMC, um linhagem celular de IEC murino condicionalmente imortalizada, com IL-1 β , IFN α , TNF α , IFN γ ou a combinação de TNF α e IFN γ e analisamos a transcrição de todos genes LY6 murinos identificados por RT-PCR quantitativo em tempo real (Tabela 8). Resumidamente, os níveis de mRNA do membro da família LY6 indicado em IEC foi determinado por RT-PCR quantitativa em tempo real após 15 horas de tratamento com a citocina indicada. O número representa a modificação de vezes (determinado pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$) versus os meios não-tratados do controle. *, P <0,05 versus as medias do controle não-tratado. †, p <0,05 versus células tratadas IFN γ . Os membros seguintes da família LY6 foram testados, mas não detectados nas amostras, apesar do tratamento: LY6K, LYPD3, LYPD4, LYPD5, LY6g5b,

Ly6g6d, Ly6g6e, Slurp1. Os resultados indicam que IEC regula para cima membros da família LY6 em resposta a citocinas inflamatórias.

Tabela 8

	Médias	IL1 β	TNF α	IFN α	IFN γ	IFN γ & TNF α
Ly6A	1,0	1,8*	2,2*	2,8*	33,1*	65,4*†
Ly6C	1,0	1,6*	1,2*	2,4*	65,6*	63,6*
Ly6D	1,0	2,7*	2,1*	1,5*	1,0	0,9
Ly6E	1,0	1,4*	1,5*	2,1*	1,9*	2,9*†
Ly6F	1,0	2,5*	0,6*	7,1*	108,2*	169,7*†
Ly6H	1,0	1,0	1,1	1,2	3,7*	1,4†
Lypd1	1,0	1,5*	2,1*	1,3*	1,3*	2,9*†
Lypd2	1,0	0,1*	ND	0,4*	0,1*	ND
Ly6g5c	1,1	1,3	0,8	0,9	1,3	1,1
Ly6g6c	1,0	0,7	0,7	0,6	0,6*	0,3*†
Slurp2/Lynx1	1,1	0,7	0,4	0,7	1,5	0,4*

Enquanto muitos dos membros da família LY6 não foram detectados na presença ou ausência de citocinas inflamatórias, detectamos uma forte regulação para cima na transcrição de LY6A, LY6C e LY6F murinos em resposta à maioria das citocinas testadas regulação para cima mais moderada de LY6E, LY6H e LYPD1 murinos em resposta a algumas citocinas testadas. Entretanto, IFN γ foi de longe a citocina mais potente na indução de regulação para cima de LY6. Além disso, TNF α aumentou os efeitos de IFN γ na expressão de LY6A, LY6F, LY6E e LYPD1. Regulação para cima similar dos membros da família LY6 foram vistos em outra linhagem IEC murino, CMT93 (dado não-mostrado).

Para examinar a expressão superficial de membros da família LY6 em resposta a citocinas, células YAMC foram expostas às citocinas acima e analisadas por citometria de fluxo para expressão das LY6A e LY6C murinos, para as quais os anticorpos comerciais estão disponíveis, como descrito aqui no Exemplo 1. Altos níveis de LY6A murino foram expressos em células YAMC até na ausência de citocinas adicionadas (Figura 25B, médias). Expressão de LY6C murino (Figura 25A, médias) foi considerável-

mente menor do que a expressão de LY6A.

IL-1 β e TNF α induziram leves aumentos na expressão superficial de ambas LY6A e LY6C murinos, em concordância com a expressão de RNA (Figuras 25A e 25B). Um aumento mais moderado na expressão foi observado quando IFN α foi adicionado às células, enquanto IFN γ induziu aumentos dramáticos na expressão superficial de ambas LY6A e LY6C (Figura 25A e 25B). A expressão proteica superficial refletiu estreitamente a expressão de RNA. Citocinas Th2, tais como IL4, IL10 ou IL13 não tiveram efeito na expressão superficial de LY6A ou LY6C (dado não-mostrado).

A indução de ambas LY6A (Figura 25D) e LY6C (Figura 25C) por IFN γ foi dose-dependente. As doses tão baixo como 6,25 unidades/ml de IFN γ resultaram em aumentos detectáveis em ambas moléculas LY6 por citometria de fluxo. Além disso, o aumento da expressão superficial em ambas LY6A (Figura 25F) e LY6C (Figura 25E) ficou evidente entre 2 e 4 horas após tratamento com IFN γ , e manteve-se aumentada por pelo menos 24 horas após tratamento com IFN γ . Estes dados indicam que concentrações relativamente baixas de IFN γ são suficientes para aumentar a expressão superficial de moléculas LY6 em horas.

Há evidência que IL-22, que é secretado principalmente por células T ativadas, funciona através do complexo IL-22R, presente na IEC para promover a produção de citoquina e um fenótipo inflamatório (Brand, S.F. *et al.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 290:G827-838 (2006)). Além disso, IL-22 está envolvida na imunopatogênese da Doença de Crohn. Para examinar se IL-22 afeta a expressão da molécula LY6 em IEC murino, células YAMC foram cultivadas na presença de IL-22 e analisadas para expressão do LY6C (Figura 25G) e LY6A ((Figura 25H). Ambas moléculas LY6 foram substancialmente aumentados na presença de IL-22 a níveis comparáveis à indução providenciada após tratamento com IFN γ .

Para assegurar que a regulação para cima de moléculas LY6 não foi específica para a linhagem celular YAMC, os níveis de RNA de LY6A e LY6C murinos na linhagem celular de tumor epitelial colônico murino CMT93 foram examinados. Os níveis de ambos LY6A murino e LY6C murino

foram regulados para cima no tratamento com IFN γ (Figura 25I). Embora os níveis de regulação para cima de moléculas LY6 fossem mais modestos em células CMT93, a análise por citometria de fluxo indicou que os níveis foram bastantes altos até em células não-tratadas (dado não-mostrado), que é provavelmente um resultado do fenótipo tumoral de células CMT93.

Este dado suporta os dados obtidos por RT-PCR quantitativa em tempo real na confirmação de que IEC regula para cima os membros da família LY6 em resposta a citocinas inflamatórias.

Exemplo 5: estimulação de LY6 de IEC associada com a formação de jangada lipídica

Como proteína ancoradas por GPI, os membros da família de LY6 não possuem um domínio intracelular único associado à tradicional sinalização para fora. Particularmente estão presentes nos microdomínios da jangada lipídica (Bohuslav, J. *et al.* Eur J Immunol 23:825-831 (1993)). Entretanto, foi sugerido que ligação cruzada de membros da família LY6 na superfície das células resulte em redistribuição de outras moléculas de superfície celular bem como reorganização de estruturas de jangada lipídica, sugerindo um mecanismo pelo qual as moléculas LY6 podem afetar a transdução de sinal e funções celulares a jusante (Simons, K. *et al.*, Nat Rev Mol Cell Biol 1:31-39 (2000)).

Alguns ligantes da proteína LY6 foram identificados até agora, e nenhum ligante para LY6A ou LY6C é atualmente conhecido (Paret, C. *et al.*, (2005) *Int J Cancer* 115:724-733; Apostolopoulos, J. *et al.*, (2000) *Immunity* 12:223-232; e Classon, B.J. (2001) *Trends Immunol* 22:126-127). Colesterol é requerido para manter a integridade de jangada lipídica. (Simons, K., *et al.* J Clin Invest 110:597-603 (2002)), e a depleção de colesterol é muitas vezes usada para inibir a biossíntese de jangada lipídica *in vitro* (von Tresckow, B. *et al.* J Immunol 172:4324-4331 (2004)).

Para analisar se a reorganização de jangada lipídica ocorre em IEC em resposta a ligação cruzada a LY6, células YAMC foram cultivadas em condições de depleção de colesterol (condições sob as quais as jangadas lipídicas são depletadas das células) e condições de não-depleção de

colesterol (condições permissivas para formação de jangada lipídicas). Em condições de depleção de colesterol, as células YAMC foram cultivadas na ausência de soro e na presença de lovastatina 4 μ M e mevalonato 0,25 mM (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) por 72 horas a 37 °C. As mesmas condições de cultura foram usadas para células YAMC sob condições de não-depleção de colesterol, exceto que nem lovastatina nem mevalonato foram adicionados ao meio de crescimento. As células então foram suspensas e LY6C foi ligada cruzadamente como descrito acima no Exemplo 1. RNA foi coletado e os níveis de expressão de CXCL2, CXCL5, e CCL7 foram determinados.

Os resultados destes estudos indicaram que a depleção de jangada lipídica resulta em uma inibição da produção quimiocina mediada por LY6C. As figuras 26A a 26C mostram que células YAMC com colesterol depletado (barras escuras) produziram menos quimiocina do que células que não foram depletadas de colesterol (barras abertas). A depleção de colesterol afetou a produção de quimiocina nos grupos controle anti-KLH estimulados, independente da estimulação por LY6C, entretanto a resposta foi mínima e não em uma direção consistente. Para examinar se a depleção de colesterol globalmente afetou a viabilidade celular, medimos a morte celular, por exclusão de 7AAD, e decidimos que a depleção de colesterol não afetou significativamente a viabilidade das células YAMC (viabilidade de 92% versus 86% nas células depletadas de colesterol, dado não-mostrado). A expressão superficial ambas LY6A (Figura 26D) e LY6C (Figura 26E) foram ambas significativamente menores nas células YAMC depletadas de colesterol, sugerindo que os níveis de colesterol da membrana plasmática e integridade de jangada lipídica afetem os níveis da expressão de LY6 na superfície das células. Este dado sugere que a integridade da jangada lipídica, influenciada pela biossíntese de colesterol, leva a considerar a expressão de moléculas LY6 na superfície, e está potencialmente envolvida na indução mediada por LY6C de quimiocinas. Dessa forma, o aumento da produção de quimiocina mediada pela interação dos polipeptídeos LY6C na membrana celular requer a presença de jangadas lipídicas na superfície celular.

Exemplo 6: Ligação cruzada à LY6C resulta na expressão superficial aumentada de moléculas LY6

Foi relatado que ligação cruzada à LY6C na superfície de células T resulta na queda de LY6C (Jaakkola, I. *et al.* (2003) *J Immunol* 170:1283-1290). Entretanto, diferentemente de células T, quando LY6C murino foi ligada cruzadamente na superfície de IEC, nenhuma queda de LY6A ou de LY6C ocorreu (Figura 27A e 27B, respectivamente). Ao contrário, a ausência de IFN γ , os níveis de expressão superficial de ambas LY6A e LY6C foram aumentados em IEC com ligação cruzada à LY6C, mas não LY6A. Quando IEC foram pré-incubadas com IFN γ , a maior parte deste efeito foi abolido (Figura 27C), entretanto, uma leve regulação para cima de LY6A foi ainda detectada (Figura 27a).

Estes dados indicam uma alça de retroalimentação positiva pela qual a estimulação por LY6C em IEC resulta na expressão superficial aumentada de moléculas LY6.

Exemplo 7: Estimulação de LY6A resulta na secreção aumentada de quimiocinas

As funções de moléculas LY6 não foram totalmente elucidadas. Para examinar o papel de moléculas LY6 na imunopatologia da colite, estimulação de moléculas LY6 foi estudada por afetar na transcrição e na secreção de quimiocinas em IEC.

Para analisar a produção de quimiocinas de IEC em resposta a ligação cruzada de moléculas LY6 murinos, células YAMC, pré-tratadas com IFN γ ou não-tratadas, foram cultivadas em placas recobertas com anticorpo controle anti-KLH, antiLY6A ou antiLY6C. Vinte e quatro horas depois, mRNA destas células foi obtido e analisado por RT-PCR quantitativa da expressão de CCL2, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL25, CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL10, CXCL12 e CX3CL1, que são quimiocinas que foram envolvidos na colite (Tabela 9) (Papadakis, K.A. (2004) *Curr Allergy Asthma Rep* 4:83-89; Banks, C. *et al.*, (2003) *J Pathol* 199:28-35; e Papadakis, K.A., and S.R. Targan (2000) *Inflamm Bowel Dis* 6:303-313). O ensaio foi realizado sob condições de crescimento não-permissivas (37°C na ausência de IFN γ) para ex-

cluír a possibilidade da proliferação aumentada de IEC em resposta a estimulação por IFN γ .

Tabela 9

Pré-tratamento >	Médias			IFN		
Ligação Cruzada >	Anti-KLH	AntiLY6A	AntiLY6C	Anti-KLH	AntiLY6A	AntiLY6C
CCL2	1,01 (0,14)	-1,38 (0,13)	8,81 (0,72)	3,53 (0,21)	2,83 (0,21)	16,12 (0,56)
CCL4	1,31 (1,14)	1,83 (0,49)	3,15 (1,17)	5,35 (0,48)	3,65 (0,69)	16,12 (0,56)
CCL5	1,00 (0,10)	1,09 (0,02)	3,31 (0,15)	2,73 (0,13)	2,76 (0,23)	10,13 (0,27)
CCL7	1,00 (0,11)	1,06 (0,08)	3,37 (0,15)	2,82 (0,44)	1,39 (0,33)	5,81 (0,51)
CCL8	1,03 (0,30)	2,05 (0,37)	12,78 (3,14)	74,22 (8,94)	74,44 (9,81)	110,44 (3,36)
CCL25	1,01 (0,16)	1,06 (0,11)	1,16 (0,00)	1,38 (0,36)	1,32 (0,15)	1,46 (0,19)
CXCL1	1,00 (0,07)	-3,17 (0,11)	11,58 (0,12)	-1,13 (0,10)	-1,64 (0,17)	13,36 (0,35)
CXCL2	1,33 (1,10)	ND	21,81 (3,13)	14,30 (3,30)	10,95 (3,05)	113,20 (16,23)
CXCL5	1,08 (0,53)	ND	118,45 (65,14)	1,70 (1,15)	ND	150,99 (55,50)
CXCL10	1,00 (0,05)	1,02 (0,06)	5,11 (0,19)	5,68 (0,31)	5,22 (0,22)	12,22 (0,51)
CXCL12	1,01 (0,14)	1,12 (0,05)	-1,99 (0,14)	-1,11 (0,05)	-1,23 (0,21)	-3,02 (0,06)
CX3CL1	1,00 (0,08)	-1,18 (0,15)	1,92 (0,07)	2,21 (0,11)	1,87 (0,16)	3,22 (0,42)

- 5 As células pré-tratadas com IFN γ mostraram regulação para cima de muitos destes genes de quimiocina (vide médias, grupo Anti-KLH versus IFN γ , grupo Anti-KLH da Tabela 9). Entretanto, com a exceção de uma regulação para cima de CCL8 e um regulação para baixo de CXCL1, antiLY6A estimulou células YAMC mostrou similares padrões de expressão gênica conforme células YAMC estimuladas por anti-KLH. Entretanto, célu-

las YAMC estimuladas com antiLY6C mostraram a expressão aumentada de todas as quimiocinas analisadas exceto CCL25, que permaneceu essencialmente inalterada, e CXCL12, que foi regulada para baixo em resposta à estimulação de LY6C. Enquanto a expressão gênica aumentada de quimiocinas induzida pela ligação cruzada à LY6C não foi dependente de IFN γ , células pré-tratadas com IFN γ mostraram a expressão aumentada de quimiocinas versus células que não foram pré-tratadas com IFN γ .

Para analisar a cinética da indução de quimiocina induzida por estimulação de LY6C murino, placas de 96 poços foram recobertas com anticorpo anti-KLH ou antiLY6A ou anticorpos monoclonais antiLY6C. Células YAMC, pré-tratadas ou não com IFN γ , foram adicionadas por 24, 48 ou 72 horas. No ponto de tempo indicado, o RNA foi coletado para análise por RT-PCR quantitativa e sobrenadantes foram coletados para ELISA.

Em 24 horas, um pico de transcrição de ambos CXCL5 e CCL7 foi detectado em células com ligação cruzada LY6C, mas não LY6A (Figura 28A). Expressão aumentada de CXCL5 e CCL7 diminuíram ao longo do tempo mas foram ainda detectáveis após 72 horas em cultura. Apesar de IFN γ não ser requerido para aumentar a transcrição de quimiocina, IFN γ atuou sinergisticamente com a estimulação de LY6C na indução da transcrição de ambos CXCL5 e CCL7 em pontos de tempo mais precoces.

Em paralelo com a expressão gênica, sobrenadantes de LY6C, mas não LY6A, células com ligação cruzada continham concentrações significativamente maiores de CXCL5 em 48 horas (Figura 28B). O efeito foi dose-dependente, e detectável tão pouco como 1 μ g/ml de antiLY6C revestido. Como na transcrição, a secreção de CXCL5 foi aumentada quando as células foram pré-tratadas com IFN γ , mas IFN γ não foi necessário para o efeito. A secreção aumentada de CXCL5 foi observada em ambos os pontos de tempo 24 e 72 horas também.

Para assegurar que LY6C esteve envolvida na regulação para cima observada de quimiocinas, usamos siRNA para reduzir a expressão de LY6C. O transcrito de LY6C foi inibido em 95% na ausência de IFN γ e aproximadamente 90% na presença de IFN γ por RT-PCR quantitativa em tempo

real que corresponde a níveis significativamente menores de LY6C na superfície das células YAMC (dado não-mostrado). Células com níveis reduzidos de LY6C na superfície mostraram uma resposta diminuída a ligação cruzada à LY6C com relação à transcrição do quimiocinas (Figura 28C). A secreção de CXCL5 foi marcadamente inibida pela redução da expressão de LY6C também (dado não-mostrado).

Estes resultados indicam que ligação cruzada de LY6C, mas não LY6A, na superfície de IEC resulta na secreção aumentada de quimiocinas.

Exemplo 8: IEC in vivo mostram uma expressão gênica de quimiocina similar a células estimuladas por LY6C

Os dados acima estabelecem um modelo pelo qual IEC estimuladas através de LY6C murino regula para cima significativamente a expressão de genes de quimiocina.

A análise dos dados de microarranjo de IEC microdissecadas por captura em laser em modelos murinos de colite, a expressão dos mesmos 12 genes de quimiocina em camundongos saudáveis e colíticos nos dois modelos murinos da colite foi examinada para determinar se as quimiocinas estimuladas pela ligação cruzada à LY6C *in vitro* correlacionam-se com as quimiocinas secretadas por IEC *in vivo* (Figuras 29A e 29B). Embora o padrão de expressão não seja idêntico ao regulação para cima de quimiocinas resultante da estimulação por LY6C, expressão de CXCL5, que foi o gene de quimiocina mais altamente regulada para cima em estudos *in vitro*, foi também a maior quimiocina regulada para cima em modelos murinos da colite. Foi visto regulação para cima significativa na expressão de CXCL1, CXCL10, CCL5 e CCL7 em ambos os modelos de colite. Além disso, foi visto regulação para cima de CCL4 e CCL8 no modelo de colite de transferência ou modelo IL10^{-/-}, respectivamente.

Interessantemente, a única quimiocina que foi regulado para baixo como um resultado de estimulação de LY6C murino *in vitro*, CXCL12 foi também a única destas quimiocinas reguladas para baixo *in vivo*.

Exemplo 9: Expressão de genes LY6 humanos em células de cólon

A expressão de LY6H, LYPD1, LYPD3, e LYPD5 humanas em

uma linhagem celular do cólon humana, células Colo 205 (uma linhagem celular derivada de carcinoma do cólon humano, ATCC® número de acesso CCL-222®), foi examinado. Células Colo 205 humanas foram tratadas com as citocinas IFN- γ , LPS, TNF α , IFN- γ + TNF α , IFN- γ + LPS, ou LPS + TNF α (todos em 100 ng/ml, exceto LPS a 1 μ g/ml) por 18 horas (LYPD3) ou 24 horas (LY6H ou LYPD5). RNA foi coletado e purificado e a expressão do membro da família LY6 indicado foi determinado por RT-PCR quantitativa usando reagentes da Applied Biosystems® de acordo com instruções do fabricante. Iniciadores e sondas usadas para a análise RT-PCR foram os seguintes:

LYPD1:

Sentido direto: CAT GAT CCT CCG AAT CTG GT (SEQ ID NO:59)

Antissenso: AGC ACA GAA CAG AGG GGC TA (SEQ ID NO:60)

Sonda: ATA CGG CCA ATG TCA CACA (SEQ ID NO:61)

LYPD3:

Sentido direto: ACT TCC TGT TCC CAC CAC TG (SEQ ID NO:62)

Antissenso: AGA GGA CAA GCG GAG AGA CA (SEQ ID NO:63)

Sonda: TTC TGG CAG GGG TGT TCT AG (SEQ ID NO:64)

LY6H:

Sentido direto: AGC AGC AGC AGG AAG GAT (SEQ ID NO:65)

Antissenso: AAA AGT GCC GCT TAA CGA AG (SEQ ID NO:66)

Sonda: CAA GAT GTG TGC TTC CTC CTG CGA (SEQ ID NO:67)

Iniciadores e sondas para LYPD5 foram adquiridas de Applied Biosystems® (número de catálogo HS00289062_m1).

Os resultados plotados nas Figuras 30A a 30C indicam aumentos de vezes na expressão destes genes LY6 humanos em relação ao controle de B-actina humana. Aumentos significantes na expressão de LY6H, LYPD3, e LYPD5 humanas foram observados seguintes ao tratamento com as citocinas indicadas.

Exemplo 10: Expressão de genes LY6 humanos em tecido de biópsia do cólon

Para investigar ainda a fonte do LYPD1 aumentado e expressão

de LYPD5 no cólon de pacientes com CD e UC, foi combinado em uma coorte de biópsias de pacientes com UC, CD e controles. Análise por microarranjo para expressão de LYPD1 usando RNA extraído de biópsias de cólon mostraram expressão estatisticamente aumentada tecido de cólon inflamado de pacientes com CD (Figura 31A). Nas biópsias de UC e CD tomadas de cólon, a expressão de LYPD5 estatisticamente aumentada foi observada em pacientes com UC e CD inflamados (Figura 31B). Isto não foi observado nas biópsias do controle não-inflamadas.

A expressão de LY6H humano nas biópsias de íleo terminal de tecido com IBD inflamado foi analisada em relação ao biópsias de íleo terminal controle (não-IBD) usando análise por RT-PCR (Taqman®). A expressão de LY6H humana foi pelo menos 1,5 vezes maior nas biópsias de IBD inflamadas em relação ao controle.

A expressão de LYPD3 humana em biópsias de cólon de UC inflamadas foi regulada para cima e pelo menos de 2 vezes maior nas biópsias de IBD inflamadas em relação ao controle.

Os resultados destes exemplos demonstraram a expressão de moléculas LY6 na superfície de IEC, e ainda indicaram que a expressão é única para IEC no contexto da inflamação. Além disso, os níveis de expressão superficiais de LY6A e LY6C foram altos em IEC de camundongos colíticos, e quase universais em todas as partes do cólon. Como moléculas ambas específicas para o estado doente, expressos em toda parte durante a doença, a detecção do gene LY6 humano ou expressão gênica ou polipeptídica, particularmente LY6H, LYPD1, LYPD3, e LYPD5 humanas, como método útil para detecção de IBD, incluindo UC e/ou CD em humanos. Adicionalmente, o método de detecção da expressão de LY6 humana é útil para diagnosticar IBD, UC e/ou CD em um ser humano e monitorar a resposta a agentes terapêuticos para IBD.

Nos Exemplos descritos aqui, a significação funcional da expressão de LY6 em IEC foi demonstrada. Células YAMC foram fortemente positivas para LY6A, e expressaram níveis menores de LY6C. Entretanto, sob estímulo com diversas citocinas presentes no cólon durante a colite,

incluindo IL-1 β , TNF α , IFN α , e em particular IL-22 e IFN γ , os níveis de expressão de ambas as moléculas LY6 foram grandemente aumentadas. Células YAMC pré-tratadas com IFN γ à expressão reguladas para cima de moléculas LY6, foram um modelo *in vitro* útil para analisar a significação funcional da expressão de LY6.

A natureza condicionalmente imortalizada das células YAMC vem do promotor de MHC II dirigida pela expressão do grande antígeno T de SV40; baixos níveis (2,5 a 5 U/ml) de IFN γ são usados para dirigir a proliferação destas células (Whitehead, R.H. *et al.* (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90:587-591; Whitehead, R.H., e J.L. Joseph. (1994) *Epithelial Cell Biol* 3:119-125). Células YAMC são muitas vezes usadas como um modelo *in vitro* para tratamentos com citocina de IEC murino (Mei, J.M. *et al.* (2000) *Faseb J* 14:1188-1201; Yan, F., and D.B. Polk (2002) *J Biol Chem* 277:50959-50965). O grande antígeno T de SV40 que estas células contêm são sensíveis à temperatura, e é não-funcional a 37°C. Todos os experimentos realizados aqui envolveram tratamento com IFN γ sob estas condições não-permissivas. Além disso, células YAMC foram privadas de soro (e privadas de IFN γ) a 37°C por 24 horas antes dos experimentos. Sob tais condições, efeitos indicando a expressão residual de antígeno T, tais como proliferação de células, não foram observados. Por conseguinte, efeitos de tratamento com IFN γ foram devidos a efeitos inerentes de IFN γ em vez de efeitos que se originam pelo direcionamento da expressão do antígeno T. Além disso, a regulação para cima dos membros da família LY6 foi detectada em uma segunda linhagem celular murino, CMT93, confirmando que este efeito é largamente aplicável a IEC.

Além disso, IFN γ não foi a única entre as citocinas para indução de moléculas LY6 como regulação para cima modesta da expressão de LY6 foi notada após tratamento com TNF α , IL-1 β e IL-22. A regulação para cima de moléculas LY6 em IEC na resposta à IL-22 é interessante à luz de dados recentes que demonstrando um papel potencial de IL-22 na Doença de Crohn (Wolk, K., *et al.* *J Immunol* 178:5973-5981 (2007)). Embora a homologia entre moléculas LY6 de camundongo e humanas muitas vezes seja

complicada, há evidência para sugerir que a regulação para cima de moléculas LY6 não seja restrita a camundongos. Estudos prévios em ratos sugeriram regulação para cima de moléculas LY6 no intestino delgado em modelos de colite, e foi sugerido que tal expressão esteja envolvida em inflamação, interações de célula/célula bem como sinalização nas IEC de rato (Bakshev, L. *et al.* J Gastroenterol 41:1041-1052 (2006)).

Os dados descritos acima indicam que há uma possibilidade que a integridade de jangada lipídica esteja envolvida na transdução de sinal mediada por LY6C em IEC. Isto implica que a alteração das jangadas lipídicas poderia servir atenuar a jusante da estimulação de LY6C ambas por regulação para baixo da expressão LY6C e alteração dos componentes estruturais da sinalização de LY6C. Recentemente, foi determinado que a depleção de colesterol de IEC com estatinas inibe a expressão gênica pró-inflamatória através de modulação de NF- κ B (Lee, J. *et al.*, Int Immunopharmacol 7:241-248 (2007)). Além disso, as estatinas foram terapeuticamente eficazes em modelos murinos da colite (Naito, Y., *et al.* Int J Mol Med 17:997-1004 (2006)). O mecanismo de motilidade das jangada lipídica e bloqueio de NF- κ B permanece indeterminado, mas os nossos dados sugerem que ativação através de LY6C possa ser uma hipótese para explicar o mecanismo de ação.

Neste estudo, identifica-se moléculas LY6 como um potencial regulador a montante na expressão de genes de quimiocina. A ligação cruzada do receptor LY6C com anticorpos monoclonais resultou em regulação para cima dramática de quase todas as quimiocinas analisadas, incluindo CXCL5. Confirma-se ainda que a secreção de CXCL5 é grandemente aumentada em ligação cruzada à LY6C de IEC. É interessante que embora ambas LY6A e LY6C estejam ancoradas a superfície celular por uma porção GPI, e apesar dos níveis maiores da expressão de LY6A do que LY6C na superfície de IEC, que os efeitos a jusante na secreção de quimiocina sejam vistos com ligação cruzada à LY6C e não consistentemente com ligação cruzada à LY6A.

Exemplo 11: Identificação de um ligante para LYPD5

Neste estudo, uma pesquisa por ligantes de LYPD5 foi realizada por técnicas bem-conhecidas àqueles versados na técnica, ou seja pela expressão por clonagem de aproximadamente 14.000 genes humanos sob o promotor CMV em células COS. Grupos de 100 genes foram transfectados nas células COS cultivadas em 140 poços em placas 12 poços. Seguinte a transfecção, as células foram marcadas com proteína LYPD5-Fc (vide a Figura 32). Poços com marcação positiva foram identificados e clones individuais foram transfectados em células COS. Um único poço expressando uma única proteína, GLG-1 (ESL-1) foi identificado como um ligante para LYPD5. GLG-1 é caracterizado por um domínio extracelular longo (ECD), um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático. Uma série de estudos de coimunoprecipitação foi conduzida usando técnicas conhecidas por aqueles versados na técnica para avaliar a capacidade de várias regiões da ECD de GLG-1 para ligar-se à LYPD5. Foi encontrado que variantes ou fragmentos do ECD de GLG-1 (vide Figuras 33 a 35) foram capazes de servir como um ligante para LYPD5. A figura 33B mostra os resultados dos estudos de coimunoprecipitação usando Fragmentos 1, 2, 3, ou 4 como representado na Figura 33A e demonstra que qualquer um dos fragmentos é suficiente para ligação à LYPD5.

Além disso, um domínio de ECD de GLG-1 foi considerado ser suficiente por si mesmo para ligação à LYPD5. Como mostrado na Figura 33, GLG-1 é composto de múltiplos domínios GLG-1 e domínios GLG-1 únicos podem ligar-se à LYPD5. A figura 34B mostra os resultados de uma coimunoprecipitação demonstrando Fragmentos 1, 2, 3, e 4, bem como domínios únicos GLG-1 115, 150, 215, 538, 609, 670, 729, e 858 (como mostrado na Figura 34A) foram capazes de ligar-se à LYPD5.

Através de outro estudo de coimunoprecipitação, a ligação foi mostrada ser específica com base nos fragmentos de LYPD5 (vide Figura 35A) em que foi verificado LYPD5 não ligar-se ao controle negativo BAP, um controle negativo FN14 foi verificado não ligar-se ao fragmento 2 de GLG-1, o domínio humano GLG-1 115 se liga à LYPD5, o domínio 115 não é sempre expresso em níveis detectáveis mas ainda reduz LYPD5, e a fração do

fragmento 1 de GLG-1 humano que não tem do domínio 115 (resíduos 26 a 114) não se liga à LYPD5 (Figura 35B).

O "*" nas Figuras 34A e 35A indica um potencial sítio de fucosilação.

- 5 Embora a invenção precedente tenha sido descrita em algum detalhe por meio de ilustração e exemplos com objetivos de clarear o entendimento, as descrições e exemplos não devem ser interpretados como limitante ao escopo da invenção. As revelações de todas as literaturas de patentes e científicas citadas aqui são expressamente incorporadas em sua totalidade por referência.
- 10

Listagem de Sequência

- <110> Diehl, Lauri;
 Flanagan, Kenneth;
 Mo, Lian;
 15 Genentech Inc.,
- <120> MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL
- <130> 39766-0296.PCT
- <140> Ainda não atribuído
- <141> Com a presente
- 20 <150> US 60/891,196
- <151> 2007-02-22
- <150> US 60/987,752
- <151> 2007-11-13
- <150> US 61/024,170
- 25 <151> 2008-01-28
- <160> 69
- <170> FastSEQ for Windows Versão 4.0
- <210> 1
- <211> 957
- 30 <212> DNA
- <213> Homo Sapiens
- <400> 1


```

cgcgctctgcg gctgcgttcc ccgaaagacg aggctgcgcc cggattccgg tccgcaggga 60
gaccgaaggg cacagctccc cgcgcgcgc acgccgccg agcccgagtg gcggacaccc 120
ccgggatgct tgcgccccag aggaccgcgc cccaagccc ccgcgcgcc cccaggccca 180
cccgagcat gctgcctgca gccatgaagg gcctcgccct ggcgctgctg gccgtcctgc 240
5  tgtgctcggc gcccgctcat ggctgtggt gccaggactg caccctgacc accaactcca 300
gccattgcac cccaaagcag tgccagccgt ccgacacggt gtgtgccagt gtccgaatca 360
ccgatcccag cagcagcagg aaggatcact cggatgaaca gatgtgtgcc tcctcctgtg 420
acttcgttaa gcgacacttt ttctcagact atctgatggg gtttattaac tctgggatct 480
taaaggctga cgtggactgc tgcgagaagg atttgtgcaa tggggcggca ggggcagggc 540
10 acagcccctg ggccctggcc ggggggctcc tgctcagcct ggggcctgcc ctctctggtg 600
ctgggccctg atgtctctc cttcccacgg ggcttctgag ctgctcccc tgagcctgtg 660
gctgcctctt cccagcctg gcgtggctgg ggctgggggc agccttgccc cagctccgtg 720
gctgtggcct gtggctctca ctctcccc gacgtgaagc ctccctgtct ctccgccagc 780
tctgagtcct aggcagctgg acatctccag gaaaccaggc catctgggca ggaggcctgg 840
15 ggatgagggt ggggggggac cccaggtcc cggaggggaa gtgaagcaac agcccagctg 900
gaagggcgct ttctgcggag aaataaagtc acttttgagt cctgagaaaa aaaaaaa 957

<210> 2
<211> 140
<212> PRT
20 <213> Homo Sapiens
<400> 2

Met Leu Pro Ala Ala Met Lys Gly Leu Gly Leu Ala Leu Leu Ala Val
1 5 10 15
Leu Leu Cys Ser Ala Pro Ala His Gly Leu Trp Cys Gln Asp Cys Thr
25 20 25 30
Leu Thr Thr Asn Ser Ser His Cys Thr Pro Lys Gln Cys Gln Pro Ser
35 40 45
Asp Thr Val Cys Ala Ser Val Arg Ile Thr Asp Pro Ser Ser Ser Arg
50 55 60
30 Lys Asp His Ser Val Asn Lys Met Cys Ala Ser Ser Cys Asp Phe Val
65 70 75 80
Lys Arg His Phe Phe Ser Asp Tyr Leu Met Gly Phe Ile Asn Ser Gly

```

	85	90	95
	Ile Leu Lys Val Asp Val Asp Cys Cys Glu Lys Asp Leu Cys Asn Gly		
	100	105	110
	Ala Ala Gly Ala Gly His Ser Pro Trp Ala Leu Ala Gly Gly Leu Leu		
5	115	120	125
	Leu Ser Leu Gly Pro Ala Leu Leu Trp Ala Gly Pro		
	130	135	140
	<210> 3		
	<211> 2683		
10	<212> DNA		
	<213> Homo Sapiens		
	<400> 3		
	agggcggtgt caatgcaccc tccagcgggtg cgcgcaggcg ggagaaggga gggcgggcccg 60		
	ggcaagtgag acagttaagg cagtgtcccc accacacccc caccagatt ggccacgccg 120		
15	agctggttct tgacagaagg ccttcgcgga ggaagagggg gcacagctgc acaggacacc 180		
	ctacggagcc tgcgggctg gaactttgcc aggcgcacgg gaacgcgcgc ctttcctgtc 240		
	agcctcccg ggccagggc tccgcgggc cgcagcggga cagcctcagt tgtgtgggct 300		
	ggaccagtc gctggggtac cgaccagtc tggaaggcgc agaggacgtg gagggggag 360		
	gctgccttcc tatgtgcgaa gggccagccg ggcagcagc cctcagaccc tagtccgcac 420		
20	ccggcaggtc cccacggcac ctgctgcgcc ctctcgcgc ccccccaac ctccccatct 480		
	cagaaaacta ccagttctct cccgcccccc ggcgcccctt tcccaggaac gtgcggaggc 540		
	gggagaagag gaagacagga aggggggtggg gatgtgaagc gaccgtccca gccttccccg 600		
	cccgccaccc ccacccaac tcggcagccg tcacgtgatg cctggagtgg gaggtgggga 660		
	gaaaaggcga gacttttgtg ggtgctcccg atcgccagta gttccttcag tctcagccgc 720		
25	caactccgga ggcgcggtgc tcggcccggg agcgcgagcg ggaggagcag agaccgcag 780		
	ccgggagccc gagcgcgggc gatgcaggct ccgcgagcgg cacctgcggc tcctctaagc 840		
	tacgaccgtc gtctccgcgg cagcagcgcg ggcgccagca gcctcggcag ccacagccgc 900		
	tgcagccggg gcagcctccg ctgctgtcgc ctctctgat gcgcttgccc tctcccgcc 960		
	ccgggactcc gggagaatgt gggtcctagg catcgcgga actttttgcg gattgttctt 1020		
30	gcttccaggc tttgcgctgc aaatccagt ctaccagtgt gaagaattcc agctgaacaa 1080		
	cgactgctcc tccccgagt tcattgtgaa ttgcacgggtg aacgttcaag acatgtgtca 1140		
	gaaagaagtg atggagcaaa gtgccgggat catgtaccgc aagtcctgtg catcatcagc 1200		

ggccctgtctc atcgccctctg ccgggtacca gtccttctgc tccccagggg aactgaactc 1260
 agtttgcata agctgctgca acacccctct ttgtaacggg ccaaggccca agaaaagggg 1320
 aagttctgcc tcggccctca ggccagggct ccgcaccacc atcctgttcc tcaaattagc 1380
 cctcttctcg gcacactgct gaagctgaag gagatgccac cccctcctgc attgttcttc 1440
 5 cagccctcgc ccccaacccc ccacctcctt gagtgaagttt cttctgggtg tccttttatt 1500
 ctgggtaggg agcgggagtc cgtgttctct tttgttcttg tgcaaataat gaaagagctc 1560
 ggtaaagcat tctgaataaa ttcagcctga ctgaattttc agtatgtact tgaaggaagg 1620
 aggtggagtg aaagtccacc ccatgtctg tgtaaccgga gtcaaggcca ggctggcaga 1680
 gtcagtcctt agaagtcact gaggtgggca tctgcctttt gtaaagcctc cagtgtccat 1740
 10 tccatccctg atgggggcat agtttgagac tgcagagtga gagtgaagtt ttcttagggc 1800
 tggagggcca gttcccactc aaggctccct cgcttgacat tcaaacttca tgctcctgaa 1860
 aaccattctc tgcagcagaa ttggctgggt tcgcgcctga gttgggctct agtgactcga 1920
 gactcaatga ctgggactta gactggggct cggcctcgtc ctgaaaagtg cttaaagaaaa 1980
 tcttctcagt tctccttgca gaggactggc gccgggacgc gaagagcaac gggcgctgca 2040
 15 caaagcgggc gctgtcggtg gtggagtgcg catgtacgcg caggcgcttc tcgtggttgg 2100
 cgtgctgcag cgacaggcgg cagcacagca cctgcacgaa caccgcgcca aactgctgcg 2160
 aggacaccgt gtacaggagc gggttgatga ccgagctgag gtagaaaaac gtctccgaga 2220
 aggggaggag gatcatgtac gcccggaagt aggacctcgt ccagtcgtgc ttgggttttg 2280
 ccgcagccat gatcctccga atctgggttg gcatccagca tacggccaat gtcacaacaa 2340
 20 tcagccctgg gcagacacga gcaggaggga gagacagaga aaagaaaaac acagcatgag 2400
 aacacagtaa atgaataaaa ccataaaata tttagccctt ctgttctgtg cttactggcc 2460
 aggaaatggg accaattttt cagtgttggg cttgacagct tcttttgcca caagcaagag 2520
 agaatttaac actgtttcaa acccggggga gttggctgtg ttaaagaaag accattaaat 2580
 gcttttagaca gtgtatttat accagttgat gtctgttaat tttaaaaaaa tgttttcatt 2640
 25 ggtgtttgtt tgcgtatcca gaaagcagtt catgttatcc ata 2683
 <210> 4
 <211> 1959
 <212> DNA
 <213> Homo Sapiens
 30 <400> 4
 gatgcctgga gtgggaggtg gggagaaaag gcgagacttt tgtgggtgct cccgatcgcc 60
 agtagttcct tcagtctcag ccgccaactc cggaggcgcg gtgctcggcc cgggagcgcg 120

agcgggagga gcagagaccc gcagccggga gcccagagcg gggcgatgca ggctccgcga 180
 gcggcacctg cggctcctct aagctacgac cgtcgtctcc gcggcagcag cgcgggcccc 240
 agcagcctcg gcagccacag ccgctgcagc cggggcagcc tccgctgctg tcgcctcctc 300
 tgatgcgctt gccctctccc ggccccggga ctccgggaga atgtgggtcc taggcacgc 360
 5 ggcaactttt tgcggattgt tcttgcttcc aggttttgcg ctgcaaatac agtgctacca 420
 gtgtgaagaa ttccagctga acaacgactg ctctccccc gagttcattg tgaattgcac 480
 ggtgaacgtt caagacatgt gtcagaaaga agtgatggag caaagtgccg ggatcatgta 540
 ccgcaagtcc tgtgcatcat cagcggcctg tctcatcgcc tctgccgggt accagtcctt 600
 ctgctcccca gggaaactga actcagtttg catcagctgc tgcaacaccc ctctttgtaa 660
 10 cgggccaagg cccaagaaaa ggggaagttc tgctcggcc ctgaggccag ggctccgcac 720
 caccatcctg ttctcaaat tagccctctt ctggcacac tgctgaagct gaaggagatg 780
 ccacccctc ctgcattgtt cttccagccc tcgccccaa cccccacct ccctgagtga 840
 gtttcttctg ggtgtccttt tattctgggt agggagcggg agtccgtgtt ctcttttgtt 900
 cctgtgcaaa taatgaaaga gtcggtaaa gcattctgaa taaattcagc ctgactgaat 960
 15 tttcagtatg tacttgaagg aaggaggtgg agtgaaagt caccatcatg tctgtgtaac 1020
 cggagtcaag gccaggctgg cagagtcagt ccttagaagt cactgaggtg ggcatctgcc 1080
 ttttgtaaag cctccagtgt ccattccatc cctgatgggg gcatagtttg agactgcaga 1140
 gtgagagtga cgttttctta gggctggagg gccagttccc actcaaggct ccctcgcttg 1200
 acattcaaac ttcatgctcc tgaaaaccat tctctgcagc agaattggct ggtttcgcgc 1260
 20 ctgagttggg ctctagtac tcgagactca atgactggga cttagactgg ggctcggcct 1320
 cgctctgaaa agtgcttaag aaaatcttct cagttctcct tgcaaggagc tggcgccggg 1380
 acgcgaagag caacgggcgc tgcacaaagc gggcgctgtc ggtgggtggag tgcgcatgta 1440
 cgcgcaggcg cttctcgtgg ttggcgtgct gcagcgacag gcggcagcac agcacctgca 1500
 cgaacacccg ccgaaactgc tgcgaggaca ccgtgtacag gagcgggttg atgaccgagc 1560
 25 tgaggtagaa aaacgtctcc gagaagggga ggaggatcat gtacgcccgg aagtaggacc 1620
 tcgtccagtc gtgcttgggt ttggccgcag ccatgatcct ccgaatctgg ttgggcatcc 1680
 agcatacggc caatgtcaca acaatcagcc ctgggcagac acgagcagga gggagagaca 1740
 gagaaaagaa aaacacagca tgagaacaca gtaaataaat aaaccataa aatatttagc 1800
 ccctctgttc tgtgcttact ggccaggaaa tggtagcaat ttttcagtgt tggacttgac 1860
 30 agcttctttt gccacaagca agagagaatt taacactgtt tcaaaccggg gggagttggc 1920
 tgtgttaaag aaagaccatt aaatgcttta gacagtga 1959

<211> 141

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 5

5 Met Trp Val Leu Gly Ile Ala Ala Thr Phe Cys Gly Leu Phe Leu Leu

1 5 10 15

Pro Gly Phe Ala Leu Gln Ile Gln Cys Tyr Gln Cys Glu Glu Phe Gln

20 25 30

Leu Asn Asn Asp Cys Ser Ser Pro Glu Phe Ile Val Asn Cys Thr Val

10 35 40 45

Asn Val Gln Asp Met Cys Gln Lys Glu Val Met Glu Gln Ser Ala Gly

50 55 60

Ile Met Tyr Arg Lys Ser Cys Ala Ser Ser Ala Ala Cys Leu Ile Ala

65 70 75 80

15 Ser Ala Gly Tyr Gln Ser Phe Cys Ser Pro Gly Lys Leu Asn Ser Val

85 90 95

Cys Ile Ser Cys Cys Asn Thr Pro Leu Cys Asn Gly Pro Arg Pro Lys

100 105 110

Lys Arg Gly Ser Ser Ala Ser Ala Leu Arg Pro Gly Leu Arg Thr Thr

20 115 120 125

Ile Leu Phe Leu Lys Leu Ala Leu Phe Ser Ala His Cys

130 135 140

<210> 6

<211> 1745

25 <212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 6

aaggctgggg ttgcctgggg cgaggttact catcctgggc tcaggttaaga gggcccgagc 60

tcggaggcgg cacatccagg ggggacgcca agggagcagg acggagccat ggaccccgcc 120

30 aggaaagcag gtgcccaggc catgatctgg actgcaggct ggctgctgct gctgctgctt 180

cgcggaggag cgcaggccct ggagtgtctac agctgcgtgc agaaagcaga tgacgggatgc 240

tccccgaaca agatgaagac agtgaagtgc gcgccgggcg tggacgtctg caccgaggcc 300

gtgggggagg tggagaccat ccacggacaa ttctcgtctg cagtgcgggg ttgcgggttcg 360
 ggactccccg gcaagaatga ccgcgccctg gatcttcacg ggcttctggc gttcatccag 420
 ctgcagcaat gcgctcagga tcgctgcaac gccaaagtca acctcacctc gcggggcgctc 480
 gacccggcag gtaatgagag tgcatacccg cccaacggcg tggagtgcta cagctgtgtg 540
 5 ggcttgagcc gggaggcgtg ccagggtaca tcgcccggcg tcgtgagctg ctacaacgcc 600
 agcgatcatg tctacaaggg ctgcttcgac ggcaacgtca ccttgacggc agctaagtgt 660
 actgtgtcct tgctgtccg gggctgtgtc caggatgaat tctgcactcg ggatggagta 720
 acaggcccg ggttcacgt cagtggctcc tgttgccagg ggtcccgtg taactctgac 780
 ctccgcaaca agacctactt cccccctcga atcccacccc ttgtccggct gccccctcca 840
 10 gagccacga ctgtggcctc aaccacatct gtcaccactt ctacctcggc ccagtgaga 900
 cccacatcca ccaccaaacc catgccagcg ccaaccagtc agactccgag acagggagta 960
 gaacacgagg cctcccggga tgaggagccc aggttgactg gaggcgccgc tggccaccag 1020
 gaccgcagca attcagggca gtatcctgca aaaggggggc ccagcagcc ccataataaa 1080
 ggctgtgtgg ctcccacagc tggattggca gcccttctgt tggccgtggc tgctgggtgtc 1140
 15 ctactgtgag cttctccacc tggaaatttc cctctcacct acttctctgg ccctgggtac 1200
 ccctcttctc atcaattcct gttcccacca ctggactggg ctggcccagc ccctgttttt 1260
 ccaacattcc ccagtatccc cagcttctgc tgcgctgggt tgcggctttg ggaaataaaa 1320
 taccgttgta tatattctgc caggggtgtt ctagcttttt gaggacagct cctgtatcct 1380
 tctcatcctt gtctctccgc ttgtcctctt gtgatgttag gacagagtga gagaagtcag 1440
 20 ctgtcacggg gaagggtgaga gagaggatgc taagcttcct actcactttc tcctagccag 1500
 cctggacttt ggagcgtggg gtgggtggga caatggctcc ccactctaag cactgcctcc 1560
 cctactcccc gcatctttgg ggaatcgggt ccccatatgt cttccttact agactgtgag 1620
 ctctcagagg gcagggaccg tgccttatgt ctgtgtgtga tcagtttctg gcacataaat 1680
 gcctcaataa agatttaatt actttgaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1740
 25 aaaaa 1745
 <210> 7
 <211> 346
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 30 <400> 7
 Met Asp Pro Ala Arg Lys Ala Gly Ala Gln Ala Met Ile Trp Thr Ala

Gly Trp Leu Leu Leu Leu Leu Arg Gly Gly Ala Gln Ala Leu Glu
 20 25 30
 Cys Tyr Ser Cys Val Gln Lys Ala Asp Asp Gly Cys Ser Pro Asn Lys
 35 40 45
 5 Met Lys Thr Val Lys Cys Ala Pro Gly Val Asp Val Cys Thr Glu Ala
 50 55 60
 Val Gly Ala Val Glu Thr Ile His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Arg
 65 70 75 80
 Gly Cys Gly Ser Gly Leu Pro Gly Lys Asn Asp Arg Gly Leu Asp Leu
 10 85 90 95
 His Gly Leu Leu Ala Phe Ile Gln Leu Gln Gln Cys Ala Gln Asp Arg
 100 105 110
 Cys Asn Ala Lys Leu Asn Leu Thr Ser Arg Ala Leu Asp Pro Ala Gly
 115 120 125
 15 Asn Glu Ser Ala Tyr Pro Pro Asn Gly Val Glu Cys Tyr Ser Cys Val
 130 135 140
 Gly Leu Ser Arg Glu Ala Cys Gln Gly Thr Ser Pro Pro Val Val Ser
 145 150 155 160
 Cys Tyr Asn Ala Ser Asp His Val Tyr Lys Gly Cys Phe Asp Gly Asn
 165 170 175
 20 Val Thr Leu Thr Ala Ala Asn Val Thr Val Ser Leu Pro Val Arg Gly
 180 185 190
 Cys Val Gln Asp Glu Phe Cys Thr Arg Asp Gly Val Thr Gly Pro Gly
 195 200 205
 25 Phe Thr Leu Ser Gly Ser Cys Cys Gln Gly Ser Arg Cys Asn Ser Asp
 210 215 220
 Leu Arg Asn Lys Thr Tyr Phe Ser Pro Arg Ile Pro Pro Leu Val Arg
 225 230 235 240
 Leu Pro Pro Pro Glu Pro Thr Thr Val Ala Ser Thr Thr Ser Val Thr
 245 250 255
 30 Thr Ser Thr Ser Ala Pro Val Arg Pro Thr Ser Thr Thr Lys Pro Met
 260 265 270

Pro Ala Pro Thr Ser Gln Thr Pro Arg Gln Gly Val Glu His Glu Ala
 275 280 285
 Ser Arg Asp Glu Glu Pro Arg Leu Thr Gly Gly Ala Ala Gly His Gln
 290 295 300
5 Asp Arg Ser Asn Ser Gly Gln Tyr Pro Ala Lys Gly Gly Pro Gln Gln
 305 310 315 320
 Pro His Asn Lys Gly Cys Val Ala Pro Thr Ala Gly Leu Ala Ala Leu
 325 330 335
 Leu Leu Ala Val Ala Ala Gly Val Leu Leu
10 340 345
 <210> 8
 <211> 2490
 <212> DNA
 <213> Homo Sapiens
15 <400> 8
 gatccgcttt gcgcatccca gtgattcttg ggttccgcgt gtagtttcgg aaggagacat 60
 cgaagcaggg cgaggcgag agggcggtgc ggactcatgc ccagtcggc agtgcgggg 120
 cccaagccct gcagtgtac agctttgagc acacctactt tggccccttt gacctcaggg 180
 ccatgaagct gccagcatc tctgtctctc atgagtgtt tgaggctatc ctgtctctgg 240
20 acaccgggta tcgcgcgccg gtgaccctgg tgcggaaggg ctgctggacc gggcctcctg 300
 cgggccagac gcaatcgaac gcggacgcgc tgccgccaga ctactcgggtg gtgcgcgggt 360
 gcacaactga caaatcgaac gccacactca tgactcatga cgccctcccc aacctgagcc 420
 aagcacccga cccgccgacg ctcagcggcg ccgagtgtta cgctgtatc ggggtccacc 480
 aggatgactg cgctatcggc aggtcccgac ggtccagtg tcaccaggac cagaccgcct 540
25 gcttcaggg caatggcaga atgacagttg gcaatttctc agtccctgtg tacatcagaa 600
 cctgccaccg gccctcctgc accaccgagg gcaccaccag cccctggaca gccatcgacc 660
 tccagggctc ctgctgtgag gggtaacctc gcaacaggaa atccatgacc cagcccttca 720
 ccagtgttcc agccaccacc cctccccgag cactacaggt cctggccctg ctctcccccag 780
 tctctctgtc ggtggggctc tcagcataga ccgcccctcc aggatgtgtg ggacagggct 840
30 cacacacctc attcttgtg ctccagcccc tatcacatag ctactggaa aatgatgtta 900
 aagtaagaat tgcactcctg tccctctggc cttccatctc tcccgcctt gtgccccaca 960
 acctggccaa cagtactgga agaaactgga cacagtcacc agcatccccg gggagggcaa 1020

aacagccatg tcgtgccccg atgaagagca attctgatca cagctgttac tcaactgagca 1080
 ccagccaggc accaggcacc ccataacacg gcttccctgtg ctctccctcc agagcctgtc 1140
 gcagctctag gagggagcta tacaatgatg tctttattag tgtcatcatg agaagcccaa 1200
 taagcagtat gccctaacag ttagtaggcc aggctctgga gctaagctgc atggggttcaa 1260
 5 atcccagctc caccattcag cctgcagaga ccatgagcga gttacttaag ccaggctctg 1320
 gagctaagct gcatgggttc aaatcccagc tccagcattc agcctacaga gaccatgggt 1380
 gagttactta agccaggctc tggagctaag ctgcatgggt tcaaattcca gctccacat 1440
 tcagcctgca gagactgtgg gtgagttact tgagctctct gtgccaatat tttctcacct 1500
 ataaggtgga ggtgaaaata aactctataa catgacaaga actacttcac agtagttgca 1560
 10 gtgaggattc aacgagatga acatttagta cttgggacac agcagtggcc cagtgtaaat 1620
 gggctacttg tcataagccc taagtcacag gtcaacaaac tgagaggcaa aagcacttgg 1680
 ttgagcttgt gtatctagtg agtatggatt cagggaccag attcccagcc ccacgaactg 1740
 ctaagcaacc ccacctccta aacacatgag tgccgattaa cttcacagaa aaacacacaa 1800
 ggcaaagtgc agcgaggatga aattctccaa gctataaaga tcaggggaaga cttcctggag 1860
 15 gaattcaccg ttgagcaaaa tcctaaagga tcaatagtag ctggcaaaaa gaagcaggag 1920
 gaagcgcatc ctaggtagag gagacagcct ggacaaaggt ctgagggagg aaggagcaca 1980
 aggagtgcag gacactttca tgagtgcagg acactttcat aactgcatga acttcataga 2040
 gatgggatcc tttagcatgt tctctgtgca catgcttgac catgttcttt cacatgcttt 2100
 ttgccacttg atctttccag caactcagtg agagaagcaa aaaagtaagt tgcacctgc 2160
 20 tattgtctga atgtttgtgt cccccaaaaa ttcacttttt gaaacctaat taccaaagtg 2220
 atattactgg gaggtggggc ctttgggagg tggtagatc atgaggggtg agcccccag 2280
 aataggatta gtgcccttat aaaagaggcc ctggagagct gccttgcccc ttccaccaca 2340
 tgagaacaca gccagcaggt gcctataagc aagaaagtgg gttctcacca gccatcgaat 2400
 ctgctggtgc attgattgca gacttcccag actccagagc tatgagacat aaatttctgt 2460
 25 tgtgtataag ccaaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2490
 <210> 9
 <211> 2118
 <212> DNA
 <213> Homo Sapiens
 30 <400> 9
 gattcttggg ttccgcgcgt agtttcggaa ggagacatcg aagcagggcg aggcgcagag 60
 ggcgttgccg actcatgccc cagtcggcag tgcgggtcc caagccctgc agtgctacag 120

ctttgagcac acctactttg gcccctttga cctcagggcc atgaagctgc ccagcatctc 180
 ctgtcctcat gagtgtttt aggtatcct gtctctggac accgggtatc gcgcgccggt 240
 gaccctgggt cggaagggct gctggaccgg gcctcctgcy ggccagacgc aatcgaaccc 300
 ggacgcgctg ccgccagact actcgggtgt gcgcggctgc acaactgaca aatgcaacgc 360
 5 ccacctcatg actcatgacg cctccccc aa cctgagccaa gcacccgacc cgccgacgct 420
 cagcggcgcc gagtgtctacg cctgtatcgg ggtccaccag gatgactgcy ctatcggcag 480
 gtcccagcga gtccagtgtc accaggacca gaccgcctgc ttccagggca gtggcagaat 540
 gacagttggc aattttctcag tccctgtgta catcagaacc tgccaccggc ctcctgcac 600
 caccgagggc accaccagcc cctggacagc catcgacctc cagggtcct gctgtgaggg 660
 10 gtacctctgc aacaggaaat ccatgaccca gcccttcacc agtgcttcag ccaccacccc 720
 tccccagca ctacaggtcc tggcctgtc cctccagtc ctctgtctgg tggggctctc 780
 agcatagacc gccctccag gatgctgggg acagggtca cacacctcat tctgtctgct 840
 tcagccccta tcacatagct cactggaaaa tgatgttaaa gtaagaattg cactcctgtc 900
 cctctggcct tccatctctc ctgcccttgt gccccacaac ctggccaaca gtactggaag 960
 15 aaactggaca cagtcaccag catcccaggg gagggcaaaa cagccatgtc gtgccctgat 1020
 gaagagcaat tctgatcaca gctgttactc actgagcacc agccaggcac caggcacccc 1080
 ataacacggc ttctgtgct ctcttccag agcctgtcgc agctctaggg gggagctata 1140
 caatgatgtc tttattagt tcatcatgag aagccaata agcagtatgc cctaacagtt 1200
 agtaggccag gctctggagc taagctgcat gggttcacat ccagctcca ccattcagcc 1260
 20 tgcagagacc atgagcgagt tacttaagcc aggtcttga gctaagctgc atgggttcaa 1320
 atcccagctc cagcattcag cctacagaga ccatgggtga gttacttaag ccaggctctg 1380
 gagctaagct gcatgggttc aaatcccagc tccaccattc agcctgcaga gactgtgggt 1440
 gagttacttg agctctctgt gccaatattt tctcacctat aaggtggagg tgaaaataaa 1500
 ctctataaca tgacaagaac tacttcacag tagttgcagt gaggattcaa cgagatgaac 1560
 25 atttagtact tgggacacag cagtggccca gtataaatgg gctacttgtc ataagcccta 1620
 agtcacaggt caacaaactg agaggtaaaa gcacttggtt gagcttgtgt atctagttag 1680
 tatggattca gggaccagat tcccagcccc acgaactgct aagcaacccc acctcctaaa 1740
 cacatgagtg ccgattaact tcacagaaaa acacacaagg caaagttcag cgaggtgaaa 1800
 ttctccaagc tataaagatc aggaagact tcctggagga attcaccctt gagcaaaatc 1860
 30 cttaaaggatc aatagtagct ggcaaaaaga agcaggagga agcacatttt aggtagagga 1920
 gagagcctgg acaaaggctt gagggaggaa ggaacacaag gagtgcagga cactttcata 1980
 actgcatgaa cttcatagag atgggatcct ttagcatgtt ctctgtgcac atgcttgacc 2040

atgttctttc acatgctttt tgccacttga tctttccagc aactcagtga gagaagcaaa 2100
 aaagtaagtt gcatacctg 2118

<210> 10

<211> 208

5 <212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 10

Met Lys Leu Pro Ser Ile Ser Cys Pro His Glu Cys Phe Glu Ala Ile

1 5 10 15

10 Leu Ser Leu Asp Thr Gly Tyr Arg Ala Pro Val Thr Leu Val Arg Lys

20 25 30

Gly Cys Trp Thr Gly Pro Pro Ala Gly Gln Thr Gln Ser Asn Ala Asp

35 40 45

Ala Leu Pro Pro Asp Tyr Ser Val Val Arg Gly Cys Thr Thr Asp Lys

15 50 55 60

Cys Asn Ala His Leu Met Thr His Asp Ala Leu Pro Asn Leu Ser Gln

65 70 75 80

Ala Pro Asp Pro Pro Thr Leu Ser Gly Ala Glu Cys Tyr Ala Cys Ile

85 90 95

20 Gly Val His Gln Asp Asp Cys Ala Ile Gly Arg Ser Arg Arg Val Gln

100 105 110

Cys His Gln Asp Gln Thr Ala Cys Phe Gln Gly Asn Gly Arg Met Thr

115 120 125

Val Gly Asn Phe Ser Val Pro Val Tyr Ile Arg Thr Cys His Arg Pro

25 130 135 140

Ser Cys Thr Thr Glu Gly Thr Thr Ser Pro Trp Thr Ala Ile Asp Leu

145 150 155 160

Gln Gly Ser Cys Cys Glu Gly Tyr Leu Cys Asn Arg Lys Ser Met Thr

165 170 175

30 Gln Pro Phe Thr Ser Ala Ser Ala Thr Thr Pro Pro Arg Ala Leu Gln

180 185 190

Val Leu Ala Leu Leu Leu Pro Val Leu Leu Leu Val Gly Leu Ser Ala

```

195                                200                                205

<210> 11

<211> 806

<212> DNA

5  <213> Homo Sapiens

<400> 11

gcccaccccc gccagcccg tgcctataag gccttgcaa tgcaggggcc cgcactgctc 60
ccagacgaca tcagagatga ggacagcatt gctgctcctt gcagccctgg ctgtggctac 120
agggccagcc cttaccctgc gctgccacgt gtgcaccagc tccagcaact gcaagcattc 180
10 tgtggtctgc ccggccagct ctcgcttctg caagaccagc aacacagtgg agcctctgag 240
ggggaatctg gtgaagaagg actgtgcgga gtcgtgcaca ccagctaca ccctgcaagg 300
ccaggtcagc agcggcacca gctccacca gtgctgccag gaggacctgt gcaatgagaa 360
gctgcacaac gctgcacca ccgcaccgc cctcgccac agtgccctca gcctggggct 420
ggccctgagc ctcttgccg tcctcttagc cccagcctg tgaccttccc ccaggggaag 480
15 gccctcatg cctttccttc cctttctctg gggattccac acctctcttc cccagccgca 540
acgggggtgc caggagcccc aggtgaggg ctccccgaa agtctgggac caggtccagg 600
tgggcatgga atgctgatga cttggagcag gcccacaga cccacagag gatgaagcca 660
ccccacagag gatgcagccc ccagctgcat ggaaggtgga ggacagaagc cctgtggatc 720
cccgatttc acactccttc tgtttgttg ccgtttattt ttgtactcaa atctctacat 780
20 ggagataaat gatttaaacc agaaaa                                806

<210> 12

<211> 128

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

25 <400> 12

Met Arg Thr Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Leu Ala Val Ala Thr Gly
1              5              10              15
Pro Ala Leu Thr Leu Arg Cys His Val Cys Thr Ser Ser Ser Asn Cys
20              25              30
30 Lys His Ser Val Val Cys Pro Ala Ser Ser Arg Phe Cys Lys Thr Thr
35              40              45
Asn Thr Val Glu Pro Leu Arg Gly Asn Leu Val Lys Lys Asp Cys Ala

```

```

      50              55              60
Glu Ser Cys Thr Pro Ser Tyr Thr Leu Gln Gly Gln Val Ser Ser Gly
65              70              75              80
Thr Ser Ser Thr Gln Cys Cys Gln Glu Asp Leu Cys Asn Glu Lys Leu
5              85              90              95
His Asn Ala Ala Pro Thr Arg Thr Ala Leu Ala His Ser Ala Leu Ser
      100              105              110
Leu Gly Leu Ala Leu Ser Leu Leu Ala Val Ile Leu Ala Pro Ser Leu
      115              120              125
10 <210> 13
    <211> 1145
    <212> DNA
    <213> Homo Sapiens
    <400> 13
15 gctccggcca gccgcggtcc agagcgcgcg aggttcgggg agctccgcca ggctgctggt 60
    acctgcgtcc gcccggcgag caggacaggc tgcttttggtt tgtgacctcc aggcaggacg 120
    gccatcctct ccagaatgaa gatcttcttg ccagtgctgc tggctgccct tctgggtgtg 180
    gagcgagcca gctcgctgat gtgcttctcc tgcttgaacc agaagagcaa tctgtactgc 240
    ctgaagccga ccatctgctc cgaccaggac aactactgcg tgactgtgtc tgctagtgcc 300
20 ggcattggga atctcgtgac atttgccac agcctgagca agacctgttc cccggcctgc 360
    cccatcccag aaggcgtcaa tgttggtgtg gcttccatgg gcatcagctg ctgccagagc 420
    tttctgtgca atttcagtgc ggccgatggc gggctgcggg caagcgtcac cctgctgggt 480
    gccgggctgc tgctgagcct gctgccggcc ctgctgcggt ttggcccctg accgcccaga 540
    ccctgtcccc cgatccccca gctcaggaag gaaagcccag ccctttcttg atcccacagt 600
25 gtatgggagc ccctgactcc tcacgtgcct gatctgtgcc cttggtccca ggtcaggccc 660
    accccctgca cctccacctg cccagcccc tgccctctgcc caagtgggcc agctgccctc 720
    acttctgggg tggatgatgt gaccttcctt gggggactgc ggaagggacg agggttccct 780
    ggagtcttac ggtccaacat cagaccaagt cccatggaca tgctgacagg gtccccaggg 840
    agaccgtgtc agtagggatg tgtgcctggc tgtgtacgtg ggtgtgcagt gcacgtgaga 900
30 gcacgtggcg gcttctgggg gccatgtttg gggaggagg tgtgccagca gcctggagag 960
    cctcagtccc tgtagcccc tgccctggca cagctgcatg cacttcaagg gcagcctttg 1020
    ggggttgggg tttctgccac ttccgggtct aggcctgcc caaatccagc cagtccctgcc 1080

```

```

ccagcccacc cccacattgg agccctcctg ctgctttggt gcctcaaata aatacagatg 1140
tcccc                                           1145

<210> 14
<211> 131
5 <212> PRT
   <213> Homo Sapiens
   <400> 14
Met Lys Ile Phe Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gly Val Glu
  1             5             10             15
10 Arg Ala Ser Ser Leu Met Cys Phe Ser Cys Leu Asn Gln Lys Ser Asn
    20             25             30
Leu Tyr Cys Leu Lys Pro Thr Ile Cys Ser Asp Gln Asp Asn Tyr Cys
    35             40             45
Val Thr Val Ser Ala Ser Ala Gly Ile Gly Asn Leu Val Thr Phe Gly
15  50             55             60
His Ser Leu Ser Lys Thr Cys Ser Pro Ala Cys Pro Ile Pro Glu Gly
65             70             75             80
Val Asn Val Gly Val Ala Ser Met Gly Ile Ser Cys Cys Gln Ser Phe
    85             90             95
20 Leu Cys Asn Phe Ser Ala Ala Asp Gly Gly Leu Arg Ala Ser Val Thr
    100            105            110
Leu Leu Gly Ala Gly Leu Leu Leu Ser Leu Leu Pro Ala Leu Leu Arg
    115            120            125
Phe Gly Pro
25  130
   <210> 15
   <211> 550
   <212> DNA
   <213> Homo Sapiens
30 <400> 15
ccagtctgtc gccacctcac ttggtgtctg ctgtccccgc caggcaagcc tggggtgaga 60
gcacagagga gtgggccggg accatgcggg ggacgcggct ggcgctcctg gcgctggtgc 120

```

tggctgcctg cggagagctg gcgccggccc tgcgtgcta cgtctgtccg gagcccacag 180
 gagtgtcgga ctgtgtcacc atcgccacct gcaccaccaa cgaaaccatg tgcaagacca 240
 cactctactc ccgggagata gtgtaccctt tccaggggga ctccacggtg accaagtcct 300
 gtgccagcaa gtgtaagccc tcggatgtgg atggcatcgg ccagaccctg cccgtgtcct 360
 5 gctgcaatac tgagctgtgc aatgtagacg gggcgcccg c tctgaacagc ctccactgcg 420
 gggccctcac gctcctccca ctcttgagcc tccgactgta gagtccccgc ccacccccat 480
 ggccttatgc gggccagccc cgaatgcctt gaagaagtgc ccctgcacc agggaaaaaaa 540
 aaaaaaaaaa 550
 <210> 16
 10 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 16
 Met Arg Gly Thr Arg Leu Ala Leu Leu Ala Leu Val Leu Ala Ala Cys
 15 1 5 10 15
 Gly Glu Leu Ala Pro Ala Leu Arg Cys Tyr Val Cys Pro Glu Pro Thr
 20 20 25 30
 Gly Val Ser Asp Cys Val Thr Ile Ala Thr Cys Thr Thr Asn Glu Thr
 35 40 45
 20 Met Cys Lys Thr Thr Leu Tyr Ser Arg Glu Ile Val Tyr Pro Phe Gln
 50 55 60
 Gly Asp Ser Thr Val Thr Lys Ser Cys Ala Ser Lys Cys Lys Pro Ser
 65 70 75 80
 Asp Val Asp Gly Ile Gly Gln Thr Leu Pro Val Ser Cys Cys Asn Thr
 25 85 90 95
 Glu Leu Cys Asn Val Asp Gly Ala Pro Ala Leu Asn Ser Leu His Cys
 100 105 110
 Gly Ala Leu Thr Leu Leu Pro Leu Leu Ser Leu Arg Leu
 115 120 125
 30 <210> 17
 <211> 3901
 <212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 17

aagatggcgg cgtgtggacg tgtacggagg atgttccgct tgcggcggc gctgcatctg 60
 ctgctgctat tcgcggccgg ggccgagaaa ctccccggcc atggcgtcca cagccagggc 120
 5 caggggcccg gggccaactt tgtgtccttc gtagggcagg ccggaggcgg cggcccgggc 180
 ggtcagcagc tgccccagct gcttcagtca tcgcagcttc agcagcaaca gcagcagcag 240
 caacagcaac agcagcttca gccgccgag ccgcctttcc cggcgggtgg gcctccggcc 300
 cggcgggggag gagcggggggc tgggtgggggc tggaagctgg cggaggaaga gtcttcgagg 360
 gaggacgtga cccgcgtgtg ccctaagcac acctggagca acaacctggc ggtgctcgag 420
 10 tgcctgcagg atgtgagggg gcctgaaaat gaaatttctt cagactgcaa tcatttggtg 480
 tggaattata agctgaacct aactacagat cccaaatttg aatctgtggc cagagagggt 540
 tgcaaactca ctataacaga gattaaagaa tgtgctgatg aaccggttgg aaaagggttac 600
 atggtttctt gcttagtgga tcaccgaggc aacatcactg agtatcagtg tcaccagtac 660
 attaccaaga tgacggccat catttttagt gattaccgtt taatctgtgg cttcatggat 720
 15 gactgcaaaa atgacatcaa cattctgaaa tgtggcagta ttcggcttgg agaaaaggat 780
 gcacattcac aagggtgaggt ggtatcatgc ttggagaaag gcctggtgaa agaagcagaa 840
 gaaagagaac ccaagattca agtttctgaa ctctgcaaga aagccattct ccgggtggct 900
 gagctgtcat cggatgactt tcacttagac cggcatttat attttgcttg ccgagatgat 960
 cgggagcggt tttgtgaaaa tacacaagct ggtgagggca gagtgtataa gtgcctcttt 1020
 20 aaccataaat ttgaagaatc catgagtga aagtgtcgag aagcacttac aaccgcgcaa 1080
 aagctgattg ccaggatta taaagtcagt tattcattgg ccaaactctg taaaagtgac 1140
 ttgaagaaat accggtgcaa tgtggaaaac cttccgcgat cgcgtgaagc caggctctcc 1200
 tacttgtaa tgtgcctgga gtcagctgta cacagagggc gacaagtcag cagtgagtgc 1260
 caggggggaga tgctggatta ccgacgcagc ttgatggaag acttttctct gagccctgag 1320
 25 atcatcctaa gctgtcgggg ggagattgaa caccattgtt ccgattaca tcgaaaaggg 1380
 cggaccctac actgtctgat gaaagtagtt cgaggggaga aggggaacct tggaatgaac 1440
 tgccagcagg cgcttcaaac actgattcag gagactgacc ctggtgcaga ttaccgcatt 1500
 gatcgagctt tgaatgaagc ttgtgaatct gtaatccaga cagcctgcaa acatataaga 1560
 tctggagacc caatgatctt gtcgtgcctg atggaacatt tatacacaga gaagatggta 1620
 30 gaagactgtg aacaccgtct cttagagctg cagtatttca tctcccggga ttggaagctg 1680
 gaccctgtcc tgtaccgcaa gtgccaggga gacgcttctc gtctttgcca caccacgggt 1740
 tggaatgaga ccagtgaatt tatgcctcag ggagctgtgt tctcttggtt atacagacac 1800

gcctaccgca ctgaggaaca gggaaggagg ctctcacggg agtgccgagc tgaagtccaa 1860
 aggatcctac accagcgtgc catggatgtc aagctggatc ctgccctcca ggataagtgc 1920
 ctgattgatac tgggaaaatg gtgcagtgcg aaaacagaga ctggacagga gctggagtgc 1980
 cttcaggacc atctggatga cttgggtggtg gagtgtagag atatagttgg caacctcact 2040
 5 gagttagaat cagaggatat tcaaatagaa gccttgetga tgagagcctg tgagcccata 2100
 attcagaact tctgccacga tgtggcagat aaccagatag actctgggga cctgatggag 2160
 tgtctgatac agaacaaaca ccagaaggac atgaacgaga agtgtgccat cggagttacc 2220
 cacttccagc tgggtgcagat gaaggatttt cggttttctt acaagttaa aatggcctgc 2280
 aaggaggacg tgttgaagct ttgcccaaac ataaaaaga aggtggacgt ggtgatctgc 2340
 10 ctgagcacga ccgtgcgcaa tgacactctg caggaagcca aggagcacag ggtgtccctg 2400
 aagtgccgca ggcagctccg tgtggaggag ctggagatga cggaggacat ccgcttgag 2460
 ccagatctat acgaagcctg caagagtgc atcaaaaact tctgttccgc tgtgcaatat 2520
 ggcaacgctc agattatcga atgtctgaaa gaaaacaaga agcagctaag caccgcctgc 2580
 caccaaaaag tatttaagct gcaggagaca gagatgatgg acccagagct agactacacc 2640
 15 ctcatgaggg tctgcaagca gatgataaag aggttctgtc cggaagcaga ttctaaaacc 2700
 atgttgacgt gcttgaagca aaataaaaac agtgaattga tggatcccaa atgcaaacag 2760
 atgataacca agcgcagat caccagaaac acagattacc gcttaaacc catgttaaga 2820
 aaagcctgta aagctgacat tctaaaatc tgtcacggta tctgactaa ggccaaggat 2880
 gattcagaat tagaaggaca agtcatctct tgcctgaagc tgagatatgc tgaccagcgc 2940
 20 ctgtcttcag actgtgaaga ccagatccga atcattatcc aggagtccgc cctggactac 3000
 cgctggatc ctacgtcca gctgactgc tcagacgaga tctccagtct atgtgctgaa 3060
 gaagcagcag cccaagagca gacaggtcag gtggaggagt gcctcaaggc caacctgctc 3120
 aagatcaaaa cagaattgtg taaaaggaa gtgctaaaca tgctgaagga aagcaaagca 3180
 gacatctttg ttgaccgggt acttcatact gcttgtgccc tggacattaa acaccactgc 3240
 25 gcagccatca ccctggccg cgggcgtcaa atgtcctgtc tcatggaagc actggaggat 3300
 aagcgggtga gggtacagcc cgagtgcaaa aagcgcctca atgaccggat tgagatgtgg 3360
 agttacgcag caaaggtggc ccagcagat ggcttctctg atcttgccat gcaagtaatg 3420
 acgtctccat ctaagaacta cattctctct gtgatcagtg ggagcatctg tatattgttc 3480
 ctgattggcc tgatgtgtgg acggatcacc aagcgagtga cacgagagct caaggacagg 3540
 30 tagagccacc ttgaccacca aaggaactac ctatccagtg ccagtttgt acagccctct 3600
 tgtatagcat cccactcac ctgcctcttc tcagaagtga caccaacccc gtgttagagc 3660
 attagcagat gtccactgcg ttgtccatc cagcctccac tcgtgtccat ggtgtcctcc 3720

tcctcctcac cgtgcagcag cagcagctgg tcgctggggg tactgccttt gtttggcaaa 3780
 cttgggttta cctgcctgta gacaagtctc tctcatacca acagaacttc cggtaacttc 3840
 agaaccaact cacctgacct gcaactcaaa ggctttttta agaaaaccac caaaaaaaaaa 3900
 a 3901

5

<210> 18

<211> 1179

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 18

10

Met Ala Ala Cys Gly Arg Val Arg Arg Met Phe Arg Leu Ser Ala Ala

1 5 10 15

Leu His Leu Leu Leu Leu Phe Ala Ala Gly Ala Glu Lys Leu Pro Gly

20 25 30

His Gly Val His Ser Gln Gly Gln Gly Pro Gly Ala Asn Phe Val Ser

15

35 40 45

Phe Val Gly Gln Ala Gly Gly Gly Gly Pro Ala Gly Gln Gln Leu Pro

50 55 60

Gln Leu Leu Gln Ser Ser Gln Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln

65 70 75 80

20

Gln Gln Gln Gln Leu Gln Pro Pro Gln Pro Pro Phe Pro Ala Gly Gly

85 90 95

Pro Pro Ala Arg Arg Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Trp Lys Leu

100 105 110

Ala Glu Glu Glu Ser Cys Arg Glu Asp Val Thr Arg Val Cys Pro Lys

25

115 120 125

His Thr Trp Ser Asn Asn Leu Ala Val Leu Glu Cys Leu Gln Asp Val

130 135 140

Arg Glu Pro Glu Asn Glu Ile Ser Ser Asp Cys Asn His Leu Leu Trp

145 150 155 160

30

Asn Tyr Lys Leu Asn Leu Thr Thr Asp Pro Lys Phe Glu Ser Val Ala

165 170 175

Arg Glu Val Cys Lys Ser Thr Ile Thr Glu Ile Lys Glu Cys Ala Asp

	180	185	190
	Glu Pro Val Gly Lys Gly Tyr Met Val Ser Cys Leu Val Asp His Arg		
	195	200	205
	Gly Asn Ile Thr Glu Tyr Gln Cys His Gln Tyr Ile Thr Lys Met Thr		
5	210	215	220
	Ala Ile Ile Phe Ser Asp Tyr Arg Leu Ile Cys Gly Phe Met Asp Asp		
	225	230	235
	Cys Lys Asn Asp Ile Asn Ile Leu Lys Cys Gly Ser Ile Arg Leu Gly		
	245	250	255
10	Glu Lys Asp Ala His Ser Gln Gly Glu Val Val Ser Cys Leu Glu Lys		
	260	265	270
	Gly Leu Val Lys Glu Ala Glu Glu Arg Glu Pro Lys Ile Gln Val Ser		
	275	280	285
	Glu Leu Cys Lys Lys Ala Ile Leu Arg Val Ala Glu Leu Ser Ser Asp		
15	290	295	300
	Asp Phe His Leu Asp Arg His Leu Tyr Phe Ala Cys Arg Asp Asp Arg		
	305	310	315
	Glu Arg Phe Cys Glu Asn Thr Gln Ala Gly Glu Gly Arg Val Tyr Lys		
	325	330	335
20	Cys Leu Phe Asn His Lys Phe Glu Glu Ser Met Ser Glu Lys Cys Arg		
	340	345	350
	Glu Ala Leu Thr Thr Arg Gln Lys Leu Ile Ala Gln Asp Tyr Lys Val		
	355	360	365
	Ser Tyr Ser Leu Ala Lys Ser Cys Lys Ser Asp Leu Lys Lys Tyr Arg		
25	370	375	380
	Cys Asn Val Glu Asn Leu Pro Arg Ser Arg Glu Ala Arg Leu Ser Tyr		
	385	390	395
	Leu Leu Met Cys Leu Glu Ser Ala Val His Arg Gly Arg Gln Val Ser		
	405	410	415
30	Ser Glu Cys Gln Gly Glu Met Leu Asp Tyr Arg Arg Met Leu Met Glu		
	420	425	430
	Asp Phe Ser Leu Ser Pro Glu Ile Ile Leu Ser Cys Arg Gly Glu Ile		

	435		440		445
	Glu His His Cys Ser Gly Leu His Arg Lys Gly Arg Thr Leu His Cys				
	450		455		460
	Leu Met Lys Val Val Arg Gly Glu Lys Gly Asn Leu Gly Met Asn Cys				
5	465		470		475 480
	Gln Gln Ala Leu Gln Thr Leu Ile Gln Glu Thr Asp Pro Gly Ala Asp				
		485		490	495
	Tyr Arg Ile Asp Arg Ala Leu Asn Glu Ala Cys Glu Ser Val Ile Gln				
	500		505		510
10	Thr Ala Cys Lys His Ile Arg Ser Gly Asp Pro Met Ile Leu Ser Cys				
	515		520		525
	Leu Met Glu His Leu Tyr Thr Glu Lys Met Val Glu Asp Cys Glu His				
	530		535		540
	Arg Leu Leu Glu Leu Gln Tyr Phe Ile Ser Arg Asp Trp Lys Leu Asp				
15	545		550		555 560
	Pro Val Leu Tyr Arg Lys Cys Gln Gly Asp Ala Ser Arg Leu Cys His				
		565		570	575
	Thr His Gly Trp Asn Glu Thr Ser Glu Phe Met Pro Gln Gly Ala Val				
	580		585		590
20	Phe Ser Cys Leu Tyr Arg His Ala Tyr Arg Thr Glu Glu Gln Gly Arg				
	595		600		605
	Arg Leu Ser Arg Glu Cys Arg Ala Glu Val Gln Arg Ile Leu His Gln				
	610		615		620
	Arg Ala Met Asp Val Lys Leu Asp Pro Ala Leu Gln Asp Lys Cys Leu				
25	625		630		635 640
	Ile Asp Leu Gly Lys Trp Cys Ser Glu Lys Thr Glu Thr Gly Gln Glu				
		645		650	655
	Leu Glu Cys Leu Gln Asp His Leu Asp Asp Leu Val Val Glu Cys Arg				
	660		665		670
30	Asp Ile Val Gly Asn Leu Thr Glu Leu Glu Ser Glu Asp Ile Gln Ile				
	675		680		685
	Glu Ala Leu Leu Met Arg Ala Cys Glu Pro Ile Ile Gln Asn Phe Cys				

	690	695	700
	His Asp Val Ala Asp Asn Gln Ile Asp Ser Gly Asp Leu Met Glu Cys		
	705	710	715 720
	Leu Ile Gln Asn Lys His Gln Lys Asp Met Asn Glu Lys Cys Ala Ile		
5	725	730	735
	Gly Val Thr His Phe Gln Leu Val Gln Met Lys Asp Phe Arg Phe Ser		
	740	745	750
	Tyr Lys Phe Lys Met Ala Cys Lys Glu Asp Val Leu Lys Leu Cys Pro		
	755	760	765
10	Asn Ile Lys Lys Lys Val Asp Val Val Ile Cys Leu Ser Thr Thr Val		
	770	775	780
	Arg Asn Asp Thr Leu Gln Glu Ala Lys Glu His Arg Val Ser Leu Lys		
	785	790	795 800
	Cys Arg Arg Gln Leu Arg Val Glu Glu Leu Glu Met Thr Glu Asp Ile		
15	805	810	815
	Arg Leu Glu Pro Asp Leu Tyr Glu Ala Cys Lys Ser Asp Ile Lys Asn		
	820	825	830
	Phe Cys Ser Ala Val Gln Tyr Gly Asn Ala Gln Ile Ile Glu Cys Leu		
	835	840	845
20	Lys Glu Asn Lys Lys Gln Leu Ser Thr Arg Cys His Gln Lys Val Phe		
	850	855	860
	Lys Leu Gln Glu Thr Glu Met Met Asp Pro Glu Leu Asp Tyr Thr Leu		
	865	870	875 880
	Met Arg Val Cys Lys Gln Met Ile Lys Arg Phe Cys Pro Glu Ala Asp		
25	885	890	895
	Ser Lys Thr Met Leu Gln Cys Leu Lys Gln Asn Lys Asn Ser Glu Leu		
	900	905	910
	Met Asp Pro Lys Cys Lys Gln Met Ile Thr Lys Arg Gln Ile Thr Gln		
	915	920	925
30	Asn Thr Asp Tyr Arg Leu Asn Pro Met Leu Arg Lys Ala Cys Lys Ala		
	930	935	940
	Asp Ile Pro Lys Phe Cys His Gly Ile Leu Thr Lys Ala Lys Asp Asp		

945 950 955 960
 Ser Glu Leu Glu Gly Gln Val Ile Ser Cys Leu Lys Leu Arg Tyr Ala
 965 970 975
 Asp Gln Arg Leu Ser Ser Asp Cys Glu Asp Gln Ile Arg Ile Ile Ile
 5 980 985 990
 Gln Glu Ser Ala Leu Asp Tyr Arg Leu Asp Pro Gln Leu Gln Leu His
 995 1000 1005
 Cys Ser Asp Glu Ile Ser Ser Leu Cys Ala Glu Glu Ala Ala Ala Gln
 1010 1015 1020
 10 Glu Gln Thr Gly Gln Val Glu Glu Cys Leu Lys Val Asn Leu Leu Lys
 1025 1030 1035 1040
 Ile Lys Thr Glu Leu Cys Lys Lys Glu Val Leu Asn Met Leu Lys Glu
 1045 1050 1055
 Ser Lys Ala Asp Ile Phe Val Asp Pro Val Leu His Thr Ala Cys Ala
 15 1060 1065 1070
 Leu Asp Ile Lys His His Cys Ala Ala Ile Thr Pro Gly Arg Gly Arg
 1075 1080 1085
 Gln Met Ser Cys Leu Met Glu Ala Leu Glu Asp Lys Arg Val Arg Leu
 1090 1095 1100
 20 Gln Pro Glu Cys Lys Lys Arg Leu Asn Asp Arg Ile Glu Met Trp Ser
 1105 1110 1115 1120
 Tyr Ala Ala Lys Val Ala Pro Ala Asp Gly Phe Ser Asp Leu Ala Met
 1125 1130 1135
 Gln Val Met Thr Ser Pro Ser Lys Asn Tyr Ile Leu Ser Val Ile Ser
 25 1140 1145 1150
 Gly Ser Ile Cys Ile Leu Phe Leu Ile Gly Leu Met Cys Gly Arg Ile
 1155 1160 1165
 Thr Lys Arg Val Thr Arg Glu Leu Lys Asp Arg
 1170 1175
 30 <210> 19
 <211> 3779
 <212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 19

```

gcgctcgagct cgccgcggac tcaagatggc ggcgtgtgga cgtgtacgga ggatgttccg 60
cttgtcggcg gcgctgcac tgctgctgct attcgcgcc ggggccgaga aactccccgg 120
5 ccagggcgctc cacagccagg gccaggggtcc cggggccaac tttgtgtcct tcgtagggca 180
ggccggaggc ggccggcccg cgggtcagca gctgccccag ctgcctcagt catcgagct 240
tcagcagcaa cagcagcagc agcaacagca acagcagcct cagccgccgc agccgccttt 300
cccgccgggt gggcctccgg ccggcgggg aggagcggg gctgggtggg gctggaagct 360
ggcgaggaa gagtctgca gggaggacgt gaccgcgtg tgccctaagc acacctggag 420
10 caacaacctg gcggtgctcg agtgctgca ggatgtgagg gagcctgaaa atgaaatttc 480
ttcagactgc aatcatttgt tgtggaatta taagctgaac ctaactacag atcccaaatt 540
tgaatctgtg gccagagagg tttgcaaac tactataaca gagattaaag aatgtgctga 600
tgaaccggtt ggaaaagggt acatgggttc ctgcttggtg gatcaccgag gcaacatcac 660
tgagtatcag tgtcaccagt acattaccaa gatgacggcc atcattttta gtgattaccg 720
15 tttaatctgt ggcttcatgg atgactgcaa aaatgacatc aacattctga aatgtggcag 780
tattcggtt ggagaaaagg atgcacattc acaaggtgag gtggtatcat gcttgagaa 840
aggcctggtg aaagaagcag aagaaagaga acccaagatt caagtttctg aactctgcaa 900
gaaagccatt ctccgggtg ctgagctgtc atcggtgac tttcacttag accggcattt 960
atattttgct tgccgagatg atcgggagcg tttttgtgaa aatacacaag ctggtgaggg 1020
20 cagagtgtat aagtgcctct ttaaccataa atttgaagaa tccatgagtg aaaagtgtcg 1080
agaagcactt acaaccgcc aaaagctgat tgccaggat tataaagtca gttattcatt 1140
ggccaaatcc tgtaaaagtg acttgaagaa ataccggtgc aatgtggaaa accttccgcg 1200
atcgctgaa gccaggctct cctacttggt aatgtgcctg gagtcaagt tacacagagg 1260
gcgacaagtc agcagtgagt gccaggggga gatgctggat taccgacgca tgttgatgga 1320
25 agacttttct ctgagccctg agatcctct aagctgtcgg ggggagattg aacaccattg 1380
ttccggatta catcgaagag ggcggacct aactgtctg atgaaagtag ttcgagggga 1440
gaaggggaac cttggaatga actgccagca ggcgcttcaa aactgattc aggagactga 1500
ccctggtgca gattaccgca ttgatcgagc tttgaatgaa gcttgtgaat ctgtaatcca 1560
gacgcctgc aaacatataa gatctggaga ccaatgac ttgtcgtgcc tgatggaaca 1620
30 tttatacaca gagaagatgg tagaagactg tgaacaccgt ctcttagagc tgcagtattt 1680
catctccccg gattggaagc tggacctgt cctgtaccgc aagtgccagg gagacgttc 1740
tcgtctttgc cacaccacg gttggaatga gaccagtga tttatgcctc agggagctgt 1800

```

gttctcttgt ttatacagac acgcctaccg cactgaggaa cagggaagga ggctctcacg 1860
 ggagtgccga gctgaagtcc aaaggatcct acaccagcgt gccatggatg tcaagctgga 1920
 tcctgccctc caggataagt gcctgattga tctgggaaaa tggtgcaagt agaaaacaga 1980
 gactggacag gagctggagt gccttcagga ccatctggat gacttggtgg tggagtgtag 2040
 5 agatatagtt ggcaacctca ctgagttaga atcagaggat attcaaatag aagccttgct 2100
 gatgagagcc tgtgagccca taattcagaa cttctgccac gatgtggcag ataaccagat 2160
 agactctggg gacctgatgg agtgtctgat acagaacaaa caccagaagg acatgaacga 2220
 gaagtgtgcc atcggagtta ccacttcca gctggtgcag atgaaggatt ttcggttttc 2280
 ttacaagttt aaaatggcct gcaaggagga cgtgttgaag ctttgcccaa acataaaaaa 2340
 10 gaagggtggac gtggtgatct gcctgagcac gaccgtgcgc aatgacactc tgcaggaagc 2400
 caaggagcac aggggtgtcc tgaagtgccg caggcagctc cgtgtggagg agctggagat 2460
 gacggaggac atccgcttgg agccagatct atacgaagcc tgcaagagtg acatcaaaaa 2520
 cttctgttcc gctgtgcaat atggcaacgc tcagattatc gaatgtctga aagaaaacaa 2580
 gaagcagcta agcaccgct gccacaaaaa agtatttaag ctgcaggaga cagagatgat 2640
 15 ggaccagag ctagactaca ccctcatgag ggtctgcaag cagatgataa agaggttctg 2700
 tccggaagca gattctaaaa ccatgttgca gtgcttgaag caaaataaaa acagtgaatt 2760
 gatggatccc aaatgcaaac agatgataac caagcgccag atcaccaga acacagatta 2820
 ccgcttaaac cccatgttaa gaaaagcctg taaagctgac attcctaaat tctgtcacgg 2880
 tatcctgact aaggccaagg atgattcaga attagaagga caagtcattc cttgcctgaa 2940
 20 gctgagatat gctgaccagc gcctgtcttc agactgtgaa gaccagatcc gaatcattat 3000
 ccaggagtcc gccctggact accgcctgga tcctcagctc cagctgcact gctcagacga 3060
 gatctccagt ctatgtgctg aagaagcagc agcccaagag cagacaggtc aggtggagga 3120
 gtgcctcaag gtcaacctgc tcaagatcaa aacagaattg tgtaaaaagg aagtgtctaa 3180
 catgctgaag gaaagcaaag cagacatctt tggtgacctg gtacttcata ctgcttgtgc 3240
 25 cctggacatt aaacaccact gcgcagccat caccctggc cgcgggcgtc aaatgtcctg 3300
 tctcatggaa gcactggagg ataagcgggt gaggttacag cccgagtga aaaagcgcct 3360
 caatgaccgg attgagatgt ggagttacgc agcaaagggt gcccagcag atggcttctc 3420
 tgatcttgcc atgcaagtaa tgacgtctcc atctaagaac tacattctct ctgtgatcag 3480
 tgggagcatc tgtatattgt tcctgattgg cctgatgtgt ggacggatca ccaagcgagt 3540
 30 gacacgagag ctcaaggaca ggctacaata caggtcagag acaatggctt ataaaggttt 3600
 agtgtgggtc caggatgtga caggcagtc agcctgacct ttctgcacac tccagacaaa 3660
 cttcccagac aagctccttt gtgcctctac gtggagaggg tgtggaaagt tatcacatta 3720

aaagatggag gatttaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaagaaaaaa aaaaaaaaaa 3779

<210> 20

<211> 1203

<212> PRT

5 <213> Homo Sapiens

<400> 20

Met Ala Ala Cys Gly Arg Val Arg Arg Met Phe Arg Leu Ser Ala Ala

1 5 10 15

Leu His Leu Leu Leu Leu Phe Ala Ala Gly Ala Glu Lys Leu Pro Gly

10 20 25 30

Gln Gly Val His Ser Gln Gly Gln Gly Pro Gly Ala Asn Phe Val Ser

35 40 45

Phe Val Gly Gln Ala Gly Gly Gly Gly Pro Ala Gly Gln Gln Leu Pro

50 55 60

15 Gln Leu Pro Gln Ser Ser Gln Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln

65 70 75 80

Gln Gln Gln Gln Pro Gln Pro Pro Gln Pro Pro Phe Pro Ala Gly Gly

85 90 95

Pro Pro Ala Arg Arg Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Trp Lys Leu

20 100 105 110

Ala Glu Glu Glu Ser Cys Arg Glu Asp Val Thr Arg Val Cys Pro Lys

115 120 125

His Thr Trp Ser Asn Asn Leu Ala Val Leu Glu Cys Leu Gln Asp Val

130 135 140

25 Arg Glu Pro Glu Asn Glu Ile Ser Ser Asp Cys Asn His Leu Leu Trp

145 150 155 160

Asn Tyr Lys Leu Asn Leu Thr Thr Asp Pro Lys Phe Glu Ser Val Ala

165 170 175

Arg Glu Val Cys Lys Ser Thr Ile Thr Glu Ile Lys Glu Cys Ala Asp

30 180 185 190

Glu Pro Val Gly Lys Gly Tyr Met Val Ser Cys Leu Val Asp His Arg

195 200 205

Gly Asn Ile Thr Glu Tyr Gln Cys His Gln Tyr Ile Thr Lys Met Thr
 210 215 220
 Ala Ile Ile Phe Ser Asp Tyr Arg Leu Ile Cys Gly Phe Met Asp Asp
 225 230 235 240
 5 Cys Lys Asn Asp Ile Asn Ile Leu Lys Cys Gly Ser Ile Arg Leu Gly
 245 250 255
 Glu Lys Asp Ala His Ser Gln Gly Glu Val Val Ser Cys Leu Glu Lys
 260 265 270
 Gly Leu Val Lys Glu Ala Glu Glu Arg Glu Pro Lys Ile Gln Val Ser
 10 275 280 285
 Glu Leu Cys Lys Lys Ala Ile Leu Arg Val Ala Glu Leu Ser Ser Asp
 290 295 300
 Asp Phe His Leu Asp Arg His Leu Tyr Phe Ala Cys Arg Asp Asp Arg
 305 310 315 320
 15 Glu Arg Phe Cys Glu Asn Thr Gln Ala Gly Glu Gly Arg Val Tyr Lys
 325 330 335
 Cys Leu Phe Asn His Lys Phe Glu Glu Ser Met Ser Glu Lys Cys Arg
 340 345 350
 Glu Ala Leu Thr Thr Arg Gln Lys Leu Ile Ala Gln Asp Tyr Lys Val
 20 355 360 365
 Ser Tyr Ser Leu Ala Lys Ser Cys Lys Ser Asp Leu Lys Lys Tyr Arg
 370 375 380
 Cys Asn Val Glu Asn Leu Pro Arg Ser Arg Glu Ala Arg Leu Ser Tyr
 385 390 395 400
 25 Leu Leu Met Cys Leu Glu Ser Ala Val His Arg Gly Arg Gln Val Ser
 405 410 415
 Ser Glu Cys Gln Gly Glu Met Leu Asp Tyr Arg Arg Met Leu Met Glu
 420 425 430
 Asp Phe Ser Leu Ser Pro Glu Ile Ile Leu Ser Cys Arg Gly Glu Ile
 30 435 440 445
 Glu His His Cys Ser Gly Leu His Arg Lys Gly Arg Thr Leu His Cys
 450 455 460

Leu Met Lys Val Val Arg Gly Glu Lys Gly Asn Leu Gly Met Asn Cys
 465 470 475 480
 Gln Gln Ala Leu Gln Thr Leu Ile Gln Glu Thr Asp Pro Gly Ala Asp
 485 490 495
 5 Tyr Arg Ile Asp Arg Ala Leu Asn Glu Ala Cys Glu Ser Val Ile Gln
 500 505 510
 Thr Ala Cys Lys His Ile Arg Ser Gly Asp Pro Met Ile Leu Ser Cys
 515 520 525
 Leu Met Glu His Leu Tyr Thr Glu Lys Met Val Glu Asp Cys Glu His
 10 530 535 540
 Arg Leu Leu Glu Leu Gln Tyr Phe Ile Ser Arg Asp Trp Lys Leu Asp
 545 550 555 560
 Pro Val Leu Tyr Arg Lys Cys Gln Gly Asp Ala Ser Arg Leu Cys His
 565 570 575
 15 Thr His Gly Trp Asn Glu Thr Ser Glu Phe Met Pro Gln Gly Ala Val
 580 585 590
 Phe Ser Cys Leu Tyr Arg His Ala Tyr Arg Thr Glu Glu Gln Gly Arg
 595 600 605
 Arg Leu Ser Arg Glu Cys Arg Ala Glu Val Gln Arg Ile Leu His Gln
 20 610 615 620
 Arg Ala Met Asp Val Lys Leu Asp Pro Ala Leu Gln Asp Lys Cys Leu
 625 630 635 640
 Ile Asp Leu Gly Lys Trp Cys Ser Glu Lys Thr Glu Thr Gly Gln Glu
 645 650 655
 25 Leu Glu Cys Leu Gln Asp His Leu Asp Asp Leu Val Val Glu Cys Arg
 660 665 670
 Asp Ile Val Gly Asn Leu Thr Glu Leu Glu Ser Glu Asp Ile Gln Ile
 675 680 685
 Glu Ala Leu Leu Met Arg Ala Cys Glu Pro Ile Ile Gln Asn Phe Cys
 30 690 695 700
 His Asp Val Ala Asp Asn Gln Ile Asp Ser Gly Asp Leu Met Glu Cys
 705 710 715 720

Leu Ile Gln Asn Lys His Gln Lys Asp Met Asn Glu Lys Cys Ala Ile
 725 730 735
 Gly Val Thr His Phe Gln Leu Val Gln Met Lys Asp Phe Arg Phe Ser
 740 745 750
 5 Tyr Lys Phe Lys Met Ala Cys Lys Glu Asp Val Leu Lys Leu Cys Pro
 755 760 765
 Asn Ile Lys Lys Lys Val Asp Val Val Ile Cys Leu Ser Thr Thr Val
 770 775 780
 Arg Asn Asp Thr Leu Gln Glu Ala Lys Glu His Arg Val Ser Leu Lys
 10 785 790 795 800
 Cys Arg Arg Gln Leu Arg Val Glu Glu Leu Glu Met Thr Glu Asp Ile
 805 810 815
 Arg Leu Glu Pro Asp Leu Tyr Glu Ala Cys Lys Ser Asp Ile Lys Asn
 820 825 830
 15 Phe Cys Ser Ala Val Gln Tyr Gly Asn Ala Gln Ile Ile Glu Cys Leu
 835 840 845
 Lys Glu Asn Lys Lys Gln Leu Ser Thr Arg Cys His Gln Lys Val Phe
 850 855 860
 Lys Leu Gln Glu Thr Glu Met Met Asp Pro Glu Leu Asp Tyr Thr Leu
 20 865 870 875 880
 Met Arg Val Cys Lys Gln Met Ile Lys Arg Phe Cys Pro Glu Ala Asp
 885 890 895
 Ser Lys Thr Met Leu Gln Cys Leu Lys Gln Asn Lys Asn Ser Glu Leu
 900 905 910
 25 Met Asp Pro Lys Cys Lys Gln Met Ile Thr Lys Arg Gln Ile Thr Gln
 915 920 925
 Asn Thr Asp Tyr Arg Leu Asn Pro Met Leu Arg Lys Ala Cys Lys Ala
 930 935 940
 Asp Ile Pro Lys Phe Cys His Gly Ile Leu Thr Lys Ala Lys Asp Asp
 30 945 950 955 960
 Ser Glu Leu Glu Gly Gln Val Ile Ser Cys Leu Lys Leu Arg Tyr Ala
 965 970 975

Asp Gln Arg Leu Ser Ser Asp Cys Glu Asp Gln Ile Arg Ile Ile Ile
 980 985 990
 Gln Glu Ser Ala Leu Asp Tyr Arg Leu Asp Pro Gln Leu Gln Leu His
 995 1000 1005
 5 Cys Ser Asp Glu Ile Ser Ser Leu Cys Ala Glu Glu Ala Ala Ala Gln
 1010 1015 1020
 Glu Gln Thr Gly Gln Val Glu Glu Cys Leu Lys Val Asn Leu Leu Lys
 1025 1030 1035 1040
 Ile Lys Thr Glu Leu Cys Lys Lys Glu Val Leu Asn Met Leu Lys Glu
 10 1045 1050 1055
 Ser Lys Ala Asp Ile Phe Val Asp Pro Val Leu His Thr Ala Cys Ala
 1060 1065 1070
 Leu Asp Ile Lys His His Cys Ala Ala Ile Thr Pro Gly Arg Gly Arg
 1075 1080 1085
 15 Gln Met Ser Cys Leu Met Glu Ala Leu Glu Asp Lys Arg Val Arg Leu
 1090 1095 1100
 Gln Pro Glu Cys Lys Lys Arg Leu Asn Asp Arg Ile Glu Met Trp Ser
 1105 1110 1115 1120
 Tyr Ala Ala Lys Val Ala Pro Ala Asp Gly Phe Ser Asp Leu Ala Met
 20 1125 1130 1135
 Gln Val Met Thr Ser Pro Ser Lys Asn Tyr Ile Leu Ser Val Ile Ser
 1140 1145 1150
 Gly Ser Ile Cys Ile Leu Phe Leu Ile Gly Leu Met Cys Gly Arg Ile
 1155 1160 1165
 25 Thr Lys Arg Val Thr Arg Glu Leu Lys Asp Arg Leu Gln Tyr Arg Ser
 1170 1175 1180
 Glu Thr Met Ala Tyr Lys Gly Leu Val Trp Ser Gln Asp Val Thr Gly
 1185 1190 1195 1200
 Ser Pro Ala
 30
 <210> 21
 <211> 2288

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 21

```

caaaaaacttc tgttccgctg tgcaatatgg caacgctcag attatcgaat gtctgaaaga 60
5 aaacaagaag cagctaagca cccgctgcc aaaaaagta tttaagctgc aggagacaga 120
gatgatggac ccagagctag actacaccct catgaggggc tgtaagcaga tgataaagag 180
gttctgtccg gaagcagatt ctaaaacat gttgcagtgc ttgaagcaa ataaaaacag 240
tgaattgatg gatcccaaat gcaaacagat gataaccaag cgccagatca ccagaacac 300
agattaccgc ttaaacccca tgttaagaaa agcctgtaaa gctgacattc ctaaattctg 360
10 tcacggatc ctgactaagg ccaaggatga ttcagaatta gaaggacaag tcatctcttg 420
cctgaagctg agatatgctg accagcgcct gtcttcagac tgtgaagacc agatccgaat 480
cattatccag gagtccgccc tggactaccg cctggatcct cagctccagc tgcactgctc 540
agacgagatc tccagtctat gtgctgaaga agcagcagcc caagagcaga caggtcaggt 600
ggaggagtgc ctcaagggtca acctgctcaa gatcaaaaca gaattgtgta aaaaggaagt 660
15 gctaaacatg ctgaaggaaa gcaaagcaga catctttgtt gaccgggtac ttcatactgc 720
ttgtgccctg gacattaaac accactgctc agccatcacc cctggccgcg ggcgtcaaat 780
gtcctgtctc atggaagcac tggaggataa gcgggtgagg ttacagcccg agtgcaaaaa 840
gcgcctcaat gaccggattg agatgtggag ttacgcagca aagggtggcc cagcagatgg 900
cttctctgat cttgccatgc aagtaatgac gtctccatct aagaactaca ttctctctgt 960
20 gatcagtggg agcatctgta tattgttctt gattggcctg atgtgtggac ggatcaccaa 1020
gcgagtgaca cgagagctca aggacaggta gagccacctt gaccaccaa ggaactacct 1080
atccagtgcc cagtttgtac agccctcttg tatagcatcc cactcacct cgctcttctc 1140
agaagtgaca ccaaccccg gttagagcat tagcagatgt cactgcgtt gtcccatcca 1200
gcctccactc gtgtccatgg tgcctcctc ctctcaccg tgcagcagca gcagctgggc 1260
25 gctgggggta ctgcctttgt ttggcagact tgggttacct gcctgtagtc aagtctctct 1320
cataccaaca gaacttccg tacttccaga accaactcac ctgacctgca actcaaaggc 1380
ttttttaaga aaaccaccaa aaaaaaaaaat ttttttaaag aaaaaaatgt atatagtaac 1440
gcatctctc caggcttgat ttgggcaatg ggggttatgt tttcatatga ctgtgtaaaa 1500
caaagacagg acttgagggg gaagcacacc acccagtgtg ccatgactga ggtgtctcgt 1560
30 tcatctctca gaagcgcctt ggggcctcgc caggggcctg gtcttcaccg aggcgtgggt 1620
gggcagccgt tccccaggct gtgtgggggc ctgctttctt ctgctgagac agtgacgcct 1680
tccagtttcc accctaata gccactgctg gtcacagccc cacagccatg ggtatttctg 1740

```

```

      tgggtctcctc gcttcattga agcaaagcat gagccttcct agacaagggc agctggggag 1800
      ggggaagggac cggaagtttg tgaagttgaa cagtccatcc atctgcactg agaggctgga 1860
      tcctgagtcc cggggcagca ggatcccagg aaccttcctc ctccagggca gcacaggact 1920
      cagccgtgtc tggaccggcc ctgctgaggc tacagtcact ctggaagctc tgcgcttcat 1980
5    caggaggcag gactgtggcg ggaggggtcc ttgaagatgg gtgtggggag cagtgggtca 2040
      ggaagtggga gccagaggtt tgactcactt tgctttattt ttcaggctac aatacaggctc 2100
      agagacaatg gcttataaag gtttagtggt gtctcaggat gtgacaggca gtccagcctg 2160
      acctttctgc aactccaga caaacttccc agacaagctc ctttgtgcct ctacgtggag 2220
      aggggtgtgga aagttatcac attaaaagat ggaggattaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2280
10   aaaaaaaaaa                                     2288

      <210> 22
      <211> 309
      <212> PRT
      <213> Homo Sapiens
15   <400> 22

      Met Met Asp Pro Glu Leu Asp Tyr Thr Leu Met Arg Val Cys Lys Gln
           1             5             10             15
      Met Ile Lys Arg Phe Cys Pro Glu Ala Asp Ser Lys Thr Met Leu Gln
           20             25             30
20   Cys Leu Lys Gln Asn Lys Asn Ser Glu Leu Met Asp Pro Lys Cys Lys
           35             40             45
      Gln Met Ile Thr Lys Arg Gln Ile Thr Gln Asn Thr Asp Tyr Arg Leu
           50             55             60
      Asn Pro Met Leu Arg Lys Ala Cys Lys Ala Asp Ile Pro Lys Phe Cys
25   65             70             75             80
      His Gly Ile Leu Thr Lys Ala Lys Asp Asp Ser Glu Leu Glu Gly Gln
           85             90             95
      Val Ile Ser Cys Leu Lys Leu Arg Tyr Ala Asp Gln Arg Leu Ser Ser
           100            105            110
30   Asp Cys Glu Asp Gln Ile Arg Ile Ile Ile Gln Glu Ser Ala Leu Asp
           115            120            125
      Tyr Arg Leu Asp Pro Gln Leu Gln Leu His Cys Ser Asp Glu Ile Ser

```

130 135 140
 Ser Leu Cys Ala Glu Glu Ala Ala Ala Gln Glu Gln Thr Gly Gln Val
 145 150 155 160
 Glu Glu Cys Leu Lys Val Asn Leu Leu Lys Ile Lys Thr Glu Leu Cys
 5 165 170 175
 Lys Lys Glu Val Leu Asn Met Leu Lys Glu Ser Lys Ala Asp Ile Phe
 180 185 190
 Val Asp Pro Val Leu His Thr Ala Cys Ala Leu Asp Ile Lys His His
 195 200 205
 10 Cys Ala Ala Ile Thr Pro Gly Arg Gly Arg Gln Met Ser Cys Leu Met
 210 215 220
 Glu Ala Leu Glu Asp Lys Arg Val Arg Leu Gln Pro Glu Cys Lys Lys
 225 230 235 240
 Arg Leu Asn Asp Arg Ile Glu Met Trp Ser Tyr Ala Ala Lys Val Ala
 15 245 250 255
 Pro Ala Asp Gly Phe Ser Asp Leu Ala Met Gln Val Met Thr Ser Pro
 260 265 270
 Ser Lys Asn Tyr Ile Leu Ser Val Ile Ser Gly Ser Ile Cys Ile Leu
 275 280 285
 20 Phe Leu Ile Gly Leu Met Cys Gly Arg Ile Thr Lys Arg Val Thr Arg
 290 295 300
 Glu Leu Lys Asp Arg
 305
 <210> 23
 25 <211> 2486
 <212> DNA
 <213> Homo Sapiens
 <400> 23
 aatttagcca gctgtggtgg cacatacctg taatcccagc tacttgagag actgaggcag 60
 30 gagaatcact tgaaccggga gatggagttt gcagtgagcc gagatggtgc cactgtactc 120
 cagcctgggt gacagagcaa gactctgtct ccaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaga 180
 catttcaagc tggaagattt gggtccctaa ctttgagcct agctctttca ttaaagtaat 240

aataaaaagta gaactctaca tttatataat ggttttgact ttccaaagtg attttccacat 300
ctcagcagtc ctgtgaagga ctaaataagg tgtttcaggg tagacttggc attgtgtttt 360
gcaaagaagg tccaaggcca tgcagctatt tggtgacaga attgaaagta aagcctgatt 420
ctcttgctgc aaggcgactt tgctatctag aagccagggt cactagacaa gatgcagtca 480
5 acaataagt ctccagaaca tatgacatct ccagcctaaa ccaagctcac ctttccatgc 540
tggtccctc atgcagacgg aggacatccg cttggagcca gatctatacg aagcctgcaa 600
gagtgcacac aaaaacttct gttccgctgt gcaatatggc aacgctcaga ttatcgaatg 660
tctgaaagaa aacaagaagc agctaagcac ccgctgccac caaaaagtat ttaagctgca 720
ggagacagag atgatggacc cagagctaga ctacaccctc atgaggggtct gcaagcagat 780
10 gataaagagg ttctgtccgg aagcagattc taaaaccatg ttgcagtgtc tgaagcaaaa 840
taaaaacagt gaattgatgg atcccaaagc caaacagatg ataaccaagc gccagatcac 900
ccagaacaca ggtaagatct tggcttggct ctccctggccc cgtggagtat ctgaaaagga 960
attcagtggc tgtagagtga cctgctcaaa ctcccagggc tttgttgctt gggaaatttta 1020
agggaggagt ctgagtgtaa gcagggcctt cctccttga ggagcatcca gaaaaatgga 1080
15 gggagagtca ggggagagag gaggccacaa gaaccagaaa actgccctaa aagaacgttc 1140
agaaggaatc aggccggcag tccttggaag gaaaaatcta gaaattcaat aaaacttcat 1200
gagtgtgcca ggagaatgta cgggtaatct gattcggaac agaaacattt cacctctgag 1260
ttggaagacc tcgtaagtta atggtcacag tgagttggat attgtatttc tttttcagtg 1320
ttctcaaaag tgtctgttat ggggaagggt gctgatgtcc ccttgatttt tctgaggact 1380
20 ccttagagta ttggagtctg cacaaaaccc cgcagagtag aaagattcct gaggacctcc 1440
agaagtactc gttaacaagt catattgctg attaaaaaca gtgtagttag agctcagtaa 1500
atgtttattg aatagataaa tccatgggtg tagtcatgat cattgacata atatgctccc 1560
tttaggaagg tggatatcta aaaatgtgtg aatcaggtgg aatgttttgt cacatgctca 1620
ctgctttcta ctctagatta ccgcttaaac cccatgttaa gaaaagcctg taaagctgac 1680
25 attcctaaat tctgtcacgg tatcctgact aaggccaagg atgattcaga attagaagga 1740
caagtcattc cttgcctgaa gctgagatat gctgaccagc gcctgtcttc agactgtgaa 1800
gaccagatcc gaatcattat ccaggagtcc gccctggact accgcctgga tcctcagctc 1860
cagctgcact gctcagacga ggtgggattt gcgtgcaaaa ctggttacgc acagagctgc 1920
tcagagaagt ttccactgga gaaaagttgt ttactttctc tccttcagc cgtgaatgat 1980
30 ctggtgaatt gaaggccatc ttctaggctc tccatgggtc gcattcctgt tctttgtaac 2040
actgaattca acttggcatt agtctgaca ctctaaagcg ttgttcata tttctctgtt 2100
gaacaagggt gttctttcat tatagctctc tgtaaatttg ttcttccctt cttcttattc 2160

tggatggttaa acccaagacc tgccagaaag ataaaagtgc tttcagctgg gcacgggtggc 2220
 tcacgcctgt aatcccaaca ctttgggagg ccaaggaggg tggatcatct gaggtcagga 2280
 gttcaagacc agcctggcta acatggagaa atctgtctct actaaaaata caaaaaatta 2340
 gccaggcgtg gtggcgtgca ccagtaatct cagctactca ggaggctgag gcaggagaat 2400
 5 cacttgaacc cgggaggcgg tggttgcagt gagctgagat catgccactg caccocagcc 2460
 tgggcgacag aggaagactc tgtctc 2486
 <210> 24
 <211> 156
 <212> PRT
 10 <213> Homo Sapiens
 <400> 24
 Met Gln Thr Glu Asp Ile Arg Leu Glu Pro Asp Leu Tyr Glu Ala Cys
 1 5 10 15
 Lys Ser Asp Ile Lys Asn Phe Cys Ser Ala Val Gln Tyr Gly Asn Ala
 15 20 25 30
 Gln Ile Ile Glu Cys Leu Lys Glu Asn Lys Lys Gln Leu Ser Thr Arg
 35 40 45
 Cys His Gln Lys Val Phe Lys Leu Gln Glu Thr Glu Met Met Asp Pro
 50 55 60
 20 Glu Leu Asp Tyr Thr Leu Met Arg Val Cys Lys Gln Met Ile Lys Arg
 65 70 75 80
 Phe Cys Pro Glu Ala Asp Ser Lys Thr Met Leu Gln Cys Leu Lys Gln
 85 90 95
 Asn Lys Asn Ser Glu Leu Met Asp Pro Lys Cys Lys Gln Met Ile Thr
 25 100 105 110
 Lys Arg Gln Ile Thr Gln Asn Thr Gly Lys Ile Leu Ala Trp Leu Ser
 115 120 125
 Trp Pro Arg Gly Val Ser Glu Lys Glu Phe Ser Gly Cys Arg Val Thr
 130 135 140
 30 Cys Ser Asn Ser Gln Gly Phe Val Ala Trp Glu Phe
 145 150 155
 <210> 25

<211> 842

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 25

```

5  ctgagaggaa gttttatctg tgcagccctt ctctgaggat ggacacttct cacactacaa 60
   agtcctgttt gctgattctt cttgtggccc tactgtgtgc agaaagagct cagggactgg 120
   agtgttacca gtgctatgga gtcccatttg agacttcttg cccatcaatt acctgcccct 180
   accctgatgg agtctgtgtt actcaggagg cagcagttat tgtggattct caaacaagga 240
   aagtaaagaa caatctttgc ttacccatct gccctcctaa tattgaaagt atggagatcc 300
10 tgggtactaa ggtcaacgtg aagacttcct gttgccagga agacctctgc aatgtagcag 360
   ttcccaatgg aggcagcacc tggaccatgg caggggtgct tctgttcagc ctgagctcag 420
   tctcctgca gacctgctc tgatggtcct cccaatgacc tccacccttg tccttttata 480
   ctcatgtgca acaattcttc ctggagccct ctagtgatga attatgagtt atagaagctc 540
   caaggtggga gtagtgtgtg aaataccatg ttttgccctt atagcccctg ctgggtaggt 600
15 aggtgctcta atcctctcta gggctttcaa gtctgtactt cctagaatgt cattttgttg 660
   tggattgctg ctcatgacct tggaggcaca cagccagcac agtgaagagg cagaattcca 720
   aggtattatg ctatcaccat ccacacataa gtatctgggg tcctgcaatg ttcccacatg 780
   tatcctgaat gtccccctgt tgagtccaat aaaccctttg ttctcccaa aaaaaaaaaa 842
   aa

```

20 <210> 26

<211> 134

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 26

```

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

```

Gln Thr Arg Lys Val Lys Asn Asn Leu Cys Leu Pro Ile Cys Pro Pro
 65 70 75 80
 Asn Ile Glu Ser Met Glu Ile Leu Gly Thr Lys Val Asn Val Lys Thr
 85 90 95
 5 Ser Cys Cys Gln Glu Asp Leu Cys Asn Val Ala Val Pro Asn Gly Gly
 100 105 110
 Ser Thr Trp Thr Met Ala Gly Val Leu Leu Phe Ser Leu Ser Ser Val
 115 120 125
 Leu Leu Gln Thr Leu Leu
 10 130
 <210> 27
 <211> 862
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 15 <400> 27
 atctgacaga acttgccact gtgcctgcaa ccttgtctga gaggaaccct tctctgagga 60
 tggacacttc tcacactaca aagtccctgtg tgctcattct tcttgtggcc ctactgtgtg 120
 cagaaagagc tcagggactg cagtgtctacg agtgctatgg agtgccaatt gagacttcct 180
 gccagcagtg tacctgccgc gcctctgatg gattctgcat tgctcaaaac atagaattga 240
 20 ttgaggactc tcaaagaagg aaactaaaga cccgtcagtg cctttctttc tgccctgctg 300
 gtgtgccaat cagggatcct aacatcaggg agaggacttc ctgttgcagc gaagacctct 360
 gcaatgcagc agttcccact gcaggttagca cctggaccat ggcaggggtg cttctgtttca 420
 gcctgagctc agtcgtcctg cagaccttgc tctgatggtc cttccaatga cccccaccct 480
 tttcctttta tcttcatgtg caaccactct ttccctggagt cctctagtga caaattatat 540
 25 gttatagaag gtccaatgtg gggatagtgt gtggaacacc ctgtttcacc tttatagccc 600
 ctgctgggta agtgcccgcac tcctctctag ggctttcaaa tctgtacttc ttgcaatgcc 660
 atttagttgt ggatttctat tcttggccct ggaggcatgt ggccagcaca tgcaacaggc 720
 agtattccaa ggtattatag tatcaccatc cacacataag tatctgggggt cctgcagggt 780
 tcccatgtat gcctgtcaat gacccctggt gagtccaata aaagctttgt tctcccagcc 840
 30 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 862
 <210> 28
 <211> 131

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 28

Met Asp Thr Ser His Thr Thr Lys Ser Cys Val Leu Ile Leu Leu Val

5 1 5 10 15

Ala Leu Leu Cys Ala Glu Arg Ala Gln Gly Leu Gln Cys Tyr Glu Cys

20 25 30

Tyr Gly Val Pro Ile Glu Thr Ser Cys Pro Ala Val Thr Cys Arg Ala

35 40 45

10 Ser Asp Gly Phe Cys Ile Ala Gln Asn Ile Glu Leu Ile Glu Asp Ser

50 55 60

Gln Arg Arg Lys Leu Lys Thr Arg Gln Cys Leu Ser Phe Cys Pro Ala

65 70 75 80

Gly Val Pro Ile Arg Asp Pro Asn Ile Arg Glu Arg Thr Ser Cys Cys

15 85 90 95

Ser Glu Asp Leu Cys Asn Ala Ala Val Pro Thr Ala Gly Ser Thr Trp

100 105 110

Thr Met Ala Gly Val Leu Leu Phe Ser Leu Ser Ser Val Val Leu Gln

115 120 125

20 Thr Leu Leu

130

<210> 29

<211> 806

<212> DNA

25 <213> Mus musculus

<400> 29

gcccaccccc gccagccccg tgcctataag gccttggcaa tgcaggggcc cgcactgctc 60
ccagacgaca tcagagatga ggacagcatt gctgctcctt gcagccctgg ctgtggctac 120
agggccagcc cttaccctgc gctgccacgt gtgcaccagc tccagcaact gcaagcattc 180
30 tgtgggtctgc ccggccagct ctgcgttctg caagaccacg aacacagtgg agcctctgag 240
ggggaatctg gtgaagaagg actgtgcgga gtcgtgcaca cccagctaca ccctgcaagg 300
ccaggctcagc agcggcacca gctccaccca gtgctgccag gaggacctgt gcaatgagaa 360

gctgcacaac gctgcaccca cccgcaccgc cctcgccac agtgccctca gcctggggct 420
 ggccctgagc ctctggccg tcatcttagc cccagcctg tgacctccc cccagggag 480
 gcccctcatg cctttccttc cctttctctg gggattccac acctctcttc cccagccgca 540
 acgggggtgc caggagcccc aggctgaggg cttccccgaa agtctgggac cagggtccagg 600
 5 tgggcatgga atgctgatga cttggagcag gccccacaga cccacagag gatgaagcca 660
 cccacagag gatgcagccc ccagctgcat ggaagggtgga ggacagaagc cctgtggatc 720
 cccggatttc acactccttc tgttttgttg ccgtttattt ttgtactcaa atctctacat 780
 ggagataaat gatttaaacc agaaaa 806
 <210> 30
 10 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 30
 Met Arg Thr Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Leu Ala Val Ala Thr Gly
 15 1 5 10 15
 Pro Ala Leu Thr Leu Arg Cys His Val Cys Thr Ser Ser Ser Asn Cys
 20 25 30
 Lys His Ser Val Val Cys Pro Ala Ser Ser Arg Phe Cys Lys Thr Thr
 35 40 45
 20 Asn Thr Val Glu Pro Leu Arg Gly Asn Leu Val Lys Lys Asp Cys Ala
 50 55 60
 Glu Ser Cys Thr Pro Ser Tyr Thr Leu Gln Gly Gln Val Ser Ser Gly
 65 70 75 80
 Thr Ser Ser Thr Gln Cys Cys Gln Glu Asp Leu Cys Asn Glu Lys Leu
 25 85 90 95
 His Asn Ala Ala Pro Thr Arg Thr Ala Leu Ala His Ser Ala Leu Ser
 100 105 110
 Leu Gly Leu Ala Leu Ser Leu Leu Ala Val Ile Leu Ala Pro Ser Leu
 115 120 125
 30 <210> 31
 <211> 1145
 <212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 31

gctccggcca gccgcggtcc agagcgcgcg aggttcgggg agctccgcca ggctgctggt 60
 acctgcgtcc gcccggcgag caggacaggc tgctttggtt tgtgacctcc aggcaggacg 120
 5 gccatcctct ccagaatgaa gatcttcttg ccagtgtgc tggctgccct tctgggtgtg 180
 gagcgagcca gtcgctgat gtgcttctcc tgcttgaacc agaagagcaa tctgtactgc 240
 ctgaagccga ccactgtctc cgaccaggac aactactgcg tgactgtgtc tgctagtgcc 300
 ggcattggga atctcgtgac atttggccac agcctgagca agacctgttc cccggcctgc 360
 cccatcccag aaggcgtcaa tgttggtgtg gcttccatgg gcatcagctg ctgccagagc 420
 10 tttctgtgca atttcagtgc ggccgatggc gggctgcggg caagcgtcac cctgctgggt 480
 gccgggctgc tgctgagcct gctgccggcc ctgctgcggt ttggcccctg accgcccaga 540
 ccctgtcccc cgatccccca gctcaggaag gaaagcccag ccctttcttg atcccacagt 600
 gtatgggagc ccctgactcc tcacgtgcct gatctgtgcc cttggtccca ggtcaggccc 660
 accccctgca cctccacctg cccagcccc tgccctgcc caagtgggccc agctgccctc 720
 15 acttctgggg tggatgatgt gaccttcctt gggggactgc ggaagggacg agggttccct 780
 ggagtcttac ggtccaacat cagaccaagt cccatggaca tgctgacagg gtccccaggg 840
 agaccgtgtc agtagggatg tgtgcctggc tgtgtacgtg ggtgtgcagt gcacgtgaga 900
 gcacgtggcg gcttctgggg gccatgtttg gggagggagg tgtgccagca gcctggagag 960
 cctcagtcct tgtagcccc tgccctggca cagctgcatg cacttcaagg gcagcctttg 1020
 20 ggggttgggg tttctgccac ttccgggtct aggcctgcc caaatccagc cagtcctgcc 1080
 ccagcccacc cccacattgg agccctcctg ctgctttggt gcctcaaata aatacagatg 1140
 tccc 1145

<210> 32

<211> 131

25 <212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 32

Met Lys Ile Phe Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gly Val Glu
 1 5 10 15
 30 Arg Ala Ser Ser Leu Met Cys Phe Ser Cys Leu Asn Gln Lys Ser Asn
 20 25 30
 Leu Tyr Cys Leu Lys Pro Thr Ile Cys Ser Asp Gln Asp Asn Tyr Cys

35 40 45
 Val Thr Val Ser Ala Ser Ala Gly Ile Gly Asn Leu Val Thr Phe Gly
 50 55 60
 His Ser Leu Ser Lys Thr Cys Ser Pro Ala Cys Pro Ile Pro Glu Gly
 5 65 70 75 80
 Val Asn Val Gly Val Ala Ser Met Gly Ile Ser Cys Cys Gln Ser Phe
 85 90 95
 Leu Cys Asn Phe Ser Ala Ala Asp Gly Gly Leu Arg Ala Ser Val Thr
 100 105 110
 10 Leu Leu Gly Ala Gly Leu Leu Leu Ser Leu Leu Pro Ala Leu Leu Arg
 115 120 125
 Phe Gly Pro
 130
 <210> 33
 15 <211> 877
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 33
 actgtgcctg caacctgggc agagaggaag taaggactgg tgtcaggagg gagctgctag 60
 20 gtttgatctg tgcagccctt ctccaaggat ggacagttgt cacactacaa agtcctgtgt 120
 actcatcctt cttgtggtcc tattgtgtgc agaaagagct caggggctgg agtgctataa 180
 ctgcctggga gtttcacttg gaattgcctg caaatcaatt acctgcccct accctgatgc 240
 agtctgcatt tctcagcagg tagaacttat tgtggactct caaagaagga aagtaaagaa 300
 caaactctgc tttcctttct gccctgctaa tcttgaaaat atggagatcc tgggtactac 360
 25 tgtcaacgtg aatacttcct gttgcaagga agacctctgc aatgcacccat tttccactgg 420
 aggcagcacc tggaccatga caagggtgct tctgttaaata ctgggctcgg tcttcctgca 480
 gaccttgctg taaaagggtc ttccaaggac ctccaccctt gttgttttat cctcatttgc 540
 aactattcct tcctggagcc ctctagtgat gaattatgag atattgaagc tccaagggtg 600
 gagtagtggt tgtggaatac gttgtttcaa ctttatagcc cctgcttggt aaatgcccc 660
 30 ctctctctca ggaatttcaa atatgtactt cctagaatgc cattttgttg tggcttgcta 720
 atcttgggcc tggaggcccg tggctagcag agggtagagg cagaattcca aggtattaag 780
 ccatcaccat ccacacataa gtgtctgagg ttctgcagga ttctcatgta tgcggcttta 840

tgtcccccttg ttgagtccaa taaacccttt gttctcc 877
 <210> 34
 <211> 134
 <212> PRT
 5 <213> Mus musculus
 <400> 34
 Met Asp Ser Cys His Thr Thr Lys Ser Cys Val Leu Ile Leu Leu Val
 1 5 10 15
 Val Leu Leu Cys Ala Glu Arg Ala Gln Gly Leu Glu Cys Tyr Asn Cys
 10 20 25 30
 Leu Gly Val Ser Leu Gly Ile Ala Cys Lys Ser Ile Thr Cys Pro Tyr
 35 40 45
 Pro Asp Ala Val Cys Ile Ser Gln Gln Val Glu Leu Ile Val Asp Ser
 50 55 60
 15 Gln Arg Arg Lys Val Lys Asn Lys Leu Cys Phe Pro Phe Cys Pro Ala
 65 70 75 80
 Asn Leu Glu Asn Met Glu Ile Leu Gly Thr Thr Val Asn Val Asn Thr
 85 90 95
 Ser Cys Cys Lys Glu Asp Leu Cys Asn Ala Pro Phe Ser Thr Gly Gly
 20 100 105 110
 Ser Thr Trp Thr Met Thr Arg Val Leu Leu Leu Asn Leu Gly Ser Val
 115 120 125
 Phe Leu Gln Thr Leu Leu
 130
 25 <210> 35
 <211> 710
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 35
 30 ctgcagccag gtctgagagg aagtaaggac tgggtgtcagg agggagctgc taggtgacaa 60
 agggaagaac cctcaggata gggctgtggt gggagtgaga ttaggaaaga agagctgggt 120
 ggggtggtgga tgagagaagt aggcagacat gtattcctca gggaaagctg tgtagagggt 180

tggagggagg gaatattgga tggctgagcc gtgtgagagc ccaggggtgt gatcaggggt 240
 ctattaactg gctccaactt ccaaggtttt atctgtgcag cccttctcca aggatggaca 300
 cttctcacga gataaagtcc tgtgtgctga tccttcttgt gaccctactc tgtgcagaaa 360
 gagctcaggg actggagtgt taccagtgt atggagtccc atttgagact tcttgcccat 420
 5 catttacctg ccctaccct gatggattct gtgttgcctca ggaggaagaa tttattgcaa 480
 actctcaaag aaagagagta aagagccgtt cttgccatcc tttctgccct gatgaaattg 540
 aaaagaagtt tatcctggat cctaacacca agatgaatat ttctgttgc caggaagacc 600
 tctgcaatgc agcagttccc actggaggca gctcctggac cacggcaggg gtgcttctgt 660
 tcagcctggg ctgagtcctc ctgcagaccc tgatgtgatg gtccccaccc 710

10 <210> 36
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 36

15 Met Asp Thr Ser His Glu Ile Lys Ser Cys Val Leu Ile Leu Leu Val

1 5 10 15

Thr Leu Leu Cys Ala Glu Arg Ala Gln Gly Leu Glu Cys Tyr Gln Cys

20 25 30

Tyr Gly Val Pro Phe Glu Thr Ser Cys Pro Ser Phe Thr Cys Pro Tyr

20 35 40 45

Pro Asp Gly Phe Cys Val Ala Gln Glu Glu Glu Phe Ile Ala Asn Ser

50 55 60

Gln Arg Lys Arg Val Lys Ser Arg Ser Cys His Pro Phe Cys Pro Asp

65 70 75 80

25 Glu Ile Glu Lys Lys Phe Ile Leu Asp Pro Asn Thr Lys Met Asn Ile

85 90 95

Ser Cys Cys Gln Glu Asp Leu Cys Asn Ala Ala Val Pro Thr Gly Gly

100 105 110

Ser Ser Trp Thr Thr Ala Gly Val Leu Leu Phe Ser Leu Gly Ser Val

30 115 120 125

Leu Leu Gln Thr Leu Met

130

<210> 37

<211> 1735

<212> DNA

<213> Mus musculus

5

<400> 37

```

gttatcagag gtgagcccggt gctcttcagc ggagaagatc ccctacctgg ccgccggcca 60
ctttctgtgg gccgtgggggt cctcaaggag acggcccttg ggctcagggg ctgcgtttcc 120
acacgcgcct ttcccagggc tccgcgcgcc gttcctgcct ggccgccggc cgctccaaca 180
gcagcacaag gcgggactca gaaccggcgt tcagggccgc cagcggccgc gaggccctga 240
10 gatgaggctc caaagacccc gacaggcccc ggcggtggg aggcgcgcgc ccgggggcgg 300
gcggggctcc ccctaccggc cagaccggg gagaggcgcg cggaggctgc gaaggttcca 360
gaagggcggg gagggggcgc cgcgcgtga ccctccctgg gcaccgctgg ggacgatggc 420
gctgctcgcc ttgctgctgg tcgtggccct accgcgggtg tggacagacg ccaacctgac 480
tgcgagacaa cgagatccag aggactccca gcgaacggac gagggtgaca atagagtgtg 540
15 gtgtcatgtt tgtgagagag aaaacacttt cgagtgccag aaccaagga ggtgcaaattg 600
gacagagcca tactgcgtta tagcggccgt gaaaatattt ccacgttttt tcatgggtgc 660
gaagcagtgc tccgtggtt gtgcagcgtat ggagagacc aagccagagg agaagcggtt 720
tctcctggaa gagcccatgc ctttctttta cctcaagtgt tgtaaaattc gctactgcaa 780
tttagagggg ccacctatca actcatcagt gttcaaagaa tatgctggga gcatgggtga 840
20 gagctgtggt gggctgtggc tggccatcct cctgctgctg gcctccattg cagccggcct 900
cagcctgtct tgagccacgg gactgccaca gactgagcct tccggagcat ggactcgctc 960
cagaccgttg tcacctgttg cattaaactt gtttctgtt gattacctct tggtttgact 1020
tcccagggtc ttgggatggg agagtgggga tcagggtcag ttggctctta accctcaagg 1080
gttctttaac tcacattcag aggaagtcca gatctcctga gtagtgattt tggtgacaag 1140
25 ttttctctt tgaaatcaaa ccttgtaact catttattgc tgatggccac tcttttctt 1200
gactccccctc tgctctgag ggcttcagta ttgatgggga gggaggccta agtaccactc 1260
atggagagta tgtgctgaga tgcttccgac ctttcagggtg acgcaggaac actgggggag 1320
tctgaatgat tggggtgaag acatccctgg agtgaaggac tcctcagcat ggggggcagt 1380
ggggcacacg ttagggctgc cccattcca gtggtggagg cgctgtggat ggctgctttt 1440
30 cctcaacctt tcctaccaga ttccaggagg cagaagataa ctaattgtgt tgaagaaact 1500
tagacttcac ccaccagctg gcacagggtg acagattcat aaattcccac acgtgtgtgt 1560
tcaacatctg aaacttaggc caagtagaga gcatcagggt aaatggcggt catttctctg 1620

```

ttaagatgca gccatccatg gggagctgag aaatcagact caaagttcca ccaaaaacaa 1680
 atacaagggg acttcaaaag ttcacgaaaa aattgaatta aaagataaaa attaa 1735
 <210> 38
 <211> 223
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 38
 Met Arg Leu Gln Arg Pro Arg Gln Ala Pro Ala Gly Gly Arg Arg Ala
 1 5 10 15
 10 Pro Arg Gly Gly Arg Gly Ser Pro Tyr Arg Pro Asp Pro Gly Arg Gly
 20 25 30
 Ala Arg Arg Leu Arg Arg Phe Gln Lys Gly Gly Glu Gly Ala Pro Arg
 35 40 45
 Ala Asp Pro Pro Trp Ala Pro Leu Gly Thr Met Ala Leu Leu Ala Leu
 15 50 55 60
 Leu Leu Val Val Ala Leu Pro Arg Val Trp Thr Asp Ala Asn Leu Thr
 65 70 75 80
 Ala Arg Gln Arg Asp Pro Glu Asp Ser Gln Arg Thr Asp Glu Gly Asp
 85 90 95
 20 Asn Arg Val Trp Cys His Val Cys Glu Arg Glu Asn Thr Phe Glu Cys
 100 105 110
 Gln Asn Pro Arg Arg Cys Lys Trp Thr Glu Pro Tyr Cys Val Ile Ala
 115 120 125
 Ala Val Lys Ile Phe Pro Arg Phe Phe Met Val Ala Lys Gln Cys Ser
 25 130 135 140
 Ala Gly Cys Ala Ala Met Glu Arg Pro Lys Pro Glu Glu Lys Arg Phe
 145 150 155 160
 Leu Leu Glu Glu Pro Met Pro Phe Phe Tyr Leu Lys Cys Cys Lys Ile
 165 170 175
 30 Arg Tyr Cys Asn Leu Glu Gly Pro Pro Ile Asn Ser Ser Val Phe Lys
 180 185 190
 Glu Tyr Ala Gly Ser Met Gly Glu Ser Cys Gly Gly Leu Trp Leu Ala

	195	200	205
	Ile Leu Leu Leu Leu Ala Ser	Ile Ala Ala Gly Leu Ser Leu Ser	
	210	215	220
	<210> 39		
5	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> Sequência Artificial		
	<220>		
	<223> Sequência Artificial		
10	<400> 39		
	cttaccatc tgccctccta		20
	<210> 40		
	<211> 20		
	<212> DNA		
15	<213> Sequência Artificial		
	<220>		
	<223> Sequência Artificial		
	<400> 40		
	cctccattgg gaactgctac		20
20	<210> 41		
	<211> 24		
	<212> DNA		
	<213> Sequência Artificial		
	<220>		
25	<223> Sequência Artificial		
	<400> 41		
	tcctgttgcc aggaagacct ctgc		24
	<210> 42		
	<211> 20		
30	<212> DNA		
	<213> Sequência Artificial		
	<220>		

<223> Sequência Artificial
 <400> 42
 acttccctgcc cagcagttac 20
 <210> 43
 5 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Sequência Artificial
 10 <400> 43
 ggcactgacg ggtcttttagt 20
 <210> 44
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Sequência Artificial
 <400> 44
 ctgccgcgcc tctgatggat 20
 20 <210> 45
 <211> 1659
 <212> DNA
 <213> mus musculus
 <400> 45
 25 ggagagagca ggacacagct atggatgccg ccaggagagg agatacacag ccagtgatgt 60
 ggaccaccgg atggctgttg ctgctgccgc ttctgctgtg tgaaggagcg caagccctgg 120
 agtgctacag ctgcgtgcag aaggcggacg atggatgctc tccgcacagg atgaagacag 180
 tcaaattgtgg tcccgggggtg gacgtctgta ccgaggccgt gggagcggta gagaccatcc 240
 acgggcaatt ctctgtggcg gtgcggggct gcggttccgg aatcccgggc aagaacgacc 300
 30 gcggactgga ctttcacggg ctccctggcct tctttcagct acagcagtgc tccgaggacc 360
 gatgcaacgc caaactcaac ctcactttgc gaggcctcaa ccctgcaggc aatgagagtg 420
 catatgagcc taacggtgca gagtgtctaca gctgtgtggg tctgagccgc gagaagtgcc 480

```

agggtccat gccgccggtc gtgaactgct acaacgccag tggccgtgtc tacaagggt 540
gcttcgatgg taacgtcacc ctgacggcag ccaacgtgac cgtgtcctta cctgtccgag 600
gctgctcca ggacgagacc tgcacccggg atggggtgac ggggtccagga ttcacactca 660
gcggctcttg ctgtcagggc ccccgctgta acgccgacct tcgcaacaag acctatttct 720
5 cccctcgaat cccaccccta gtctgtgtgc cccctccaac caccgcagcc ccatccactc 780
gggcccagaa ctctccagc acgacctcta cagcagcccc aaccacgacc acctccatca 840
tcaagcccac cacagcccaa gccagccaca cttctcccca tgaaatggat ctggaagtca 900
tacaggaaga gggggcgctg ttgagtggag gtgctgcggg ccatggaggt actgcggggc 960
atggaggtgc tgcggggcac caagaccgca gcaatatgga gaagtatcca ggaaagggtg 1020
10 gggcccagat cccagctaaa ggaggctctg gcactctagg gtcttggttg tctgcagttc 1080
tgttgactgt ggttgctggc gcgatgctgt gaatgtctca tctgaaaag tccatctcac 1140
tttgtttccc tggccccgtg gtaccaactc tttccatttc tcaactgact ggactggctc 1200
cgcccccatc cttcagcatt ctgagttccg actgcactgg tttgcagctt cggaaaacag 1260
tcctctgttg taaatattcc gctcgggtgg ccctactttt ttgatgcggc cacagcattc 1320
15 cccctgatgg tgaccaggac agaggggaaga gacgtctact gggtgagaga ggcccagaga 1380
gtccacggca agcctcctct tcccgttttc ctgaccaggc tggaagatga ccaggcaggt 1440
agacaatgga tccatcctcc gagcactgtg cttgcctggc acattgtgcg gaaatctggt 1500
cgctgtctt ccttaggaga ctgtgaacaa ctctacaaca gggctctgtc tctggcctct 1560
ctatgtgttc tgtctggcac aggaaggtgt caataaagat ttagttactt tgtatagtga 1620
20 gttaactaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1659
<210> 46
<211> 363
<212> PRT
<213> mus musculus
25 <400> 46
Met Asp Ala Ala Arg Arg Gly Asp Thr Gln Pro Val Met Trp Thr Thr
1 5 10 15
Gly Trp Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu Cys Glu Gly Ala Gln Ala
20 25 30
30 Leu Glu Cys Tyr Ser Cys Val Gln Lys Ala Asp Asp Gly Cys Ser Pro
35 40 45
His Arg Met Lys Thr Val Lys Cys Gly Pro Gly Val Asp Val Cys Thr

```

	50		55		60											
	Glu	Ala	Val	Gly	Ala	Val	Glu	Thr	Ile	His	Gly	Gln	Phe	Ser	Val	Ala
	65				70						75					80
	Val	Arg	Gly	Cys	Gly	Ser	Gly	Ile	Pro	Gly	Lys	Asn	Asp	Arg	Gly	Leu
5				85							90					95
	Asp	Leu	His	Gly	Leu	Leu	Ala	Phe	Phe	Gln	Leu	Gln	Gln	Cys	Ser	Glu
				100						105						110
	Asp	Arg	Cys	Asn	Ala	Lys	Leu	Asn	Leu	Thr	Leu	Arg	Gly	Leu	Asn	Pro
				115						120						125
10	Ala	Gly	Asn	Glu	Ser	Ala	Tyr	Glu	Pro	Asn	Gly	Ala	Glu	Cys	Tyr	Ser
				130						135						140
	Cys	Val	Gly	Leu	Ser	Arg	Glu	Lys	Cys	Gln	Gly	Ser	Met	Pro	Pro	Val
	145					150					155					160
	Val	Asn	Cys	Tyr	Asn	Ala	Ser	Gly	Arg	Val	Tyr	Lys	Gly	Cys	Phe	Asp
15						165					170					175
	Gly	Asn	Val	Thr	Leu	Thr	Ala	Ala	Asn	Val	Thr	Val	Ser	Leu	Pro	Val
						180					185					190
	Arg	Gly	Cys	Val	Gln	Asp	Glu	Thr	Cys	Thr	Arg	Asp	Gly	Val	Thr	Gly
				195						200						205
20	Pro	Gly	Phe	Thr	Leu	Ser	Gly	Ser	Cys	Cys	Gln	Gly	Pro	Arg	Cys	Asn
				210						215						220
	Ala	Asp	Leu	Arg	Asn	Lys	Thr	Tyr	Phe	Ser	Pro	Arg	Ile	Pro	Pro	Leu
	225					230					235					240
	Val	Leu	Leu	Pro	Pro	Pro	Thr	Thr	Ala	Ala	Pro	Ser	Thr	Arg	Ala	Gln
25						245					250					255
	Asn	Ser	Ser	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Ala	Ala	Pro	Thr	Thr	Thr	Thr	Ser
						260					265					270
	Ile	Ile	Lys	Pro	Thr	Thr	Ala	Gln	Ala	Ser	His	Thr	Ser	Pro	His	Glu
				275						280						285
30	Met	Asp	Leu	Glu	Val	Ile	Gln	Glu	Glu	Gly	Ala	Ser	Leu	Ser	Gly	Gly
				290						295						300
	Ala	Ala	Gly	His	Gly	Gly	Thr	Ala	Gly	His	Gly	Gly	Ala	Ala	Gly	His

305 310 315 320
 Gln Asp Arg Ser Asn Met Glu Lys Tyr Pro Gly Lys Gly Gly Ala Gln
 325 330 335
 Ile Pro Ala Lys Gly Gly Ser Gly Thr Leu Gly Ser Trp Leu Ser Ala
 5 340 345 350
 Val Leu Leu Thr Val Val Ala Gly Ala Met Leu
 355 360
 <210> 47
 <211> 934
 10 <212> DNA
 <213> mus musculus
 <400> 47
 tcgctccccg cgccgtgccc gccgctgagc ccggagtgcg gacaccccag ggatgcctgc 60
 gccccagagg acccccgccct gcagcccccg cgccctcttc aggcctatc ggagcatgct 120
 15 gcctgcagcc atgaagagcc tcggtctggc gctgctggcc ttgcttctct gccctcgcc 180
 ggcccatggc ctgtggtgcc aggactgcac cctggccaat tccagccatt gcgctccgaa 240
 gcagtgccag cccaccgata ccgtttgtgc cagcgtgcgg atcaccgacc ccagcagcag 300
 caggaaggat cattctgtga acaagatgtg tgcttcctcc tgcgacttcg ttaagcggca 360
 ctttttctca gactatctga tggggttcat taactctggg atcttaaaag tcgacgtgga 420
 20 ctgctgcgag aaagatttgt gcaacggggc atcggtcgca ggacgcagcc cctgggccct 480
 ggctgggggg ctccctgctca gcctggggcc tgctcttctc tgggctgggc cctaagacct 540
 ctccctccct cctgctgggc tttggagctt gtcccctaag cctgttgctg cccctcccca 600
 gcctggcctg gctggggctg ggacagcaag ggtttgcat caaggctctga ggctctcaac 660
 ctccctagat gtgagtgagc cttctccgtt tctccaccag ctccatatcc caagcagctg 720
 25 aatatctcca ggagtccaga catcctggca ggaagctggg gtagggggga gggggagggc 780
 aagggaactga gaccctccag gtctccaagg ggagggaggt caagccaggg acagcccaac 840
 agcctggcct gaggggcatt aactacagag aaataaagtc acttctgagt cttgtgaaaa 900
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 934
 <210> 48
 30 <211> 160
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 48

Met Pro Ala Pro Gln Arg Thr Pro Ala Cys Ser Pro Arg Ala Ser Phe

1 5 10 15

Arg Pro Tyr Arg Ser Met Leu Pro Ala Ala Met Lys Ser Leu Gly Leu

5 20 25 30

Ala Leu Leu Ala Leu Leu Leu Cys Pro Ser Pro Ala His Gly Leu Trp

35 40 45

Cys Gln Asp Cys Thr Leu Ala Asn Ser Ser His Cys Ala Pro Lys Gln

50 55 60

10 Cys Gln Pro Thr Asp Thr Val Cys Ala Ser Val Arg Ile Thr Asp Pro

65 70 75 80

Ser Ser Ser Arg Lys Asp His Ser Val Asn Lys Met Cys Ala Ser Ser

85 90 95

Cys Asp Phe Val Lys Arg His Phe Phe Ser Asp Tyr Leu Met Gly Phe

15 100 105 110

Ile Asn Ser Gly Ile Leu Lys Val Asp Val Asp Cys Cys Glu Lys Asp

115 120 125

Leu Cys Asn Gly Ala Ser Val Ala Gly Arg Ser Pro Trp Ala Leu Ala

130 135 140

20 Gly Gly Leu Leu Leu Ser Leu Gly Pro Ala Leu Leu Trp Ala Gly Pro

145 150 155 160

<210> 49

<211> 2047

<212> DNA

25 <213> mus musculus

<400> 49

agaagaggcg agactttttt ggggtgctccg gatcgccagt agttcttcaa gcctcagcag 60
 ccaactcctc cggaggcgct gcgctccgcc ccagggagcg cgaatccaag gagcctggga 120
 ccagcctctg ggagcccccg gcgcgggcga tgcgggcgcc gcgggcgaca cctgcggctc 180
 30 ctctcggtgg cagccgtcgc ttgggcggca gcagcgcgag cctcggcagc ctcggcagct 240
 actgtcgccg cggccagaac agcctccgct gcggtcgtgg tctctgatgc tcttgccgcg 300
 tcccggccct gccgatccgg gaggatgtgg gttctcggca tcgcagcaac tttttgcgga 360

ttgttctggc ttccagggct ggcgctgcaa attcagtgtc accagtgtga agaattccag 420
 ctgaacaacg attgtctatc cctgagttc atcgtaaatt gcaccgtgaa cgttcaagac 480
 atgtgtcaga aagaagtgat ggagcaaagt gctgggatca tgtaccgga gtcgtgtgca 540
 tcgtcagcag cctgtctcat tgcttcagct gggtagcagt ccttctgttc ccttgggaaa 600
 5 ctgaactccg tgtgcatcag ctgctgcaac acccctcttt gcaatgggcc gaggcccaag 660
 aagagaggca gctctgcctc ggccatcagc ccagggttcc tcaccactct cctgttcttc 720
 cacttagccc tctgcttggc aactgctga agctaaagga gatgccaacc cctgctgcct 780
 cacctgtctg gcccttcgtc tctcaccttc ccgagtctct tctgggtgtc cttttattct 840
 gggtagacaa gggagtcttt ttgttccctc ctttcaagta acgcaagatt gccgtgcaca 900
 10 aatacttttg taagctctga accaattcat tctgaatttc tgtgtgtagt tgaagaaaaa 960
 agcatggagc agaaagtcca gaccctccca tcccaatctg gttaaccacc gccagggcta 1020
 gcctggaaga accagccctt agaagtcatt gagatacgca tctgccttcc ccaaagcctt 1080
 gagcttccat tctgtcccag taggagtcac agtctattca gagactgctg ctgctggaag 1140
 gtaactttgc ttttgcgga ggggagagcc agtttcggct caaggcttct gaacttgcca 1200
 15 ttcatacttc ctgctcctgt aaactatttt ctgggggtga cccagctggt ttggtctctg 1260
 agccagtctg tggtgactca ggactcaagg gctggggctt agcctctcca ggcttggcct 1320
 cagtctgaaa agtgcttaag aaaaccttgt tagttctcct ggaggaagag ttactgcgcc 1380
 gggaggctag gaagatgagg gggctgcggg ctgagctggt gctgtccttg gtggagatga 1440
 agcgggcacg ctggcgcttc tcttggttgg catgctgcag agtcaggcgg cagcagagca 1500
 20 cctgccagaa caccttccgg aactgctgag aggacacgtt gtagaggaga gggttgacca 1560
 cagagctgag gtagaagaag gtatcagaga agggcaggag gatcatgtat gccctgaagt 1620
 acgttctggt ccagtcattg ttgggttttg ctgcagccat gatccgtcgg atctgatttg 1680
 gcatccaaca cacggccaac gtcaccacaa tcagtctctg caggcaagaa caggagagaa 1740
 aaggagacgg ggagagaaac agcatgagaa caaaaataaa taaataaaaa ccataaaat 1800
 25 attaagcccc ttggttctgt tgcttactgg ccgagaaacg gtaccaatct ttcagctctg 1860
 tgcttgtcgg cttctttttg ccaactggca aggagaattt aatgctgctt caagctcagg 1920
 ggacttggct atgttaaaaa gcgttaaatg ctttcgacag tgtatttata cttacggctg 1980
 cctgttaatt ttcaaaatgt tttcattggt gctcgtgtat ccagaaaata tctcacgttg 2040
 gccaaaa 2047
 30 <210> 50
 <211> 141
 <212> PRT

<213> mus musculus

<400> 50

Met Trp Val Leu Gly Ile Ala Ala Thr Phe Cys Gly Leu Phe Trp Leu

1 5 10 15

5 Pro Gly Leu Ala Leu Gln Ile Gln Cys Tyr Gln Cys Glu Glu Phe Gln

20 25 30

Leu Asn Asn Asp Cys Ser Ser Pro Glu Phe Ile Val Asn Cys Thr Val

35 40 45

Asn Val Gln Asp Met Cys Gln Lys Glu Val Met Glu Gln Ser Ala Gly

10 50 55 60

Ile Met Tyr Arg Lys Ser Cys Ala Ser Ser Ala Ala Cys Leu Ile Ala

65 70 75 80

Ser Ala Gly Tyr Gln Ser Phe Cys Ser Pro Gly Lys Leu Asn Ser Val

85 90 95

15 Cys Ile Ser Cys Cys Asn Thr Pro Leu Cys Asn Gly Pro Arg Pro Lys

100 105 110

Lys Arg Gly Ser Ser Ala Ser Ala Ile Arg Pro Gly Leu Leu Thr Thr

115 120 125

Leu Leu Phe Phe His Leu Ala Leu Cys Leu Ala His Cys

20 130 135 140

<210> 51

<211> 516

<212> DNA

<213> mus musculus

25 <400> 51

ggcaggcctg agtgaggacc tcgaccatgc aggggacctg gatggtgctg ttggcactga 60

tattgggcac cttcggggag cttgctatgg ccttacagtg ctacacctgt gcgaatcctg 120

tgagtgcata caactgtgtc accaccaccc actgccacat caatgaaacc atgtgcaaga 180

ctacgctcta ctccctggag attgttttcc ctttctctggg ggactccacg gtgaccaagt 240

30 cctgcgccag caagtgtgag ccttcggatg tggatggcat tgggcaaacc cggccagtgt 300

cctgctgcaa ttctgaccta tgcaacgtgg atggggcacc cagcctgggc agtcctgggtg 360

gcctgctcct tgccttgga cttttcttgc tcttgggtgt cctgctgtaa agccatggcc 420

atctagctcc actcccttgt ccctgacatc ccagttccct aatgcctaga agaaatacaa 480
 tggccatctg caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 516
 <210> 52
 <211> 127
 5 <212> PRT
 <213> mus musculus
 <400> 52
 Met Gln Gly Thr Trp Met Val Leu Leu Ala Leu Ile Leu Gly Thr Phe
 1 5 10 15
 10 Gly Glu Leu Ala Met Ala Leu Gln Cys Tyr Thr Cys Ala Asn Pro Val
 20 25 30
 Ser Ala Ser Asn Cys Val Thr Thr Thr His Cys His Ile Asn Glu Thr
 35 40 45
 Met Cys Lys Thr Thr Leu Tyr Ser Leu Glu Ile Val Phe Pro Phe Leu
 15 50 55 60
 Gly Asp Ser Thr Val Thr Lys Ser Cys Ala Ser Lys Cys Glu Pro Ser
 65 70 75 80
 Asp Val Asp Gly Ile Gly Gln Thr Arg Pro Val Ser Cys Cys Asn Ser
 85 90 95
 20 Asp Leu Cys Asn Val Asp Gly Ala Pro Ser Leu Gly Ser Pro Gly Gly
 100 105 110
 Leu Leu Leu Ala Leu Ala Leu Phe Leu Leu Leu Gly Val Leu Leu
 115 120 125
 <210> 53
 25 <211> 450
 <212> DNA
 <213> mus musculus
 <400> 53
 atgcttttta tggcaggccc tgcagccagc tggctccctga ggcccctggg actccatggc 60
 30 gtcccccgaag ccttggtgtgc tgtcctctta acagtgtctgg tcatgaagac cttgggttctc 120
 ggtgatacca agctcgagga ccttcaccct cagtcctctcc cactaaacaa gtacctgaat 180
 tgctaccgat gtctgctgga gaccgaagag ctgggggtgcc tcttggggtc tgacacctgc 240

ctgacacctc tgggcagcag ctgtgtcacc ctgcacataa agaacagcag cggttttaat 300
gtcatgggtga gcgactgcta cagcaaggag cagatgggtcc attgttcata taccctgtgct 360
tccccggtgt ttggcttttg gatattctat cagtgttgct tcctggattt ctgcaacaat 420
ccggacaaca gaaagaatag catgcactag 450

5

<210> 54

<211> 149

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 54

10

Met Leu Phe Met Ala Gly Pro Ala Ala Ser Trp Ser Leu Arg Pro Leu

1 5 10 15

Gly Leu His Gly Val Pro Gln Ala Leu Cys Ala Val Leu Leu Thr Val

20 25 30

Leu Val Met Lys Thr Leu Val Leu Gly Asp Thr Lys Leu Glu Asp Leu

15

35 40 45

His Pro Gln Ser Leu Pro Leu Asn Lys Tyr Leu Asn Cys Tyr Arg Cys

50 55 60

Leu Leu Glu Thr Glu Glu Leu Gly Cys Leu Leu Gly Ser Asp Thr Cys

65 70 75 80

20

Leu Thr Pro Leu Gly Ser Ser Cys Val Thr Leu His Ile Lys Asn Ser

85 90 95

Ser Gly Phe Asn Val Met Val Ser Asp Cys Tyr Ser Lys Glu Gln Met

100 105 110

Val His Cys Ser Tyr Thr Arg Ala Ser Pro Val Phe Gly Phe Trp Ile

25

115 120 125

Phe Tyr Gln Cys Cys Phe Leu Asp Phe Cys Asn Asn Pro Asp Asn Arg

130 135 140

Lys Asn Ser Met His

145

30

<210> 55

<211> 960

<212> DNA

<213> mus musculus

<400> 55

agagctggag acctgggaat ctgctgtcaa ctgctggggc tgtggacatt ctcaggaccc 60
 tcaccatgaa acacctcctg ttgctcacc tgtctgcct actctactgc tgggtctcag 120
 5 ctgatactcg atgtcactcc tgctacaaag tccctgtgct gggctgtgtg gatcgccagt 180
 cctgcccgcct ggagccgggc cacaaatgcc tgacaacaaa cgtgtacctt gggaagatgt 240
 gggttttctc taacctgctc tgcggcacac cagaagagcc ttgtcgggag gtcttcaacg 300
 aaaccaacca taagctgggc ctgaactaca acaccacctg ctgtgacaag gataactgta 360
 acagcccggc tccacggccc acaccgcac tggccctcat ctccctcacc tccttggtctg 420
 10 gcctcggcct ctggttattg cattgagact agctccatgg ctacaatctt accacctgct 480
 atagcctgag cctttctccc tgtgtcctca gagctccagc tttccagaat cttctctcct 540
 cccaccccct tcttctgaag atcatgtccc tagtccata ccatttatct catgggactg 600
 tacctggagt ggcctttcta gccaccgctc ctctccctca cttgtcacct tccactccat 660
 tccaccacaca cacagacaca cagacacaca gacacaaaga cacacacaca cacacacaca 720
 15 cacacacaca ccagtcctt tcccatttcc ttctagaaca ctctacctcc tccactggcc 780
 actgaaaggc tcccctcctt ggacgcacac tgtgtgcct ctgggatcta agtctggaag 840
 aactcctgtc ttgtctccag ggagtgattc caaaaggcgc tggcctcatt gcatgggcct 900
 ggcttaccag accctctgct tgtccccttc tatcttgaga aataaacatc agtgtcta 960

<210> 56

20 <211> 126

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 56

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

65 70 75 80
 Asn His Lys Leu Gly Leu Asn Tyr Asn Thr Thr Cys Cys Asp Lys Asp
 85 90 95
 Asn Cys Asn Ser Pro Ala Pro Arg Pro Thr Pro Ala Leu Ala Leu Ile
 5 100 105 110
 Ser Leu Thr Ser Leu Ala Gly Leu Gly Leu Trp Leu Leu His
 115 120 125
 <210> 57
 <211> 3952
 10 <212> DNA
 <213> mus musculus
 <400> 57
 gcctacttgg cctgcctgcg atgcggtacc aacaccgcac gaagtgtgta cagattccca 60
 gttagacagc aggagggacc tgggagcggc cagggggatg ttttatctct aagagaccaa 120
 15 gagctcaggc agggtctctg tgccctgctt cctccctggc ttgagctgga tcctggacca 180
 gctgctgacc tcctgttcac tctggcactg ccctcacgtc tccgtcatga cccatctgct 240
 cacagtgttc ctggtggccc tgatgggcct gcctgtggcc caggctctgg agtgccacgt 300
 gtgtgcctac aatggagaca actgcttcaa acccatgcgc tgcccagcca tggccaccta 360
 ctgtatgacc acacgaactt acttcacccc ataccggatg aaggtgagga agtctctgtg 420
 20 ccccagctgc tttgaaaccg tgtacgatgg ctattccaag catgcatctg ccacctctg 480
 ttgccagtac tacctctgca acggtgctgg ctttgcctacc ccggtgacct tggccctggg 540
 cccagcactc ctagctacct tctggagctt gctgtaaagc tcggttcccc aagccagatc 600
 cactcaaacg caacactctc aaaaaacaca gtttccctct ctctcccaat tcactccacc 660
 caacgctctt ccttctgaca ctctcaact accacgaggt cccatggcta cctacgaaag 720
 25 aactgatggc atccagatac ctcaactcaa ggtcattttc agaaggctga catgtggacc 780
 tgtaatgtgc ccacccatgg gtggggcagg ctgggcttct cctctacca agatcagggg 840
 catctgggag aatgtttatg gaggaggggt catcactcaa gtcaaggagc actgatttga 900
 tagaattagt agccaaactc caccttcaga accctgcctc agtctacca gtagaggatg 960
 ggtctgctag aggtgagggg aggagagcgg cggagaataa cgagctggct agaagcagag 1020
 30 aaagactcag cagggtgtgc tccgaagatc agcgcggctt gccagagcaa atgtgatgtg 1080
 gaagccatgt gaggaagccc tttgtcattt ccacttatct gaggaactct gccagacctg 1140
 atgttgggat agccattggc caagggttcc tagcaacggc gtcatttcca tagggcactg 1200

aaatccctcc agccccagct cagcaggccc cttgacctcc actacagtcc ttcattcaca 1260
 caccagctgc tgggccttga agttggcagg gacttgggag caggtgaccc atgctatttt 1320
 ttgtctggcc tgttattctg ggcattggcaa gaagggatca gacgcaggtc agagcagggc 1380
 agtagggcga ctgagacagg gaaacagact tcagccagtg gcttcccagg tcccgtaggc 1440
 5 agctcctaca tccttcagtc tcttggttaca ttcccgggag acaaataatac agggagccaa 1500
 gccgagtgc aggtgatgac tgcctgtgaa gtctattgtg gccacagact gctgggtacc 1560
 aagtctcagg agaaccacgc ctagatttag gagacacaga tctgcctttc atgcagtgtg 1620
 gctgtccttg ggagccttac catgctctct aactagtacc tcaactcaca tgtcactgag 1680
 gaaccccccta acactggccc agcccagggg tcgggatgct ggccaatgtc catggagtgg 1740
 10 gactacccat ggagagtcct tgggtcatca catcaciaat gttttattcc aacctccag 1800
 tggtgagagc tcgggacaca aaggtccatc ctggggacct tcttcctggg tctaggcaga 1860
 cctgaactct gtctgtctgt agagctgatg tggttttccg cctcagtttc ctctccggg 1920
 gataggccac cggaggattt gggagggtgg ggagggcatc ctgctgatgg gctcgccgag 1980
 gttctcagga acaggaacgg gcggggcctt agtacacagg tgagttgggt gggaactggc 2040
 15 ccggagctga ggagacactg actgggcaga gggaagatga gtctcaaggg agggcaggaa 2100
 aaggaggggg gagcgcgcat gcacatgtgc actcagtgc ggctacagag cccaaaaggc 2160
 agcactggct gtgggtgtccc ctgaggccca ggcaagatgc taggaggaag ccaatgctgc 2220
 cccacactga gctcacatgg aacatgcaca ccaccagcag cagcagcaag cattgagact 2280
 gacctgtgga cgccataggg cactggcaag gagggtcaga ggcggtccc tgactcagt 2340
 20 ggtgaggccc gggaaacatt atcctgttac cctgcgtgtg caagatcatt gtccccagct 2400
 agatggcgtc ctcaaccaa actgagagga gccccagttc aggtcctccc tcctaccaca 2460
 aggggggtgt gtggaggagg cttgattgcc cttggagaag caccggtact gcagagctgg 2520
 gggccagctt ctttcatctg tgtctagaca ccgaccagat agggccccaca gtggcaacac 2580
 tgccacacag ccctacaaga agccctgtgc ctagctagca cagagcccca aaaggtgctc 2640
 25 aattaataca gggccaagcc tgccagtggg ggggatgcag attaggggaa cagaccaga 2700
 tggcctgtcc tgaaccctgt ctgggggtgt gtgatgagca tctgtctagc cactgcagg 2760
 tggctctaca cactccacaa cagttctgca aaagtgtatg aggtgggtcat tactgcgcc 2820
 ctctcacagg taaaggcact gaggcacgga ggagtgaggc acttcatttt cctgggcat 2880
 tcaactttcc aggaccaaca cattcaacta tgggtactac tccaatagct ggggttcttt 2940
 30 gaggtggggc ccctgaaga tgatagtggc ttcattcaacc agagaatttc agagtgcagt 3000
 gttgtaggag cctatgaacc tgaaatgtca gaactggagg tttgaggggc tgaggggtag 3060
 gccaggggtg tctggccctt tgtgtggaga cagagagaga gggaacatgg gatggggtag 3120

tagagagaag tgcaaaggag cgtcagcctt tctcagggct aatgctgtca gggacgaggg 3180
 ctcaagcctg tgagtgttct cacactgtga taaacagtgg cccctcaaca cagacggtgt 3240
 ccagagtggc cggcagtggg tatctagagt tgcaatctgg aagcctcttg gtagtcactg 3300
 gagagaggcc gcttgatggg acagcaccaa atgtgtgtgc ttctgtggga tgtgaggaag 3360
 5 ctgggtcagc gcatgaagcc aaagcgtcct tcagagcaga ggggtggctg gtctagtcca 3420
 ccagagacaa gctatccagt gagagtcata ctctgccacc gtctctgtga ttaccttacc 3480
 ccaaagcaga cggggacggg atgcagagca cccgtgtctt catcttctgc ggcaagcacg 3540
 tgagttcaca ttctgaaact ctagaaagat ttccaggagt ggggtgtgcc ttgcttttg 3600
 tgcattggtta ctctctggca agcaccgtgg catcccgag cactgagtga cctgggctcc 3660
 10 tcaagccatc tcattggtga aatgacagtg ccagtaccct ctcagctggc tcttgagggc 3720
 ctgtgcatgg ggtctgcaca gaggaggccc ccaaactatg catggacgga cactgtatgc 3780
 ctagcacttc ccttggttgt gtctctgcca accccaggct ctcaccagc aaggaaatga 3840
 aatccacttt tatgacacat ctccctcccc cagccagctc cattcaccta tatgccaggg 3900
 tggctccctt caatgtctgt ccccatctgg atgaataaac aagcgaagga ca 3952
 15 <210> 58
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> mus musculus
 <400> 58
 20 Met Thr His Leu Leu Thr Val Phe Leu Val Ala Leu Met Gly Leu Pro
 1 5 10 15
 Val Ala Gln Ala Leu Glu Cys His Val Cys Ala Tyr Asn Gly Asp Asn
 20 25 30
 Cys Phe Lys Pro Met Arg Cys Pro Ala Met Ala Thr Tyr Cys Met Thr
 25 35 40 45
 Thr Arg Thr Tyr Phe Thr Pro Tyr Arg Met Lys Val Arg Lys Ser Cys
 50 55 60
 Val Pro Ser Cys Phe Glu Thr Val Tyr Asp Gly Tyr Ser Lys His Ala
 65 70 75 80
 30 Ser Ala Thr Ser Cys Cys Gln Tyr Tyr Leu Cys Asn Gly Ala Gly Phe
 85 90 95
 Ala Thr Pro Val Thr Leu Ala Leu Val Pro Ala Leu Leu Ala Thr Phe

	100	105	110
	Trp Ser Leu Leu		
	115		
	<210> 59		
5	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> Sequência Artificial		
	<220>		
	<223> Sequência Artificial		
10	<400> 59		
	catgacctc cgaatctggt		20
	<210> 60		
	<211> 20		
	<212> DNA		
15	<213> Sequência Artificial		
	<220>		
	<223> Sequência Artificial		
	<400> 60		
	agcacagaac agaggggcta		20
20	<210> 61		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> Sequência Artificial		
	<220>		
25	<223> Sequência Artificial		
	<400> 61		
	atacggccaa tgtcacaaca		20
	<210> 62		
	<211> 20		
30	<212> DNA		
	<213> Sequência Artificial		
	<220>		

	<223> Sequência Artificial	
	<400> 62	
	acttcctggtt cccaccactg	20
	<210> 63	
5	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Sequência Artificial	
	<220>	
	<223> Sequência Artificial	
10	<400> 63	
	agaggacaag cggagagaca	20
	<210> 64	
	<211> 20	
	<212> DNA	
15	<213> Sequência Artificial	
	<220>	
	<223> Sequência Artificial	
	<400> 64	
	ttctggcagg ggtgttctag	20
20	<210> 65	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Sequência Artificial	
	<220>	
25	<223> Sequência Artificial	
	<400> 65	
	agcagcagca ggaaggat	18
	<210> 66	
	<211> 20	
30	<212> DNA	
	<213> Sequência Artificial	
	<220>	

<223> Sequência Artificial
 <400> 66
 aaaagtgccg cttaacgaag 20
 <210> 67
 5 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Sequência Artificial
 10 <400> 67
 caagatgtgt gcttctctct gcga 24
 <210> 68
 <211> 2798
 <212> DNA
 15 <213> Homo Sapiens
 <400> 68
 cgttgcgtgc gctctgcacg cacctatgtg gaaactaaag cccagagaga aagtctgact 60
 tgccccacag ccagtgcagtg actgcagcag caccagaatc tggctctgttt cctggtttggc 120
 tcttctacca ctacggcttg ggatctcggg catggtggct ttgccaatgg tccttggttt 180
 20 gctgctggtc ctgagcagag gtgagagtga attggacgcc aagatcccat ccacagggga 240
 tgccacagaa tggcggaatc ctcacctgtc catgctgggg tcctgccagc cagccccctc 300
 ctgccagaag tgcacacctc cacacccag ctgtgcatgg tgcaagcaac tgaacttcac 360
 cgcgctggga gaggcggagg cgcggcgctg cgcccgacga gaggagctgc tggctcgagg 420
 ctgcccgtg gaggagctgg aggagccccg cgccagcag gaggtgctgc aggaccagcc 480
 25 gctcagccag ggcgcccgc gagaggggtgc caccagctg gcgcgcagc gggtcgggt 540
 cacgctgcgg cctggggagc cccagcagct ccaggtccgc ttccttcgtg ctgagggata 600
 cccggtggac ctgtactacc ttatggacct gagctactcc atgaaggacg acctggaacg 660
 cgtgcgccag ctggggcacg ctctgctggt cggctgcag gaagtcaccc attctgtgcg 720
 cattggtttt ggttcctttg tggacaaaac ggtgctgccc tttgtgagca cagtaccctc 780
 30 caaactgcgc caccctgcc ccaccggct ggagcgtgc cagtcacat tcagctttca 840
 ccatgtgctg tccctgacgg gggacgcaca agccttcgag cgggaggtgg ggcgccagag 900
 tgtgtccggc aatctggact cgcctgaagg tggcttcgat gccattctgc aggctgcact 960

ctgccaggag cagattggct ggagaaatgt gtccccgctg ctggtgttca cttcagacga 1020
 cacattccat acagctgggg acgggaagtt gggcggcatt ttcattgcca gtgatgggca 1080
 ctgccacttg gacagcaatg gcctctacag tcgcagcaca gagtttgact acccttctgt 1140
 gggtcaggta gcccaggccc tctctgcagc aaatatccag cccatctttg ctgtcaccag 1200
 5 tgcgcactg cctgtctacc aggagctgag taaactgatt cctaagtctg cagttgggga 1260
 gctgagttag gactccagca acgtggtaca gctcatcatg gatgcttata atagcctgtc 1320
 ttccaccgtg acccttgaac actcttcact ccctcctggg gtccacattt cttacgaatc 1380
 ccagtgtgag ggtcctgaga agagggaggg taaggctgag gatcgaggac agtgcaacca 1440
 cgtccgaatc aaccagacgg tgactttctg ggttttcttc caagccaccc actgcctccc 1500
 10 agagcccat ctctgaggg tccgggccct tggcttctca gaggagctga ttgtggagtt 1560
 gcacacgctg tgtgactgta attgcagtga caccagccc caggctcccc actgcagtga 1620
 tggccaggga cacctacaat gtggtgtatg cagctgtgcc cctggccgcc taggtcggct 1680
 ctgtgagtgc tctgtggcag agctgtcctc ccagacctg gaatctgggt gccgggctcc 1740
 caatggcaca gggccctgt gacgtggaaa gggtcactgt caatgtggac gctgcagctg 1800
 15 cagtggacag agctctgggc atctgtgcga gtgtgacgat gccagctgtg agcgacatga 1860
 gggcatcctc tgcggaggct ttggtcgtg ccaatgtgga gtatgtcact gtcattgcaa 1920
 ccgcacgggc agagcatgcg aatgcagtgg ggacatggac agttgcatca gtcccaggga 1980
 agggctctgc agtgggcatg gacgtgcaa atgcaaccgc tgccagtgtc tggacggcta 2040
 ctatggtgct ctatgcgacc aatgccagg ctgcaagaca ccatgcgaga gacaccggga 2100
 20 ctgtgcagag tgtggggcct tcaggactgg cccactggcc accaactgca gtacagcttg 2160
 tgccataacc aatgtgacct tggccttggc ccctatcttg gatgatggct ggtgcaaaga 2220
 gcggaccctg gacaaccagc tgttcttctt cttggtggag gatgacgcca gaggcacggt 2280
 cgtgctcaga gtgagacccc aagaaaaggg agcagaccac acgcaggcca ttgtgctggg 2340
 ctgcgtaggg ggcatcgtgg cagtggggct ggggctggc ctggcttacc ggctctcggt 2400
 25 ggaaatctat gaccgccggg aatacagtcg ctttgagaag gagcagcaac aactcaactg 2460
 gaagcaggac agtaatcctc tctacaaaag tgccatcacg accaccatca atcctcgctt 2520
 tcaagaggca gacagtccca ctctctgaag gagggaggga cacttaccga aggtcttctt 2580
 ccttgaggga cagtgggaac tggaggggtga gaggaagggt ggtctgttaa gaccttggtg 2640
 ggggactaat tcaactggcg ggtgcggcca ccaccctact tcattttcag agtgacaccc 2700
 30 aagagggtg cttcccatgc ctgcaacctt gcatccatct gggctacccc acccaagtat 2760
 acaataaagt cttacctcag aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2798

<211> 798

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 69

5 Met Val Ala Leu Pro Met Val Leu Val Leu Leu Leu Val Leu Ser Arg
 1 5 10 15
 Gly Glu Ser Glu Leu Asp Ala Lys Ile Pro Ser Thr Gly Asp Ala Thr
 20 25 30
 Glu Trp Arg Asn Pro His Leu Ser Met Leu Gly Ser Cys Gln Pro Ala
 10 35 40 45
 Pro Ser Cys Gln Lys Cys Ile Leu Ser His Pro Ser Cys Ala Trp Cys
 50 55 60
 Lys Gln Leu Asn Phe Thr Ala Ser Gly Glu Ala Glu Ala Arg Arg Cys
 65 70 75 80
 15 Ala Arg Arg Glu Glu Leu Leu Ala Arg Gly Cys Pro Leu Glu Glu Leu
 85 90 95
 Glu Glu Pro Arg Gly Gln Gln Glu Val Leu Gln Asp Gln Pro Leu Ser
 100 105 110
 Gln Gly Ala Arg Gly Glu Gly Ala Thr Gln Leu Ala Pro Gln Arg Val
 115 120 125
 Arg Val Thr Leu Arg Pro Gly Glu Pro Gln Gln Leu Gln Val Arg Phe
 130 135 140
 Leu Arg Ala Glu Gly Tyr Pro Val Asp Leu Tyr Tyr Leu Met Asp Leu
 145 150 155 160
 25 Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu Glu Arg Val Arg Gln Leu Gly His
 165 170 175
 Ala Leu Leu Val Arg Leu Gln Glu Val Thr His Ser Val Arg Ile Gly
 180 185 190
 Phe Gly Ser Phe Val Asp Lys Thr Val Leu Pro Phe Val Ser Thr Val
 195 200 205
 30 Pro Ser Lys Leu Arg His Pro Cys Pro Thr Arg Leu Glu Arg Cys Gln
 210 215 220

Ser Pro Phe Ser Phe His His Val Leu Ser Leu Thr Gly Asp Ala Gln
 225 230 235 240
 Ala Phe Glu Arg Glu Val Gly Arg Gln Ser Val Ser Gly Asn Leu Asp
 245 250 255
 5 Ser Pro Glu Gly Gly Phe Asp Ala Ile Leu Gln Ala Ala Leu Cys Gln
 260 265 270
 Glu Gln Ile Gly Trp Arg Asn Val Ser Arg Leu Leu Val Phe Thr Ser
 275 280 285
 Asp Asp Thr Phe His Thr Ala Gly Asp Gly Lys Leu Gly Gly Ile Phe
 10 290 295 300
 Met Pro Ser Asp Gly His Cys His Leu Asp Ser Asn Gly Leu Tyr Ser
 305 310 315 320
 Arg Ser Thr Glu Phe Asp Tyr Pro Ser Val Gly Gln Val Ala Gln Ala
 325 330 335
 15 Leu Ser Ala Ala Asn Ile Gln Pro Ile Phe Ala Val Thr Ser Ala Ala
 340 345 350
 Leu Pro Val Tyr Gln Glu Leu Ser Lys Leu Ile Pro Lys Ser Ala Val
 355 360 365
 Gly Glu Leu Ser Glu Asp Ser Ser Asn Val Val Gln Leu Ile Met Asp
 20 370 375 380
 Ala Tyr Asn Ser Leu Ser Ser Thr Val Thr Leu Glu His Ser Ser Leu
 385 390 395 400
 Pro Pro Gly Val His Ile Ser Tyr Glu Ser Gln Cys Glu Gly Pro Glu
 405 410 415
 25 Lys Arg Glu Gly Lys Ala Glu Asp Arg Gly Gln Cys Asn His Val Arg
 420 425 430
 Ile Asn Gln Thr Val Thr Phe Trp Val Ser Leu Gln Ala Thr His Cys
 435 440 445
 Leu Pro Glu Pro His Leu Leu Arg Leu Arg Ala Leu Gly Phe Ser Glu
 30 450 455 460
 Glu Leu Ile Val Glu Leu His Thr Leu Cys Asp Cys Asn Cys Ser Asp
 465 470 475 480

Thr Gln Pro Gln Ala Pro His Cys Ser Asp Gly Gln Gly His Leu Gln
 485 490 495
 Cys Gly Val Cys Ser Cys Ala Pro Gly Arg Leu Gly Arg Leu Cys Glu
 500 505 510
 5 Cys Ser Val Ala Glu Leu Ser Ser Pro Asp Leu Glu Ser Gly Cys Arg
 515 520 525
 Ala Pro Asn Gly Thr Gly Pro Leu Cys Ser Gly Lys Gly His Cys Gln
 530 535 540
 Cys Gly Arg Cys Ser Cys Ser Gly Gln Ser Ser Gly His Leu Cys Glu
 10 545 550 555 560
 Cys Asp Asp Ala Ser Cys Glu Arg His Glu Gly Ile Leu Cys Gly Gly
 565 570 575
 Phe Gly Arg Cys Gln Cys Gly Val Cys His Cys His Ala Asn Arg Thr
 580 585 590
 15 Gly Arg Ala Cys Glu Cys Ser Gly Asp Met Asp Ser Cys Ile Ser Pro
 595 600 605
 Glu Gly Gly Leu Cys Ser Gly His Gly Arg Cys Lys Cys Asn Arg Cys
 610 615 620
 Gln Cys Leu Asp Gly Tyr Tyr Gly Ala Leu Cys Asp Gln Cys Pro Gly
 20 625 630 635 640
 Cys Lys Thr Pro Cys Glu Arg His Arg Asp Cys Ala Glu Cys Gly Ala
 645 650 655
 Phe Arg Thr Gly Pro Leu Ala Thr Asn Cys Ser Thr Ala Cys Ala His
 660 665 670
 25 Thr Asn Val Thr Leu Ala Leu Ala Pro Ile Leu Asp Asp Gly Trp Cys
 675 680 685
 Lys Glu Arg Thr Leu Asp Asn Gln Leu Phe Phe Phe Leu Val Glu Asp
 690 695 700
 Asp Ala Arg Gly Thr Val Val Leu Arg Val Arg Pro Gln Glu Lys Gly
 30 705 710 715 720
 Ala Asp His Thr Gln Ala Ile Val Leu Gly Cys Val Gly Gly Ile Val
 725 730 735

Ala Val Gly Leu Gly Leu Val Leu Ala Tyr Arg Leu Ser Val Glu Ile

740

745

750

Tyr Asp Arg Arg Glu Tyr Ser Arg Phe Glu Lys Glu Gln Gln Gln Leu

755

760

765

5 Asn Trp Lys Gln Asp Ser Asn Pro Leu Tyr Lys Ser Ala Ile Thr Thr

770

775

780

Thr Ile Asn Pro Arg Phe Gln Glu Ala Asp Ser Pro Thr Leu

785

790

795

REIVINDICAÇÕES

1. Método de detecção a doença inflamatória intestinal (IBD) em um mamífero, compreendendo detecção do nível de expressão de um gene de codificação de um polipeptídeo LY6 (a) em uma amostra de teste de tecido ou células obtida a partir do dito mamífero, e (b) em uma amostra de controle, em que um nível maior de expressão do ácido nucleico ou polipeptídeo LY6 na amostra de teste, quando comparada com a amostra de controle, é indicativo da presença de IBD no mamífero a partir do qual a amostra de teste foi obtida.
2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o tecido ou células da amostra de teste são do trato gastrointestinal do mamífero.
3. Método de acordo com a reivindicação 2, em que tecido ou células da amostra de teste são do cólon do mamífero.
4. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a amostra de controle é uma amostra de tecido ou células normais não-IBD da mesma origem ou tipo de tecido, ou múltiplas amostras de tecido ou células não-IBD da mesma origem ou tipo de tecido, dos quais os níveis de expressão tem a média calculada, ou um controle universal representando a expressão gênica em amostras múltiplas do tecido normal, saudável da mesma espécie.
5. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o tecido ou células da amostra de teste são inflamados.
6. Método de acordo com a reivindicação 1, em que tecido ou células da amostra de teste não são inflamados.
7. Método de acordo com a reivindicação 1, compreendendo:
 - (a) contato da amostra de teste com um agente detectável que se liga especificamente um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo LY6 ou fragmento do mesmo; (b) contato da amostra de controle com o agente detectável; e (c) detecção da formação de um complexo entre o agente e o polinucleotídeo da amostra de teste e amostra de controle, em que a formação de menos complexo na amostra de teste em relação à amostra de controle é indicativa da presença de IBD no mamífero.
8. Método de acordo com a reivindicação 7, em que o polinu-

cleotídeo compreende a sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, ou um fragmento da mesma compreendendo pelo menos 15 nucleotídeos contíguos de SEQ ID NO:1, 3, 5 ou 7.

5 9. Método de acordo com a reivindicação 7, em que tecido ou células da amostra de teste são do trato gastrointestinal do mamífero.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, em que o tecido ou células da amostra de teste são de cólon do mamífero.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, em que a amostra de controle é uma amostra do tecido ou células normais não-IBD da mesma origem ou tipo tecido, ou múltiplas amostras do tecido ou células não-IBD da mesma origem ou tipo de tecido, dos quais níveis de expressão tem a média calculada, ou um controle universal que representa a expressão gênica em múltiplas amostras de tecido normal, saudável da mesma espécie.

12. Método de acordo com a reivindicação 1, em que tecido ou células da amostra de teste são inflamados.

13. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o tecido ou células da amostra de teste são não-inflamados.

14. Método de acordo com a reivindicação 7, em que o agente é um segundo polinucleotídeo que hibridiza a um polinucleotídeo tendo a sequência SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 ou seus complementos.

15. Método de acordo com a reivindicação 14, em que o segundo polinucleotídeo compreende um marcador detectável ou ligado a um suporte sólido.

16. Método de acordo com a reivindicação 15, em que o marcador detectável é diretamente detectável.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, em que o marcador detectável é indiretamente detectável.

18. Método de acordo com a reivindicação 14, em que o marcador detectável é um marcador fluorescente.

19. Método de acordo com a reivindicação 7, em que o método está no ensaio de hibridização *in situ*.

20. Método de acordo com a reivindicação 7, em que o método é

ensaio de reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR).

21. Método de acordo com a reivindicação 7, em que o método é ensaio de reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR).

22. Método de acordo com a reivindicação 1, compreendendo:

5 (a) contato da amostra de teste com um agente detectável que se liga especificamente um polipeptídeo ou fragmento do mesmo; (b) contato da amostra de controle com o agente detectável; e (c) detecção da formação de um complexo entre o agente e o polipeptídeo da amostra de teste e amostra de controle, em que a formação de menos complexo na amostra de teste em relação à amostra de controle é indicativa da presença de IBD no mamífero.

23. Método de acordo com a reivindicação 22, em que o polipeptídeo LY6 compreende a SEQ ID NO:2, 4, 6, 8 ou um fragmento da mesma compreendendo pelo menos 10 aminoácidos contíguos de SEQ ID NO:2, 4, 6, ou 8.

24. Método de acordo com a reivindicação 22, em que o tecido ou células da amostra de teste são do trato gastrointestinal do mamífero.

25. Método de acordo com a reivindicação 24, em que o tecido ou células da amostra de teste são do cólon do mamífero.

20 26. Método de acordo com a reivindicação 7 ou 22, em que o tecido ou células da amostra de teste são inflamados.

27. Método de acordo com a reivindicação 7 ou 22, em que tecido ou células da amostra de teste são não-inflamados.

25 28. Método de acordo com a reivindicação 22, em que o agente é um anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo.

29. Método de acordo com a reivindicação 28, em que o anticorpo ou fragmento de ligação do mesmo compreendem um marcador detectável.

30 30. Método de acordo com a reivindicação 29, em que o marcador detectável é diretamente detectável.

31. Método de acordo com a reivindicação 29, em que o marcador detectável é indiretamente detectável.

32. Método de acordo com a reivindicação 29, em que o marcador detectável é um marcador fluorescente ou um radiomarcador.

33. Método de acordo com a reivindicação 1, 7 ou 22, em que a amostra de teste de tecido ou células é obtida de um mamífero suspeito de
5 experimental IBD.

34. Método de acordo com a reivindicação 1, 7, ou 22, em que a amostra de teste de tecido ou células é obtida de um mamífero suspeito de experimental UC.

35. Método de acordo com a reivindicação 1, 7, ou 22, em que
10 os tecidos ou as células do mamífero foram contactados com um agente terapêutico, e em que o nível da expressão de LY6 é indicativo da presença ou ausência de uma resposta ao agente terapêutico no tecido ou células do mamífero.

36. Método de acordo com a reivindicação 1, 7, ou 22, em que
15 os tecidos ou células do mamífero foram contactados com um agente terapêutico, em que a detecção é uma segunda ou subsequente detecção, e em que o nível da expressão de LY6 é indicativo da presença ou ausência de uma resposta ao agente terapêutico no tecido ou células do mamífero.

37. Método de acordo com a reivindicação 1, 7, ou 22, em que o
20 aumento na expressão de LY6 na amostra de teste é pelo menos 1,5 vezes, pelo menos 2 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 5 vezes, pelo menos 6 vezes, pelo menos 7 vezes, pelo menos 8 vezes, pelo menos 9 vezes, ou pelo menos 10 vezes maior que a amostra de controle.

cgcgtctgcggctgcgttccccgaaagacgaggctgcgcccggattccggctccgcaggagaccgaagggcacagctccccgcgccg
cgcacgccgcccagcccggagtgcggacacccccgggatgcttgcgccccagaggaccgcgccccaaagccccgcgccgcccc
aggcccacccggagcatgctgcctgcagccatgaagggcctcggcctggcgtgctggccgtcctgctgtgctcggcgcccgtcatgg
cctgtggtgccaggactgcacctgaccaccaactccagccattgcaccccaaagcagtgccagccgtccgacacgggtgtgtgccagtgt
ccgaatcaccgaicccagcagcagcaggaaggatcactcgggtgaacaagatgtgtgcctcctcctgtgacttcgttaagcgacactttttc
agactatctgatgggggtttatfaactctgggatcttaaaggctgacgtggactgctgcgagaaggatttgtcaatggggcggcaggggcag
ggcacagcccctgggccctggccggggggctcctgctcagcctggggcctgccctcctctgggctggggccctgatgtctcctccttcca
cggggcttctgagcttgctcccctgagcctgtggctgccctctcccagcctggcgtggctggggctgggggcagccttggcccagctcc
gtggctgtggcctgtggctctcactcctccccgacgtgaagcctcctgtctctccgccagctctgagtcacagcagctggacatctcca
ggaaaccaggccatctgggcaggagggcctggggatgaggggtggggggggacccccagggtcccgagggggaagtgaagcaacagcc
cagctggaagggcgtcttctgcggag aaataaagtcacittttgagtcctgagaaaaaaaaa

FIG. 1A

MLPAAMKGLGLALLAVLLCSAPAHGLWCQDCTLTTNSSHCTPKQCQPSDTVCASVRIT
DPSSSRKDHSVNMKMCASSCDFVKRHFFSDYLMGFINSKILKVDVDCCEKDLNKAAGA
GHSPWALAGGLLLSLGPALLWAGP

FIG. 1B

agggcgggtgt caatgcaccc tccagcgggtg cgcgcaggcg ggagaaggga gggcggcccc ggcaagtga acagttaagg
 cagtgtcccc accacacccc caccagatt ggccacgccg agctggttct tgacagaagg ccttcgcgga ggaagagggg
 gcacagctgc acaggacacc ctacggagcc tgcggcggtg gaactttgcc aggcgcacgg gaacgcgcgc ctttctgtc
 agcctcccg ggcgccaggc tccgcggcc cgcagcggga cagcctcagt tgtgtgggct ggaccagtc gctggggtac
 cgaccagtc tggagggcgc agaggacgtg gagtggggag gctgcctcc tatgtcgaa gggccagccg ggcacgagt
 cctcagaccc tagtccgac cggcaggtc cccacggcac ctgtcgcc ctcctcgcc ctccccaac ctccccatct
 cagaaaacta ccagttctct cccgcccc ggcgcccc tccaggaac gtgcggaggc gggagaagag gaagacagga
 aggggggtgg gatgtgaagc gacctccca gcctcccc cccgccccc ccacccaac tggcagccg tcacgtgatg
 cctggagtg gagggtggga gaaaaggcga gactttgtg ggtgctccg atcgccagta gtctctcag tctcagccgc
 caactccgga ggcgcgggtc tggccccgg agcgcgagcg ggaggagcag agaccgcag cgggagccc gagcgcgggc
 gatgcaggct ccgcagcgg cactgcggc tctctaac tacgaccgtc gtctccgcg cagcagcgc ggccccagca
 gcctcggcag ccacagccgc tgcagccgg gcagcctcc ctgtgtgc ctcctctgat gcgttgccc tctccggcc
 cgggactcc gggagaaatgt gggctcctagg catcgcggca acttttgcg gattgtctt gcttcaggc tttcgctgc
 aaatccagt ctaccagtgt gaagaattcc agctgaaca cactgtcc tccccgagt tcattgtgaa ttgacgggtg
 aacgttcaag acatgtgtca gaaagaagt atggagcaaa gtgccgggat catgtaccgc aagtctgtg calcatcagc
 ggctgtctc atgcctctg ccgggtacca gtcttctgc tccccagga aactgaactc agttgtcgc agctgtgca
 acacccctct ttgtaacggg ccaaggccca agaaaagggg aagttctgcc tggccctca ggccagggt cgcaccacc
 atctgttcc taaattagc cctctctcg gcacactgt gaagtgaag gagatgccac cccctctgc attgttctc cagccctgc
 ccccaacccc ccacctccct gattgagtt ctttgggtg tcttttatt ctgggtagg agcgggagtc cgtgttctt tttgttctg
 tgcaataat gaaagagtc ggtaaagcat tctgaataa ttcagcctga ctgaatttc agtatgtact tgaaggaagg
 aggtggagt aaagttcacc ccatgtctg tgaaccgga gtcaaggcca ggctggcaga gtcagtcct agaagtcact
 gagggtggga tctgctttt gtaaagcctc cagtgtccat tccatccctg atgggggcat agtttgagac tgcagagtga
 gattgacgt tcttagggc tggagggcca gtccactc aaggtccct cgcttgacat taaacttca tctctgaa aaccattct
 tgcagcagaa ttggctggt tgcgcctga gttgggtct agtgactga gactcaatga ctgggactta gactggggt
 cggcctcgt ctgaaaagt ctaagaaaa tcttctcagt tctcttga gaggactggc gccgggacgc gaagagcaac
 gggcgctgca caaagcggg gctgtcggg gtggagtgc catgtacgc caggcgctt tctgtgttg cgtgtcagc
 cgacaggcg cagcacagca cctgcagaa ccccgccga aactgtcgc aggcacacc gtacaggagc ggttgatga
 ccgagctgag gtagaaaaac gtctccgaga aggggaggag gatcatgtac gcccgaagt aggcctcgt ccagtcgtc
 ttgggttg ggcagccat gatcctcga atctgttg gcatccagca tacggccaat gtcacaaca tcagccctg
 gcagacacga gcaggaggga gagacagaga aaagaaaa acagcatgag aacacagtaa atgaataaaa ccaataaata
 tttagccct ctgttctgt ctactggcc aggaatgtt accaatttt cagtgttgga ctgacagct tctttgcca caagcaagag
 agaattaac actgttcaa acccggggga gttggctgt taaagaaag accattaat gcttagaca gtgtattat accagttgat
 gtctgttaatt ttaaaaaa tgtttcatt ggtgttgt tgcgtacca gaaagcagt catgtatcc ata

FIG. 2A

gatgcctgga gtgggaggtg gggagaaaag gcgagacttt tgtgggtgct cccgatcgcc agtagttcct tcagtctcag
 ccgccaactc cggaggcgcg gtgctcgcc cgggagcgcg agcgggagga gcagagaccc gcagccggga gcccagcgcg
 gggcgatgca ggctccgca gcggcacctg cggctcctct aagctacgac cgtcgtctcc gcggcagcag cgcgggcccc
 agcagcctcg gcagccacag ccgctgcagc cggggcagcc tccgctgctg tcgctcctc tgatgcgctt gccctctccc
 ggccccggga ctccgggaga atgtgggtcc taggcacgc ggcaactttt tgcggattgt tcttctcc aggccttgcg
 ctgcaaatcc agtgctacca gtgtgaagaa ttccagctga acaacgactg ctctccccc gagttcattg tgaattgcac
 ggtgaacgtt caagacatgt gtcagaaaga agtgatggag caaagtgccg ggatcatgta ccgcaagtc tgtcatcat
 cagcggcctg tctcatcgcc tctgccgggt accagtcct ctgctccca gggaaactga actcagtttg catcagctgc
 tgcaacaccc ctctttgtaa cgggccaaagg cccaagaaaa ggggaagttc tgcctcgcc ctacggccag ggctccgcac
 caccatctg ttctcaaat tagccctctt ctggcacac tgcgaagct gaaggagatg ccacccctc ctgcatgtt ctccagccc
 tcgccccaa cccccacct cctgagtga gttctctg ggtgtcctt tattctgggt agggagcggg agtccgtgt ctctttgtt
 cctgtgcaaa laatgaaaga gctcggtaaa gcatttgaa taaattcagc ctgactgaat tttagtatg tacttgaagg
 aaggaggtgg agtgaaagt caccctcatg tctgttaac cggagtcaag gccaggctgg cagagtcagt cctagaagt
 cactgaggtg ggcatctgcc tttgtaaag cctccagtgt ccattccatc cctgatgggg gcatagtgt agactgcaga
 gtgagagtga cgtttctta gggctggagg gccagttccc actcaaggct cctcgttg acattcaaac ttcatgtcc
 tgaaccat tctctgcagc agaattggct ggttctgcgc ctgagttggg ctctagtac tcgagactca atgactggga
 cttagactgg ggctcgccct cgtctgaaa agtgcttaag aaaatctct cagttctct tgcagaggac tggcgccggg
 acgcaagag caacggcgcg tgcacaaagc gggcgctgtc ggtggtggag tgcgatgta cgcgcaggcg ctctctgtg
 ttggcggtg gcagcgacag gcggcagcac agcactgca cgaacacccg ccgaaactgc tgcaggaca ccgtgtacag
 gagcgggtg atgaccgagc tgaggtagaa aaacgtctc gagaagggga ggaggatcat gtacgcccg aagtaggacc
 tcgtccagtc gtgctgggt ttggccgag ccatgatct ccgaatctg ttgggcatcc agcatacggc caatgtcaca
 acaatcagcc ctgggcagac acgagcagga gggagagaca gagaaaagaa aaacacagca tgagaacaca gtaaatgaat
 aaaaccataa aatatttagc cctctgttc tgtcttact ggccaggaaa tggtaaccaat tttcagttg ttgacttgac agcttcttt
 gccacaagca agagagaatt taacactgt tcaaccggg gggagttggc tgtgttaaag aaagaccatt aatgcttta gacagtg

FIG. 2B

5/74

MWVLGIAATFCGLFLLPGFALQIQCYQCEEFQLNNDCSSPEFIVNCTVNVQDMCQKEV
MEQSAGIMYRKSCASSAACLIASAGYQSFCS PGKLNSVCISCCNTPLCNGPRPKKRGSSA
SALRPGLRTTILFLKLALFSAHC

FIG. 2C

aaggctgggg ttgcctgggg cgaggttact catcctgggc tcaggttaaga gggcccgagc tcggaggcgg cacatccagg
ggggacgcca agggagcagg acggagccat ggaccccgcc aggaaagcag gtgcccaggc catgatctgg actgcaggct
ggctgctgct gctgctgctt cgcggaggag cgcaggccct ggagtgtac agctgcgtgc agaaagcaga tgacggatgc
tcccgaaca agatgaagac agtgaagtgc gcgccgggcg tggacgtctg caccgaggcc gtgggggcgg tggagaccat
ccacggacaa ttctcgctgg cagtgcgggg ttgcgggtcg ggactccccg gcaagaatga ccgcggcctg gatcttcacg
ggcttctggc gticatccag ctgcagcaat gcgtcagga tcgtgcaac gccaagctca acctcacctc gcgggcgctc
gacccggcag gtaatgagag tgcatacccg cccaacggcg tggagtgtca cagctgtgtg ggcctgagcc gggaggcgtg
ccagggtaca tcgccgccgg tcgtgagctg ctacaacgcc agcgtatcatg tctacaaggg ctgcttcgac ggcaacgtca
ccttgacggc agctaattgt actgtgtcct tgcctgtccg gggctgtgtc caggatgaat tctgactcg ggatggagta
acaggcccag ggttcacgct cagtggctcc tgttgccagg ggtcccgtg taactctgac ctccgaaca agacctactt
ctccccga atcccacccc ttgtccggt gcccctcca gagcccacga ctgtggcctc aaccacatct gtcaccactt
ctacctggc ccagtgaga cccacatcca ccacaaacc catgccagc ccaaccagtc agactccgag acagggagta
gaacacgagg cctcccggga tgaggagccc aggttgactg gaggcgccgc tggccaccag gaccgcagca attcagggca
gtatctgca aaaggggggc ccagcagcc ccataataa ggctgtgtgg ctcccacagc tggattggca gcccttctgt
tggccgtggc tgtggtgtc ctactgtgag cttctccacc tggaaattc cctctacct acttctctgg ccctgggtac cctctctc
atcacttctt gtcccacca ctggactggg ctggcccagc cctgttttt ccaacattcc ccagtatccc cagcttctgc tgcgtgggtt
tgcggctttg ggaaataaaa taccgttga tatattctgc caggggtgtt ctacttttt gaggacagct cctgtatcct tctatcctt
gtctctccgc ttgtctctt gtgatgttag gacagagtga gagaagtcag ctgtcacggg gaaggtgaga gagaggatgc
taagcttct actcacttcc tctagccag cctggactt ggagcgtggg gtgggtggga caatggctcc ccacttaag
cactgcctcc cctactcccc gcacttttg ggaatcgggt ccccatatgt ctcttact agactgtgag ctctcgagg
gcagggaccg tgccttatgt ctgtgtgtga tcagttctg gcacataat gccicaataa agatttaatt actttgaaaa aaaaaaaaaa
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa

FIG. 3A

MDPARKAGAQAMIWTAGWLLLLLLRGGAQALECYSCVQKADDGCSPNKMKTVKCAP
GVDVCTEAVGAVETIHGQFSLAVRGCGSLPGKNDRGLDLHGLLAFIQLQQCAQDRCN
AKLNLTSRALDPAGNESAYPPNGVECYSCVGLSREACQGTSPPVVSCYNASDHVYKGC
FDGNVTLTAANVTVSLPVRGCVQDEFCTRDGVTGPGFTLSGSCCQGSRCNSDLRNKTYF
SPRIPLVRLPPPEPTTVASTTSVTTSTSAPVRPTSTTKPMPAPTSQTPRQGVHEASRDEE
PRLTGGAAGHQDRSNSGQYPAKGGPQQPHNKGCVAPTAGLAALLLAVAAGVLL

FIG. 3B

gatccgcttt gcgcatccca gtgattcttg gggtccgct gtagtttcgg aaggagacat cgaagcaggg cgaggcgag
agggcggtgc ggacatcatc cccagtcggc agtgccgggt cccaagccct gcagtgtac agcttgagc acacctactt
tgccccctt gacctcaggg ccatgaagct gcccagcatc tctgtctc atgagtgtt tgaggctatc ctgtctctgg
acaccgggta tcgcgcgccg gtgacctgg tgccgaagg ctgctggacc gggcctctg cgggccagac gcaatcgaac
cgcccgccg tgccgccaga ctactcgggt gtgcgcgggt gcacaactga caaatgcaac gccacacctca tgactcatga
cgccctcccc aacctgagcc aagcaccga cccgccgacg ctacgcggcg ccgagtgtca cgcctgtatc ggggtccacc
aggatgactg cgtatcggc aggtcccgac gagtccagt tcaccaggac cagaccgct gcttcagggg caatggcaga
atgacagtgt gcaattctc agtccctgtg tacatcagaa cctgccaccg gccctcctgc accaccgagg gcaccaccag
cccctggaca gccatcgacc tccagggtc ctgctgtgag gggtagctct gcaacaggaa atccatgacc cagccctca
ccagtgttc agccaccacc cctccccgag cactacaggt cctggccctg ctctcccag tctcctgtc ggtggggctc
tcagcataga cgcctctcc aggatgttg ggacagggt cacacacctc attctgtg cttagcccc tatcatatg
ctcactggaa aatgatgta aagtaagaat tgcactcctg tccctctggc ctccatctc tcccgcctt gtccccaca acctggccaa
cagtactgga agaaactgga cacagtcacc agcatcccc ggaggggcaa aacagccatg tctgccccg atgaagagca
attctgatca cagctgttac tactgagca ccagccaggc accaggcacc ccataacacg gcttctgtg ctctccctcc
agagcctgtc gcagctctag gagggagcta tacaatgatg tctttattag tgtcatcatg agaagcccaa taagcagat
gcccatacag ttagtggcc aggtcttga gtaagtgc atgggtcaa atccagctc caccattcag cctgcagaga
ccatgagcga gttacttaag ccaggctctg gagctaagct gcatgggtc aaatcccagc tccagcttc agcctacaga
gaccatgggt gagtactta agccaggctc tggagctaag ctgcatgggt tcaaatcca gctccaccat tcagcctgca
gagactgttg gtgagttact tgagctctc gtgccaatat ttctacact ataagggtga ggtgaaaata aactctataa catgacaaga
actacttcac agtagttgca gtgaggatc aacgagatga acatttagta ctggggacac agcagtggcc cagtgtaat
gggtctattg tcataagccc taagtcacag gtcaacaaac tgaggaggcaa aagcacttg ttgagctgt gtactagt
agtatggatt cagggaccag attcccagcc ccacgaactg ctaagcaacc ccacctcta aacacatgag tggcgattaa
cttcacagaa aaacacaaa ggcaaagttc agcgaggta aattctcaa gctataaaga tcagggaaga ctctctggag
gaattcacc ttgagcaaaa tctaaagga tcaatagtag ctggcaaaaa gaagcaggag gaagcgcat ctaggtagag
gagacagct ggacaaaggt ctgaggagg aaggagcaca aggagtgcag gacacttca tgagtgcagg acacttcat
aactgcatga actcataga gatgggatcc ttagcatgt tctgtgca catgctgac catgttctt cacatgttt ttgccattg
atcttccag caactcagt agagaagcaa aaaagtaagt tgcactcctg tattgtctga atgttgtgt ctccccaaa tcatcttt
gaaacctaat taccaaagt atattactgg gaggtggggc ctgtggagg tggtagatc atgagggtg agccccatg
aataggatta gtgccctat aaaagaggcc ctggagagct gccttcccc tccaccaca tgagaacaca gccagcagg
gcctataagc aagaaagtgg gttctacca gccatcgaat ctgctgtgctc attgattgca gacttccag actccagagc
tatgagacat aaattctgt tgtgtataag ccaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

FIG. 4A

gattcttggg ttccgcgcgt agtttcggaa ggagacatcg aagcagggcg aggcgcagag ggcgttgcgg actcatgccc
 cagtcggcag tgcgggggtcc caagccctgc agtgctacag CtttgagCaC acctactttg gccccttga cctcagggcc
 atgaagctgc ccagcatctc ctgtcctcat gagtgccttg aggctatcct gtctctggac accgggtatc gcgcgcgggt
 gaccctgggt cggaagggct gctggaccgg gcctcctgcg ggccagacgc aatcgaacc ggacgcgctg ccgccagact
 actcgggtgt gcgcggctgc acaactgaca aatgcaacgc ccacctcatg actcatgacg cctccccc aa cctgagccaa
 gcacccgacc cggcgacgt cagcggcgcc gagtgtacg cctgtatcgg ggtccaccag gatgactgcg ctatcgccag
 gtcccgcga gtccagtgtc accaggacca gaccgcctgc ttccagggca gtggcagaat gacagttggc aatttctcag
 tccctgtgta catcagaacc tgccaccggc cctcctgcac caccgagggc accaccagcc cctggacagc catcgacctc
 cagggtcctt gctgtgagg gtacctctgc aacaggaaat ccatgaccca gcccttcacc agtgcttcag ccaccacccc
 tccccgagca ctacaggctc tggccctgt cctccagtc ctctgtctg tggggctctc agcatagacc gccctccag
 gatgttggg acagggtca cacacctcat tctgtctgt tcagccccta tcacatagct cacttgaaaa tgatgttaa
 gtaagaattg cactcctgtc cctctggcct tccatctctc ctgccctgt gcccacaac ctggccaaca gtacttggaag
 aaactggaca cagtaccag catcccagg gagggcaaaa cagccatgtc gtgccctgat gaagagcaat tctgacaca
 gctgttact acigagcacc agccaggcac caggcacccc ataacacggc ttctgtgtc ctcttcag agcctgtcgc
 agcttaggg gggagctata caatgatgtc ttattatgt tcacatgag aagcccaata agcagtatgc cctaacagt
 agtaggccag gctctggagc taagctgcat ggggtcacat cccagctcca ccattcagc tgcagagacc atgagcgagt
 tacttaagcc aggccttgga gctaagctgc atgggttcaa atcccagctc cagcattcag cctacagaga ccatgggtga
 gttacttaag ccaggctctg gagctaagct gcatgggttc aaatcccagc tccaccattc agcctgcaga gactgtgggt
 gaggttactg agctctctgt gccaatattt tctcacctat aagggtggagg tgaaaataaa cctataaca tgacaagaac tacttcacag
 tagttgcagt gaggattcaa cgagatgaac atttagtact tgggacacag cagtggccca gtataaatgg gctactgtc
 ataagcccta agtcacaggt caacaaactg agaggtaaaa gcacttggt gagcttgtgt atctagttag tatggattca
 gggaccagat tccagcccc acgaactgct aagcaacccc acctcctaaa cacatgagtg ccgattaact tcacagaaaa
 acacacaagg caaagttcag cgagggtgaaa ttctcaagc tataaagatc agggaagact tcttgaggga attcaccctt
 gagcaaaatc cttaaaggatc aatagtagct ggcaaaaaga agcaggagga agcacattt aggtagagga gacagcctgg
 acaaaggctt gaggggaggaa ggaacacaag gagtgcagga cactttcata actgcatgaa ctcatagag atgggatcct
 ttgcatgtt ctctgtcac atgcttgacc atgttcttc acatgcttt tgccacttga tcttccagc aactcagtga gagaagcaaa
 aaagtaagtt gcatcctg

FIG. 4B

10/74

MKLPSISCPHECFEAILSLDTGYRAPVTLVRKGCWTGPPAGQTQSNADALPPDYSVVRG
CTTDKCNAHLMTHDALPNLSQAPDPPTLSGAECYACIGVHQDDCAIGRSRRVQCHQDQ
TACFQGNGRMTVGNFSPVYIRTCRPSCTTEGTTSPWTAIDLQGSCCEGYLCNRKSMT
QPFTSASATTPRALQVLALLPVLLLVGLSA

FIG. 4C

ctgagaggaa gttttatctg tgcagccctt ctctgaggat ggacacttct cacactacaa agtctctgtt gctgattctt ctgtggccc
tactgtgtgc agaaagagct cagggactgg agtgttacca gtgctatgga gtccatttg agacttcttg cccatcaatt
acctgcccct accctgatgg agtctgtgtt actcaggagg cagcagttat tgtggattct caaacaagga aagtaaagaa
caatctttgc ttacccatct gccctcctaa tattgaaagt atggagatcc tgggtactaa ggtcaacgtg aagacttctt gtgccagga
agacctctgc aatgtagcag ttcccaatgg aggcagcacc tggacatgg caggggtgct tctgttcagc ctgagctcag
tcctcctgca gaccttgctc tgatggctct cccaatgacc tccaccttg tccctttatc ctcatgtgca acaattcttc ctggagccct
ctagtatga attatgagtt atagaagctc caaggtggga gtagtgtgtg aaataccatg ttttgccttt atagcccctg ctgggtagg
agggtctcta atcctctcta gggccttcaa gtctgtactt cctagaatgt cattttgttg tggattgctg ctcatgacc tggaggcaca
cagccagcac agtgaagagg cagaattcca aggtattatg ctatcaccat ccacacataa gtatctgggg tcctgcaatg
ttcccatg tatcctgaat gtccccctgt tgagtccaat aaaccttttg ttccccaaa aaaaaaaaaa aa

FIG. 5A

12/74

MDTSHTTKSCLLILLVALLCAERAQGLECYQCYGVFPFETSCPSITCPYPDGVCVTQEAAV
IVDSQTRKVKNNLCLPICPPNIESMEILGTKVNVKTSCCQEDLCNVAVPNGGSTWTMAG
VLLFSLSSVLLQTLL

FIG. 5B

gctccggcca gccgcgggcc agagcgcgcg aggttcgggg agctccgcca ggctgctggt acctgcgtcc gcccggcgag
 caggacaggc tgccttggtt tgtgacctcc aggcaggacg gccatcctct ccagaatgaa gatctcttg ccagtgtgc
 tggctgccct tctgggtgtg gagcgagcca gctcgtgat gtgcttctcc tgcctgaacc agaagagcaa tctgtactgc
 ctgaagccga ccatctgctc cgaccaggac aactactgcg tgactgtgtc tgctagtgc ggcatggga atctcgtgac
 atttggccac agcctgagca agacctgtc cccggcctgc cccatcccag aaggcgtcaa tgttggtgtg gcttccatgg
 gcatcagctg ctccagagc ttctgtgca attcagtg gcctgatggc gggctgcggg caagcgtcac cctgtgggt
 gccgggctgc tgcagacct gctgccggcc ctgctgcgt ttggcccctg accgcccaga cctgtcccc cgatccccc
 gctcaggaag gaaagcccag cctttctgg atcccacagt gtatgggagc cctgactcc tcacgtgcct gatctgtcc
 ctgggtccca ggtcaggccc accccctgca cctccacctg cccagcccc tgcctctgcc caagtgggccc agctgccctc
 acttctgggg tggatgatgt gaccttctt gggggactgc ggaaggagc agggttccct ggagtcttac ggtccaacat
 cagaccaagt ccatggaca tctgacagg gtcccaggg agaccgtgc agtagggatg tctgcctggc tctgtacgtg
 ggtgtgcagt gcacgtgaga gcacgtggcg gcttctgggg gccatgttg gggaggagg tctgccagca gcctggagag
 cctcagtccc tctagcccc tgcctggca cagctgcatg cacttcaagg gcagccttg ggggttggg ttctgccac
 ttccgggtct aggcctgcc caaatccagc cagtctgcc ccagcccacc cccacattgg agcctcctg ctgcttggt
 gcccaaata aatacatg tccc

FIG. 6A

14/74

MKIFLPVLLAALLGVERASSLMCFSCLNQKSNLYCLKPTICSDQDNYCVTVSASAGIGNL
VTFGHSLSKTCSPACPIEGVNVGVASMGISCCQSFLCNFSAADGGLRASVTLLGAGLLL
SLLPALLRFGP

FIG. 6B

.ccagtctgtc gccacctcac ttggtgtctg ctgtccccgc caggcaagcc tggggtgaga gcacagagga gtgggccggg
accatgcggg ggacgcggct ggcgctcctg gcgctggtgc tggctgcctg cggagagctg gcgccggccc tgcgtgcta
cgtctgtccg gagcccacag gagtgtcgga ctgtgtcacc atgccacct gcaccaccaa cgaaacctg tgcaagacca
cactctactc ccgggagata gtgtaccct tccaggggga ctccacggtg accaagtcct gtgccagcaa gtgtaagccc
tcggatgtgg atggcatcg ccagaccctg cccgtgtcct gctgcaatac tgagctgtgc aatgtagacg gggcgccgc
tctgaacagc ctccactgc gggccctcac gtcctccca ctctgagcc tccgactgta gagtccccgc ccaccccat
ggccctatgc ggcccagccc cgaatgcctt gaagaagtgc ccctgcacc aggaaaaaa aaaaaaaaaa

FIG. 7A

16/74

MRGTRLALLALVLAACGELAPALRCYVCPEPTGVSDCVTIATCTTNETMCKTTLYSREI
VYPFQGDSTVTKSCASKCKPSDVDGIGQTLPVSCCNTELCNVDGAPALNSLHCGALTLL
PLLSLRL

FIG. 7B

aagatggcgg cgtgtggacg tgtacggagg atgtccgct tgcggcggc gctgcatctg ctgctgctat tcgcgccgg
ggccgagaaa ctccccggcc atggcgtcca cagccagggc caggggccg gggccaactt tgtgtccttc gtagggcagg
ccggaggcgg cggcccggcg ggtcagcagc tgcgccagct gcttcagtca tcgcagcttc agcagcaaca gcagcagcag
caacagcaac agcagcttca gccgccgag ccgcccttc cggcgggtgg gcctccggcc cggcggggag gaggcggggc
tgggtggggc tgaagctgg cggaggaaga gtctgcagg gaggacgtga cccgcgtgtg ccctaagcac acctggagca
acaacctggc ggtgtcagc tgcctgcagg atgtgaggga gcctgaaaat gaaatttct cagactgcaa tcatttgtg
tggaattata agctgaacct aactacagat cccaaattg aatctgtggc cagagagggt tgcaaatcta ctataacaga
gattaagaa tgtgctgatg aaccgggtgg aaaagggtac atgtttcct gcttagtgga tcaccaggc aacatcactg
agtatcagtg tcaccagtac attaccaaga tgacggccat cattttagt gattaccgtt taatctgtgg ctcatggat gactgcaaaa
atgacatcaa cattctgaaa tgggcagta ttggcgtgg agaaaaggat gcacattcac aaggtgaggt ggtatcatgc
ttggagaaag gcctggtgaa agaagcagaa gaaagagaac ccaagattca agtttctgaa ctctgcaaga aagccattct
ccgggtggct gagctgtcat cggatgactt tcacttagac cggcatttat atttgcttg ccgagatgat cgggagcgtt ttigtgaaaa
tacacaagct ggtgagggca gagtgtataa gtgcctctt aaccataaat tgaagaatc catgagttaa aagtgtcag
aagcatttac aaccgccaa aagctgattg ccaggatta taaagtcagt taticattgg ccaaatcctg taaaagtac
ttgaagaaat accggtgcaa tgtggaaaac ctcccgcat cgcgtgaagc caggctctcc tacttgtaa tgtgcctgga
gtcagctgta cacagagggc gacaagtcag cagttagtgc cagggggaga tgcctgatta ccgacgcag ttgatggaag
acttttctt gagccctgag atcatcctaa gctgtcggg ggagattgaa caccattgtt ccgattaca tcgaaaagg
cggacctac actgtctgat gaaagtagt cgaggggaga aggggaacct tggatgaac tgccagcagg cgctcaaac
actgattcag gagactgacc ctggtgcaga ttaccgcat gatcgagct tgaatgaagc ttgtgaatc gtaatccaga
cagcctgcaa acatataaga tctggagacc caatgatctt gtcgtgcctg atggaacatt tatacacaga gaagatggta
gaagactgtg aacaccgtct cttagagctg cagtatttca tctccggga ttggaagctg gaccctgtc tgtaccgcaa
gtgccaggga gacgcttct gttttgcca caccacggt tggatgaga ccagtgaatt tatgcctcag ggagctgtgt tctctgtt
atacagacac gcctaccgca ctgaggaaca gggaaggagg ctctcaggg agtgccgagc tgaagtcaa aggatcctac
accagcgtgc catggatgtc aagctggatc ctgccctcca ggataagtgc ctgattgatc tgggaaaatg gtgcagttag
aaaacagaga ctggacagga gctggagtgc ctacaggacc atctggatga ctgtgtgtg gagttagag atatagtgg
caacctact gattagaat cagaggatat tcaaatagaa gccttgctga tgagagcctg tgagccata attcagaact
tctgccagc tgtggcagat aaccagatag actctgggga cctgatggag tgtctgatac agaacaaaca ccagaaggac
atgaacgaga agtgtgccat cggagttacc cactccagc tggtcagat gaaggattt cggttttctt acaagtttaa aatggcctgc
aaggaggacg tgtgaagct ttgcccac ataaaaaga aggtggacgt ggtgatctgc ctgagcacga ccgtgcgcaa
tgacactctg caggaagcca aggagcacag ggtgtccctg aagtccgca ggcagctccg tgtggaggag ctgagatga
cggaggacat ccgcttggag

FIG. 8A

ccagatctat acgaagcctg caagagtgc atcaaaaact tctgtccgc tgtgcaatat ggcaacgctc agattatcga
 atgtctgaaa gaaaacaaga agcagctaag caccgcctgc caccaaaaag tatttaagct gcaggagaca gagatgatgg
 acccagagct agactacacc ctcatgaggg tctgcaagca gatgataaag aggttctgtc cggaagcaga ttctaaaacc
 atgttgacgt gcttgaagca aaataaaaac agtgaattga tggatcccaa atgcaaacag atgataacca agcgccagat
 caccagaac acagattacc gcttaaaccc catgttaaga aaagcctgta aagctgacat tcctaaattc tgcacggta
 tcctgactaa ggccaaggat gattcagaat tagaaggaca agtcattctc tgcctgaagc tgagatatgc tgaccagcgc
 ctgtcttcag actgtgaaga ccagatccga atcattatcc aggagtccgc cctggactac cgcctggatc ctcagctcca
 gctgactgc tcagacgaga tctccagtct atgtgctgaa gaagcagcag cccaagagca gacaggtcag gtggaggagt
 gccicaaggt caacctgctc aagatcaaaa cagaattgtg taaaaggaa gtgctaaaca tgctgaagga aagcaaagca
 gacatcttg ttgaccgggt acitcatact gctgtgccc tggacattaa acaccactgc gcagccatca cccctggccg
 cgggcgtcaa atgtcctgtc tcatggaagc actggaggat aagcgggtga gggtacagcc cgagtgcaa aagcgcctca
 atgaccggat tgagatgtgg agttacgcag caaagggtggc cccagcagat ggcttctctg atcttccat gcaagtaatg
 acgtctccat ctaagaacta cattctctc gtgatcagt ggagcatctg tatattgttc ctgattggcc tgatgtgtgg acggatcacc
 aagcgagtga cacgagagct caaggacagg tagagccacc tgaccacca aaggaactac ctatccagt cccagttgt
 acagccctct tgtatagcat cccactcac ctgctcttc tcagaagtga caccaacccc gtgttagagc attagcagat
 gtccactgcg ttgtccatc cagctccac tegtgtccat ggtgtctcc tctctctac cgtgcagcag cagcagctgg
 tcgtgggggt tactgccttt gttggcaaa cttgggtta cctgcctgta gacaagtctc tctcatacca acagaacttc cggtaacttc
 agaaccaact cacctgacct gcaactcaaa ggcttttta agaaaaccac caaaaaaaaa a

FIG. 8A (CONTINUAÇÃO)

MAACGRVRRMFRLSAAHLHLLLLFAAGAEKLPGHGVHSQGQGPANFVSFVGQAGGGG
 PAGQQLPQLLQSSQLQQQQQQQQQQQLQPPQPPFPAGGPPARRGGAGAGGGWKLAE
 EESCREDVTRVCPKHTWSNNLAVLECLQDVREPENEISSDCNHLLWNYKLNLTDPKFE
 SVAREVCKSTITEIKECADEPVGKGYMVSCLVDHRGNITEYQCHQYITKMTAIFSDYRLI
 CGFMDDCKNDINILKCGSIRLGEKDAHSQGEVVSCLEKGLVKEAEEREPEPKIQVSELCKK
 AILRVAELSSDDFHLDRHLYFACRDDRERFCENTQAGEGRVYKCLFNHKKFEESMSEKCR
 EALTTRQKLIQAQDYKVSYSKAKSCKSDLKKYRCNVENLPRSREARLSYLLMCLESVHR
 GRQVSSECQGEMLDYRRMLMEDFSLSPEIILSCRGEIEHHCSGLHRKGRTLHCLMKVVR
 GEKGNLGMNCCQALQTLIQUETDPGADYRIDRALNEACESVIQTACKHIRSGDPMILSCL
 MEHLYTEKMWEDCEHRLLELQYFISRDWKLDPVLYRKCCQGDASRLCHTHGWNSETSEF
 MPQGAVFSLYRHAYRTEEQGRRLSRECRAEVQRILHQRAMDVKLDPALQDKCLIDLG
 KWCSEKTETGQEECLQDHLDDLVECDIVGNLTESEDIQIEALLMRACEPIIQNFC
 HDVADNQIDSGDLMECLIQNKHQKDMNEKCAIGVTHFQLVQMKDFRFSYKFKMACKE
 DVLKLCPNIKKKVDVVICLSTTVRNDTLQEAKEHRVSLKCRRLRVEELEMTEDIRLEP
 DLYEACKSDIKNFCSAVQYGNAQIIECLKENKKQLSTRCHQKVFKLQETEMMDPELDYT
 LMRVCKQMIKRFCEADSKTMLQCLKQNKNSLMDPKCKQMITKRQITQNTDYRLNP
 MLRKACKADIPKFCHGILTKAKDDSELEGQVISCLKLRYADQRLSSDCEDQIRIHQESAL
 DYRLDPQLQLHCSDEISSLCAEEAAAQEQTGQVEECLKVNLLKIKTELCKKEVLNMLKE
 SKADIFVDPVLHTACALDIKHHCAAITPGRGRQMSCLMEALEDKRVRLQPECKKRLND
 RIEMWSYAAKVAPADGFSDLAMQVMTSPSKNYILSVISGSICILFLIGLMCGRITKRVTRE
 LKDR

FIG. 8B

gcgtcgagct cggcgcggac tcaagatggc ggcgtgtgga cgtgtacgga ggatgttccg cttgtcggcg gcgctgcac
 tgctgtgct attcgcggcc gggcccgaga aactccccgg ccaggcgctc cacagccagg gccagggtcc cggggccaac
 ttgtgtcct tcgtaggga ggccggaggc ggcggcccg cggtcagca gctgcccag ctgcctcagt catcgagct
 tcagcagca cagcagcagc agcaacagca acagcagcct cagccggcg agccgcctt cccggcgggt gggcctcgg
 cccggcgggg aggagcgggg gctgggggg gctggaagct ggcggaggaa gagtcttca gggaggagct gacccgctg
 tgcctaaac acacctggag caacaacctg gcggtgctcg agtgcttca ggatgtgagg gagcctgaaa atgaaattc
 ttcagactgc aatcattgt tttggaatta taagctgaac ctaactacag atcccaaatt tgaatctgtg gccagagagg ttgcaaatc
 tactataca gagattaaag aatgtgctga tgaaccggtt ggaaaagggt acatggttc ctgcttgggt gatcaccgag
 gcaacatcac tgagtacag tgcaccagt acattacca gatgacggcc atcatttta gtgattaccg ttaattctgt ggcttcagg
 atgactgcaa aaatgacac aacattctga aatgtggcag taticggctt ggagaaaagg atgcacattc acaaggtag
 gtgtatcat gcttgagaa aggcctgggtg aaagaagcag aagaaagaga acccaagatt caagtttctg aactctcaa
 gaaagccatt ctccgggtgg ctgagctgc atcgatgac ttacttag accggcattt atatttctg tccgagatg
 atcgggagcg ttttgtga aatacacaag ctggtgaggg cagagtgtat aatgcctct ttaaccataa attgaagaa
 tccatgagtg aaaagtgtcg agaagcacti acaaccgcc aaaagctgat tggccaggat tataaagtca gttattcatt
 ggccaaatcc tgtaaaagt actgaagaa ataccggtgc aatgtgaaa acctccgcg atcgcgtgaa gccaggctct
 cctactgtt aatgtgcctg gagtgcctg tacacagagg gcgacaagtc agcagtgagt gccaggggga gatgctggat
 taccgacgca tgtgatgga agactttct ctgagccctg agatcatcct aagctgtcgg ggggagattg aacaccattg
 ttccggatta catgaaaag ggcggaccct acactgtctg atgaaagtag ttcgagggga gaaggggaac ctggaatga
 actgccagca ggcgctcaa acactgattc aggagactga cctggtgca gattaccgca ttgatcgagc ttgaatgaa
 gcttgtgaat ctgtaatcca gacagcctgc aaacatataa gatctggaga ccaatgac ttgtctgccc tgatggaaca ttatacaca
 gagaagatgg tagaagactg tgaacaccgt ctcttagagc tgcagtatt catctcccgg gattggaagc tggaccctgt
 cctgtaccgc aagtgcagg gagacgctc tcgtcttgc cacaccacg gtggaatga gaccagtga tttatgcctc
 agggagctgt gttctctgt ttatacagac acgcctaccg cactgaggaa cagggaagga ggctctcac ggagtgccga
 gctgaagtc aaaggatcct acaccagct gccatggatg tcaagctgga tctgccctc caggataagt gcctgattga
 tctgggaaaa tggtagctg agaaaacaga gactggacag gagctggagt gccttcagga ccatctggat gacttgggtg
 tggagttag agatatagt ggcaacctca ctgagttaga atcagaggat attcaaatag aagccttgc gatgagagcc
 tgtgagccca taaticagaa ctctgccac gatgtggcag ataaccagat agactctggg gacctgatg agtgtctgat
 acagaacaaa caccagaagg acatgaacga gaagtgtgcc atcgaggtta cccacttcca gctggtgcag atgaaggatt
 ttcggtttc

FIG. 8C

ttacaagttt aaaatggcct gcaaggagga cgtgttgaag ctttgccaa acataaaaaa gaaggtggac gtggtgatct
 gcctgagcac gaccgtgcgc aatgacactc tgcaggaagc caaggagcac aggggtgtccc tgaagtgccg caggcagctc
 cgtgtggagg agctggagat gacggaggac atccgcttgg agccagatct atacgaagcc tgcaagagtg acatcaaaaa
 cttctgttcc gctgtgcaat atggcaacgc tcagattatc gaatgtctga aagaaaacaa gaagcagcta agcacccgct
 gccacaaaaa agtatattaag ctgcaggaga cagagatgat ggaccagag ctagactaca ccctcatgag ggtctgcaag
 cagatgataa agaggttctg tccggaagca gattctaaaa ccatgttgca gtgcttgaag caaaataaaa acagtgaatt
 gatggatccc aaatgcaaac agatgataac caagcgccag atcacccaga acacagatta ccgcttaaac cccatgttaa
 gaaaagcctg taaagctgac attcctaaat tctgtcacgg tatcctgact aaggccaagg atgattcaga attagaagga
 caagtcattc ctgacctgaa gctgagatat gctgaccagc gcctgtcttc agactgtgaa gaccagatcc gaatcattat
 ccaggagtcc gccctggact accgcctgga tcttcagctc cagctgact gctcagacga gatctccagt ctatgtgctg
 aagaagcagc agcccaagag cagacaggtc aggtggagga gtgcctcaag gtcaacctgc tcaagatcaa aacagaattg
 tgtaaaaagg aagtgtctaaa catgctgaag gaaagcaaag cagacatctt tgttgacctg gtacttcata ctgcttgtgc
 cctggacatt aaacaccact ggcagccat caccctggc cgcgggctc aaatgtctg tctcatggaa gcactggagg
 ataagcgggt gaggttacag ccgagtgca aaaagcgct caatgaccgg attgagatgt ggagttacgc agcaaagggtg
 gcccagcag atggcttctc tgatcttgc atgcaagtaa tgacgtctcc atctaagaac tacattctct ctgtgatcag tgggagcatc
 tgtatattgt tctgattgg cctgatgtgt ggacggatca ccaagcgagt gacacgagag ctcaaggaca ggctacaata
 caggtcagag acaatggctt ataaagggtt agtgtggtct caggatgtga caggcagtc agcctgacct ttctgcacac
 tccagacaaa ctccagac aagctcctt gtgcctctac gtggagaggg tgtggaaagt tatcacatta aaagatggag
 gatttaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaagaaaaa aaaaaaaaaa

FIG. 8C (CONTINUAÇÃO)

MAACGRVRRMFRLSAAHLHLLLF AAGAEKLPGQG VHSQGGPGANFVSFVGQAGGGG
PAGQQLPQLPQSSQLQQQQQQQQQQPPPPFPAGGPPARRGGAGAGGGWKLAE
EESCREDVTRVCPKHTWSNNLAVLECLQDVREPENESSDCNHLLWNYKLNLTDPKFE
SVAREVCKSTITEIKECADEPVGKGYMVSCLVDHRGNITEYQCHQYITKMTAIFSDYRLI
CGFMDDCKNDINILKCGSIRLGEKDAHSQGEVVSCLEKGLVKEAEEREPKIQVSELCKK
AILRVAELSSDDFHLDRHLYFACRDDRERFCENTQAGEGRVYKCLFNHKFEESMSEKCR
EALTTRQKLI AQDYKVSYS LAKSCKSDLKKYRCNVENLPRSREARLSYLLMCLES AVHR
GRQVSSECQGEMLDYRRMLMEDFSLSP EILSCRGEIEHHCSGLHRKGRTLHCLMKVVR
GEKGNLGMNCQQALQTLIQETDPGADYRIDRALNEACESVIQTACKHIRSGDPMILSCL
MEHLYTEKMVEDCEHRLLELQYFISR DWKLDPVLYRK CQGDASRLCHTHGWNETSEF
MPQGAVFSCLYRHAYRTEE QGRRLSRECRAEVQRILHQRAMDVKLDPALQDKCLIDL G
KWCSEKTETGQELECLQDHLDDL VVECRDIVGNLTESEDIQIEALLMRACEPIIQNFC
HDVADNQIDSGDLMECLIQNKHQKDMNEKCAIGVTHFQLVQMKDFRFSYKFKMACKE
DVLKLCPNIKKKVDVVICLSTTVRNDTLQEAKEHRVSLKCRRLRVEELEMTEDIRLEP
DLYEACKSDIKNFCSAVQYGNAQII ECLKENKKQLSTRCHQKVFKLQETEMMDPELDYT
LMRVCKQMIKRFCPEADSKTMLQCLKQNKNS ELMDPKCKQMITKRQITQNTDYRLNP
MLRKACKADIPKFCHGILTKAKDDSELEGQVISCLKLRYADQRLSSDCEDQIRIIQESAL
DYRLDPQLQLHCSDEISSLCAEEAAAQEQTGQVEECLKVNLLIKTELCKKEVLNMLKE
SKADIFVDPVLHTACALDIKHHCAAITPGRGRQMSCLMEALEDKRVRLQPECKKRLND
RIEMWSYAAKVAPADGFSDLAMQVMTSPSKNYILSVISGSICILFLIGLMCGRITKRVTRE
LKDRLQYRSETMAYKGLVWSQDVTGSPA

FIG. 8D

caaaaacttc tgttccgctg tgcaatatgg caacgctcag attatcgaat gtctgaaaga aaacaagaag cagctaagca
 cccgctgccca ccaaaaagta tttaagctgc aggagacaga gatgatggac ccagagctag actacaccct catgagggtc
 tgtaagcaga tgataaagag gtctgtccg gaagcagatt ctaaaacat gttgcagtgc ttgaagcaaa ataaaaacag
 tgaattgatg gatcccaaat gcaaacagat gataaccaag cgcagatca ccagaacac agattaccgc ttaacccca
 tgltaagaaa agcctgtaaa gctgacattc cttaattctg tcacggtatc ctgactaagg ccaaggatga ttcagaatta
 gaaggacaag tcactcttg cctgaagctg agatatgctg accagcgct gtcttcagac tgtgaagacc agatccgaat
 cattatccag gagtccgcc tggactaccg cctgcatct cagctccagc tgcactgctc agacgagatc tccagtctat
 gtgctgaaga agcagcagcc caagagcaga caggtcaggt ggaggagtgc ctcaagggtca acctgctcaa gatcaaaaca
 gaattgtgta aaaaggaagt gctaaacatg ctgaaggaaa gcaaacgaga catctttgtt gacccggtac ttcatactgc
 ttgtgccctg gacattaac accactgcgc agcatcacc cctggccgcg ggcgtcaaat gtctgtctc atggaagcac
 tggaggataa gcggtgagg ttacagcccg agtgcaaaa gcgctcaat gaccggattg agatgtggag ttacgcagca
 aagggtggccc cagcagatgg ctctctgat ctggccatgc aagtaatgac gtctccatct aagaactaca ttctctctgt gatcagtggtg
 agcatctgta taltgttctt gattggcctg atgtgtggac ggaacacaa gcgagtgaaca cgagagctca aggacaggta
 gagccacctt gaccacaaa ggaactacct atccagtgc cagttgtac agccctcttg tatagcatcc ccactcacct
 cgctctctc agaagtgaaca ccaaccccg gttagagcat tagcagatgt ccaactgcgt gtcccatcca gcctccactc
 gtgtccatgg tgcctctc ctctcaccg tgcagcagca gcagctggc gctggggta ctgcctttgt ttggcagact tggttacct
 gcctgtagtc aagtctctc cataccaaca gaactccgg tacttcaga accaactcac ctgacctga actcaaaaggc ttitttaaga
 aaaccaccaa aaaaaaaat ttitttaag aaaaaatgt atatagtaac gcatctctc caggcttgal ttgggcaatg gggttatgtc
 ttcatatga ctgtgtaaaa caaagacagg acttgagggg gaagcacacc accagtgtg ccatgactga ggtgtctgt
 tcactctca gaagcgctt ggggcctcgc caggcccggt gtcttcaccg aggcgtgggt ggcagccgt tccccaggct
 gtgtggggc ctgccttct ctgtgagac agtgacgctt tccagttcc accctaata gccactgctg gtcacagccc
 cacagccatg ggtattctg tggctctc gctcattga agcaaagcat gacccctct agacaagggc agctggggag
 gggaaggagc cggaagtgtg tgaagtga cagtcacatc atctgcactg agaggctgga tctgagtc cggggcagca
 ggatcccagg aaccttctc ctccaggga gcacaggact cagccgtgc tggaccggcc ctgctgaggc tacagtact
 ctggaagctc tgcgctcat caggaggcag gactgtggcg ggagggtcc ttgaagatgg gtgtggggag cagtgggtca
 ggaagtggga gccagaggtt tgactcactt tgccttatt ttcaggctac aatacaggtc agagacaatg gctataaag gtttagtgtg
 gtctcaggat gtgacaggca gtccagcctg accttctgc acatccaga caaacttccc agacaagctc ctttgtccct
 ctacgtggag aggtgtgga aagttatcac attaaaagat ggaggattaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa

FIG. 8E

MMDPELDYTLMRVCKQMIKRFCPEADSKTMLQCLKQNKNSSELMDBPKCKQMITKRQIT
QNTDYRLNPMLRKACKADIPKFCHGILTKAKDDSELEGQVISCLKLRYADQRLSSDCED
QIRIIQESALDYRLDPQLQLHCSDEISSLCAEAAAQEQTGQVEECLKVNLLKIKTELCK
KEVLNMLKESKADIFVDPVLHTACALDIKHHCAAITPGRGRQMSCLMEALEDKRVRLQ
PECKKRLNDRIEMWSYAAKVAPADGFSDLAMQVMTSPSKNYILSVISGSICILFLIGLMC
GRITKRVRELKDR

FIG. 8F

aatttagcca gctgtggtgg cacatacctg taatcccagc tacttgagag actgaggcag gagaatcact tgaaccggga
gatggagtgt gcagtgagcc gagatgggtgc cactgtactc cagcctgggt gacagagcaa gactctgtct ccaaaaaaaa
aaaaaaaaa aaaaaaaga catttcaagc tggagattt gggtccctaa ctttgagcct agctcttca ttaaagtaat aataaaagta
gaactctaca ttatataat ggtttgact ttccaaagtg attttcacat ctacagcagtc ctgtgaagga cttaaafaagg tgttcaggg
tagacttggc attgtgtttt gcaaagaagg tccaaggcca tgcagctatt tggtagacaga attgaaagta aagcctgatt ctctgtctgc
aaggcgactt tgctatctag aagccagggt cactagacaa gatgcagtc acaaataagt ctccagaaca tatgacatct
ccagcctaaa ccaagctcac cttccatgc tggctccctc atgcagacgg aggacatccg ctggagacca gatctatagc
aagcctgcaa gagtgcacac aaaaacttct gticcgtgt gcaatatggc aacgctcaga ttatcgaatg tctgaaagaa
aacaagaagc agctaagcac ccgctgccac caaaaagtat ttaagctgca ggagacagag atgatggacc cagagctaga
ctacaccctc atgagggctc gcaagcagat gataaagagg ttctgtccgg aagcagattc taaaaccatg ttgcagtgtc
tgaagcaaaa taaaacagc gaattgatgg atcccaaatg caaacagatg ataaccaagc gccagatcac ccagaacaca
ggtaagatct tggcttggct ctcttgccc cgtggagtat ctgaaaagga attcagtggc tgtagagtga cctgctcaaa
ctcccagggc ttgttgctt gggaatttta agggaggagt ctgagttaa gcagggcctt cctccttga ggagcatcca
gaaaaatgga gggagagtca ggggagagag gaggccacaa gaaccagaaa actgccctaa aagaacgttc agaaggaatc
aggccggcag tcttggaag gaaaaatcta gaaattcaat aaaacttcat gagtgtgcca ggagaatgta cgggtaatct
gattcggaa agaaacattt cacctctgag ttggaagacc tctgaagtta atggtcacag tgagtggat attgtatttc ttttcagt
tttcaaaaag tgtctgtat gggaagggt gctgatgtcc ccttgatttt tctgaggact ccttagagta ttggagtctg caaaaaccc
cgcagagtag aaagatttct gaggacctcc agaagtactc gtaacaagt catattgctg attaaaaaca gtgtagttag
agctcagtaa atgtttattg aatagataaa tccatgggtg tagtcatgat cattgacata atatgtccc tttaggaagg tggatatcta
aaaatgtgtg aatcagggtg aatgtttgt cacatgtca ctgtticta ctctagatta ccgcttaaac cccatgttaa gaaaagcctg
taaagctgac attcctaaat tctgtcacgg tatcctgact aaggccaagg atgattcaga attagaagga caagtcattc ctgacctgaa
gctgagatal gctgaccagc gcctgtctc agactgtgaa gaccagatcc gaatcattat ccaggagtcc gccctggact
accgctgga tctcagctc cagctgcaat gctcagacga ggtgggattt gcgtgcaaaa ctggttacgc acagagctgc
tcagagaagt tccactgga gaaaagtgt ttacttctc tccctcagc cgtgaatgat ctggtgaatt gaaggccatc ttctaggctc
tccatggctt gatttctgt tctttgtaac actgaattca acttggcatt agtctgaca ctctaaagcg ttgttccata ttctctgtt
gaacaagggt gtttctcat tatagctctc tgtaaatgt ttcttccctt ctcttattc tggatggtaa acccaagacc tggcagaaag
ataaaagtgc tttagctgg gcacgggtgc tcacgcctgt aatcccaaca ctttgggagg ccaaggaggg tggatcatct
gaggtcagga gttaagacc agcctggcta acatggagaa atctgtctct actaaaaata caaaaaatta gccaggcgtg
gtggcgtgca ccagtaatct cagctactca ggaggctgag gcaggagaat cacttgaacc cgggaggcgg tgggtgcagt
gagctgagat catgccactg caccagcc tggcgacag aggaagactc tgtctc

FIG. 8G

MQTEDIRLEPDLYEACKSDIKNFCSAVQYGNAQIECLKENKKQLSTRCHQKVFKLQETE
MMDPELDYTLMRVCKQMIKRFCPEADSKTMLQCLKQNKNSLMDPKCKQMITKRQIT
QNTGKILAWLSWPRGVSEKEFSGCRVTCNSQGFVAWEF

FIG. 8H

27/74

ctgagaggaa gttttatctg tgcagccctt ctctgaggat ggacacttct cacactacaa agtctctgtt gctgattctt ctltggccc
tactgtgtgc agaaagagct cagggactgg agtggtacca gtgctatgga gtcccatitg agacttcttg cccatcaatt
acctgcccct acctgatgg agtctgtgtt actcaggagg cagcagttat tgtggattct caaacaagga aagtaaagaa
caatctttgc ttacccatct gccctcctaa tattgaaagt atggagatcc tgggtactaa ggtcaacgtg aagacttcct gttgccagga
agacctctgc aatgtagcag ttcccaatgg aggcagcacc tggacatgg caggggtgct tctgttcagc ctgagctcag
tctcctgca gaccttgctc tgatggctct cccaatgacc tccaccttg tcttttate ctcatgtgca acaattcttc ctggagccct
ctagtatga attatgagtt atagaagctc caagggtggga gtagtgtgtg aaataccatg ttttgccttt atagcccctg ctgggtaggt
aggtgctcta atcctctcta gggctttcaa gtctgtactt cctagaatgt catttgttg tggattgctg ctcatgacc tggaggcaca
cagccagcac agtgaagagg cagaattcca aggtattatg ctatccat ccacacataa gtatctgggg tcttgaatg
ttcccatg tatcctgaat gtccccctgt tgagtccaat aaaccctttg ttccccaaa aaaaaaaaaa aa

FIG. 9A

28/74

MDTSHTTKSCLLILLVALLCAERAQGLECYQCYGVFPFETSCPSITCPYPDGVCVTQEAAV
IVDSQTRKVKNNLCLPICPPNIESMEILGTKVNVKTSCCQEDLCNVAVPNGGSTWTMAG
VLLFSLSSVLLQTLL

FIG. 9B

atctgacaga acttgccact gtgcctgcaa ccttgtctga gaggaaccct tctctgagga tggacacttc tcacactaca
aagtcctgtg tgctcattct tcttgtggcc ctactgtgtg cagaaagagc tcagggactg cagtgtctacg agtgctatgg
agtgccaatt gagacttct gcccagcagt lacctgccgc gccctgatg gattctgcat tgctcaaac atagaattga
ttgaggactc tcaaagaagg aaactaaaga cccgtcagtg ccttcttctc tgcctgctg gtgtgccaat cagggatcct
aacatcaggg agaggacttc ctgttcagc gaagacctt gcaatgcagc agtccact gcaggtagca cctggaccat
ggcaggggtg cttctgtca gcctgagtc agtcgtctg cagacctgc tctgatggc ctccaatga cccccacct tttcttta
tctcatgtg caaccactct tcttgagc cctctagtga caaattatat gttatagaag gtccaatgtg gggatagtgt gtggaacacc
ctgttcacc ttatagccc ctgctgggtg agtgccgac tctctctag ggcttcaaa tctgtacttc ttcaatgcc attagtgt
ggattctat tcttgccct ggaggcatgt ggccagcaca tgcaacaggc agtatccaa ggtattatag tatcaccatc
cacacataag tatctgggt cctgcagggt tccatgtat gcctgtcaat gaccctgtt gagtccaata aaagcttgt tctccagcc
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa

FIG. 10A

30/74

MDTSHTTKSCVLILLVALLCAERAQGLQCYECYGVPIETSCPAVTCRASDGFCIAQNIELI
EDSQRRLKTRQCLSFCPAGVPIRDPNIRERTSCCSEDLNAAVPTAGSTWTMAGVLLFS
LSSVVLQTLL

FIG. 10B

gccccccccc gccagcccg tgcctataag gccttggcaa tgcaggggcc cgcactgctc ccagacgaca tcagagatga
ggacagcatt gctgctcctt gcagccctgg ctgtggctac agggccagcc cttaccctgc gctgccacgt gtgcaccagc
tccagcaact gcaagcattc tgttgtctgc ccggccagct ctgcctctg caagaccacg aacacagtgg agcctctgag
ggggaatctg gtgaagaagg acigtgcgga gtctgcaca cccagctaca cctgcaagg ccaggtcagc agcggcacca
gctccacca gtgctgccag gaggacctgt gcaatgagaa gctgcacaac gctgcacca cccgcaccgc cctgcccac
agtgcctca gcctggggct ggccctgagc ctctggccg tcacttagc cccagcctg tgacctccc cccagggag
gcccctcatg ccttcttc ctttctctg gggattccac acctctctc cccagccgca acgggggtgc caggagcccc
aggctgaggg ctccccgaa agtctgggac caggtccagg tgggcatgga atgctgatga cttggagcag gccccacaga
ccccacagag gatgaagcca ccccacagag gatgcagccc ccagctgcat ggaaggtgga ggacagaagc cctgtggatc
cccgatttc acatctctc tgtttgttg ccgtttatt ttgtactcaa atctctacat ggagataaat gatttaaacc agaaaa

FIG. 11A

32/74

MRTALLLLAALAVATGPALTLRCHVCTSSSNCKHSVVCPASSRFCKTTNTVEPLRGNLV
KKDCAESCTPSYTLQGQVSSGTSSSTQCCQEDLCNEKLHNAAPTRTALAHSALSGLALS
LLAVILAPSL

FIG. 11B

gctccggcca gccgcgggcc agagcgcgcg aggttcgggg agctccgcca ggctgctggt acctgcgtcc gcccggcgag
 caggacaggc tgccttggtt tctgacctcc aggcaggacg gccatcctct ccagaatgaa gatcttcttg ccagtgtctgc
 tggctgccct tctgggtgtg gagcgagcca gctcgtgat gtgcttctcc tgcctgaacc agaagagcaa tctgtactgc
 ctgaagccga ccatctgtct cgaccaggac aaclactgctg tgactgtgtc tgctagtgcc ggcattggga atctcgtgac
 atttggccac agcctgagca agacctgttc cccggcctgc cccatcccag aaggcgtcaa tgttgggtgtg gcttccatgg
 gcatcagctg ctgccagagc ttctgtgca atttcagtgc ggccgatggc gggctgcggg caagcgtcac cctgtgggt
 gccgggctgc tgcctgagcct gctgccggcc ctgctgcggt ttggccctg accgcccaga ccctgtcccc cgatcccca
 gctcaggaag gaaagcccag cctttctgg atcccacagt gtatgggagc ccctgactcc tcacgtgcct gatctgtgcc
 ctgggtcca ggtcaggccc accccctgca cctccacctg cccagcccc tgcctctgcc caagtgggcc agctgccctc
 acttctgggg tggatgatgt gaccttcctt gggggactgc ggaaggagc aggggtccct ggagtcttac ggtccaacat
 cagaccaagt cccatggaca tgctgacagg gtccccaggg agaccgtgtc agtagggatg tgtgcctggc tgtgtacgtg
 ggtgtgcagt gcacgtgaga gcacgtggcg gcttctgggg gccatgtttg gggaggaggg tgtgccagca gcctggagag
 cctcagtccc tctagcccc tgcctggca cagctgcatg cacttcaagg gcagcctttg ggggttgggg ttctgccac
 ttccgggtct aggccctgcc caaatccagc cagtctgcc .ccagcccacc cccacattgg agccctcctg ctgcttgggt
 gctcaaata aatacagatg tcccc

FIG. 12A

MKIFLPVLLAALLGVERASSLMCFSCLNQKSNLYCLKPTICSDQDNYCVTVSASAGIGNL
VTFGHSLSKTCSPACPIPEGVNVGVASMGISCCQSFLCNFSAADGGLRASVTLLGAGLLL
SLLPALLRFGP

FIG. 12B

actgtgctg caacctggc agagaggaag taaggactgg tgcaggagg gagctgctag gttgatctg tgcagccctt
ctccaaggat ggacagtgt cactacaa agtcctgtgt actatcctt cttgtggtcc tattgtgtgc agaaagagct
caggggctgg agtgctataa ctgcctggga gttcacttg gaattgcctg caaatcaatt acctgcccct acctgatgc
agtctgcatt tctcagcagg tagaacttat tgtggactct caaagaagga aagtaaagaa caaactctgc ttctcttct gccctgtaa
tcttgaat atggagatcc tgggtactac tgtcaacgtg aatacttctt gtgcaagga agacctctgc aatgcaccat ttccactgg
aggcagcacc tggacatga caagggtgct tctgttaaat ctgggctcgg tcttctgca gacctgctg taaaaggctc
tccaaggac ctccacctt gttgtttat cctcatttc aactattct tctggagcc ctctagtat gaattatgag atattgaagc
tccaagggtg gagtagtgt tgtggaatac gtgtttcaa ctctatagcc cctgcttggt aaatgcccc ctctctcta ggaattcaa
atatgtact cctagaatgc cttttgtg tggcttgcta atctggccc tggaggccc tggctagcag agggtagagg
cagaattcca aggtattaag ccatcaccat ccacacataa gtgtctgagg tctgcagga ttctcatgta tgcggctta tgcctctg
ttgagtcaa taaaccttt gtctcc

FIG. 13A

MDSCHTTKSCVLILLVVLLCAERAQGLECYNCLGVSLGIACKSITCPYPDAVCISQQVELI
VDSQRRKVKNKLCFPFCPANLENMEILGTTVNVNTSCCKEDLCNAPFSTGGSTWTMTR
VLLNLGSLVFLQTLL

FIG. 13B

37/74

ctgcagccag gctgagagg aagtaaggac tgggtgcagg agggagctgc taggtgacaa agggaagaac cctcaggata
gggctgtggt gggagtgaga ttaggaaaga agagctgggt ggggtggtgga tgagagaagt aggcagacat gtattcctca
gggaaagctg tgtagagggt tggaggaggagg gaatattgga tggctgagcc gtgtgagagc ccaggggtgt gatcaggggt
ctattaactg gctccaactt ccaaggttt atctgtgcag cccttctcca aggatggaca ctctcacga gataaagtcc tgtgtgctga
tccttctgt gacctactc tgtgcagaaa gagctcaggg actggagtgt taccagtgt atggagtccc atttgagact tcttgccat
cattacctg ccctaccct gatggattct gtgtgtctca ggaggaagaa ttattgcaa actctcaaag aaagagagta
aagagccgtt ctgccaatcc ttctgccct gatgaaattg aaaagaagtt taccctggat cctaacacca agatgaatat ttctgttg
caggaagacc tctgcaatgc agcagttccc actggaggca gctcctggac cacggcaggg gtgttctgt tcagcctggg
ctcagtcctc ctgcagacc tgatgtgatg gtccccacc

FIG. 14A

38/74

MDTSHEIKSCVLILLVTLLCAERAQGLECYQCYGVFPFETSCPSFTCPYPDGFCVAQEEEFI
ANSQRKRVKSRSCHPFCPDEIEKKFILD PNTKMNISCCQEDLCNAAVPTGGSSWTTAGV
LLFSLGSVLLQTLM

FIG. 14B

gttatcagag gtgagcccggt gctcttcagc ggagaagatc cctacctgg ccgccggcca cttctgtgg gccgtgggggt
 cctcaaggag acggcccttg ggctcagggg ctgcgttcc acacgcgcct tcccagggc tcccgcgccc gttcctgcct
 ggccgccggc cgtccaaca gcagcacaag gcgggactca gaaccggcgt tcagggccgc cagcggccgc gaggccctga
 gatgaggctc caaagacccc gacaggcccc ggccgggtggg aggcgcgcgc ccggggggcg gcgggggtcc cctaccggc
 cagaccggg gagaggcgcg cggaggctgc gaagggtcca gaaggggggg gaggggggcgc cgcgcgtga cctccctgg
 gcaccgtgg ggacgatggc gctgctgcc ttgctgtgg tcgtggccct accgcgggtg tggacagacg ccaacctgac
 tgcgagacaa cgagatccag aggactccca gcgaacggac gagggtgaca atagagtgtg gtgtcatgtt tgtgagagag
 aaaacacttt cgagtgccag aaccaagga ggtgcaaatg gacagagcca tactgcgtta tagcgccgt gaaaatatt
 ccacgtttt tcatggtgc gaagcagtgc tccgtggtt gtgcagcat ggagagacc aagccagagg agaagcgggt
 tctctggaa gagccatgc cttcttta cctcaagtgt tgaataac gctactgcaa ttagagggg ccacctatca actcatcgt
 gtcaaagaa tatgtggga gcatgggtga gagctgtgtt gggctgtggc tggccatcct cctgtgtgtg gccctcatg
 cagccggcct cagcctgtct tgagccacgg gactgccaca gactgagcct tccggagcat ggactcgtc cagaccgttg
 tcacctgtt cattaaactt gtttctgtt gattacctt tggttgact tcccagggtc ttgggatggg agagtgggga tcaggtgcag
 ttggctctta accctcaagg gttcttaac tcacattcag aggaagtcca gatctctga gtagtgattt tggtgacaag ttttctct
 tgaaatcaa cctgttaact catttatgc tgatggccac tctttctt gactccctc tgcctctgag ggcttcagta ttgatgggga
 gggaggccta agtaccactc atggagagta tgtgtgaga tcttccgac cttcagggtg acgcaggaac actgggggag
 tctgaatgat tgggtggaag acatccctgg agtgaaggac tctcagcat gggggggcagt ggggcacacg ttagggtgc
 cccattcca gtgggtgagg cgtgtggat ggctgcttt cctcaacctt tctaccaga tccaggagg cagaagataa
 ctaattgtt tgaagaaact tagacttcac ccaccagctg gcacagggtc acagattcat aaattccac acgtgtgtgt tcaacatctg
 aaacttaggc caagtagaga gcatcagggt aaatggcgtt catttctctg ttaagatgca gccatccatg gggagctgag
 aaatcagact caaagtcca caaaaaaca atacaagggg acttcaaaag ttacgaaaa aattgaatta aaagataaaa attaa

FIG. 15A

40/74

MRLQRPRQAPAGGRRAPRGGRGSPYRPDPGRGARRLRRFQKGGEAPRADPPWAPLGT
MALLALLLVVALPRVWTDANLTARQRPEDSQRTDEGDNRVWCHVCERENTFECQNP
RRCKWTEPYCVIAAVKIFPRFFMVAKQCSAGCAAMERPKPEEKRFLLPEMPFFYLKCC
KIRYCNLEGPPINSSVFKEYAGSMGESCGGLWLAILLLLASIAAGLSLS

FIG. 15B

ggagagagca ggacacagct atggatgccg ccaggagagg agatacacag ccagtgatgt ggaccaccgg atggctgttg
 ctgctgccgc ttctgctgtg tgaaggagcg caagccctggagtgtacag ctgcgtgcag aaggcggacg atggatgctc
 tccgcacagg atgaagacagtcaaagtgg tccgggggtg gacgtctgta ccgaggccgt gggagcggta
 gagaccatccacgggcaatt ctctgtggcg gtgcggggct gcggttccgg aatcccgggc aagaacgaccgcggactgga
 ccttcacggg ctctggcct tcttcagct acagcagtc tccgaggaccgatgcaacgc caaactcaac ctactttgc
 gaggccitaa cctgcaggc aatgagagtgcataatgagcc taacggtgca gagtgtaca gctgtgtggg tctgagccgc
 gagaagtgccagggctccat gccgccggtc gtgaactgct acaacgccag tggccgtgtc tacaagggtgcttcgatgg
 taacgtcacc ctgacggcag ccaacgtgac cgtgtcctta cctgtccgagggtgcgtcca ggacgagacc tgcacccggg
 atgggggtgac ggggtccagga ttcacaticagcggctcttg ctgtcagggc ccccgctgta acgccgacct tcgcaacaag
 acctatttctcccctcgaat ccaccccta gtctgtgtc cccctccaac caccgcagcc ccatccactcgggccagaa
 ctctccagc acgacctta cagcagcccc aaccacgacc acctccatcatcaagcccac cacagccaa gccagccaca
 ctctcccca tgaatggat ctgaagtcatacaggaaga gggggcgtcg ttgagtggag gtgctgcggg ccatggagggt
 actgcgggcatggagggtgc tgcggggcac caagaccgca gcaatatgga gaagtatcca ggaaagggtg gggcccagat
 cccagctaaa ggaggctctg gcactctagg gtctgtgtg tctgcagttc tgttgactgt ggttgctggc gcgatgctgt
 gaatgtctca tctgaaaag tccatctcac ttgtttccc tggccccgtg gtaccaatic ttccatttc tcaactgact ggactggctc
 cgccccatc cttagcatt ctacgtccg actgcactgg ttgcagctt cggaaaacag tctctgttg taaatattcc gctcgggtgg
 ccctactttt ttgatgcggc cacagcattc cccctgatgg tgaccaggac agagggaaga gacgtctact ggttgagaga
 ggcccagaga gtccacggca agcctcctct tcccgtttc ctgaccaggc tggaagatga ccaggcaggt agacaatgga
 tccatcctcc gagcactgtg ctgtcctggc acattgtgcg gaaatctggt cgcctgtctt ccttaggaga ctgtgaacaa
 ctctacaaca gggctctgtc tctggcctct ctatgtgtc tgtctggcac aggaaggtgt caataaagat ttagttactt tgtatagtga
 gttactaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

FIG. 16A

MDAARRGDTQPVMWTTGWLLLLPLLLCEGAQALECYSCVQKADDGCSPHRMKTVKC
GPGVDVCTEAVGAVETIHGQFSVAVRGCGSGIPGKNDRGLDLHGLLAFFQLQQCSEDR
CNAKLNLTLRGLNPAGNESAYEPNGAECYSCVGLSREKCQGSMPVVCYNASGRVY
KGCDFDGNVTLTAANVTVSLPVVRCVQDETCTRDGVTGPGFTLSGSCCQGPRCNADLRN
KTYFSPRIPLVLLPPPTTAAPSTRAQNSSSTTSTAAPTSTTSIIKPTTAQASHTSPHEMDLE
VIQEEGASLSGGAAGHGGTAGHGGAAGHQDRSNMEKYPGKGGAQIPAKGGSGLGSW
LSAVLLTVVAGAML

FIG. 16B

tcgtccccc cgccgtgcc gccgctgagc ccggagtgcg gacaccccag ggatgcctgc gcccagagg accccgcct
 gcagcccccg cgctcttc aggccctatc ggagcatgctgcctgcagcc atgaagagcc tcggtctggc gctgctggcc
 ttgcttctc gcccctgcggcccatggc ctgtggtgcc aggactgcac cctggccaat tccagccatt
 gcgctccgaagcagtgccag cccaccgata ccgtttgtgc cagcgtgcgg atcaccgacc ccagcagcagcaggaaggat
 cattctgtga acaagatgtg tgcttctcc tgcgacttcg itaagcggcactttttctca gactatctga tggggttcat taactctggg
 atctaaaag tcgacgtggactgctgcgag aaagatttgt gcaacggggc atcggtcgca ggacgcagcc
 cctgggccctggctgggggg ctctgtca gcctggggcc tgcttctc tgggctgggc cctaagacccctccctccct
 cctgctgggc ttggagctt gtcccctaag cctgttgctg cccctcccagcctggcctg gctggggctg ggacagcaag
 ggittggcat caaggtctga ggctctcaaccctccctagat gtgagtgagc ctctccgtt tctccaccag ctccatacc
 caagcagctgaatatctcca ggagtccaga catcctggca ggaagctggg gtagggggga gggggagggaaggaggactga
 gaccctccag gtctccaagg ggaggagggt caagccaggg acagcccaacagcctggcct gaggggcatt aactacagag
 aaataaagtc actctgagt ctgtgaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa

FIG. 17A

MPAPQRT PACSPRASFRPYRSM LPAAMKSLGLALLALLCPSPAHGLWCQDCTLANSSH
CAPKQCQPTDTVCASVRITDPSSSRKDH SVNKMCASSCDFVKRHFFSDYLMGFINS GILK
SRRGLLRERFVQRGIGRRTQPLGPGWGAPVQLGAWLFFGLGPKTPPSLLVGFGACPLSL
LVPLPSLAWLGLGQQGFGIKV

FIG. 17B

agaagaggcg agacttttt ggggtgctccg gatcgccagt agttcttcaa gcctcagcag ccaactctc cggaggcgct
 gcgctccgcc ccaggggagcg cgaatccaag gagcctgggaccagcctctg ggagcccccg gcgcggggoga tgcggggcgcc
 gcggggcgaca cctgcggctcctctcggtgg cagccgtcgc ttgggcggca gcagcgcgag cctcgggcagc
 ctggcagctactgtcgccg cggccagaac agcctccgt gcggtcgtgg tctctgatgc tcttgcccgtcccgccct
 gccgatccgg gaggatgtgg gttctcgga tcgcagcaac ttttgcggattgttctggc ttccagggtt ggcgtgcaa
 attcagtgt accagtgtga agaattccagctgaacaacg attgctcgc ccttgagttc atcgtaaatt gcaccgtgaa
 cgttaagacatgtgtcaga aagaagtgt ggagcaaagt gctgggatca tgtaccggaa gtcgtgtgcatcgtcagcag
 cctgtctcat tgcctcagct gggfaccagt cttctgttc cctgggaaactgaactccg tgtgcatcag ctgctgcaac acccctctt
 gcaatgggcc gaggccaagaagagaggca gctctgcctc ggccatcagg ccagggttc tcaccactt
 cctgttctccacttagccc tctgttggc acactgtga agctaaagga gatgccaacc cctgtgcctcacctgtctg gcccttctc
 tctaccttc ccgagtctt tctgggtgtc cttttattctggtagacaa gggagcttt ttgtccctc ctttaagla acgcaagatt
 gccgtgcacaaatactttt taagctctga accaattcat tctgaattc tgtgtgtagt tgaagaaaaagcatggagc agaaagtcca
 gacctccca tcccaatctg gtttaaccacc gccaaaggcta gcctggaaga accagccctt agaagtcatt gagatacgca
 tctgccttc ccaaagcctt gagcttccat tctgtcccag taggagtcac agtctattca gagactgtctg ctgctggaag gtaactttgc
 ttttgcggga ggggagagcc agtttcggct caaggcttct gaacttgcca ttcatactc ctgctcctgt aaactattt ctgggttggg
 ccagctggt ttggtctctg agccagtctg tggtagtca ggactcaagg gctggggctt agcctctcca ggcttggcct
 cagtctgaaa agtgcttaag aaaacctgt tagttcctt ggaggaagag ttactgcgc gggaggctag gaagatgagg
 gggctgcggg ctgagctggt gctgtcctt gtggagatga agcgggcacg ctggcgctt tcttggttgg catgctgag
 agtcaggcgg cagcagagca cctgccagaa caccctcgg aactgctgag aggacacgtt gtagaggaga gggttgacca
 cagagctgag gtagaagaag gtatcagaga agggcaggag gatcatgtat gccctgaagt acgttctggt ccagtcagt
 ttgggtttt ctgcagccat gatccgtcgg atctgattgg gcatccaaca cacggccaac gtcaccacaa tcagtcttgg
 caggcaagaa caggagagaa aaggagacgg ggagagaaac agcatgagaa caaaaataaa taaataaaaa ccataaaat
 attaaagccc ttggttctgt tgcctactgg ccgagaaacg gtaccaatct ttcagctctg tcttctcgg cttcttttgc cacttgcaa
 aggagaattt aatgctgctt caagctcagg ggacttggct atgttaaaaa gcgttaaatg ctttcgacag tgtatttata cttacggctg
 cctgttaatt tcaaaatgt ttcatgtt gctcgtgtat ccagaaaata tctcacgttg gccaaaa

FIG. 18A

46/74

MWVLGIAATFCGLFWLPGLALQIQCYQCEEFLNNDCSSPEFIVNCTVNVQDMCQKEV
MEQSAGIMYRKSCASSAACLIASAGYQSFCSGKLNSVCISCCNTPLCNGPRPKKRGSSA
SAIRPGLLTLLFFHLALCLAHC

FIG. 18B

47/74

ggcaggcctg agtgaggacc tcgaccatgc aggggacctg gatggtgctg ttggcactga tattgggcac cttcggggag
cttgctatgg ccttacagtg ctacacctgt gcgaatcctgtgagtgcac caactgtgtc accaccaccc actgccacat
caatgaaacc atgtgcaagactacgctcta ctccctggag attgttttcc ctttcctggg ggactccacg gtgaccaagtcctgccag
caagtgtgag ccttcggatg tggatggcat tgggcaaacc cggccagtgtcctgtgcaa ttctgacctg tgcaacgtgg
atggggcacc cagcctgggc agtcctggcctgctcct tgcctggca ctttcttgc tcttgggtgt cctgctgtaa
agccatggccatctagctcc actccctgt ccctgacac ccagttccct aatgcctaga agaaatacaatggccatctg
caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa

FIG. 19A

MQGTWMVLLALILGTFGELAMALQCYTCANPVASNCVTTTHCHINETMCKTTLYSLEI
VFPFLGDSTVTKSCASKCEPSDVDGIGQTRPVSCCNSDLCNVDGAPSLGSPGGLLLALAL
FLLGVLL

FIG. 19B

atgcttttta tggcaggccc tgcagccagc tggccctga gggccctggg actccatggc gtccccaag cttgtgtgc
tgtctctta acagtgtgg tcatgaagac ctgggtctcgggtatacca agctcgagga ccttcaccct cagtcctcc cactaaaca
gtacctgaattgtaccgat gtctgtgga gaccgaagag ctgggggtgcc tcctggggtc tgacacctgcctgacacctc
tgggcagcag ctgtgtcacc ctgcacataa agaacagcag cggttttaatgtcatggga gcgactgcta cagcaaggag
cagatggcc attgtcata taccgtgttccccgggt ttggcttttg gatattctat cagtgttgct tcctggattt
ctgcaacaatccggacaaca gaaagaatag catgcactag

FIG. 20A

50/74

MLFMAGPAASWSLRPLGLHGVPQALCAVLLTVLVMKTLVLGDTKLEDLHPQSLPLNKY
LNCYRCLETTEELGCLLGSDTCLTPLGSSCVTLHIKNSSGFNVMVSDCYSKEQMVHCSY
TRASPVFGFWIFYQCCFLDFCNPDPNRKNSMH

FIG. 20B

agagctggag acctgggaat ctgctgtcaa ctgctggggc tgtggacatt ctcaggacce tcaccatgaa acacctcctg
ttgtcacc ttgttgcctt actctactgc tgggtctcagctgatactcg atgtcactcc tgctacaaag tccctgtgct gggctgtgtg
gatgccagtcctgccgcct ggagccgggc cacaatgcc tgacaacaaa cgtgtacctt gggaagatgtgggttttctc
taacctgcgc tgcggcacac cagaagagcc ttgtcggggag gtcttcaacgaaaccaacca taagctgggc ctgaactaca
acaccacctg ctgtgacaag gataactgtaacagccggc tccacggccc acaccgcac tggccctcat ctcctcacc
tccttggctggcctcggcct ctggttattg cattgagact agctccatgg ctacaatctt accacctgctatagcctgag cttttctcc
tgttctca gagctccagc ttccagaat ctctctctcccacccct tttctgaag atcatgtccc tagtctata ccatttatt
catgggactgtacctggag ggctttcta gccaccgctc ctctccctca ctgtcacct tccactccattccaccaca cacagacaca
cagacacaca gacacaaaga cacacacaca cacacacacacacacaca ccagtcctt tccatttcc ttctagaaca
ctctacctcc tccactggccactgaaaggc tccctcctt ggacgcacac tgcgtgcct ctgggatcta agtctggaagaactcctgtc
ttgtctccag ggagtgttc caaaaggcgc tggcctcatt gcatgggcctggcttaccag accctctgct tctcccttc tatcttgaga
aataaacatc agtgtcta

FIG. 21A

52/74

MKHLLLLTLSALLYCWVSADTRCHSCYKVPVLGCVDRQSCRLEPGHKCLTTNVYLGK
MWVFSNLRCGTPEEPCREVFNETNHLGLNYNTTCCDKDNCNSPAPRPTPALALISLTS
LAGLGLWLLH

FIG. 21B

gcctacttgg cctgcctgcg atgcggtacc aacaccgcac gaagtgtgta cagattccca gttagacagc aggagggacc
 tgggagcggc cagggggatg ttttatctct aagagaccaagagctcaggc agggcttctg tgccctgctt cctccctggc
 ttgagctgga tcttgaccagctgctgacc tctgttcac tctggcactg ccttcacgic tccgtcatga cccatctgctcacagtgtc
 ctgggtggccc tgatgggcct gcctgtggcc caggctctgg agtgccacgtgtgtgcctac aatggagaca actgcttcaa
 acccatgcmc tgcccagcca tggccacctactgtatgacc acacgaactt acttcacccc ataccggatg aagggtagga
 agtctgtgtccccagctgc ttgaaaccg tgtacgatgg ctattccaag catgcatctg ccacctctgttgccagtac tacctctgca
 acggtgctgg ctttgcctacc ccggtgacct tggccctgggtccagcactc ctactacct tctggagctt gctgtaaacg
 tgggtcccc aagccagatccactcaaag caacactctc aaaaaacaca gtttccctct ctctcccaat tcactccaccaacgctctt
 cctctgaca ctctcaact accacgaggt cccatggcta cctacgaaagaactgatggc atccagatac ctactcaa ggtcatttc
 agaaggtga catgtggacctgtaatgtgc ccacctatgg gtggggcagg ctgggcttct cctctacca
 agatcaggggcatctgggag aatgtttatg gaggaggggt catcactcaa gtcaaggagc actgattgatagaattagt
 agccaaactc caccttcaga accctgcctc agtctacca gtagaggatgggtctgtag aggtgagggg aggagagcgg
 cggagaataa cgagctggct agaagcagag aaagactcag cagggtctgc tccgaagatc agcgcggctt gccagagcaa
 atgtgatgtg gaagccatgt gaggaagccc ttgtcatctt ccacttatct gaggaactct gccagacctg atgttgggat
 agccattggc caagggttcc tagcaacggc gtcatttcca tagggcactg aaatccctcc agccccagct cagcagggcc
 cttgacctcc actacagtcc ttcattcaca caccagctgc tgggccttga agttggcagg gacttgggag caggtgacct
 atgctatctt ttgtctggcc tgttattctg ggcatggcaa gaagggatca gacgcaggct agagcagggc agtagggcga
 ctgagacagg gaaacagact tcagccagtg gcttcccagg tccgtaggc agctcctaca tcttcagtc tctgttaca
 tccccgggag acaaatatac agggagccaa gccgagtgt aggtgatgac tgcctgtgaa gtctatttg gccacagact
 gctgggtacc aagtctcagg agaaccagc ctgatttag gagacacaga tctgccttc atgcagtga gctgtccttg
 ggagccttac catgctctct aactagtacc tcaactcaca tgtcactgag gaaccccta aactggccc agccagggg
 tcgggatgct ggccaatgtc catggagtgg gactacccat ggagagtcct tgggtcatca catcacaat gtttattcc
 aacctcccag tggtagagc tggggacaca aagggtccatc ctggggacct tcttctggt tctaggcaga cctgaactct
 gtctgtgct agagctgat tggtttccg cctcagtttc ctctccggg gataggccac cggaggattt gggaggggtg
 ggagggcatc ctgctgatgg gctcgccgag gttctcagga acaggaacgg gcggggcttt agtacacagg tgagtgggt
 gggaaactggc ccggagctga ggagacactg actgggcaga gggaaagatga gtctcaaggg agggcaggaa aaggagggg
 gagcgcgcat gcacatgtgc actcagtga ggctacagag cccaaaaggc agcactggct gtggtgtccc ctgaggccca
 ggcaagatgc taggaggaag ccaatgtgc cccacctga gctcacatgg aacatgcaca ccaccagcag cagcagcaag
 catlgagact gacctgtgga cgccataggg cactggcaag gagggtcaga ggcgggtccc tgactcagt ggtgaggccc
 gggaaacatt atcctgttac cctgcgtgtg caagatcatt gtccccagt

FIG. 22A

agatggcgtc ctcaacaaa actgagagga gcccagttc aggtcctccc tctaccaca agggggtggt gtggaggagg
 cttgattgcc cttggagaag caccggtact gcagagctgg gggccagctt ctttcatctg tgtctagaca ccgaccagat
 agggcccaca gtggcaacac tgccacacag ccctacaaga agccctgtgc ctagctagca cagagcccca aaaggtgctc
 aattaataca gggccaagcc tgccagtggg ggggatgcag attaggggaa cagaccaga tggcctgtcc tgaaccctgt
 ctgggggtggt gtgatgagca tctgtctagc ccactgcagg tggctctaca cactccaca cagttctgca aaagtgtatg
 aggtggtcat tactgcgcc ctctcacagg taaaggcact gaggcacgga ggagtgaggc acttcattt cctgggcat
 tcaactttcc aggaccaaca cattcaacta tgggtactac tccaatagct ggggttctt gaggtgggc cccctgaaga
 tgatagtggc ttcataacc agagaatttc agagtgcagt gtttaggag cctatgaacc tgaaatgca gaactggagg
 tttaggggc tgaggggtag gccaggggtg tctggccct tgtgtggaga cagagagaga gggaacatgg gatggggtag
 tagagagaag tgcaaaggag cgtcagcctt tctcagggt aatgctgtca gggacgaggg ctcaagcctg tgagtgtct
 cacactgtga taaacagtgg cccctcaaca cagacggtgt ccagagtggc cggcagtggt tatctagagt tgcaatctgg
 aagcctttg gtagtcactg gagagaggcc gcttgatggg acagcaccaa atgtgtgtgc ttctgtgga tgtgaggaag
 ctgggtcagc gcatgaagcc aaagcgtcct tcagagcaga ggggtggctg gtctagtcca ccagagacaa gctatccagt
 gagagtcata ctctgccacc gtctctgtga ttacctacc ccaaagcaga cggggacggg atgcagagca cccgtgtctt
 catcttctgc ggcaagcag tgagttcaca ttctgaaact ctgaaagat ttccaggagt ggggtgtgcc ttgctttgg tgcattgta
 ctcttgga agcaccgtgg catcccag cactgagtga cctgggtcc tcaagccatc tcattggtga aatgacagt
 ccagtacct ctcagctggc tcttgaggc ctgtgcatgg ggtctgcaca gaggaggccc ccaaactatg catggacgga
 cacgtgatgc ctgacattc ccttggtgt gtcttgcca acccagggt ctacccagc aaggaaatga aatccattt
 tatgacacat ctccctccc cagccagctc cattcaccta tatgccagg tggccctt caatgtctgt ccccatgg atgaataaac
 aagcgaagga ca

FIG. 22A (CONTINUAÇÃO)

MTHLLTVFLVALMGLPVAQALECHVCAYNQDNCFKPMRCPAMATYCMTTRTYFTPYR
MKVRKSCVPSCFETVYDGYSKHASATSCCQYYLCNGAGFATPVTALALVPALLATFWSL
L

FIG. 22B

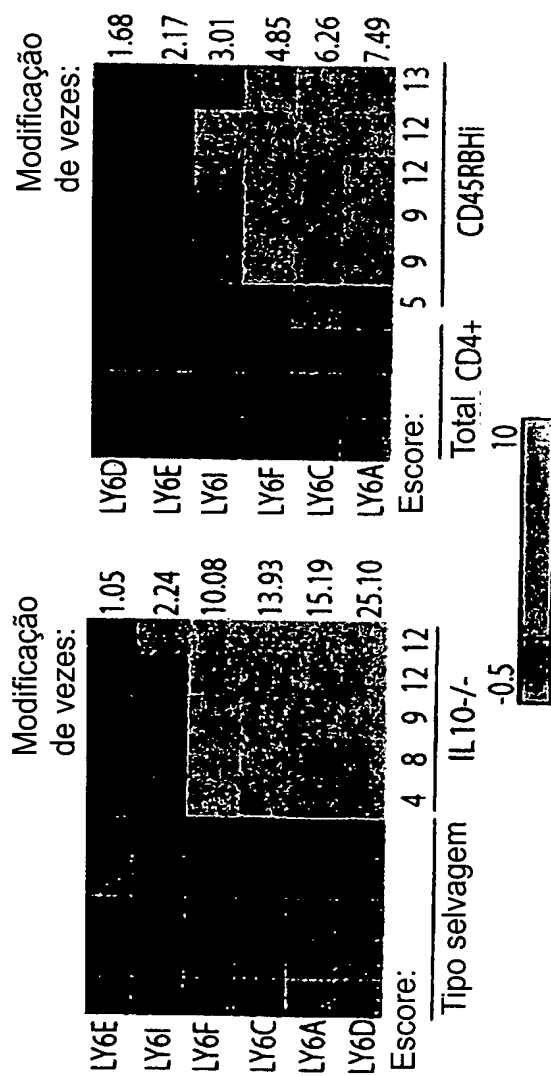


FIG. 23A

FIG. 23B

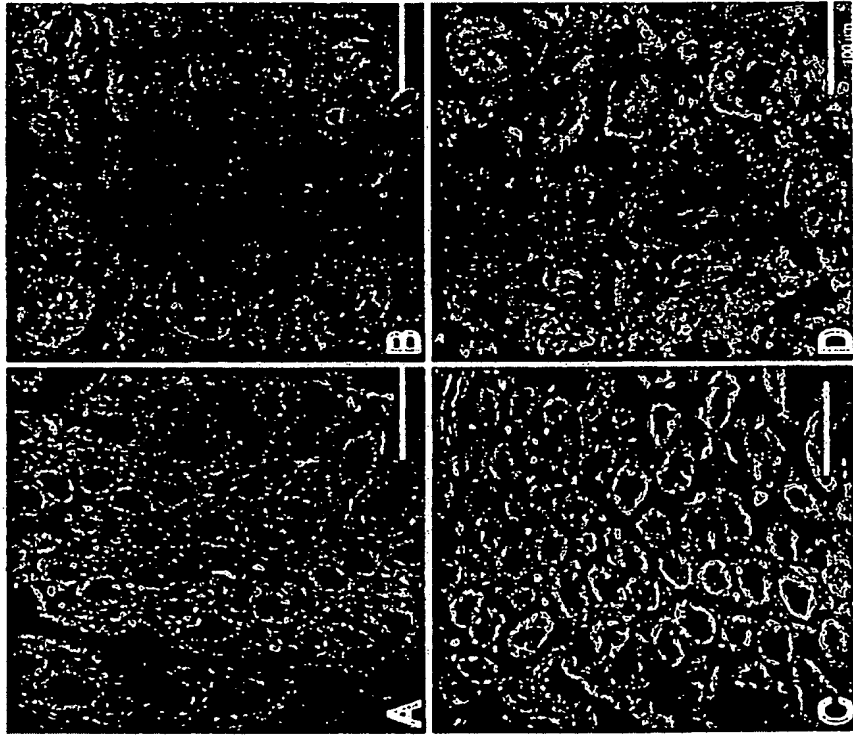


FIG. 24

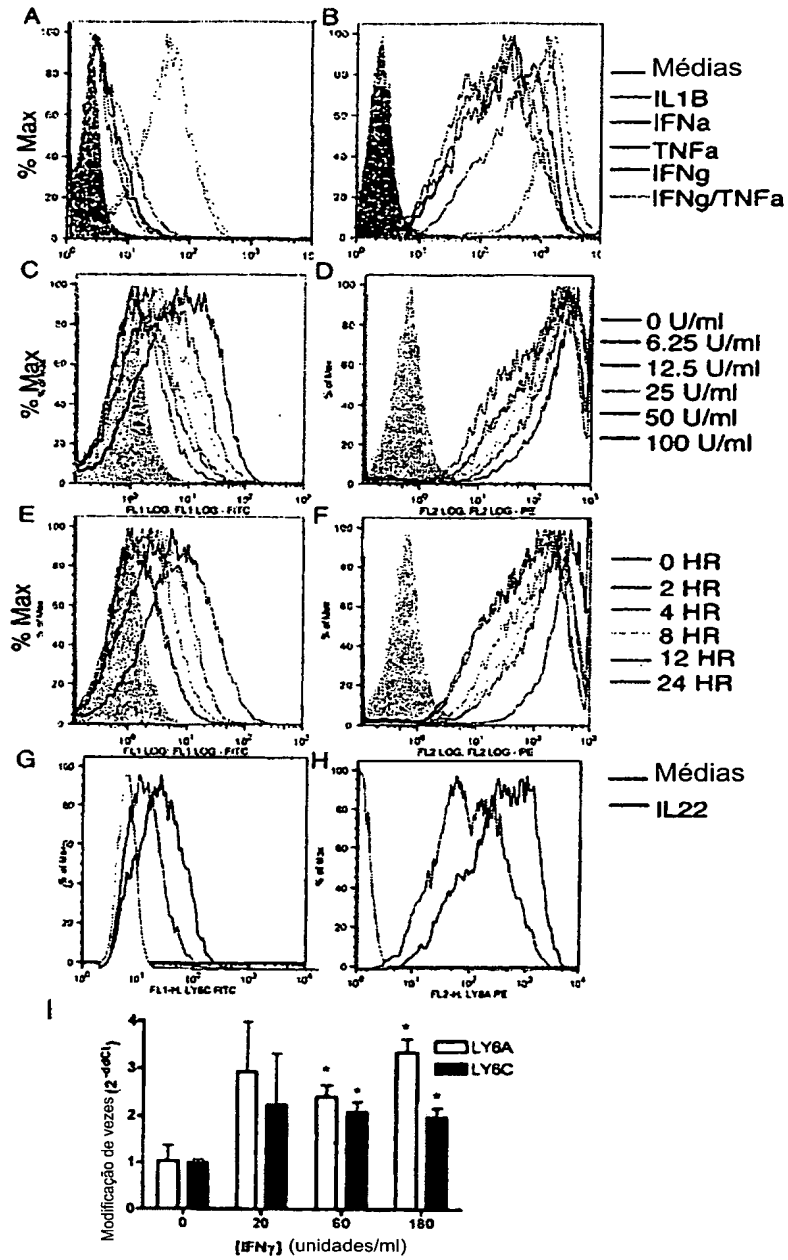


FIG. 25

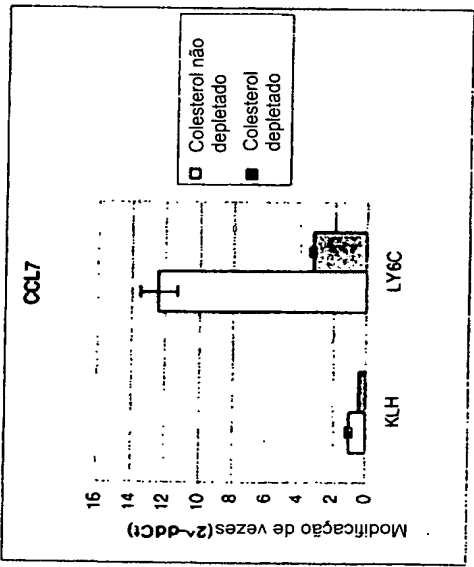
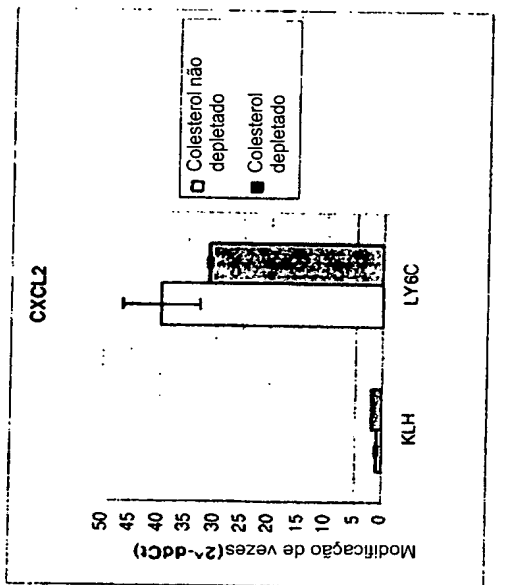
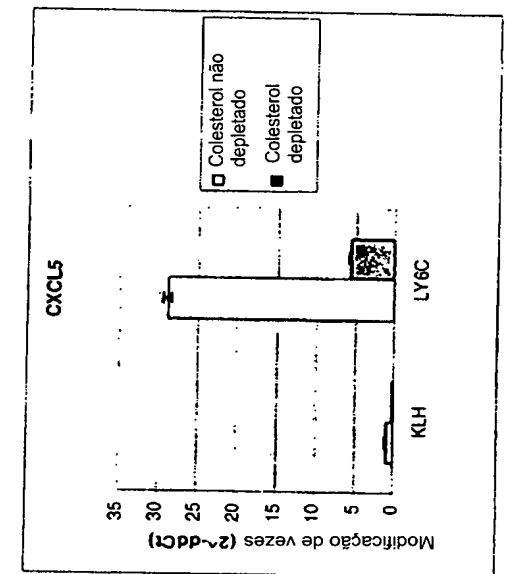


FIG. 26

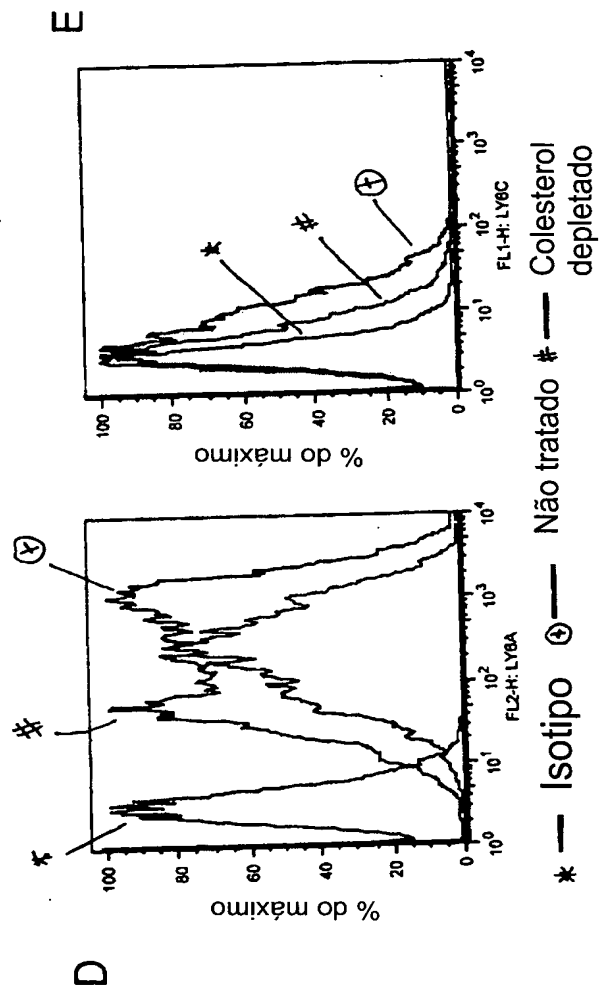


FIG. 26 (CONTINUAÇÃO)

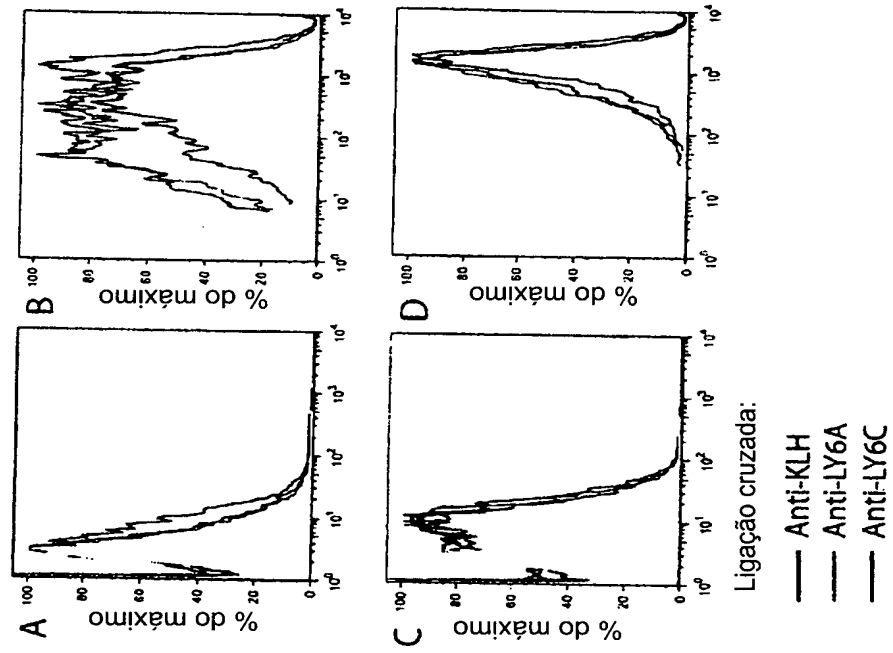


FIG. 27

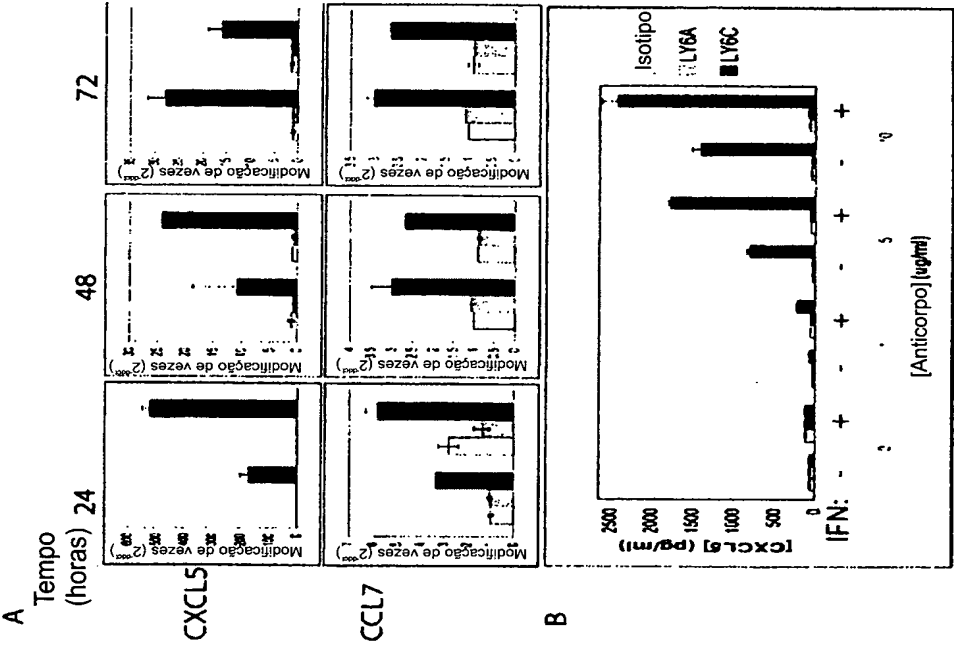


FIG. 28

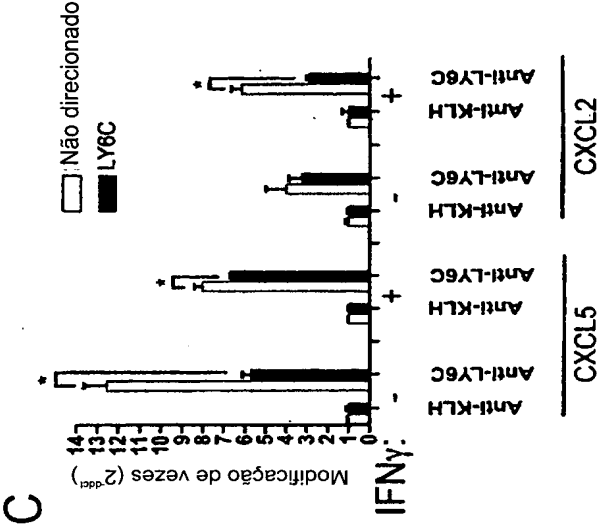


FIG. 28 (CONTINUAÇÃO)

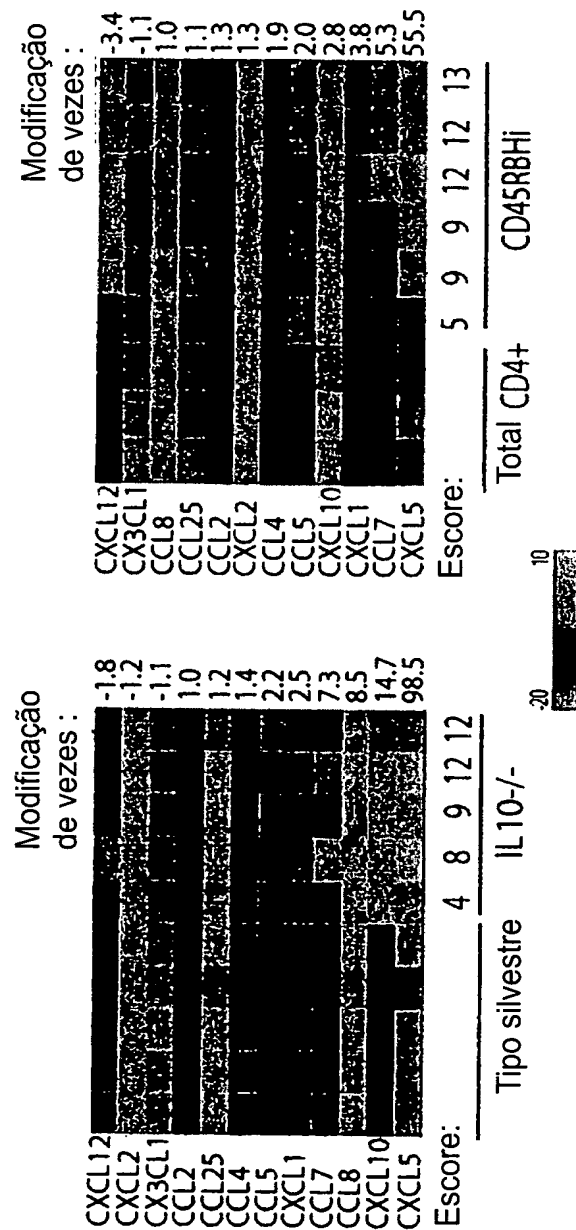
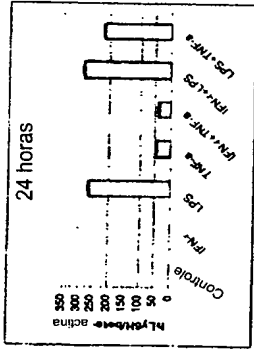
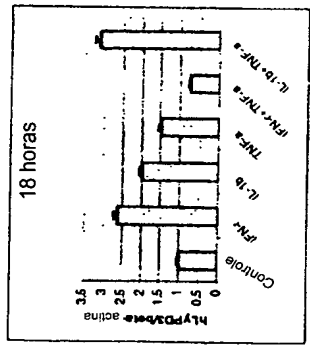


FIG. 29A

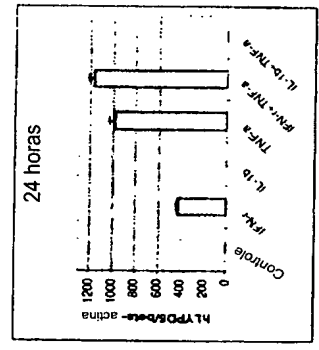
FIG. 29B



A



B



C

LY6H

LYPD3

LYPD5

FIG. 30

LYPD1

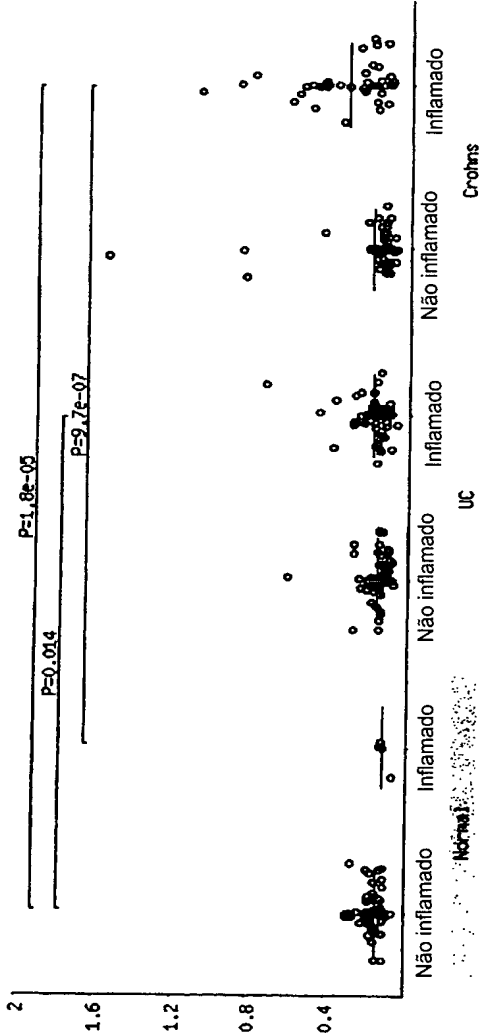


FIG. 31A

LYPD5

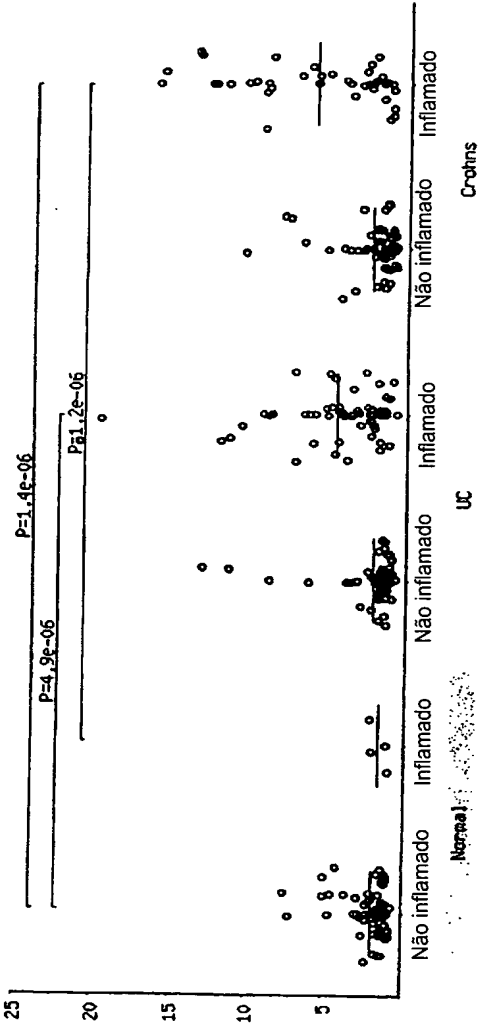


FIG. 31B



FIG. 32A



FIG. 32B

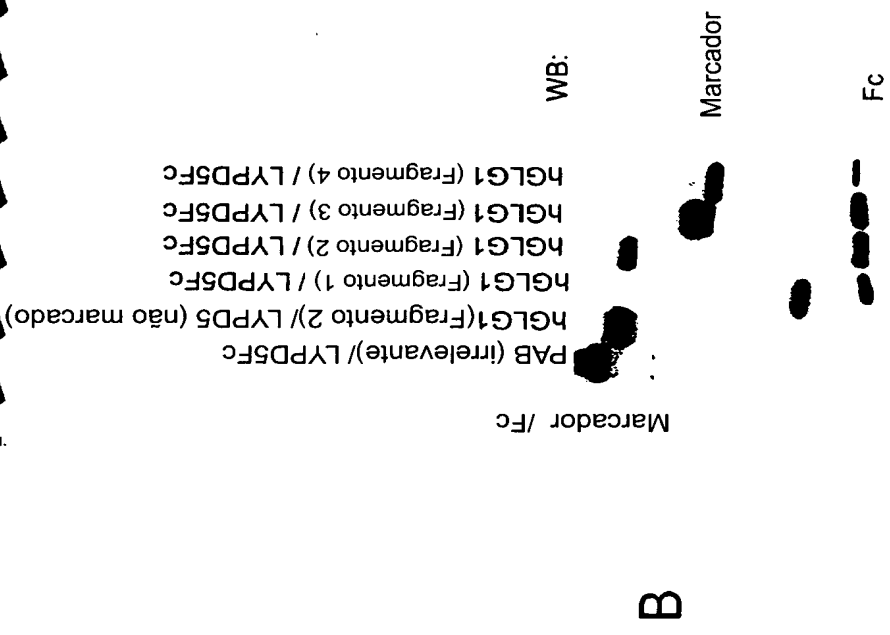
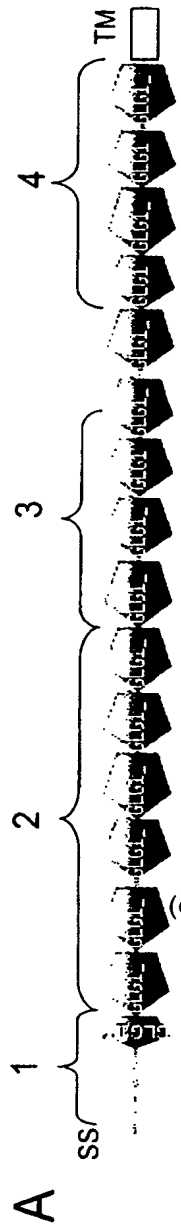


FIG. 33

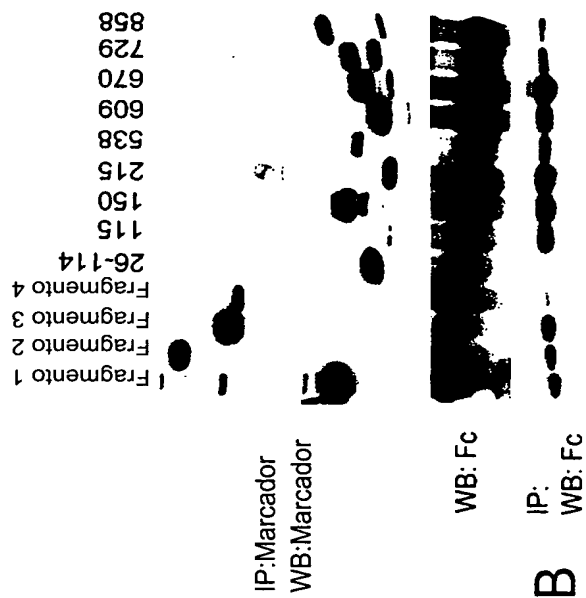
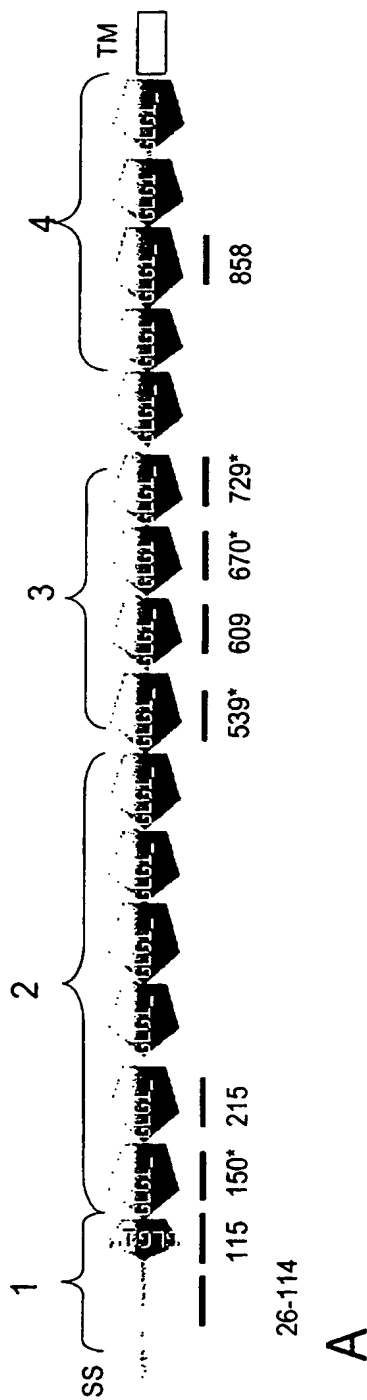


FIG. 34

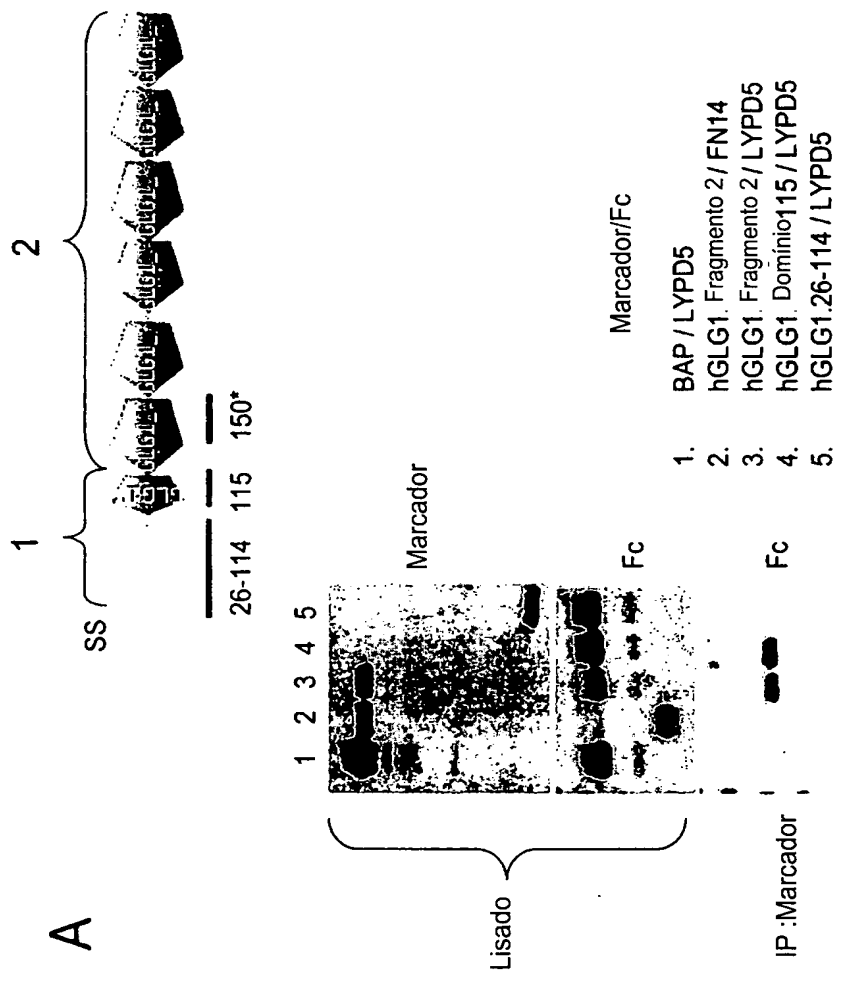


FIG. 35

cgttgctgtc gctctgcacg cacctatgtg gaaactaaag cccagagaga aagcttgact
 tgcacacag ccagtgagt actgcagcag caccagaatc tggctgttt cctgtttggc
 tctttacca ctacggcttg ggaatcggg catggtggct ttgccaatgg tcttgtttt
 gctgctggtc ctgagcagag gtgagagtga attggacgcc aagatcccat ccacagggga
 tgcacagaa tggcggaaic ctacactgtc catgctgggg tctgccagc cagccccctc
 ctgccagaag tgcactctc cacacccag ctgtcatgg tgaagcaac tgaactcac
 cgcgtcggga gaggcggagg cgcggcgctg cgcggacga gagagctgc tggctcagg
 ctgcccgtg gagagcttg aggagcccc cggccagcag gaggtgctg aggaccagcc
 gctcagccag ggcggcccg gagagggtgc caccagctg gcggccagc gggtcgggt
 cagctgcgg cctggggagc cccagcagct ccaggtccgc ttcctcgtg ctgagggata
 cccgtggac ctgactacc ttatggacct gagctactcc atgaaggac acctggaacg
 cgtgcggcag ctggggcacg ctctgctggt cgggtcag gaagtcacc attctgtcg
 cattgtttt ggttctttg tggacaaaac ggtgctgcc ttgtgagca cagtaccctc
 caaactgcgc caccctgcc ccaccggct ggagcgtgc cagtcacat tcagcttca
 ccatgtctg tccctgacgg gggacgcaca agccttcag cgggaggtgg ggcgccagag
 tgtgtccggc aatctggact gcctgaagg tggcttcgat gccattctg aggtgctact
 ctgccaggag cagattggct ggagaaatgt gtcccgctg ctggtgtca ctacagcga
 cacattccat acagctgggg acgggaagt gggcggcatt ttcatgcca gtgatggga
 ctgccattg gacagcaatg gcctctacag tgcagcaca gatttgact acctctgt
 ggtcaggtg gccaggccc tctctcagc aaatatccag cccatcttg ctgtaccag
 tgcgcactg cctgtctacc aggagctgag taaactgatt cctaagtctg cagtgggga
 gctgagttag gactccagca acgtggtaca gctcatcatg gatgcttata atagcctgtc
 ttccaccgtg accttgaac actcttact cctctctggg gtccacatt ctacgaac
 ccagtgtgag ggtctgaga agaggagggg taaggctgag gatcaggac agtgaacca
 cgtccgaatc aaccagacgg tgactttctg ggtttctc caagccccc actgcctcc
 agagcccat ctctgaggc tccgggccct tggcttctca gaggagctga ttgtggagt
 gcacagctg tgtactgta attgcagtga cccagccc caggctccc actgcagtga
 tggccaggga cacctacaat gtggtgatg cagctgtcc cctggccgc taggtcggct
 ctgtgagtgc tctgtggcag agctgtctc cccagacctg gaactgggt gccgggctcc
 caatggcaca gggccctgt gcagtggaaa ggtcactgt caatgtggac gctgcagctg
 cagtggacag agctctgggc atctgtcga gtgtgacgat gccagctgt agcgacatga
 gggcatctc tgcggaggct ttggtcgtg ccaatgtga gtatgtact gtatgcaa
 ccgcacgggc agagcatgc aatgcagtgg ggacatggac agtgcata gtccgaggg
 agggctctg agtgggcatg gacgtgcaa atgcaaccgc tgcagtgct tggacggcta
 ctatggtgt ctatgcgacc aatccccagg ctgcaagaca ccatgcgaga gacaccggga
 ctgtcagag tgtggggcct tcaggactgg cccactggc accaactgca gtacagctg
 tgcacatac aatgtgacc tggcctggc ccctatctg gatgatggct ggtgcaaga
 gcggaccctg gacaaccagc tgttctctt cttgggtggag gatgacgcca gaggcagggt
 cgtgctcaga gtgagacccc aagaaaagg agcagaccac acgcaggcca ttgtgtggg
 ctgctaggg ggcactgtg cagtggggt ggggctgtg ctggttacc ggtctcgtg
 ggaaatctat gaccggggg aatacagtc cttgagaag gagcagcaac aactcaactg
 gaagcaggac agtaatctc tctacaaaag tgcacacg accacatca atctcgtt

FIG. 36A

tcaagaggca gacagtccca ctctctgaag gagggaggga cacttaccca aggtcttct
ccttgaggga cagtgggaac tggaggggtga gaggaagggt gggctgttaa gaccttgga
ggggactaat tcactggcga ggtgcggcca ccacctact tcatttcag agtgacacc
aagagggtg ctccccatgc ctgcaacctt gcatccatct gggctacccc acccaagtat
acaataaagt ctacctcag aaaaaaaaaa aaaaaaaaa

FIG. 36A (CONTINUAÇÃO)

MVALPMVLVLLLVL SRGESELD AKIPSTGDATEWRNPHLSMLGSCQPAPSCQKCILSHP
SCAWCKQLNFTASGEAEARRCARREELLARGCPLEELEEPRGQQEVLQDQPLSQGARG
EGATQLAPQVRVTLRPGEPPQLQVRFLRAEGYPVDLYYLMDSLYSMKDDLRLVRQL
GHALLVRLQEVTHSVRIGFGSFVDKTVLPFVSTVPSKLRHPCPTRLERCQSPFSFHHVLSL
TGDAQAFEREVGRQSVSGNLDSPGGFDAILQAALCQEQIGWRNVSRLLVFTSDDTFHT
AGDGKLG GIFMPSDGHCHLDSNGLYSRSTEFDYPSVGQVAQALSAANIQPIFAV TSAAL
PVYQELSKLIPKSAVGELSESSNVVQLIMDAYNSLSSTVTLEHSSLPPGVHISYESQCEG
PEKREGKAEDRGQCNHVRINQTVTFWVSLQATHCLPEPHLLRLRALGFSEELIVELHTLC
DCNCSDTQPQAPHCS DGQGH LQCGVCSCAPGRLGRLCECSVAELSSPDLESGCRAPNGT
GPLCSGKGHCQCGRCSCSGQSSGHLCECDDAS CERHEGILCGGFGRQCQGVCHCHANR
TGRACECSGDMDCISPEGGLCSGHGRCKCNRCQCLDGYYGALCDQCPGCKTPCERHR
DCAECGAFRTGPLATNCSTACAHTNVTLALAPILDDGWCKERTLDNQLFFFLVEDDAR
GTVVLRVRPQEKGADHTQAIVLGCVGGIVAVGLGLVLAYRLSVEIYDRREYSRFEKEQQ
QLNWKQDSNPLYKSAITTTINPRFQEADSPTL

FIG. 36B

RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL"**.

- 5 A presente invenção refere-se a um método para detecção da presença de doença inflamatória intestinal em tecidos gastrointestinais ou células de um mamífero pela detecção da expressão aumentada de genes LY6 em tecidos ou células do mamífero em relação a um controle.