

**C12N 15/19** (2006.01) **C07K 14/52** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01) **C12N 1/21** (2006.01)  
**C12N 1/19** (2006.01) **C12Q 1/68** (2006.01)  
**C12N 15/62** (2006.01) **C07K 16/24** (2006.01)  
**A61K 38/19** (2006.01) **C12Q 1/00** (2006.01)

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

(22) Data de pedido: **1999.05.14**

(30) Prioridade(s): **1998.05.15 US 85579 P**  
**1998.12.23 US 113621 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2001.02.21**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.06.27**  
**097/2007**

(73) Titular(es):

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

(72) Inventor(es):

**AUDREY GODDARD** **US**  
**AUSTIN L. GURNEY** **US**  
**WILLIAM I. WOOD** **US**  
**ELLEN FILVAROFF** **US**  
**JIAN CHEN** **US**

(74) Mandatário:

**ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA**  
**R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA** **PT**

(54) Epígrafe: **"UTILIZAÇÕES TERAPÊUTICAS DE POLIPÉPTIDO HOMÓLOGOS DE IL-17"**

(57) Resumo:

RESUMO**"Utilizações terapêuticas de polipéptido homólogos de IL-17"**

A presente invenção refere-se a novos polipéptidos possuindo identidade de sequência com IL-17 e a moléculas de anticorpo que codificam esses polipéptidos. São igualmente proporcionados vectores e células hospedeiras que compreendem essas sequências de ácido nucleico, moléculas polipeptídicas quiméricas compreendendo os polipéptidos da presente invenção fundidos com sequências polipeptídicas heterólogas, anticorpos que se ligam aos polipéptidos da presente invenção e métodos de produção dos polipéptidos da presente invenção. São ainda proporcionados métodos de tratamento de doenças cartilaginosas degenerativas.

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

## DESCRIÇÃO

### **"Utilizações terapêuticas de polipéptido homólogos de IL-17"**

#### **CAMPO DA INVENÇÃO**

A presente invenção refere-se genericamente à identificação e isolamento de ADN, a utilizações terapêuticas e à produção recombinante de novos polipéptidos com identidade de sequência com a citocina IL-17, e o antigénio 8 associado a linfócitos T citotóxicos (CTLA-8) aqui designado como polipéptido PRO1122.

#### **ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

Foi relatado que a citocina interleucina 17 (IL-17) estimula células epiteliais, endoteliais e fibroblásticas a segregar citocinas tais como IL-6, IL-8 e factor estimulante de colónias de granulócitos, assim como prostaglandina E2. Embora a expressão de IL-17 seja restrita a células T activadas, o receptor de IL-17 é amplamente expresso, uma propriedade consistente com as actividades pleiotrópicas de IL-17. Adicionalmente, mostrou-se que quando cultivados na presença de IL-17, os fibroblastos podem sustentar a proliferação de maturação preferencial CD34+ em neutrófilos. Em resultado, a IL-17 podia ser um potenciador precoce ou mesmo um elemento de manutenção da reacção inflamatória dependente de células T e/ou um elemento da rede de citocinas que faz a ponte entre o sistema imunitário e a hematopoiese. Veja-se, Yao, et al., J. Immunol., 155(12):5483-5486 (1995); Fossiez et al., J. Exp. Med., 183(6):2593-2603 (1996); Kennedy, et al., J. Interferon Cytokine Res., 16(8):611-617 (1996).

Mais genericamente, todas as novas proteínas têm interesse. As proteínas extracelulares desempenham um importante papel na formação, diferenciação e manutenção de organismos pluricelulares. O destino de muitas células individuais, e.g., proliferação, migração, diferenciação ou interacção com outras células, é tipicamente governado por informação recebida de outras células e/ou do ambiente imediato. Esta informação é frequentemente transmitida por

polipéptidos segregados (por exemplo, factores mitogénicos, factores de sobrevivência, factores citotóxicos, factores de diferenciação, neuropéptidos e hormonas) que são, por sua vez, recebidos e interpretados por diversos receptores celulares ou proteínas ligadas a membranas. Estes polipéptidos ou moléculas de sinalização segregados normalmente passam através da via de secreção celular para atingir o seu local de acção no ambiente extracelular.

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

Estão a decorrer esforços, tanto industrial como academicamente, para identificar novas proteínas segregadas nativas. Muitos esforços estão focados na pesquisa de bibliotecas de ADN recombinante de mamífero, para identificar as sequências de codificação para novas proteínas segregadas. Exemplos de métodos e técnicas de pesquisa estão descritos na literatura [veja-se, por exemplo, Klein et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 93:7108-7113 (1996); Patente U.S. 5,536,637)]. Os resultados desses esforços estão aqui apresentados.

A interleucina-17 é uma citoquina derivada de células T recentemente descrita, cujas funções biológicas estão apenas a começar a ser entendidas. Spriggs et al., J. Clin. Immunol. 17:366 (1997); Broxmeyer, H.E., J. Exp. Med. 183: 2411 (1996). Quando a IL-17 foi inicialmente identificada como um clone de ADNc a partir de um linfoma de células T de roedor, foi reconhecido que possuía uma sequência similar a um quadro de leitura aberto de um herpesvírus de primata, o *Herpervirus saimiri* Rouvier et al., J. Immunol. 150: 5445 (1993), Yao et al., Immunity 3: 811 (1995) [Yao-1], Fossiez et al., J. Exp. Med. 183: 2593 (1996). Subsequentemente, foi confirmado que esta proteína viral possui muitas, se não todas, as actividades imunoestimulantes encontradas para a IL-17 do

hospedeiro. Fleckenstein e Desrosiers, "Herpesvirus saimiri and herpesvirus ateles," em The Herpesviruses, I.B. Roizman, ed, Plenum Publishing Press, New York, p.253 (1982), Biesinger, B.I. et al., Procl Natl Acad Sci. USA 89: 3116 (1992).

A IL-17 humana é uma proteína homodimérica de 20-30 kDa, ligada por dissulfureto, com glicosilação variável. Yao-1, *supra*; Fossier et al., *supra*. É codificada por um quadro de leitura aberto de 155 aminoácidos que inclui uma sequência de sinal de secreção N-terminal de 19-23 aminoácidos. A sequência de aminoácidos de IL-17 é apenas semelhante à proteína de *Herpesvirus* descrita acima e não apresenta identidade significativa com as sequências de outras citocinas ou outras proteínas conhecidas. Adicionalmente, o ARNm que codifica IL-17 que foi detectado foi detectado apenas em células T de memória CD4<sup>+</sup> activadas e células PBMC estimuladas com PMA/ionomicina.

Apesar da sua restrita distribuição nos tecidos, a IL-17 exhibe actividades biológicas pleiotrópicas em vários tipos de células, tais como fibroblastos, células endoteliais e células epiteliais. Spriggs, M.K., *supra*.; Broxmeyer, H.E., *supra*. Verificou-se que a IL-17 estimula a produção de muitas citocinas: TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  de macrófagos [Jovanovic et al., J. Immunol. 160: 3513 (1998)]; IL-6, IL-8 e a molécula de adesão intracelular (ICAM-1) de fibroblastos humanos. Fossiez et al., *supra*, Yao et al., J. Immunol. 155: 5483 (1995) [Yao-2]; factor estimulante de colónias de granulócitos (G-CSM) e prostaglandina (PGE-2) de sinoviócitos, Fossiez et al., *supra*. Através da indução de várias citocinas, a IL-17 é capaz de mediar uma ampla gama de respostas, principalmente a pró-inflamatória e a hematopoiética. Isto conduziu à sugestão de que a IL-17 pode desempenhar um papel crucial na iniciação ou sustentação de uma resposta inflamatória. Jovanovic et al., *supra*.

Em consistência com a ampla gama de efeitos da IL-17, verificou-se que o receptor da superfície celular para a IL-17 é amplamente expresso em muitos tecidos e tipos celulares, Yao et al., Cytokine 9: 794 (1997) [Yao-3]. Embora a sequência de aminoácidos do receptor da hIL-17 (866 a.a.) preveja uma

proteína com um único domínio transmembranar e um domínio intracelular longo de 525 aminoácidos, a sequência do receptor é única e não é semelhante à de nenhum dos receptores da família de receptores de citocinas/factores de crescimento. Isto, juntamente com a ausência de semelhança da própria IL-17 com outras proteínas conhecidas, indica que a IL-17 e o seu receptor podem fazer parte de uma nova família de proteínas de sinalização e receptores.

Mostrou-se ainda, por sinalização intracelular, que a IL-17, estimula o influxo transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  e uma redução em  $[\text{AMPC}]_i$  em macrófagos humanos. Jovanovic et al., *supra*. Fibroblastos e macrófagos tratados com IL-17 induzem a activação de NF- $\kappa$ B, Yao-1, *supra*, Jovanovic et al., *supra*., enquanto macrófagos com ela tratados activam NF- $\kappa$ B e proteína-quinases activadas por mitogénios. Shalom-Barek et al., J Biol. Chem. 273: 27467 (1998).

A presente descrição descreve a clonagem e a caracterização de duas novas proteínas, denominadas PRO1031 (IL-I7B) e PRO1122 (IL-17C), e suas variantes activas, que são semelhantes em sequência de aminoácidos à IL-17. A invenção relaciona-se com esta última, PRO1122 IL-17C. WO99/61617, que é relevante para a avaliação apenas da novidade, relaciona-se também com a mesma proteína, aí designada por IL-21.

### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

Os Requerentes identificaram um clone de ADNc que codifica um novo polipéptido possuindo identidade de sequência com IL-17, em que o polipéptido é designado no presente pedido de patente por PRO1122".

Um aspecto da invenção, tal como definido nas reivindicações refere-se à utilização de um polipéptido PRO1122 isolado, compreendendo uma sequência de aminoácidos possuindo pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência, preferivelmente pelo menos cerca de 81% de identidade de sequência, mais preferivelmente cerca de 82% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 83% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 84% de identidade de sequência, ainda mais

preferivelmente pelo menos cerca de 85% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 86% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 87% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 88% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 89% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 90% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 91% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 92% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 93% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 94% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 95% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 96% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 97% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 98% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 99% de identidade de sequência com a sequência de resíduos de aminoácido de cerca de 1 ou cerca de 19 a cerca de 197, inclusive, da Figura 3 (SEQ ID NO:3). Num aspecto preferido, o polipéptido compreende os resíduos de aminoácido de cerca de 1 ou cerca de 19 a cerca de 197, inclusive, da Figura 3 (SEQ ID NO:3).

Num outro aspecto, tal como definido nas reivindicações, a invenção refere-se à utilização de um polipéptido PR01122 isolado compreendendo uma sequência de aminoácidos possuindo pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência, preferivelmente pelo menos cerca de 81% de identidade de sequência, mais preferivelmente pelo menos cerca de 82% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 83% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 84% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 85% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 86% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 87% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 88% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 89% de identidade de sequência, ainda mais

preferivelmente pelo menos cerca de 90% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 91% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 92% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 93% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 94% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 95% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 96% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 97% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 98% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 99% de identidade de sequência com os aminoácidos codificados pelo ADNc de proteína humana depositado na ATCC em 22 Dezembro de 1998 com o número de depósito ATCC 203552.

Numa concretização preferida, o polipéptido PRO1122 é obtido ou obtenível por expressão do polipéptido codificado pela inserção de ADNc do vector depositado em 22 de Dezembro de 1998 com o número de depósito na ATCC 203552 (DNA62377-1381-1).

Num aspecto específico, a invenção utiliza um polipéptido PRO1122 isolado sem a metionina de iniciação e/ou a sequência de sinal do terminal N. Processos para a produção do mesmo são também aqui descritos, sendo que esses processos compreendem a cultura de uma célula hospedeira compreendendo um vector que compreende a molécula de ácido nucleico codificante apropriada sob condições adequadas para a expressão do polipéptido PRO1122 e a recuperação do polipéptido PRO1122 a partir da cultura celular.

Ainda noutra concretização, como definido nas reivindicações, a invenção refere-se a antagonistas de um polipéptido PRO1122 nativo. Num aspecto particular, o antagonista é um anticorpo anti-PRO1122.

Ainda numa outra concretização, como definido nas reivindicações, a invenção refere-se a uma composição compreendendo um antagonista do polipéptido PRO1122 como atrás

definido, em combinação com um transportador. Preferivelmente, o transportador é farmacêuticamente aceitável.

Ainda numa outra concretização, como definido nas reivindicações, a invenção refere-se à utilização de um polipéptido PRO1122, ou um seu antagonista como atrás descrito, que pode ser um anticorpo anti-PRO1122), para a preparação de um medicamento útil no tratamento de uma condição que é responsiva ao polipéptido PRO1122 ou um seu agonista ou antagonista (e.g., anti-PRO1122). Num aspecto particular, a invenção refere-se à utilização de um polipéptido PRO1122, ou um seu antagonista, num método para o tratamento de uma desordem cartilaginosa degenerativa.

Ainda numa outra concretização, a invenção refere-se a moléculas antagonistas de PRO1122.

Em ainda outra concretização, como definido nas reivindicações, a invenção refere-se a uma composição terapêutica compreendendo uma quantidade terapêuticamente eficaz de um antagonista de PRO1122 em combinação com um transportador farmacêuticamente aceitável.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

A Figura 1 mostra a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:1) derivada dos nucleótidos 42-581 de SEQ ID NO:2. Mostram-se igualmente na Figura 1 o péptido de sinal, um local de N-glicosilação, uma região possuindo identidade de sequência com IL-17, o peso molecular, e o pI aproximado.

A Figura 2 mostra uma sequência nucleotídica (SEQ ID NO:2) contendo a sequência nucleotídica de um ADNc de PRO1031 de sequência nativa (nucleótidos 42-581 de SEQ ID NO:2), em que a sequência nucleotídica (SEQ ID NO:2) é um clone aqui designado por "UNQ516" e/ou "DNA59294-1381".

A Figura 3 mostra a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO:3) derivada dos nucleótidos 50-640 de SEQ ID NO:4. Mostram-se igualmente as localizações aproximadas do péptido de sinal, um padrão "fecho-de-correr" de leucinas numa região

possuindo identidade de sequência com IL-17. Mostram-se também o peso aproximado em daltons, e o pI aproximado.

A Figura 4 mostra uma sequência nucleotídica (SEQ ID NO:4) contendo a sequência nucleotídica de um ADNc de PRO1122 de sequência nativa (nucleótidos 50-640 de SEQ ID NO:1), em que a sequência nucleotídica (SEQ ID NO:4) é um clone aqui designado por "UNQ561" e/ou "DNA62377-1381-1". Mostram-se também a sequência complementar e sequências de aminoácidos deduzidas.

A Figura 5 mostra o DNA47332 (SEQ ID NO:5), um fragmento de ADN virtual utilizado no isolamento de DNA59294 (SEQ ID NO:2).

A Figura 6 mostra o DNA49665 (Incyte EST 1347523) (SEQ ID NO:7), um fragmento virtual utilizado no isolamento de DNA62377 (SEQ ID NO:4).

A Figura 7A mostra um alinhamento entre as sequências de proteína codificadas por DNA59624 (IL17-B) (SEQ ID NO:1), DNA62377 (IL17-C) (SEQ ID NO:3) e IL-17 (SEQ ID NO:11). As sequências de sinal putativas estão sublinhadas, os potenciais locais de glicosilação ligada a N têm duplo sublinhado e os resíduos de triptofano e cisteína conservados estão marcados com asteriscos. As IL-17, IL-17B e IL-17C partilham 26-28% de identidade de aminoácidos com entre si. A Figura 7B mostra um alinhamento entre apenas as proteínas codificadas a partir de DNA59624 (SEQ ID NO:1) e de DNA62377 (SEQ ID NO:3).

A Figura 8 é uma análise de transferência de ARN de IL-17B (UNQ516) (SEQ ID NO:1). O *Northern blot* representa o ARNm de tecidos humanos (Clontech) hibridado com uma sonda radiomarcada específica para IL17B humana como descrito no Exemplo 8. Mostram-se à esquerda marcadores de tamanho de ARN. Uma nova hibridação do mesmo material da transferência com uma sonda de ADNc de  $\beta$ -actina humana é mostrada no fundo.

As Figuras 9A-9B representam gráficos de barras que representam as actividades biológicas de IL17 (SEQ ID NO:11), IL17B (UNQ516) (SEQ ID NO:1) e IL17C (UNQ561) (SEQ ID NO:3). A Figura 9A mostra células fibroblastos de prepúcio humano (HFF)

cultivadas com proteína de fusão com Fc de controlo, IL-17, IL-17B.Fc (SEQ ID NO:12) ou IL-17C.Fc (SEQ ID NO:13) a 100 ng/ml durante 18 horas e os meios condicionados foram ensaiados quanto a IL-6 (SEQ ID NO:14) como descrito no Exemplo 10. A Figura 9B mostra a linha celular leucémica humana, THP1, que foi tratada com as mesmas citocinas (100 ng/ml) que acima sob as mesmas condições, em que os sobrenadantes foram ensaiados quanto ao nível de libertação de TNF- $\alpha$ . Os resultados são expressos como a média  $\pm$  EP de determinações em triplicado a partir de uma experiência representativa.

A Figura 10 representa no decorrer de tempo, a dependência da libertação activada por IL17B e IL17C de TNF- $\alpha$  por células THP1. Na Figura 10A, as células THP1 foram incubadas com 100 ng/ml (2,2 nM) de IL17B.Fc (SEQ ID NO:12) ou IL17C.Fc (SEQ ID NO:13) durante 0,5 a 32 horas, os meios condicionados foram recolhidos, e a concentração de TNF- $\alpha$  foi quantificada como descrito no Exemplo 10. Na Figura 10B, as células THP1 foram tratadas com a IL-17B.Fc e a IL-17C.Fc numa gama de concentrações de 0 a 120 nM durante 18 horas e foi determinada a libertação de TNF- $\alpha$ .

A Figura 11 é uma imunoprecipitação de ECD de IL-17R (SEQ ID NO:15) com IL-17 (SEQ ID NO:11), IL17B (SEQ ID NO:1) e IL-17C (SEQ ID NO:3). O ECD do receptor de IL-17 marcado com His foi expresso em células 293 e metabolicamente marcado com  $^{35}\text{S}$  como descrito no Exemplo 11. Recuperou-se o sobrenadante, e utilizaram-se contas de Ni-NTA para precipitar por afinidade o ECD de IL-17R marcado com His (SEQ ID NO:15) no sobrenadante (pista 1). Na Figura 11A, incubaram-se IL-17 (SEQ ID NO:11), IL-17B.Fc (SEQ ID NO:12) e IL-17C.Fc (SEQ ID NO:13), ou proteínas de fusão com Fc de controlo, com o sobrenadante e adicionaram-se contas de proteína-A-agarose para precipitar as proteínas de fusão com Fc. Para a reacção de imunoprecipitação da IL-17, incluíram-se anticorpos anti-IL-17. A Figura 11B mostra os resultados de uma experiência de ligação competitiva, em que a imunoprecipitação de ECD de IL-17R (SEQ ID NO:22) pela IL-17 (SEQ ID NO:11) foi realizada na presença de um excesso de cinco vezes de IL-17B.his (SEQ ID NO:23) e proteínas de controlo marcadas com His. Os precipitados em ambas as Figura 11A e Figura 11B foram analisados por

electroforese sobre géis de NuPAGE (4-12% de Bis-Tris). Os marcadores de peso molecular estão indicados à esquerda de cada painel.

A Figura 12 mostra a análise FACS da ligação de IL-17B.Fc (SEQ ID NO:12) e IL-17C.Fc (SEQ ID NO:13) as células THP-1. As células THP-1 foram incubadas com IL-17B.Fc (A) ou IL-17C.Fc (B) ou proteínas de fusão com Fc de controlo em PBS (soro de cavalo a 5%) e seguiu-se a adição de anticorpos secundários anti-Fc conjugados com FITC.

A Figura 13 mostra o efeito de IL-17 (SEQ ID NO:11) sobre a cartilagem articular. Cultivaram-se explantes de cartilagem com a concentração indicada de IL-17 sozinha (cheio) ou na presença de IL-1 $\alpha$  na concentração indicada (tracejado) (SEQ ID NO:25) ou IL1ra (antagonista de receptor de IL-1, R&D Systems, 1  $\mu$ g/ml) (SEQ ID NO:26) durante 72 horas. A libertação de proteoglicanos (PG) para o meio (painel superior) indica a quebra da matriz. A síntese de matriz foi determinada por incorporação de <sup>35</sup>S-sulfato no tecido (painel inferior).

A Figura 14 mostra o efeito de IL-17 (SEQ ID NO:11) sobre a libertação de óxido nítrico. Trataram-se explantes com IL-17 (10 ng/ml) sozinho (colunas da esquerda) ou na presença de IL-1 $\alpha$  (10 ng/ml) (SEQ ID NO:25) (colunas da direita). Após 48 horas, ensaiaram-se os meios quanto à concentração de nitrito.

A Figura 15 mostra o efeito de NO sobre alterações no metabolismo da matriz induzidas por IL-17. Trataram-se explantes com IL-17 (5 ng/ml) (SEQ ID NO:11) sozinha (+) ou com um inibidor irreversível de óxido nítrico-sintase, NOS (L-NIO, Caymen Chemical, 0,5mM). Após 72 horas de tratamento, ensaiaram-se os meios quanto a (A) nitrito e (B) proteoglicanos (PG). (C) A síntese de proteoglicano foi determinada por incorporação de <sup>35</sup>S-sulfato no tecido.

A Figura 16 mostra o efeito da inibição de NO sobre alterações no metabolismo dos proteoglicanos (PG) induzidas por IL-1 $\alpha$ . Trataram-se explantes de cartilagem articular com IL-1 $\alpha$  (5 ng/ml) (SEQ ID NO:25) sozinha (+) ou com inibidores de NOS (L-NIO ou L-NIL) (L-NIL, inibidor reversível de NOS,

Caymen Chemical) ou IL-1ra (antagonista de receptor de IL-1, R&D Systems, 1 µg/ml) (SEQ ID NO:26). Após 72 horas de tratamento, os meios foram ensaiados quanto a (A) concentração de nitrito e (B) quantidade de proteoglicanos. (C) A síntese de matriz foi determinada por incorporação de <sup>35</sup>S-sulfato no tecido.

A Figura 17 mostra o efeito de UNQ516 (SEQ ID NO:1) sobre a cartilagem articular. Trataram-se explantes com UNQ561 a 1% ou 0,1% na ausência (3 colunas mais à esquerda) ou na presença (três colunas mais à direita) de IL-1α (SEQ ID NO:25) a 10 ng/ml, e a síntese de proteoglicano (PG) e a produção de nitrito foram determinadas como descrito no Exemplo 16.

A Figura 18 mostra o efeito de UNQ561 (SEQ ID NO:3) sobre a cartilagem articular. Trataram-se explantes com LTNQ561 a 1% ou 0,1% na ausência (três colunas mais à esquerda) ou na presença (três colunas mais à direita) de IL-1α (+) (10 ng/ml) (SEQ ID NO:25). A liberação e a síntese de proteoglicano (PG) estão apresentadas como a quantidade acima do controle.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DAS CONCRETIZAÇÕES PREFERIDAS

##### **I. Definições**

Os termos "polipéptido PRO1122" e "PRO1122", quando aqui se utilizam abrangem o PRO1122 de sequência nativa e suas variantes polipeptídicas (que são adicionalmente aqui definidas). O polipéptido PRO1122 pode ser isolado de várias fontes, tais como de tipos de tecidos humanos ou de outra fonte, ou preparados por métodos recombinantes ou sintéticos.

Um "polipéptido PRO1122 de sequência nativa" compreende um polipéptido possuindo a mesma sequência de aminoácidos que um polipéptido PRO1122 derivado da natureza. Este polipéptido PRO1122 de sequência nativa pode ser isolado da natureza ou pode ser produzido por meios recombinantes ou sintéticos. A expressão "polipéptido PRO1122 de sequência nativa" abrange especificamente formas de ocorrência natural segregadas ou truncadas de um polipéptido PRO1122 (e.g., formas solúveis contendo, por exemplo, uma sequência de domínio extracelular), formas variantes de ocorrência natural (e.g., formas de

*splicing* alternativo) e variantes alélicas de ocorrência natural de um polipéptido PRO1122.

Numa concretização da invenção, o polipéptido PRO1122 de sequência nativa que é utilizado é um polipéptido PRO1122 de sequência nativa de comprimento completo ou maduro compreendendo os aminoácidos 1 ou 19 a 197 da Figura 3 (SEQ ID NO:3). Igualmente, embora o polipéptido PRO1122 descrito na Figura 3 (*i.e.*, UNQ561), seja mostrado como principiando com um resíduo de metionina designado como posição de aminoácido 1, é conceptível e possível que outro resíduo de metionina localizado quer a montante quer a jusante da posição de aminoácido 1 na Figura 3 possa ser empregue como resíduo de aminoácido de partida.

O termo "UNQ561" refere-se à proteína PRO1122 de sequência nativa específica representada na Figura 3. Opcionalmente, o polipéptido PRO1122 é obtido ou obtenível por expressão do polipéptido codificado pela inserção de ADNc do vector DNA62377-1381-1, com o número de depósito na ATCC 203552.

"Variante de PRO1122" significa um polipéptido PRO1122 "activo" tal como definido adiante possuindo pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência de aminoácidos com o polipéptido PRO1122 possuindo a sequência de aminoácidos deduzida dos resíduos 1 ou cerca de 19 a 197 apresentada na Figura 3 (SEQ ID NO:3), para um polipéptido PRO1122 de sequência nativa maduro ou de comprimento completo. Estas variantes de polipéptido PRO1122 incluem, por exemplo, polipéptidos PRO1122, em que um ou mais resíduos de aminoácido foram adicionados, substituídos ou eliminados, no terminal N ou C ou no interior da sequência da Figura 3 (SEQ ID NO:3). Normalmente, uma variante de polipéptido PRO1122 terá pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência de aminoácidos, preferivelmente pelo menos cerca de 81% de identidade de sequência de aminoácidos, mais preferivelmente pelo menos cerca de 82% de identidade de sequência de aminoácidos, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 83% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 84% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 85% de identidade de sequência, ainda mais

preferivelmente pelo menos cerca de 86% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 87% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 88% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 89% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 90% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 91% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 92% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 96% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 97% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 98% de identidade de sequência, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 99% de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos da Figura 3 (SEQ ID NO:3), com ou sem o péptido de sinal (e.g., com os resíduos de aminoácido 1 a 197 do péptido de sinal de SEQ ID NO:3, sem o péptido de sinal de cerca de 19 a 197 de SEQ ID NO:3). As variantes aqui proporcionadas excluem as sequências de PRO1122 de sequência nativa assim como os polipéptidos e ácidos nucleicos aqui descritos com os quais os polipéptidos PRO1122 partilham 100% de identidade e/ou que são já conhecidos na especialidade.

A "percentagem (%) de identidade de sequência de aminoácidos" em relação às sequências de aminoácidos de PRO1122 identificadas aqui define-se como a percentagem de resíduos de aminoácido na sequência candidata que são idênticos aos resíduos de aminoácido na sequência de um polipéptido PRO1122, após alinhamento das sequências e introdução de hiatos, se necessário, para se conseguir a máxima percentagem de identidade de sequências, e não considerando quaisquer substituições conservativas como parte da identidade de sequências. O alinhamento para fins de determinação da percentagem de identidade de sequência de aminoácidos pode ser conseguido de várias maneiras que fazem parte das qualificações do perito na especialidade, por exemplo, utilizando software de computador disponível ao público tal com os programas ALIGN, ALIGN-2, Megalign (DNASTAR) ou BLAST (e.g., Blast, Blast-2, WU-Blast-2). Os peritos na especialidade podem determinar os parâmetros apropriados para a medição do alinhamento, incluindo quaisquer

algoritmos necessários para se conseguir o alinhamento máximo ao longo da totalidade do comprimento das sequências que se estão a comparar. Por exemplo, os valores de % de identidade aqui utilizados são gerados utilizando WU-BLAST-2 (Altschul et al., *Methods in Enzymology* 266: 460-480 (1996)). A maioria dos parâmetros de busca de WU-BLAST-2 estão estabelecidos nos valores por defeito. Os valores que não estão estabelecidos nos valores por defeito, i.e., os parâmetros ajustáveis, são estabelecidos nos seguintes valores: "overlap span = 1", "overlap fraction = 0.125", "word threshold (T) = 11", e "scoring matrix = BLOSUM 62". Para os presentes fins, um valor de % aminoácido identidade de sequência de aminoácidos é determinado dividindo (a) o número de resíduos de aminoácido com correspondência idêntica entre a sequência de aminoácidos do polipéptido PRO1122 de interesse e a sequência de aminoácidos de comparação de interesse (i.e., a sequência contra a qual o polipéptido PRO1122 de interesse está a ser comparado) como determinado por WU-BLAST-2, por (b) o número total de resíduos de aminoácido do polipéptido PRO 1122 de interesse.

"Isolado", quando utilizado para descrever os vários polipéptidos aqui revelados, significa um polipéptido que foi identificado e separado e/ou recuperado a partir de um componente do seu ambiente natural. Preferivelmente, o polipéptido isolado está isento de associação com todos os componentes com os quais está naturalmente associado. Os componentes contaminantes do seu ambiente natural são materiais que poderiam tipicamente interferir com utilizações terapêuticas ou de diagnóstico, do polipéptido, e podem incluir enzimas, hormonas, e outros solutos proteínáceos ou não proteínáceos. Em concretizações preferidas, o polipéptido será purificado (1) até um grau suficiente para se obter pelo menos 15 resíduos de sequência de aminoácidos N-terminal ou interna utilizando um sequenciador de copo giratório, ou (2) até à homogeneidade por SDS-PAGE sob condições não redutoras ou redutoras utilizando coloração com azul de Coomassie ou, preferivelmente, com prata. O polipéptido isolado inclui o polipéptido *in situ* no interior de células recombinantes, pois pelo menos um componente do ambiente natural do polipéptido PRO1122 não estará presente. Normalmente, contudo, o

polipéptido isolado será preparado através de pelo menos um passo de purificação.

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

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

O grau de "rigor" das reacções de hibridação é prontamente determinável por um perito na especialidade, e geralmente é um cálculo empírico dependente do comprimento da sonda, da temperatura de lavagem e da concentração salina. Em geral, sondas mais longas requerem temperaturas mais elevadas para uma hibridação correcta, enquanto as sondas curtas necessitam de temperaturas mais baixas. A hibridação geralmente depende da capacidade do ADN desnaturado para voltar a hibridar quando estão presentes cadeias complementares num ambiente abaixo da sua temperatura de fusão. Quanto maior o grau de homologia desejado entre a sonda

e a sequência hibridável, mais elevada a temperatura relativa que se pode utilizar. Em resultado, segue-se que temperaturas relativas mais elevadas tenderão a tornar as reacções mais rigorosas, enquanto temperaturas mais baixas, menos rigorosas. Para detalhes e explicações adicionais sobre o rigor de reacções de hibridação, veja-se Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

"Condições rigorosas" ou "condições muito rigorosas", como aqui se define, podem ser identificadas como aquelas que: (1) empregam baixa força iónica e temperatura elevada para a lavagem, por exemplo cloreto de sódio 0,015 M/citrato de sódio 0,0015 M/dodecilsulfato de sódio a 0,1%, a 50°C; (2) empregam durante a hibridação um agente desnaturante, tal como formamida, por exemplo, formamida a 50% (v/v) com albumina sérica bovina a 0,1%/Ficoll a 0,1%/polivinilpirrolidona a 0,1%/tampão de fosfato de sódio 50 mM a pH 6,5 com cloreto de sódio 750 mM, citrato de sódio 75 mM a 42°C; ou (3) empregam formamida a 50%, SSC 5x (NaCl 0,75 M, citrato de sódio 0,075 M), fosfato de sódio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sódio a 0,1%, solução de Denhardt 5x, ADN de esperma de salmão tratado com ultra-sons (50 µg/ml), SDS a 0,1%, e sulfato de dextrano a 10% a 42°C, com lavagens a 42°C com SSC 0,2x (cloreto de sódio/citrato de sódio) e formamida a 50% a 55°C, seguidas por uma lavagem muito rigorosa consistindo em SSC 0,1x contendo EDTA a 55°C.

"Condições moderadamente rigorosas" podem ser identificadas como descrito por Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluem a utilização de solução de lavagem e condições de hibridação (e.g., temperatura, força iónica e % de SDS) menos rigorosas do que as descritas acima. Um exemplo de condições moderadamente rigorosas é a incubação durante a noite a 37°C numa solução compreendendo: formamida a 20%, SSC 5x (NaCl 150 mM, citrato trissódico 15 mM), fosfato de sódio 50 mM (pH 7,6), solução de Denhardt 5x, sulfato de dextrano a 10%, e ADN de esperma de salmão desnaturado por corte a 20 mg/ml, seguida de lavagem dos filtros com SSC 1x a cerca de 37-50°C. O perito saberá como ajustar a temperatura,

a força iónica, etc. conforme necessário para acomodar factores como o comprimento da sonda e semelhantes.

A expressão "marcado com epítopo", quando aqui se utiliza, refere-se a um polipéptido quimérico compreendendo um polipéptido PRO1122 ou um seu domínio, fundido com um "polipéptido marcador". O polipéptido marcador possui resíduos suficientes para proporcionar um epítopo contra o qual um anticorpo pode ser criado, ou que pode ser identificado por qualquer outro agente, e no entanto é suficientemente curto para não interferir com a actividade do polipéptido PRO1122. O polipéptido marcador preferivelmente também é francamente único de modo a que o anticorpo não reaja de modo cruzado substancialmente com outros epítopos. Os polipéptidos marcadores adequados geralmente possuem pelo menos seis resíduos de aminoácido e usualmente entre cerca de 8 e cerca de 50 resíduos de aminoácido (preferivelmente, entre cerca de 10 e cerca de 20 resíduos).

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

O termo "anticorpo" é utilizado no sentido mais lato e cobre especificamente anticorpos monoclonais únicos anti-polipéptido PRO1122 (incluindo anticorpos agonistas, antagonistas e neutralizantes), anti-PRO1122, composições de anticorpos com especificidades poliepitópica, anticorpos anti-

PRO1122 de cadeia simples, e fragmentos de anticorpos anti-PRO1122. A expressão "anticorpo monoclonal", como aqui se utiliza, refere-se a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, *i.e.*, os anticorpos individuais que constituem a população são idênticos excepto quanto a possíveis mutações de ocorrência natural que podem estar presentes em quantidades minoritárias.

"Activo" ou "actividade", para os presentes fins, referem-se a forma(s) de PRO1122 que retêm as actividades biológica e/ou imunológica do polipéptido PRO1122 nativo ou de ocorrência natural. Mais elaborado, actividade "biológica" refere-se a uma função biológica (quer inibidora, quer estimulante) causada por um PRO1122 nativo ou de ocorrência natural, outra que não a capacidade de induzir a produção de um anticorpo contra um epítipo antigénico em posse de um PRO1122 nativo ou de ocorrência natural e uma actividade "imunológica" refere-se apenas à capacidade de induzir a produção de um anticorpo contra um epítipo antigénico em posse de um PRO1122 nativo ou de ocorrência natural. Uma actividade biológica preferida inclui, por exemplo, a libertação de TNF- $\alpha$  por células THP1.

"Desordem cartilaginosa degenerativa" descreve um hospedeiro de desordens que se caracterizam principalmente pela destruição da matriz de cartilagem. Patologias adicionais incluem produção de óxido nítrico e quebra elevada de proteoglicano. Desordens exemplificativas abrangidas nesta definição incluem, por exemplo, artrite (*e.g.*, osteoartrite, artrite reumatóide, artrite psoriásica), sépsia, colite ulcerativa, psoríase, esclerose múltipla, diabetes do tipo I, artrite de células gigantes, lúpus eritematoso sistémico e síndrome de Sjögren.

O termo "antagonista" é utilizado no sentido mais lato, e inclui qualquer molécula que parcial ou completamente bloqueia, inibe ou neutraliza uma actividade biológica de um polipéptido PRO1122 nativo aqui revelado. De maneira similar, o termo "agonista" é utilizado no sentido mais lato e inclui qualquer molécula que imite uma actividade biológica de um polipéptido PRO1122 nativo aqui revelado. As moléculas de agonistas ou antagonistas adequadas incluem especificamente

anticorpos agonistas ou antagonistas ou fragmentos de anticorpos, fragmentos ou variantes de sequências de aminoácidos de polipéptidos PRO1122 nativos, péptidos, moléculas orgânicas pequenas, etc. Os métodos para a identificação de agonistas ou antagonistas de um polipéptido PRO1122 podem compreender o contacto de um polipéptido PRO1122 com uma molécula agonista ou antagonista candidata e a medição de uma alteração detectável numa ou mais actividades biológicas normalmente associadas ao polipéptido PRO1122.

"Anticorpos" (Ab) e "imunoglobulinas" (Ig) são glicoproteínas possuindo as mesmas características estruturais. Enquanto os anticorpos exibem especificidade de ligação a um antigénio específico, as imunoglobulinas incluem tanto os anticorpos como outras moléculas semelhantes a anticorpos que não têm especificidade antigénica. Os polipéptidos deste ultimo tipo são, por exemplo, produzido em baixos níveis pelo sistema linfático e em níveis aumentados por mielomas. O termo "anticorpo" é utilizado no sentido mais lato e cobre especificamente, sem limitação, anticorpos monoclonais intactos, anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (e.g. anticorpos biespecíficos) formados a partir de pelo menos dois anticorpos intactos, e fragmentos de anticorpo desde que exibam a actividade biológica desejada.

Os termos "tratar", "tratamento" e "terapia", como aqui utilizados, referem-se a terapia curativa, terapia profiláctica e terapia preventiva. Um exemplo de "terapia preventiva" é a prevenção ou diminuição da condição ou desordem patológicas alvo. Aqueles que necessitam de tratamento incluem aqueles já com a desordem assim como aqueles que são propensos a ter a desordem ou aqueles em quem se pretende prevenir a desordem.

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

O termo "mamífero", como aqui utilizado, refere-se a qualquer mamífero classificado como mamífero, incluindo seres humanos, animais domésticos e de criação, e animais de zoológico, de desporto ou de companhia, tais como gado bovino (e.g. vacas), cavalos, cães, ovelhas, porcos, coelhos, cabras, gatos, etc. Numa concretização preferida da invenção, o mamífero é o ser humano.

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

Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" é a quantidade mínima de agente activo (e.g., PRO1122, um seu antagonista ou agonista) que é necessária para conferir um benefício terapêutico a um mamífero. Por exemplo, uma "quantidade terapeuticamente eficaz" para um mamífero que sofre ou é propenso a sofrer, ou para prevenir que sofra, uma desordem cartilaginosa degenerativa, é uma quantidade tal que induza, melhore ou de outro modo cause uma melhoria dos sintomas patológicos, progressão da doença, das condições fisiológicas associadas com, ou resistência a sucumbir à desordem caracterizada principalmente pela destruição da matriz de cartilagem.

"Transportadores", como aqui se utiliza, incluem transportadores, excipientes ou estabilizantes farmacêuticamente aceitáveis que não são tóxicos para a célula ou o mamífero que estão a ser a eles expostos, nas dosagens e concentrações empregues. Frequentemente, o transportador fisiologicamente aceitável é uma solução aquosa de pH tamponado. Os exemplos de transportadores fisiologicamente aceitáveis incluem tampões tais como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico; polipéptidos de baixo peso molecular (inferior a cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina sérica, gelatina, ou imunoglobulinas; polímeros hidrófilos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, arginina ou lisina; monossacáridos, dissacáridos, e outros hidratos de carbono incluindo glucose, manose ou dextrinas; agentes quelantes tais como EDTA; aldóis

tais como manitol ou sorbitol; contra-íões formadores de sais tais como sódio; e/ou tensioactivos não iónicos tais como TWEEN®, polietilenoglicol (PEG) e PLURONICS™.

"Fragmentos de anticorpo" compreendem uma porção de um anticorpo intacto, preferivelmente a região variável ou de ligação ao antigénio do anticorpo intacto. Os exemplos de fragmentos de anticorpo incluem fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> e Fv; diacorpos; anticorpos lineares (Zapata *et al.*, Protein Engin. 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 ao antigénio idênticos, denominados fragmentos "Fab", cada um com um único local de ligação ao antigénio, e um fragmento residual "Fc", uma designação que reflecte a capacidade para cristalizar prontamente. O tratamento com pepsina origina um fragmento F(ab')<sub>2</sub> que possui dois locais de combinação com antigénio e é ainda capaz de ligar de modo cruzado o antigénio.

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

O fragmento Fab também contém o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (CH1) da cadeia pesada. Os fragmentos Fab diferem dos fragmentos Fv pela adição de alguns resíduos no terminal carboxi do domínio CH1 da cadeia pesada incluindo uma ou mais cisteínas da região charneira do anticorpo. Fab'-SH é a designação aqui para um Fab' em que o(s) resíduo(s) de cisteína dos domínios

constantes são portadores de um grupo tiol livre. Os fragmentos de anticorpo  $F(ab')_2$  originalmente eram produzidos na forma de pares de fragmentos Fab' que possuem cisteínas de charneira entre si. Outros acoplamentos químicos de fragmentos de anticorpo são também conhecidos.

As "cadeias leves" de anticorpos (imunoglobulinas) de qualquer espécie de vertebrado podem ser atribuídas a um de dois tipos claramente distintos, denominados  $\kappa$  e  $\lambda$ , com base nas sequências de aminoácidos dos seus domínios constantes.

Dependendo da sequência de aminoácidos do domínio constante das suas cadeias pesadas, as imunoglobulinas podem ser atribuídas a diferentes classes. Existem cinco classes principais de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, e várias destas podem ser adicionalmente divididas em subclasses (isotipos), e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

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

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

Um anticorpo "isolado" é um anticorpo que foi identificado e separado e/ou recuperado de um componente do seu ambiente natural. Os componentes contaminantes do seu ambiente natural são materiais que interfeririam com as utilizações em diagnóstico ou terapêuticas do anticorpo, e podem incluir enzimas, hormonas e outros solutos proteínáceos ou não proteínáceos. Em concretizações preferidas, o anticorpo será purificado (1) até mais de 95% em peso de anticorpo como determinado pelo método de Lowry, e o mais preferivelmente mais de 99% em peso, (2) até um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos de sequência de aminoácidos N-terminais ou internos utilizando um sequenciador de copo giratório; ou (3) até à homogeneidade por SDS-PAGE sob condições redutoras ou não redutoras utilizando coloração com azul de Coomassie ou, preferivelmente, com prata. O anticorpo isolado inclui o anticorpo *in situ* no interior de células recombinantes pois pelo menos um componente do ambiente natural do anticorpo não estará presente. Normalmente, contudo, um anticorpo isolado será preparado através de pelo menos um passo de purificação.

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

"Fase sólida" pretende significar uma matriz não aquosa à qual o anticorpo da presente invenção pode aderir. Os exemplos de fases sólidas aqui abrangidas incluem as que são formadas parcial ou totalmente por vidro (e.g., vidro de poro controlado), polissacáridos (e.g., agarose), poliacrilamidas, poliestireno, poli(álcool vinílico) e silicones. Em certas concretizações, dependendo do contexto, a fase sólida pode constituir o poço de uma placa de ensaio; em outras é uma coluna de purificação (e.g., uma coluna de cromatografia de afinidade). Este termo também inclui uma fase sólida descontínua de partículas discretas, como as descritas na Patente U.S. 4,275,149.

Um "lipossoma" é uma pequena vesícula composta por vários tipos de lípidos, fosfolípidos e/ou tensioactivos que é útil para a entrega de um fármaco (tal como um polipéptido PRO1122 ou um seu anticorpo) a um mamífero. Os componentes do lipossoma são vulgarmente dispostos numa conformação em bicamada, similar ao arranjo lipídico das membranas biológicas.

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

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

## **II. Composições e Métodos da Invenção**

### **A. Polipéptido PRO1122 de Comprimento Completo**

A presente invenção identifica e isola sequências nucleotídicas que codificam polipéptidos referidos no presente pedido de patente como PRO1122. Em particular, os Requentes identificaram e isolaram ADNc que codifica um polipéptido PRO1031 (e.g., UNQ516, IL-17B, SEQ ID NO:1) e PRO1122 (e.g., UNQ561, IL-17C, SEQ ID NO:3), como revelado com mais detalhes nos Exemplos seguintes. Utilizando os programas de computador para alinhamento de sequências BLAST e FastA, os Requerentes verificaram que várias porções dos polipéptidos PRO1031 e PRO1122 possuem identidade de sequência com IL-17. Assim, crê-se presentemente que os polipéptidos PRO1031 e PRO1122 revelados no presente pedido de patente são membros pela primeira vez identificados da família das citoquinas e assim podem estar envolvidos na inflamação e/ou na função do sistema imunitário. Este último constitui o objecto da invenção.

Como apresentado anteriormente, o termo "PRO1122" refere-se à sequência nativa e variantes, enquanto o termo

"UNQ561" se refere à sequência de aminoácidos específica da Figura 3 (SEQ ID NO:3) e/ou a proteínas codificadas pelo ADNc depositado na American Type Culture Collection, com o número de Depósito 203552.

Como se revela nos Exemplos adiante, o clone de ADNc aqui designado por DNA62377-1381-1 foi depositado na ATCC. A sequência de nucleótidos real do clones pode ser prontamente determinada por um perito por sequenciação do clone depositado utilizando métodos de rotina na especialidade. A sequência de aminoácidos prevista pode ser determinada a partir da sequência de nucleótidos utilizando conhecimentos de rotina. Para o polipéptido PRO1122 e o ácido nucleico de codificação aqui descritos, os Requerentes identificaram o que se crê ser o quadro de leitura mais bem identificável com a informação sobre a sequência disponível na altura.

#### **B. Variantes de PRO 1122**

Em adição ao polipéptido PRO1122 de sequência nativa de comprimento completo aqui descrito, está contemplado que possam ser preparadas variantes de PRO1122. As variantes de PRO1122 podem ser preparadas introduzindo alterações de nucleótidos apropriadas no ADN que codifica o PRO1122, ou através de síntese do polipéptido PRO1122 desejado. Os peritos na especialidade notarão que alterações de aminoácidos podem alterar processos pós-tradução do polipéptido PRO1122, tais como a alteração do número ou da posição de locais de glicosilação ou a alteração de características de ancoragem à membrana.

Variações no PRO1122 de sequência nativa de comprimento completo ou em vários domínios do polipéptido PRO1122 aqui descritos, podem ser feitas, por exemplo, utilizando quaisquer das técnicas e directrizes para mutações conservativas e não conservativas estabelecidas, por exemplo, na Patente U.S. 5,364,934. As variações podem ser uma substituição, deleção ou inserção de um ou mais codões que codificam o polipéptido PRO1122 que resultam numa alteração na sequência de aminoácidos do polipéptido PRO1122 comparativamente com a do PRO1122 de sequência nativa. Opcionalmente, a variação é efectuada por substituição de pelo menos um aminoácido por

qualquer outro aminoácido num ou mais dos domínios do polipéptido PRO1122. Directrizes para a determinação de que resíduo de aminoácido pode ser inserido, substituído ou eliminado sem afectar adversamente a actividade desejada, podem ser encontradas comparando a sequência do polipéptido PRO1122 com a de moléculas de proteína homólogas conhecidas e minimizando o número de alterações na sequência de aminoácidos efectuadas em regiões de homologia elevada. As substituições de aminoácidos podem ser o resultado da substituição de um aminoácido por outro aminoácido possuindo propriedades estruturais e/ou químicas similares, tais como a substituição de uma leucina por uma serina, *i.e.*, substituições conservativas de aminoácidos. As inserções ou as deleções podem opcionalmente ser na gama de 1 a 5 aminoácidos. A variação permitida pode ser determinada fazendo sistematicamente inserções, deleções ou substituições de aminoácidos na sequência e testando as variantes resultantes quanto à actividade (tal como em qualquer dos ensaios *in vitro* descritos nos Exemplos adiante) quanto à actividade exibida pela sequência nativa de comprimento completo ou madura.

São aqui proporcionados fragmentos de polipéptido PRO1122. Estes fragmentos podem ser truncados no terminal N ou no terminal C, ou podem ter falta de resíduos internos, por exemplo, comparativamente com uma proteína nativa ou de comprimento completo. A certos fragmentos faltam resíduos de aminoácido que não são essenciais para uma actividade biológica desejada do polipéptido PRO1122.

Os fragmentos de PRO1122 podem ser preparados por qualquer uma de várias técnicas convencionais. Os fragmentos peptídicos desejados podem ser quimicamente sintetizados. Uma abordagem alternativa envolve gerar fragmentos de PRO1122 por digestão enzimática, *e.g.*, por tratamento da proteína com uma enzima que se sabe clivar proteínas em locais definidos por resíduos de aminoácido particulares, ou por digestão do ADN com enzimas de restrição adequadas e isolamento do fragmento desejado. Ainda outra técnica adequada envolve o isolamento e a amplificação de um fragmento de ADN que codifica um fragmento polipeptídico desejado, por reacção em cadeia com polimerase (PCR). Os oligonucleótidos que definem os terminais desejados do fragmento de ADN são empregues nos iniciadores 5'

e 3' na PCR. Preferivelmente, os fragmentos de polipéptido PRO1122 partilham pelo menos uma actividade biológica e/ou imunológica com o polipéptido PRO1122 nativo apresentado na Figura 3 (SEQ ID NO:3).

Em concretizações particulares, mostram-se na Tabela substituições conservativas de interesse na Tabela, na coluna com o título de "Substituições Preferidas". Se essas substituições resultarem numa alteração da actividade biológica, então são introduzidas alterações mais substanciais, denominadas "Substituições Exemplificativas" na Tabela 1, ou como adicionalmente descrito adiante em referência a classes de aminoácidos, e os produtos são pesquisados.

Tabela 1  
**Substituições conservativas**

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

As modificações substanciais na função ou identidade imunológica do polipéptido PRO1122 são realizadas seleccionando substituições que diferem significativamente no seu efeito sobre a manutenção (a) da estrutura do esqueleto do polipéptido na área da substituição, por exemplo, como uma conformação em folha ou helicoidal, (b) da carga ou da hidrofobicidade da molécula no local alvo, ou (c) o volume da cadeia lateral. Os resíduos de ocorrência natural dividem-se em grupos com base nas propriedades comuns das cadeias laterais:

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

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

Variações podem ser feitas utilizando métodos conhecidos na especialidade tais como mutagénese mediada por oligonucleótidos (dirigida ao local), varrimento de alaninas e mutagénese por PCR. Mutagénese dirigida ao local [Carter et al., Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)], mutagénese por cassetes [Wells et al., Gene, 34:315 (1985)], mutagénese de selecção de restrição [Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)] ou outras técnicas conhecidas, podem ser realizadas no ADN clonado para produzir o ADN variante que codifica PRO1031.

A análise por varrimento de aminoácidos também pode ser empregue para identificar um ou mais aminoácidos ao longo de uma sequência contígua. Entre os aminoácidos preferidos para o varrimento estão os aminoácidos neutros, relativamente pequenos. Estes aminoácidos incluem alanina, glicina, serina, e cisteína. A alanina é tipicamente um aminoácido preferido para varrimento entre este grupo porque elimina a cadeia

lateral para além do carbono beta e é menos provável que altere a conformação da cadeia principal da variante. A alanina é também tipicamente preferida porque é o aminoácido mais comum. Adicionalmente, encontra-se frequentemente tanto em posições expostas como ocultas [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976)]. Se a substituição por alanina não originar quantidades adequadas de variante, pode ser utilizado um aminoácido isotérico.

### **C. Modificações de PRO1122**

As modificações covalentes de polipéptidos PRO1122 estão incluídas no âmbito da presente invenção como definido nas reivindicações. Um tipo de modificação covalente inclui a reacção de resíduos de aminoácido alvo de um polipéptido PRO1122 com um agente orgânico de derivatização que é capaz de reagir com cadeias laterais seleccionadas ou os resíduos N- ou C-terminais de um polipéptido PRO1122. A derivatização com agentes bifuncionais é útil, por exemplo, para a reticulação de PRO1122 numa matriz de suporte insolúvel em água ou numa superfície para utilização no método para purificação de anticorpos anti-PRO1122, e vice-versa. Os agentes de reticulação normalmente utilizados incluem, e.g., 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldeído, ésteres de N-hidroxissuccinimida, por exemplo, ésteres com ácido 4-azidossalicílico, imidoésteres homobifuncionais, incluindo ésteres de dissuccinimidilo tais como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidas bifuncionais tais como bis-N-maleimido-1,8-octano e agentes tais como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato.

Outras modificações incluem desamidação de resíduos glutaminilo e asparaginilo nos correspondentes resíduos glutamilo e aspartilo, respectivamente, hidroxilação de prolina e lisina, fosforilação de grupos hidroxilo de resíduos serilo ou treonilo, metilação dos grupos  $\alpha$ -amino das cadeias laterais 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 N-terminal e amidação de qualquer grupo carboxilo C-terminal.

Outro tipo de modificação covalente do polipéptido PRO1122 incluída no âmbito da presente invenção como definido nas reivindicações compreende a alteração do padrão de glicosilação nativo do polipéptido. A "alteração do padrão de glicosilação nativo" significa, para os presentes fins, a eliminação de uma ou mais porções hidrato de carbono encontradas no polipéptido PRO1122 de sequência nativa, e/ou adição de um ou mais locais de glicosilação que não estão presentes no polipéptido PRO1122 de sequência nativa. Adicionalmente, a frase inclui alterações qualitativas na glicosilação das proteínas nativas, envolvendo uma alteração na natureza e proporções das várias porções hidrato de carbono presentes.

A adição de locais de glicosilação aos polipéptidos PRO1122 pode ser conseguida alterando a sua sequência de aminoácidos. A alteração pode ser realizada, por exemplo, através da adição de, ou substituição por, um ou mais resíduos de serina ou treonina no polipéptido PRO1122 de sequência nativa (para locais de glicosilação com ligação a O). A sequência de aminoácidos de PRO1122 pode opcionalmente ser alterada através de alterações ao nível do ADN, particularmente, por mutação do ADN que codifica o polipéptido PRO1122 em bases pré-seleccionadas de modo a que sejam gerados codões que se irão traduzir nos aminoácidos desejados.

Outro meio para aumentar o número de porções hidrato de carbono no polipéptido PRO1122 é através de acoplamento químico ou enzimático de glicósidos ao polipéptido. Estes métodos estão descritos na especialidade, e.g., em WO 87/05330 publicado em 11 de Setembro de 1987, e em Aplin e Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981).

A remoção de porções hidrato de carbono presentes no polipéptido PRO1122 pode ser realizada química ou enzimaticamente ou por substituição mutacional de codões que codificam para resíduos de aminoácido que servem como alvos de glicosilação. As técnicas de desglicosilação química são conhecidas na especialidade e estão descritas, por exemplo, por Hakimuddin, et al., Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987) e por Edge et al., Anal. Biochem., 118:131 (1981). A clivagem enzimática de porções hidrato de carbono nos polipéptidos pode

ser conseguida utilizando uma variedade de endo- e exoglicosidasas como descrito por Thotakura et al., Meth. Enzymol., 138:350 (1987).

Outro tipo de modificação covalente de PRO1122 compreende a ligação do polipéptido PRO1122 a um de uma variedade de polímeros não proteináceos, e.g., polietilenoglicol, polipropilenoglicol ou polioxialquilenos, da maneira descrita nas Patentes U.S. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 ou 4,179,337.

Os polipéptidos PRO1122 podem também ser modificados de maneira a formar moléculas quiméricas compreendendo um polipéptido PRO1122, respectivamente, fundido com outro polipéptido ou sequência de aminoácidos heterólogos. Numa concretização, esta molécula quimérica compreende uma fusão de um polipéptido PRO1122 com um polipéptido marcador que proporciona um epítipo ao qual um anticorpo anti-marcador se pode ligar selectivamente. O marcador epitópico é geralmente colocado no terminal amino ou carboxilo do polipéptido PRO1122. A presença destas formas marcadas com epítipo de um polipéptido PRO1122 pode ser detectada utilizando um anticorpo contra o polipéptido marcador. Também, proporcionar o marcador epitópico permite que o polipéptido PRO1122 seja prontamente purificado por purificação por afinidade utilizando um anticorpo anti-marcador ou outro tipo de matriz de afinidade que se ligue ao marcador epitópico. Vários polipéptidos marcadores e seus respectivos anticorpos são bem conhecidos na especialidade. Os exemplos incluem marcadores poli-histidina (poli-His) ou poli-histidina-glicina (poli-His-Gly); o polipéptido marcador HA da gripe e o seu anticorpo 12CA5 [Field et al., Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]; o marcador c-myc e os seus anticorpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 e 9E10 [Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]; e o marcador glicoproteína D (gD) do vírus Herpes *Simplex* e o seu anticorpo [Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]. Outros polipéptidos marcadores incluem o péptido Flag [Hopp et al., BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]; o péptido epitópico KT3 [Martin et al., Science, 255:192-194 (1992)]; um péptido epitópico  $\alpha$ -tubulina [Skinner et al., J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]; e o marcador peptídico de proteína do gene 10 de T7 [Lutz-

Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)].

Numa concretização alternativa, a molécula quimérica pode compreender uma fusão de um polipéptido PRO1122 com uma imunoglobulina ou uma região particular de uma imunoglobulina. Para uma forma bivalente da molécula quimérica, esta fusão pode ser com a região Fc de uma molécula de IgG. As fusões de Ig preferivelmente incluem a substituição de uma forma solúvel (domínio transmembranar eliminado ou inactivado) de um polipéptido PRO1122 em vez de pelo menos uma região variável no interior de uma molécula de Ig. Numa concretização particularmente preferida, a fusão de imunoglobulina inclui as regiões charneira, CH2 e CH3, ou charneira, CH1, CH2 e CH3 de uma molécula de IgG1. Para a produção de fusões de imunoglobulina veja-se também a Patente US 5,428,130 concedida em 27 de Junho, 1995.

Ainda numa outra concretização, os polipéptidos PRO1122 podem também ser modificados de maneira a que formem uma molécula quimérica compreendendo um polipéptido PRO1122 fundido com um fecho-de-correr de leucinas. Vários polipéptidos fecho-de-correr de leucinas foram descritos na especialidade. Veja-se, e.g., Landschulz et al., Science 240:1759 (1988); WO 94/10308; Hoppe et al., FEBS Letters 344:1991 (1994); Maniatis et al., Nature 341:24 (1989). Crê-se que a utilização de um fecho-de-correr de leucinas fundido a um polipéptido PRO1122 pode ser desejável para auxiliar na dimerização ou trimerização de polipéptidos PRO1122 solúveis em solução. Os peritos na especialidade notarão que o fecho-de-correr de leucinas pode ser fundido quer à extremidade N-quer C-terminal da molécula de PRO1122.

#### **D. Preparação de PRO1122**

A descrição que se segue refere-se principalmente à produção de PRO1122 por cultura de células transformadas ou transfectadas com um vector contendo ácido nucleico que codifica polipéptido PRO1122. Está, evidentemente, contemplado que possam ser empregues métodos alternativos, que são bem conhecidos na especialidade, para preparar os polipéptidos PRO1122. Por exemplo, a sequência de PRO1122, ou suas porções,

podem ser produzidas por síntese peptídica directa utilizando técnicas em fase sólida [veja-se, e.g., Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)]. A síntese de proteínas *in vitro* pode ser realizada utilizando técnicas manuais ou automatizadas. A síntese automatizada pode ser realizada, por exemplo, utilizando um sintetizador de péptidos da Applied Biosystems (Foster City, CA) utilizando as instruções do fabricante. As várias porções de polipéptidos PRO1122 podem ser quimicamente sintetizadas separadamente e combinadas utilizando métodos químicos ou enzimáticos para produzir um polipéptido PRO1122 de comprimento completo.

### **1. Isolamento de ADN que codifica PRO1122**

O ADN que codifica um polipéptido PRO1122 pode ser obtido a partir de uma biblioteca de ADNc preparada a partir de tecido que se crê possuir o ARNm de PRO1122 e expressá-lo a um nível detectável. Deste modo, ADN que codifica PRO1122 humano pode ser obtido convenientemente a partir de uma biblioteca de ADNc preparada a partir de tecido humano, tal como descrito nos Exemplos. O gene que codifica PRO1122 pode também ser obtido a partir de uma biblioteca genómica ou por procedimentos sintéticos conhecidos (e.g., procedimentos de síntese automatizada, síntese de oligonucleótidos).

As bibliotecas podem ser pesquisadas com sondas (tais como anticorpos contra um polipéptido PRO1122 ou oligonucleótidos de pelo menos cerca de 20-80 bases) desenhadas para identificar o gene de interesse ou a proteína por ele codificada. A pesquisa da biblioteca genómica ou de ADNc com a sonda seleccionada pode ser conduzida utilizando procedimentos *standard*, tal como descrito em Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Um meio alternativo para isolar genes consiste em utilizar a metodologia de PCR [Sambrook et al., *supra*; Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Os Exemplos que se seguem descrevem técnicas para a pesquisa de uma biblioteca de ADNc. As sequências

oligonucleotídicas seleccionadas como sondas deverão ter comprimento suficiente e ser suficientemente não ambíguas para que sejam minimizados os falsos positivos. O oligonucleótido é preferivelmente marcado de modo a poder ser detectado após hibridação com ADN na biblioteca a pesquisar. Os métodos de marcação são bem conhecidos na especialidade, e incluem a utilização de marcadores radioactivos como ATP marcado com  $^{32}\text{P}$ , biotinylation ou marcação enzimática. As condições de hibridação, incluindo as de rigor moderado e as muito rigorosas, são proporcionadas em Sambrook *et al.*, *supra*.

As sequências identificadas através destes métodos de pesquisa de bibliotecas podem ser comparadas e alinhadas com outras sequências conhecidas depositadas e disponíveis em bases de dados públicas tais como a GenBank ou outras bases de dados de sequências privadas. A identidade de sequência (quer ao nível dos aminoácidos quer ao dos nucleótidos) no interior de regiões definidas da molécula ou ao longo da totalidade do comprimento da sequência, pode ser determinada utilizando métodos conhecidos na especialidade e como aqui descrito (e.g., através de alinhamento de sequências utilizando programas de computador tais como ALIGN, DNASTAR, BLAST, BLAST-2, INHERIT e ALIGN-2, que empregam vários algoritmos para medir a homologia).

O ácido nucleico possuindo a sequência de codificação da proteína pode ser obtido através da pesquisa de bibliotecas seleccionadas, genómicas ou de ADNc, utilizando a sequência de aminoácidos deduzida aqui revelada pela primeira vez, e, se necessário, utilizando procedimentos convencionais de alongamento de iniciadores como descrito em Sambrook *et al.*, *supra*, para detectar precursores e processando os intermediários de ARNm que podem não ter sofrido transcrição inversa em ADNc.

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

As células hospedeiras são transfectadas ou transformadas com vectores de expressão ou clonagem aqui descritos para a produção de polipéptido PRO1122 e cultivadas em meios nutrientes convencionais modificados conforme apropriado para a indução de promotores, selecção de transformantes ou

amplificação dos genes que codificam as sequências desejadas. As condições de cultura, tais como meios, temperatura, pH e semelhantes, podem ser seleccionadas pelo perito sem experimentação desnecessária. Em geral, princípios, protocolos e técnicas práticas para maximizar a produtividade das culturas celulares podem ser encontrados em Mammalian Cell BioTechnology: A Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) e Sambrook et al., *supra*.

São conhecidos das pessoas competentes na matéria métodos de transfecção, por exemplo,  $\text{CaPO}_4$  e electroporação. Dependendo da célula hospedeira utilizada, a transformação é realizada utilizando técnicas *standard* apropriadas para essas células. O tratamento com cálcio empregando cloreto de cálcio, como descrito em Sambrook et al., *supra*, ou a electroporação, são geralmente utilizados para procariotas ou outras células que contêm barreiras de parede celular substanciais. A infecção com *Agrobacterium tumefaciens* é utilizada para a 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 estas paredes celulares, pode ser empregue o método de precipitação com fosfato de cálcio de Graham e van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978). Aspectos gerais de transformações em sistemas de células hospedeiras de mamífero foram descritos na Patente U.S. 4,399,216. As transformações em levedura são tipicamente realizadas de acordo com o método de Van Solingen et al., J. Bact., 130:946 (1977) e Hsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979). Contudo, podem também ser utilizados outros métodos para a introdução de ADN em células, tais como por micro-injecção nuclear, electroporação, fusão de protoplastos bacterianos com células intactas, ou policatiões, e.g., polibreno, poliornitina. Para várias técnicas para a transformação de células de mamífero, veja-se Keown et al., Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990) e Mansour et al., Nature, 336:348-352 (1988).

As células hospedeiras adequadas para clonagem ou expressão do ácido nucleico (e.g., ADN) nos presentes vectores incluem células procariotas, de levedura ou eucariotas superiores. Os procariotas adequados incluem, mas não se lhes limitam, eubactérias, tais como organismos Gram-negativos ou

Gram-positivos, por exemplo, *Enterobacteriaceae* tais como *E. coli*. Várias estirpes de *E. coli* estão disponíveis ao público, tais como *E. coli* K12 estirpe MM294 (ATCC 31,446); *E. coli* X1776 (ATCC 31,537); *E. coli* estirpe W3110 (ATCC 27,325) e K5 772 (ATCC 53,635). Outras células hospedeiras procariotas adequadas incluem *Enterobacteriaceae* tais como *Escherichia*, e.g., *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, e.g., *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, e.g., *Serratia marcescans* e *Shigella*, assim como *Bacilli* tais como *B. subtilis* e *B. licheniformis* (e.g., *B. licheniformis* 41P revelado em DD 266,710 publicado em 12 de Abril de 1989), *Pseudomonas* tais como *P. aeruginosa* e *Streptomyces*. Estes exemplos são ilustrativos e não limitantes. A estirpe W3110 é um hospedeiro ou hospedeiro parental particularmente preferido pois é uma estirpe hospedeira comum para fermentações de produtos de ADN recombinante. Preferivelmente, a célula hospedeira segrega quantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por exemplo, a estirpe W3110 pode ser modificada para efectuar uma mutação genética nos genes que codificam proteínas endógenas ao hospedeiro, incluindo os exemplos destes hospedeiros *E. coli* W3110 estirpe 1A2, que possui o genótipo completo *tonA*; *E. coli* W3110 estirpe 9E4, que possui o genótipo completo *tonA ptr3*; *E. coli* W3110 estirpe 27C7 (ATCC 55,244), que possui o genótipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kan'*; *E. coli* W3110 estirpe 40B4, que é a estirpe 37D6 com uma mutação de deleção de *degP* não resistente a canamicina; e uma estirpe de *E. coli* possuindo protease periplasmática mutante revelada na Patente U.S. 4,946,783 concedida em 7 de Agosto de 1990. Alternativamente, são adequados métodos de clonagem *in vivo*, e.g., PCR ou outras reacções com ácido nucleico-polimerase.

Em adição aos procariotas, micróbios eucariotas tais como fungos filamentosos ou leveduras são hospedeiros de clonagem ou expressão adequados para vectores de codificação de PRO1122. A *Saccharomyces cerevisiae* é um microorganismo hospedeiro eucariota inferior vulgarmente utilizado. Outros incluem *Schizosaccharomyces pombe* (Beach e Nature, Nature, 290: 140 [1981]; EP 139383 publicado em 2 de Maio de 1995); hospedeiros *Kluyveromyces* (Patente U.S. 4,943,529; Fleer et al., Bio/Technology, 9:968-975 (1991)) tais como, e.g., *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt et al., J.

Bacteriol., 737 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilae* (ATCC 36,906; Van den Berg et al., Bio/Technology, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans*, e *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402226); *Pichia pastoris* (EP 183070; Sreekrishna et al., J. Basic Microbiol., 28:265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244,234); *Neurospora crassa* (Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5359-5263 [1979]); *Schwanniomyces* tais como *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394538 publicado em 31 de Outubro de 1990); e fungos filamentosos tais como, e.g., *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357 publicado em 10 de Janeiro de 1991), e hospedeiros *Aspergillus* tais como *A. nidulans* (Balance et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983]; Tilburn et al., Gene, 26:205-221 [1983]; Yelton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]) e *A. niger* (Kelly e Hynes, EMBO J., 4:475-479 [1985]). As leveduras metilotróficas são seleccionadas dos géneros que consistem em *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* e *Rhodotorula*. Uma listagem de espécies específicas que constituem exemplos desta classe de leveduras pode ser encontrada em C. Antony, The Biochemistry of Metilotrophs, 269 (1982).

As células hospedeiras adequadas para a expressão de PRO1122 glicosilado são derivadas de organismos pluricelulares. Os exemplos de células de invertebrados incluem células de insecto tais como *Drosophila* S2 e *Spodoptera Sf9*, *Spodoptera high5*, bem como células vegetais. Os exemplos de linhas celulares hospedeiras de mamífero úteis incluem células de ovário de hamster chinês (CHO) e COS. Exemplos mais específicos incluem a linha CV1 de rim de macaco transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); a linha de rim embrionário humano (células 293 ou 293 subclonadas para crescimento em cultura em suspensão, Graham et al., J. Gen Virol., 36:59 (1977)); células de ovário de hamster chinês/-DHFR (CHO, Urlaub e Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratinho (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); células de pulmão humano (W138, ATCC CCL 75); células de fígado humano (Hep G2, HB 8065); e tumor mamário de ratinho (MMT 060562, ATCC CCL51).

Considera-se que a selecção da célula hospedeira apropriada faz parte da perícia na especialidade.

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

O ácido nucleico (e.g., ADNc ou ADN genómico) que codifica o polipéptido PRO1122 desejado pode ser inserido num vector replicável para clonagem (amplificação do ADN) ou para expressão. Vários vectores estão disponíveis ao público. O vector pode, por exemplo, estar na forma de um plasmídeo, cosmídeo, partícula viral ou fago. A sequência de ácido nucleico apropriada pode ser inserida no vector através de uma variedade de procedimentos. Em geral, o ADN é inserido num local ou locais para endonucleases de restrição apropriados utilizando técnicas conhecidas na especialidade. Os componentes do vector incluem geralmente, mas não se lhes limitam, um ou mais de entre uma sequência de sinal, uma origem de replicação, um ou mais genes marcadores, um elemento potenciador, um promotor e uma sequência de terminação da transcrição. A construção de vectores adequados contendo um ou mais destes componentes emprega técnicas *standard* de ligação que são conhecidas dos peritos.

O polipéptido PRO1122 pode ser produzido recombinantemente não apenas directamente, mas também na forma de um polipéptido de fusão com um polipéptido heterólogo, que pode ser uma sequência de sinal ou outro polipéptido possuindo um local de clivagem específico no terminal N da proteína ou do polipéptido maduros. Em geral, a sequência de sinal pode ser um componente do vector, ou pode fazer parte do ADN que codifica o PRO1122 que é inserido no vector. A sequência de sinal pode ser uma sequência de sinal de procariota seleccionada, por exemplo, do grupo dos comandos de fosfatase alcalina, penicilinase, Ipp ou enterotoxina estável ao calor II. Para secreção em leveduras, a sequência de sinal pode ser, e.g., o comando da invertase de levedura, o comando do factor alfa (incluindo comandos de factor  $\alpha$  de *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*, este último descrito na Patente U.S. 5,010,182), ou o comando da fosfatase ácida, o comando da glucoamilase de *C. albicans* (EP 362179 publicado em 4 de Abril de 1990), ou o sinal descrito em WO 90/13646 publicado em 15 de Novembro de 1990. Na expressão em células de mamífero,

podem-se utilizar sequências de sinal de mamífero para dirigir a secreção da proteína, tais como as sequências de sinal de polipéptidos segregados da mesma espécie ou de espécies relacionadas, bem como comandos de secreção virais.

Tanto os vectores de expressão como os de clonagem contêm uma sequência de ácido nucleico que permite que o vector replique numa ou mais células hospedeiras seleccionadas. Estas sequências são bem conhecidas para uma variedade de bactérias, leveduras e vírus. A origem de replicação do plasmídeo pBR322 é adequada para a maioria das bactérias Gram-negativas, a origem do plasmídeo 2 $\mu$  é adequada para leveduras, e várias origens virais (SV40, políoma, adenovírus, VSV ou BPV) são úteis para vectores de clonagem em células de mamífero.

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

Um exemplo de marcadores seleccionáveis adequados para células de mamífero são aqueles que permitem a identificação de células competentes para assimilar o ácido nucleico que codifica PRO1122, tais como DHFR ou timidina-quinase. Uma célula hospedeira apropriada quando é empregue DHFR do tipo selvagem é a linha de células de CHO deficientes em actividade de DHFR, preparada e propagada como descrito por Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980). Um gene de selecção adequado para utilização em levedura é o gene *trp1* presente no plasmídeo YRp7 de levedura [Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979); Kingsman et al., Gene, 7:141 (1979); Tschemper et al., Gene, 10:157 (1980)]. O gene *trp1* proporciona um marcador de selecção para uma estirpe mutante de levedura a que falta a capacidade de crescer em triptofano, por exemplo, ATCC N°. 44076 ou PEP4-1 [Jones, Genetics, 85:12 (1977)].

Os vectores de expressão e clonagem usualmente contêm um promotor ligado operativamente à sequência de ácido nucleico que codifica PRO1122 para dirigir a síntese de ARNm. Os promotores reconhecidos por uma variedade de potenciais células hospedeiras são bem conhecidos. Os promotores adequados para utilização com hospedeiros procariotas incluem os sistemas promotores de  $\beta$ -lactamase e lactose [Chang et al., Nature, 275:615 (1978); Goeddel et al., Nature, 281:544 (1979)], fosfatase alcalina, um sistema promotor de triptofano (trp) [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36776], e promotores híbridos tais como o promotor tac [deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)]. Os promotores para utilização em sistemas bacterianos também conterão uma sequência de Shine-Dalgarno (S.D.) ligada operativamente ao ADN que codifica o polipéptido PRO1122.

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

Outros promotores de levedura, que são promotores indutíveis possuindo a vantagem adicional de transcrição controlada pelas condições de crescimento, são as regiões promotoras para a álcool-desidrogenase 2, isocitocromo C, fosfatase ácida, enzimas degradativas associadas ao metabolismo do azoto, metalotioneína, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase e enzimas responsáveis pela utilização da maltose e da galactose. Os vectores e promotores adequados para utilização na expressão em leveduras são adicionalmente descritos em EP 73657.

A transcrição de PRO1122 a partir de vectores em células hospedeiras de mamífero é controlada, por exemplo, por promotores obtidos dos genomas de vírus tais como

poliomavírus, vírus *fowlpox* (UK 2,211,504 publicado em 5 de Julho de 1989), adenovírus (tais como Adenovírus 2), papilomavírus de bovino, vírus do sarcoma aviário, citomegalovírus, um retrovírus, vírus de hepatite B e Vírus Símio 40 (SV40), a partir de promotores de mamífero heterólogos, e.g., o promotor da actina ou um promotor de imunoglobulina, e a partir de promotores de choque por calor, desde que estes promotores sejam compatíveis com os sistemas de células hospedeiras.

A transcrição de um ADN que codifica um polipéptido PRO1122 por eucariotas superiores pode ser aumentada inserindo uma sequência potenciadora no vector. Os potenciadores são elementos de ADN que actuam em *cis*, usualmente com cerca de 10 a 300 pb, que actuam sobre um promotor para aumentar a sua transcrição. Muitas sequências potenciadoras são actualmente conhecidas de genes de mamífero (globina, elastase, albumina,  $\alpha$ -fetoproteína e insulina). Tipicamente, contudo, utilizar-se-á um potenciador de um vírus de célula eucariota. Os exemplos incluem o potenciador de SV40 no lado tardio da origem de replicação (pb 100-270), o potenciador do promotor precoce de citomegalovírus, o potenciador de polioma no lado tardio da origem de replicação e potenciadores de adenovírus. O potenciador pode ser unido com *splicing* no vector numa posição a 5' ou 3' da sequência de codificação do PRO1122, mas está preferivelmente localizado do lado 5' do promotor.

Os vectores de expressão utilizados em células hospedeiras eucariotas (células de levedura, de fungo, de insecto, vegetais, animais, humanas ou células nucleadas de outros organismos pluricelulares) conterão também sequências necessárias para a terminação da transcrição e para estabilização do ARNm. Estas sequências estão vulgarmente disponíveis a partir das regiões não traduzidas a 5' e, ocasionalmente a 3', de ADN ou ADNc eucariotas ou virais. Estas regiões contêm segmentos de nucleótidos transcritos na forma de fragmentos poliadenilados na porção não traduzida do ARNm que codifica PRO1122.

Ainda outros métodos, vectores e células hospedeiras adequados para adaptação à síntese de polipéptidos PRO1122 em cultura de células recombinantes de vertebrado, estão

descritos em Gething et al., Nature, 293:620-625 (1981); Mantei et al., Nature, 281:40-46 (1979); EP 117060; e EP 117058.

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

A amplificação e/ou expressão de genes podem ser medidas numa amostra directamente, por exemplo, por *Southern blotting* convencional, *Northern blotting* para quantificar a transcrição de ARNm [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)], *dot blotting* (análise de ADN), ou hibridação *in situ*, utilizando uma sonda apropriadamente marcada, com base nas sequências aqui proporcionadas. Alternativamente, podem ser empregues anticorpos que podem reconhecer cópias específicas, incluindo cópias de ADN, cópias de ARN e cópias híbridas de ADN-ARN ou cópias de ADN-proteína. Os anticorpos por sua vez podem ser marcados e o ensaio pode ser realizado onde a cópia está ligada a uma superfície, de modo a que pela formação da cópia na superfície, a presença de anticorpo ligado à cópia possa ser detectada.

A expressão de genes, alternativamente, pode ser medida por métodos imunológicos, tais como coloração imuno-histoquímica de células ou secções de tecidos e ensaio de culturas celulares ou de fluidos corporais, para quantificar directamente a expressão do produto génico. Os anticorpos úteis para coloração imuno-histoquímica e/ou ensaio de amostras de fluidos podem ser monoclonais ou policlonais, e podem ser preparados em qualquer mamífero. Convenientemente, os anticorpos podem ser preparados contra um polipéptido PRO1122 de sequência nativa ou contra um péptido sintético baseado nas sequências de ADN aqui proporcionadas ou contra uma sequência exógena fundida com ADN que codifica PRO1122 e codificando um epítopo de anticorpo específico.

#### **5. Purificação do Polipéptido**

As formas de PRO1122 podem ser recuperadas a partir do meio de cultura ou de lisados das células hospedeiras. Se estiver ligado à membrana, pode ser libertado da membrana utilizando uma solução de detergente adequado (e.g. Triton-X 100) ou por clivagem enzimática. As células empregues

na expressão de polipéptidos PRO1122 podem ser rompidas através de vários meios físicos ou químicos, tais como ciclos de congelação-descongelação, tratamento com ultra-sons, ruptura mecânica ou agentes de lise celular.

Pode-se desejar purificar o PRO1122 a partir de proteínas ou polipéptidos de células recombinantes. Os procedimentos que se seguem são exemplos de procedimentos de purificação adequados: por fraccionamento numa coluna de permuta iónica; precipitação com etanol; HPLC de fase inversa; cromatografia sobre sílica ou numa resina de permuta catiónica tal como DEAE; cromatofocagem; SDS-PAGE; precipitação com sulfato de amónio; filtração em gel utilizando, por exemplo, Sephadex G-75; colunas de proteína A-Sepharose para remover contaminantes tais como IgG; e colunas quelantes de metais para ligar formas marcadas com epítipo do polipéptido PRO1122. Vários métodos de purificação de proteínas podem ser empregues e esses métodos são conhecidos na especialidade e estão descritos por exemplo em Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982). O(s) passo(s) de purificação seleccionado(s) irão depender, por exemplo, da natureza do processo de produção utilizado e do polipéptido PRO1122 particular produzido.

#### **E. Utilizações para PRO1122**

As sequências de nucleótidos (ou seu complemento) que codificam polipéptidos PRO1122 têm várias aplicações na especialidade da biologia molecular, incluindo utilizações como sondas de hibridação, em mapeamento de cromossomas e genes e na geração de ADN e ARN anti-sentido. O ácido nucleico que codifica PRO1122 também será útil para a preparação de polipéptidos PRO1122 por técnicas recombinantes aqui descritas.

A sequência de nucleótidos de DNA62377-1381-1 de comprimento completo (SEQ ID NO:4) ou a sequência de nucleótidos de codificação de PRO1122 de sequência nativa, de comprimento completo, ou suas porções, podem ser utilizadas como sondas de hibridação para uma biblioteca de ADNc para isolar o gene de PRO1122 de comprimento completo ou para

isolar ainda outros genes (por exemplo, os que codificam variantes de ocorrência natural de PRO1122 ou o mesmo de outras espécies) que têm uma identidade de sequência desejada com a sequência de nucleótidos de PRO1122 revelada na Figura 4 (SEQ ID NO:4). Opcionalmente, o comprimento das sondas será de cerca de 20 a cerca de 50 bases. As sondas de hibridação podem ser derivadas da sequência de nucleótidos DNA62377-1381-1 de SEQ ID NO:4 como mostrado na Figura 4 ou de sequências genómicas incluindo promotores, elementos potenciadores e intrões de ADN que codifica PRO1122 de sequência nativa. A título de exemplo, um método de pesquisa compreenderá o isolamento da região de codificação do gene de PRO1122 utilizando a sequência de ADN conhecida para sintetizar uma sonda seleccionada de cerca de 40 bases. As sondas de hibridação podem ser marcadas por uma variedade de marcadores, incluindo radionuclídeos tais como  $^{32}\text{P}$  ou  $^{35}\text{S}$ , ou marcadores enzimáticos tais como fosfatase alcalina acoplada à sonda por via de sistemas de acoplamento avidina/biotina. As sondas marcadas possuindo uma sequência complementar à do gene de PRO1122 da presente invenção podem ser utilizadas para pesquisar bibliotecas de ADNc humano, ADN genómico ou ARNm para determinar com que membros dessas bibliotecas a sonda hibrida. As técnicas de hibridação estão descritas com mais detalhes nos Exemplos adiante.

Quaisquer sequências de EST (ou seus fragmentos) reveladas no presente pedido de patente podem ser similarmente empregues como sondas, utilizando os métodos aqui revelados.

Outros fragmentos úteis dos ácidos nucleicos de PRO1122 incluem oligonucleótidos de sentido directo ou anti-sentido compreendendo uma sequência de ácido nucleico de cadeia simples (quer ARN, quer ADN) capaz de se ligar a sequências alvo de ARNm de PRO1122 (sentido directo) ou ADN de PRO1122 (anti-sentido). Os oligonucleótidos anti-sentido ou de sentido directo, de acordo com a presente invenção, compreendem um fragmento da região de codificação do ADN de PRO1122. Este fragmento geralmente compreende pelo menos cerca de 14 nucleótidos, preferivelmente de cerca de 14 a 30 nucleótidos. A capacidade de derivar um oligonucleótido anti-sentido ou um de sentido directo, com base numa sequência de ADNc que codifica uma determinada proteína está descrita, por

exemplo, em Stein e Cohen (Cancer Res. 48:2659, 1988) e van der Krol et al. (BioTechniques 6:958, 1988).

A ligação de oligonucleótidos anti-sentido ou de sentido directo a sequências de ácido nucleico alvo resulta na formação de dúpliques que bloqueiam a transcrição ou a tradução da sequência alvo através de um de vários meios, incluindo a degradação aumentada das dúpliques, a terminação prematura da transcrição ou da tradução, ou por outros meios. Os oligonucleótidos anti-sentido podem assim ser utilizados para bloquear a expressão de proteínas PRO1122. Os oligonucleótidos anti-sentido ou de sentido directo compreendem ainda oligonucleótidos possuindo esqueletos de açúcar-fosfodiéster modificados (ou outras ligações de açúcares, tais como as descritas em WO 91/06629) e em que essas ligações de açúcares são resistentes a nucleases endógenas. Estes oligonucleótidos com ligações de açúcares resistentes são estáveis *in vivo* (*i.e.*, capazes de resistir a degradação enzimática) mas retêm a especificidade da sequência para se poder ligar a sequências de nucleótidos alvo.

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

Os oligonucleótidos anti-sentido ou de sentido directo podem ser introduzidos numa célula contendo a sequência de ácido nucleico alvo por qualquer método de transferência de genes, incluindo, por exemplo, transfecção de ADN mediada por  $\text{CaPO}_4$ , electroporação ou utilizando vectores de transferência de genes tais como o vírus de Epstein-Barr. Num procedimento preferido, um oligonucleótido anti-sentido ou de sentido directo é inserido num vector retroviral adequado. Uma célula contendo a sequência de ácido nucleico alvo é colocada em

contacto com o vector retroviral recombinante, quer *in vivo* quer *ex vivo*. Os vectores retrovirais adequados incluem, mas não se lhes limitam, os derivados dos retrovírus murinos M-MuLV, N2 (um retrovírus derivado de M-MuLV), ou os vectores de cópia dupla designados por CDT5A, DCT5B e DCT5C (veja-se WO 90/13641).

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

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

As sondas podem também ser empregues em técnicas de PCR para gerar um conjunto de sequências para identificação de sequências de PRO1122 estreitamente relacionadas.

As sequências de nucleótidos que codificam um polipéptido PRO1122 podem também ser utilizadas para construir sondas de hibridação para mapeamento de genes que codificam esse polipéptido PRO1122 e para a análise genética de indivíduos com desordens genéticas. As sequências de nucleótidos aqui proporcionadas podem ser mapeadas num cromossoma e regiões específicas de um cromossoma utilizando técnicas conhecidas, tais como hibridação *in situ*, análise de ligação génica

(*linkage analysis*) contra marcadores cromossómicos conhecidos e pesquisa por hibridação com bibliotecas.

Quando as sequências de codificação para PRO1122 codificam uma proteína que se liga a outra proteína (por exemplo, quando o polipéptido PRO1122 funciona como um receptor), o polipéptido PRO1122 pode ser utilizado em ensaios para identificar as outras proteínas ou moléculas envolvidas na interacção de ligação. Através destes métodos, podem ser identificados inibidores da interacção de ligação receptor/ligando. As proteínas envolvidas nestas interacções de ligação podem também ser utilizadas para pesquisar inibidores peptídicos ou de molécula pequena ou agonistas da interacção de ligação. Também, o polipéptido PRO1122 receptor pode ser utilizado para isolar ligando(s) correlacionados. Podem ser desenhados ensaios de pesquisa para encontrar compostos líder que imitam a actividade biológica de um PRO1122 nativo ou um receptor para PRO1122. Estes ensaios de pesquisa incluirão ensaios susceptíveis de pesquisa de alto rendimento de bibliotecas químicas, o que os torna particularmente adequados para a identificação de candidatos a fármacos de molécula pequena. As moléculas pequenas contempladas incluem compostos sintéticos orgânicos ou inorgânicos. Os ensaios podem ser realizados numa variedade de formatos, incluindo ensaios de ligação proteína-proteína, ensaios de pesquisa bioquímicos, imunoenaios e ensaios à base de células, que estão bem caracterizados na especialidade.

Os ácido nucleicos que codificam polipéptido PRO1122 ou quaisquer das suas formas modificadas podem também ser utilizados para gerar animais transgénicos não humanos ou animais "*knock-out*" não humanos que, por sua vez, são úteis no desenvolvimento e pesquisa de reagentes terapeuticamente úteis. Um animal transgénico não humano (e.g., um ratinho ou rato) é um animal possuindo células que contêm um transgene, transgene este que foi introduzido no animal ou num ascendente do animal num estágio pré-natal, e.g., estágio embrionário. Um transgene é um ADN que está integrado no genoma de uma célula a partir da qual se desenvolve o animal transgénico. Numa concretização, o ADNc que codifica polipéptido PRO1122 pode ser utilizado para clonar ADN genómico que codifica PRO1122 de acordo com técnicas estabelecidas e as sequências genómicas

podem ser utilizadas para gerar animais transgénicos que contêm células que expressam o ADN que codifica o PRO1122. Os métodos para gerar animais transgénicos, particularmente animais tais como ratinhos ou ratos, tornaram-se convencionais na especialidade e estão descritos, por exemplo, nas Patentes U.S. 4,736,866 e 4,870,009. Tipicamente, células particulares serão escolhidas como alvo para a incorporação do transgene de PRO1122 com potenciadores específicos de tecidos. Os animais transgénicos que incluem uma cópia de um transgene que codifica PRO1122 introduzida na linha germinal do animal num estágio embrionário podem ser utilizados para examinar o efeito de expressão aumentada de ADN que codifica PRO1122. Estes animais podem ser utilizados como animais de teste para reagentes que se pensa conferirem protecção contra, por exemplo, condições patológicas associadas à sua sobre-expressão. De acordo com esta faceta da invenção, um animal é tratado com o reagente e uma incidência reduzida da condição patológica, comparada com a de animais não tratados portadores do transgene, indicaria uma potencial intervenção terapêutica para a condição patológica.

Alternativamente, homólogos não humanos de PRO1122 podem ser utilizados para construir um animal "*knock-out*" relativamente a PRO1122 que possui um gene codificador de PRO1122 defectivo ou alterado em resultado de recombinação homóloga entre o gene endógeno que codifica PRO1122 e o ADN genómico alterado que codifica PRO1122 introduzido numa célula embrionária do animal. Por exemplo, ADNc que codifica PRO1122 pode ser utilizado para clonar ADN genómico que codifica PRO1122 de acordo com técnicas estabelecidas. Uma porção do ADN genómico que codifica PRO1122 pode ser eliminada ou substituída por outro gene, tal como um gene codificando um marcador seleccionável que pode ser utilizado para monitorar a integração. Tipicamente, estão incluídas no vector várias quilobases de ADN flaqueador inalterado (em ambas as extremidades 5' e 3') [veja-se e.g., Thomas e Capecchi, Cell, 51:503 (1987) para uma descrição de vectores de recombinação homóloga]. O vector é introduzido numa linha de células estaminais embrionárias (e.g., por electroporação) e as células em que o ADN introduzido foi homologamente recombinado com o ADN endógeno são seleccionadas [veja-se e.g., Li et al., Cell, 69:915 (1992)]. As células seleccionadas são então

injectadas num blastocisto de um animal (e.g., um ratinho ou rato) para formar quimeras de agregação [veja-se e.g., Bradley, em Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E.J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152]. Um embrião quimérico pode então ser implantado num animal hospedeiro fêmea pseudo-grávida adequada e o embrião é levado a termo para criar um animal "knock-out". A progénie portadora do ADN homologamente recombinado nas suas células germinais pode ser identificada por técnicas *standard* e utilizada para criar animais em que todas as células do animal contêm o ADN homologamente recombinado. Os animais *knock-out* podem ser caracterizados por exemplo, pela sua capacidade de se defenderem contra certas condições patológicas e pelo seu desenvolvimento de condições patológicas devido à ausência do polipéptido PRO1122.

O ácido nucleico que codifica os polipéptidos PRO1122 pode também ser utilizado em terapia génica. Em aplicações de terapia génica, os genes são introduzidos em células de modo a conseguir a síntese *in vivo* de um produto genético terapeuticamente eficaz, por exemplo para substituição de um gene defectivo. A "terapia génica" inclui tanto a terapia génica convencional onde um efeito duradouro é conseguido através de um único tratamento, como a administração de agentes terapêuticos génicos, que envolve a administração de uma só vez ou repetida de um ADN ou ARNm terapeuticamente eficazes. Os ADN e ARN anti-sentido podem ser utilizados como agentes terapêuticos para o bloqueio da expressão de certos genes *in vivo*. Mostrou-se já que oligonucleótidos anti-sentido curtos podem ser importados pelas células onde actuam como inibidores, apesar das suas baixas concentrações intracelulares causadas pela sua restrita assimilação pela membrana celular. (Zamecnik *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4143-4146 [1986]). Os oligonucleótidos podem ser modificados para aumentar a sua assimilação, e.g. substituindo os seus grupos fosfodiéster negativamente carregados por grupos não carregados.

Existem uma variedade de técnicas disponíveis para a introdução de ácidos nucleicos em células viáveis. As técnicas variam dependendo de se o ácido nucleico é transferido para células de cultura *in vitro*, ou *in vivo* nas células do

hospedeiro pretendido. As técnicas adequadas para a transferência de ácido nucleico para células de mamífero *in vitro* incluem a utilização de lipossomas, electroporação, micro-injecção, fusão celular, DEAE-dextrano, o método de precipitação com fosfato de cálcio, etc. As técnicas de transferência de genes *in vivo* presentemente preferidas incluem a transfecção com vectores virais (tipicamente retrovirais) e transfecção mediada por lipossomas de proteína do revestimento viral (Dzau et al., Trends in BioTechnology 11, 205-210 [1993]). Em algumas situações é desejável proporcionar a fonte de ácido nucleico com um agente que tem como alvo as células alvo, tal como um anticorpo específico para uma proteína de membrana da superfície celular ou para a célula alvo, um ligando para um receptor na célula alvo, etc. Quando são empregues lipossomas, podem ser utilizadas proteínas que se ligam a uma proteína de membrana da superfície celular associada a endocitose, para atingir e/ou facilitar a assimilação, e.g. proteínas da cápside ou seus fragmentos trópicos para um tipo de células em particular, anticorpos para proteínas que sofrem internalização em ciclos, proteínas que têm como alvo uma localização intracelular e aumentam a semivida intracelular. A técnica de endocitose mediada por receptores é descrita, por exemplo, por Wu et al., J. Biol. Chem. 262, 4429-4432 (1987); e Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990). Para uma revisão de protocolos de marcação de genes e terapia génica veja-se Anderson et al., Science 256, 808-813 (1992).

Os polipéptidos PRO1122 aqui descritos podem também ser empregues como marcadores de peso molecular para fins de electroforese de proteínas.

A molécula de ácido nucleico que codifica os polipéptidos PRO1122 ou seus fragmentos aqui descritos são úteis para a identificação de cromossomas. A este respeito, existe uma necessidade crescente de identificar novos marcadores de cromossomas, pois estão actualmente disponíveis relativamente poucos reagentes marcadores para cromossomas, baseados nos actuais dados de sequências. Cada molécula de ácido nucleico de PRO1122 da presente invenção pode ser utilizada como um marcador de cromossoma.

Os polipéptidos PRO1122 e moléculas de ácido nucleico da presente invenção podem também ser utilizados para a tipificação de tecidos, em que os polipéptidos PRO1122 da presente invenção podem ser expressos diferencialmente num tecido em comparação com outros. As moléculas de ácido nucleico de PRO1122 serão úteis para gerar sondas para PCR, análise de *Northern*, análise de *Southern* e análise de *Western*.

Os polipéptidos PRO1122 da presente invenção que possuem actividade biológica relacionada com a da IL-17 podem ser empregues tanto *in vivo* para fins terapêuticos como *in vitro*. Os peritos na especialidade saberão bem como empregar os polipéptidos PRO1122 da presente invenção para estes fins.

O PRO1122 pode ser utilizado em ensaios com os polipéptidos com os quais tem identidade para determinar as actividades relativas. Os resultados podem ser aplicados em concordância.

Um alinhamento da sequência de aminoácidos prevista de IL-17B (e.g., UNQ516) (SEQ ID NO:1) e IL-17C (UNQ561) (SEQ ID NO:3) com a sequência conhecida de IL-17 (SEQ ID NO:11), mostra que esta é uma família de sequências relacionadas com uma identidade de aminoácidos de 26-28% entre os três membros (Figura 7). Todos os três polipéptidos contêm uma sequência hidrófoba no terminal N que se espera que funcione como uma sequência de sinal de secreção de 18-20 aminoácidos, dando uma gama de tamanhos prevista para os membros desta família de 155 a 197 aminoácidos (PM maduro de 17 a 20 kDa). O alinhamento da Figura 7 mostra vários aminoácidos conservados, incluindo um resíduo de triptofano e 5 cisteínas na metade C-terminal das proteínas.

O ácido nucleico que codifica PRO1122 ou seus fragmentos podem também ser utilizados para localizações cromossómicas. Por exemplo, a localização cromossómica de IL-17B (UNQ516) (SEQ ID NO:1) e IL-17C (UNQ561) (SEQ ID NO:3) foi determinada utilizando iniciadores Taqman e sondas desenhadas nas regiões não traduzidas a 3' de IL-17B e IL-17C, foi realizada por PCR com o painel Stanford Radiation Hybrid Panel G3. A IL-17B (UNQ516) (SEQ ID NO:1) foi mapeada no cromossoma humano 5q32-34, enquanto a IL-17C (UNQ561) (SEQ ID NO:3) foi localizada no

cromossoma 16q24. A IL-17 humana, ela própria, é encontrada no cromossoma 2q31. Rouvier et al., M Immunol. 150: 5445 (1993).

Com o isolamento e a caracterização dos dois novos parentes da IL-17, os Requerentes estabeleceram e expandiram o potencial papel que esta família de citocinas pode desempenhar na resposta imunitária pró-inflamatória e noutras respostas. Os três membros da família, IL-17 (SEQ ID NO:11), IL-17B (SEQ ID NO:1) e IL-17C (SEQ ID NO:3), relacionam-se modestamente em termos de estrutura primária com cerca de 27% de identidade global de aminoácidos incluindo 5 resíduos de cisteína conservados (Figura 7). Os três membros da família partilham várias características - têm 150-200 resíduos de aminoácido de comprimento, são segregados pelas células por via de uma sequência de sinal de secreção hidrófoba, e são expressos na forma de homodímeros ligados por dissulfureto que em alguns casos parecem estar glicosilados.

Embora membros da mesma família de genes com base na semelhança de sequências de aminoácidos, as três proteínas são expressas em diferentes tecidos e estão dispersas no genoma. A expressão de IL-17 (SEQ ID NO:11) foi relatada apenas em células T activadas, Fossiez et al., *J Exp. Med.* 183: 2593 (1996), Yao et al., J. Immunol. 155: 5483 (1995) [Yao-3], enquanto se demonstra que a IL-17B (DNA59294) (SEQ ID NO:2) é expressa em pâncreas humano adulto normal, intestino delgado e estômago (Figura 8). O padrão de expressão da IL-17C (DNA62377) (SEQ ID NO:4), contudo, é muito mais restrito, já que a expressão continuada noutros tecidos ainda não foi verificada.

As caracterizações aqui descritas demonstram que as actividades biológicas de IL-17B (UNQ516) (SEQ ID NO:1) e IL-17C (UNQ561) (SEQ ID NO:3) são consideravelmente diferentes das actividades estabelecidas para a IL-17 (SEQ ID NO:11). A IL-17B (UNQ516) (SEQ ID NO:1) e a IL-17C (UNQ561) (SEQ ID NO:3) são ambas incapazes de induzir a produção de IL-6 em fibroblastos de prepúcio humano (Exemplo 10) (Figura 9A). Isto está em contraste com a indução marcada conhecida para a IL-17 (SEQ ID NO:11). Yao et al., Immunity 3:811 (1995) [Yao-1], Yao et al., J. Immunol. 155:5483 (1995) [Yao-3]. Ao contrário, a IL-17B (SEQ ID NO:1) e a IL-17C (SEQ ID NO:3), ambas induzem a

libertação de TNF- $\alpha$  pela linha celular monocítica, THP1, enquanto a IL-17 tem apenas um efeito muito pequeno (Figura 9B). A libertação de TNF- $\alpha$  em células THP1 estimulada pela IL-17B (SEQ ID NO:1) e pela IL-17C (SEQ ID NO:3) é dependente do tempo e da concentração, (Exemplo 10) (Figura 10), sendo a IL-17B (SEQ ID NO:1) cerca de 10 vezes mais potente do que a IL-17C (SEQ ID NO:3) [ $EC_{50}$  = 2,4 nM para IL-17B vs. 25 nM para IL-17C].

Os diferentes efeitos biológicos da IL-17 (SEQ ID NO:11) comparativamente com as IL-17B ou C (SEQ ID NO:1 & 3), sugerem que estas podem funcionar por via de um receptor da superfície celular diferente (ou alguns componentes diferentes do receptor) do receptor de IL-17 conhecido. Yao et al., *Cytokine* 9:794 (1997) [Yao-3]. Num esforço para examinar directamente a questão da especificidades dos receptores, os Requerentes demonstraram que tanto a IL-17B (SEQ ID NO:1) como a IL-17C (SEQ ID NO:3) são incapazes de se ligar ao ECD do receptor de IL-17 (SEQ ID NO:16) (Figura 11A), e são também incapazes de competir pela ligação de IL-17 (SEQ ID NO:11) ao ECD do seu receptor (SEQ ID NO:16) (Figura 11B). A IL-17B (SEQ ID NO:1) e a IL-17C (SEQ ID NO:3) ligam-se à superfície de células THP1, onde têm actividade (Figura 12). A interacção é específica pelo menos na medida em que uma proteína de fusão com Fc de controlo não se consegue ligar a estas células. Os resultados sugerem que pode haver um conjunto de receptores que ligam e transduzem o sinal a partir da família de citocinas da IL-17, um modelo de receptor/ligando que foi encontrado para muitas famílias de citocinas e factores de crescimento.

As novas citocinas aqui reveladas, PRO1031 (e.g., 516) e PRO1122 (e.g., UNQ561), diferem da IL-17 (SEQ ID NO:11) nos seus padrões de expressão e actividades biológicas. A expressão diferencial acoplada com a incapacidade de interacção com o receptor de IL-17 conhecido sugere e expandiu o papel da família da IL-17 na resposta imunitária pró-inflamatória.

#### **F. Anticorpos Anti-PRO1122**

A presente invenção utiliza ainda anticorpos anti-polipéptido PRO1122. Os exemplos de anticorpos incluem

anticorpos policlonais, monoclonais, humanizados, biespecíficos e heteroconjugados.

### 1. Anticorpos Policlonais

Os anticorpos anti-PRO1122 utilizados na presente invenção podem compreender anticorpos policlonais. São conhecidos dos peritos na especialidade métodos de preparação de anticorpos policlonais. Os anticorpos policlonais podem ser criados num mamífero, por exemplo, através de uma ou mais injeções de um agente imunizante e, se pretendido, um adjuvante. Tipicamente, o agente imunizante e/ou o adjuvante serão injectados no mamífero por múltiplas injeções subcutâneas ou intraperitoneais. O agente imunizante pode incluir o polipéptido PRO1122 ou uma sua proteína de fusão. Pode ser útil conjugar o agente imunizante a uma proteína que se sabe ser imunogénica no mamífero a imunizar. Os exemplos de tais proteínas imunogénicas incluem, mas não se lhes limitam, hemocianina de lapa *Fissurella*, albumina sérica, tiroglobulina bovina e inibidor de tripsina de soja. Os exemplos de adjuvantes que podem ser empregues incluem adjuvante completo de Freund e adjuvante MPL-TDM (monofosforil-Lípido A, dicorinomicolato de trealose sintético). O protocolo de imunização pode ser seleccionado por um perito na especialidade sem experimentação desnecessária.

### 2. Anticorpos monoclonais

Os anticorpos anti-PRO1122 podem, alternativamente, ser anticorpos monoclonais. Os anticorpos monoclonais podem ser preparados utilizando métodos de hibridomas, tais como os descritos por Kohler e Milstein, Nature, 256:495 (1975). Num método de hibridoma imuniza-se tipicamente um ratinho, um *hamster* ou outro animal hospedeiro adequado, com um agente de imunização, para elicitar linfócitos que produzem, ou são capazes de produzir, anticorpos que se ligarão especificamente ao agente de imunização. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*.

O agente de imunização incluirá tipicamente o polipéptido PRO1122, ou uma sua proteína de fusão. Em geral, utilizam-se linfócitos de sangue periférico ("PBL") caso se pretendam

células de origem humana, ou utilizam-se células de baço ou células de nódulos linfáticos caso se pretendam fontes de mamífero não humano. Os linfócitos são então fundidos com uma linha celular imortalizada utilizando um agente de fusão adequado, tal como polietilenoglicol, para formar uma célula de hibridoma [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) p. 59-103]. As linhas celulares imortalizadas são usualmente células de mamífero transformadas, nomeadamente células de mieloma de origem em roedor, bovina e humana. Usualmente, utilizam-se linhas celulares de rato ou ratinho. As células de hibridoma podem ser cultivadas num meio de cultura adequado que preferivelmente contém uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou a sobrevivência das células imortalizadas não fundidas. Por exemplo, se as células parentais não contiverem a enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas incluirá tipicamente hipoxantina, aminopterina e timidina ("meio HAT"), substâncias que impedem o crescimento de células deficientes em HGPRT.

As linhas celulares imortalizadas preferidas são as que se fundem eficazmente, suportam expressão estável em níveis elevados de anticorpo pelas células produtoras de anticorpo seleccionadas e são sensíveis a um meio, tal como meio HAT. Constituem linhas celulares imortalizadas mais preferidas as linhas de mieloma murino, que podem ser obtidas, por exemplo, de Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California e de American Type Culture Collection, Rockville, Maryland. Foram também descritas linhas celulares de mieloma humano e de heteromieloma ratinho-humano para a produção de anticorpos monoclonais humanos [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibodies Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) p. 51-63].

O meio de cultura no qual se cultivam as células de hibridoma pode então ser ensaiado quanto à presença de anticorpos monoclonais dirigidos contra um polipéptido PRO1122. Preferivelmente, determina-se a especificidade de ligação de anticorpos monoclonais produzidos pelas células de hibridoma por imunoprecipitação ou através de um ensaio de

ligação *in vitro*, tal como um radioimunoensaio (RIA) ou um ensaio de imunoassorção com enzimas ligadas (ELISA). Estas técnicas e ensaios são conhecidos na especialidade. A afinidade de ligação do anticorpo monoclonal pode, por exemplo, ser determinada pela análise Scatchard de Munson e Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Após terem sido identificadas as células de hibridoma pretendidas, os clones podem ser subclonados por procedimentos de diluição limitante e crescidos por métodos *standard* [Goding, *supra*]. Os meios de cultura adequados para este objectivo incluem, por exemplo, meio de Eagle modificado por Dulbecco e meio RPMI-1640. Alternativamente, as células de hibridoma podem ser crescidas *in vivo* na forma de ascites num mamífero.

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

Os anticorpos monoclonais podem também ser preparados por métodos de ADN recombinante, tais como os descritos na Patente U.S. 4,816,567. O ADN que codifica os anticorpos monoclonais do invento pode ser prontamente isolado e sequenciado utilizando procedimentos convencionais (e.g., por utilização de sondas oligonucleotídicas que são capazes de se ligar especificamente a genes que codificam as cadeias pesada e leve de anticorpos murinos). As células de hibridoma do invento servem como fonte preferida deste ADN. Uma vez isolado, o ADN pode ser colocado em vectores de expressão, que são então transfectados para células hospedeiras tais como células COS de símio, células de ovário de *hamster* chinês (CHO) ou células de mieloma que de outra forma não produzem proteínas imunoglobulina, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. Os ADN podem também ser modificados, por exemplo, por substituição com a sequência de codificação para domínios constantes de cadeia pesada e leve humanos em vez das sequências homólogas murinas [Patente U.S. 4,816,567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81,

6851-6855 (1984)] ou por ligação covalente à sequência de codificação de imunoglobulina de toda ou parte da sequência de codificação para um polipéptido que não imunoglobulina. Este polipéptido que não imunoglobulina pode ser substituído pelos domínios constantes de um anticorpo do invento ou pode ser substituído pelos domínios variáveis de um local de combinação com o antigénio de um anticorpo do invento para criar um anticorpo bivalente quimérico.

Os anticorpos podem ser anticorpos monovalentes. São bem conhecidos na especialidade métodos para preparar anticorpos monovalentes. Por exemplo, um método envolve a expressão recombinante de cadeia leve e cadeia pesada modificada de imunoglobulina. A cadeia pesada é, em geral, truncada em qualquer ponto na região Fc de modo a evitar a ligação cruzada da cadeia pesada. Alternativamente, substituem-se os resíduos de cisteína relevantes por outro resíduo de aminoácido ou eliminam-se para evitar ligação cruzada.

São também adequados métodos *in vitro* para preparar anticorpos monovalentes. Pode efectuar-se a digestão de anticorpos para produzir seus fragmentos, em particular fragmentos Fab, utilizando técnicas de rotina conhecidas na especialidade.

### 3. Anticorpos humanos e humanizados

Os anticorpos anti-PRO1122 utilizados na presente invenção podem adicionalmente incluir anticorpos humanizados ou anticorpos humanos. As formas humanizadas de anticorpos não humanos (e.g., murinos) são imunoglobulinas quiméricas, cadeias de imunoglobulina ou seus fragmentos (tais como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> ou outras subsequências de ligação ao antigénio de anticorpos) que contêm uma sequência mínima derivada de imunoglobulina não humana. Os anticorpos humanizados incluem imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor) em que os resíduos de uma região determinante de complementaridade (CDR) do receptor são substituídos pelos resíduos de uma CDR de uma espécie não humana (anticorpo dador) tal como ratinho, rato ou coelho apresentando as especificidade, afinidade e capacidade pretendidas. Em alguns casos, substituem-se resíduos do esqueleto de Fv da

imunoglobulina humana por resíduos não humanos correspondentes. Os anticorpos humanizados podem também compreender resíduos que não se encontram no anticorpo receptor, nem nas sequências de CDR ou de esqueleto importadas. 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 correspondem às de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as regiões FR são as de uma sequência de consenso de uma imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado incluirá optimamente também pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de uma imunoglobulina humana [Jones *et al.*, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332:323-329 (1988); e Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)].

São bem conhecidos na especialidade métodos para humanizar anticorpos não humanos. Em geral, um anticorpo humanizado tem um ou mais resíduos de aminoácido introduzidos, de uma fonte que não é humana. Estes resíduos de aminoácidos não humanos são usualmente denominados resíduos de "importação", que são tipicamente tomados de um domínio variável de "importação". A humanização pode ser essencialmente efectuada seguindo o método de Winter e colaboradores [Jones *et al.*, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, Science, 239:1534-1536 (1988)], por substituição por CDR ou sequências de CDR de roedor as sequências correspondentes de um anticorpo humano. Assim, estes anticorpos "humanizados" são anticorpos quiméricos (Patente U.S. 4,816,567), em que substancialmente menos de um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente de uma espécie não humana. Na prática, os anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos em que alguns resíduos de CDR e possivelmente alguns resíduos de FR são substituídos por locais análogos em anticorpos de roedor.

Os anticorpos humanos podem também ser produzidos utilizando várias técnicas conhecidas na especialidade, incluindo bibliotecas de exibição em fagos [Hoogenboom e Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol.

Biol. 222:581 (1991)]. As técnicas de Cole et al. e Boerner et al. estão também disponíveis para a preparação de anticorpos monoclonais humanos (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) e Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)]. De igual modo, podem ser preparados anticorpos humanos por introdução de loci de imunoglobulina humana em animais transgênicos, e.g., ratinhos nos quais os gene de imunoglobulina endógenos foram parcial ou completamente inactivados. Após provocação, observa-se a produção de um anticorpo humano, que é muito semelhante ao observado em seres humanos em todos os sentidos, incluindo rearranjo de genes, montagem e repertório de anticorpos. Esta abordagem é descrita, por exemplo, nas Patentes U.S. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016 e nas seguintes publicações científicas: Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992); Lonberg et al., Nature, 368:856-859 (1994); Morrison, Nature, 368:812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology, 14:845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology, 14:826 (1996); Lonberg e Huszar, Intern. Rev. Immunol., 13:65-93 (1995).

#### 4. Terapia com Pró-fármaco Mediada por Enzima Dependente de Anticorpo (ADEPT)

Os anticorpos da presente descrição podem também ser utilizados em ADEPT por conjugação do anticorpo com uma enzima activadora de pró-fármacos que converte um pró-fármaco (e.g., um agente quimioterapêutico de peptidilo, veja-se WO 81/01145) num fármaco anticanceroso activo. Veja-se, por exemplo, WO 88/07378 e Patente U.S. 4 975 278.

A componente enzima do imunoconjugado útil para ADEPT inclui uma enzima capaz de actuar sobre um pró-fármaco de forma a convertê-lo na sua forma citotóxica, mais activa.

As enzimas que são úteis no método incluem, mas não se lhes limitam, glicosidase, glucose-oxidase, lisozima humana, glucuronidase humana, fosfatase alcalina útil para converter pró-fármacos contendo fosfatos em fármacos livres; arilsulfatase, útil para converter pró-fármacos contendo sulfatos em fármacos livres; citosina-desaminase, útil para converter 5-fluorocitosina não tóxica no fármaco anticanceroso

5-fluorouracilo; proteases, tais como protease de *Serratia*, termolisina, subtilisina, carboxipeptidases (por exemplo, carboxipeptidase G2 e carboxipeptidase A) e catepsinas (tais como catepsinas B e L), que são úteis para converter pró-fármacos contendo péptidos em fármacos livres; D-alanilcarboxipeptidases, úteis para converter pró-fármacos que contêm substituintes D-aminoácido; enzimas que clivam hidratos de carbono, tais como  $\beta$ -galactosidase e neuraminidase, úteis para converter pró-fármacos glicosilados em fármacos livres;  $\beta$ -lactamase, útil para converter fármacos derivatizados com  $\beta$ -lactamas em fármacos livres; e penicilina-amidases, tais como penicilina V-amidase ou penicilina G-amidase, úteis para converter fármacos derivatizados nos seus azotos da amina com grupos fenoxiacetilo ou fenilacetilo, respectivamente, em fármacos livres. Alternativamente, podem ser utilizados anticorpos com actividade enzimática, também conhecidos na especialidade como "abzimas" para converter os pró-fármacos do invento em fármacos activos livres (veja-se, e.g., Massey, Nature, 328:457-458 (1987)). Podem preparar-se conjugados anticorpo-abzima tal como aqui descrito, para entrega da abzima a uma população de células tumorais.

As enzimas podem ser ligadas covalentemente aos anticorpos anti-PRO1122 por técnicas bem conhecidas na especialidade, tais como a utilização dos agentes de reticulação heterobifuncionais discutidos acima. Alternativamente, podem ser construídas proteínas de fusão incluindo pelo menos a região de ligação ao antigénio do anticorpo ligada a pelo menos uma porção funcionalmente activa de uma enzima, utilizando técnicas de ADN recombinante bem conhecidas na especialidade (veja-se, e.g., Neuberger et al., Nature, 312:604-608 (1984)).

## 5. Anticorpos biespecíficos

Os anticorpos biespecíficos são anticorpos monoclonais, preferivelmente humanos ou humanizados, que apresentam especificidades de ligação para com pelo menos dois antigénios diferentes. No presente caso, uma das especificidades de ligação é para com um polipéptido PRO1031 e a outra é para com qualquer outro antigénio e preferivelmente para com uma

proteína ou receptor ou subunidade de receptor de superfície celular.

São conhecidos na especialidade métodos para preparar anticorpos biespecíficos. Tradicionalmente, a produção recombinante de anticorpos biespecíficos baseia-se na co-expressão de dois pares de cadeia pesada/cadeia leve de imunoglobulina, em que as duas cadeias pesadas têm especificidades diferentes (Milstein e Cuello, Nature, 305:537-539 [1983]). Dada a distribuição aleatória de cadeias pesada e leve de imunoglobulina, estes hibridomas (quadromas) produzem uma mistura potencial de dez moléculas de anticorpo diferentes, das quais só uma tem a estrutura biespecífica correcta. A purificação da molécula correcta é usualmente conseguida por passos de cromatografia de afinidade. Descrevem-se procedimentos semelhantes em WO 93/08829, publicado a 13 de Maio de 1993 e em Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

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

De acordo com outra abordagem descrita em WO 96/27011, a interface entre um par de moléculas de anticorpo pode ser manipulada para maximizar a percentagem de heterodímeros que são recuperados da cultura de células recombinantes. A interface preferida inclui pelo menos uma parte da região CH3 de um domínio constante de anticorpo. Neste método, substituem-se uma ou mais cadeias laterais pequenas de

aminoácidos da interface da primeira molécula de anticorpo por cadeias laterais maiores (e.g., tirosina ou triptofano). Criam-se "cavidades" de compensação de tamanho idêntico ou semelhante à(s) cadeia(s) lateral(ais) grande(s) na interface da segunda molécula de anticorpo por substituição de cadeias laterais grandes de aminoácidos por cadeias mais pequenas (e.g., alanina ou treonina). Isto proporciona um mecanismo para aumentar o rendimento do heterodímero relativamente a produtos secundários indesejáveis, tais como homodímeros.

Podem preparar-se anticorpos biespecíficos na forma de anticorpos de comprimento completo ou fragmentos de anticorpo (e.g., anticorpos biespecíficos  $F(ab')_2$ ). Foram descritas na literatura técnicas para gerar anticorpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticorpo. Por exemplo, podem preparar-se anticorpos biespecíficos utilizando ligação química. Brennan et al., Science, 229:81 (1985) descrevem um procedimento em que se clivam proteoliticamente anticorpos intactos para gerar fragmentos  $F(ab')_2$ . Estes fragmentos são reduzidos na presença do agente de complexação de ditiol, arsenieto de sódio, para estabilizar ditióis vizinhos e evitar a formação de dissulfureto intermolecular. Os fragmentos  $Fab'$  gerados são então convertidos nos derivados tionitrobenzoato (TNB). Um dos derivados  $Fab'$ -TNB é então reconvertido no  $Fab'$ -tiol por redução com mercaptoetilamina e é misturado com uma quantidade equimolar do outro derivado  $Fab'$ -TNB para formar o anticorpo biespecífico. Os anticorpos biespecíficos produzidos podem ser utilizados como agentes para a imobilização selectiva de enzimas.

Os fragmentos  $Fab'$  podem ser recuperados directamente de *E. coli* e acoplados quimicamente para formar anticorpos biespecíficos. Shalaby et al., J. Exp. Med., 175:217-225 (1992) descrevem a produção de uma molécula de anticorpo biespecífico  $F(ab')_2$  completamente humanizada. Cada fragmento  $Fab'$  foi excretado separadamente de *E. coli* e sujeito a acoplamento químico directo *in vitro* para formar o anticorpo biespecífico. O anticorpo biespecífico assim formado foi capaz de se ligar a células que sobre-expressam o receptor ErbB2 e a células T humanas normais, bem como desencadear a actividade lítica de linfócitos citotóxicos humanos contra alvos de tumor de mama humanos.

Foram também descritas várias técnicas para preparar e isolar fragmentos de anticorpos biespecíficos directamente da cultura de células recombinantes. Por exemplo, produziram-se anticorpos biespecíficos utilizando fechos-de-correr de leucinas. Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992) em que se ligaram péptidos fecho-de-correr de leucinas das proteínas Fos e Jun às porções Fab' de dois anticorpos diferentes através de fusão génica. Reduziram-se os homodímeros de anticorpo na região de charneira para formar monómeros e seguidamente re-oxidaram-se para formar os heterodímeros de anticorpo. Este método pode também ser utilizado para a produção de homodímeros de anticorpo. A tecnologia do "diacorpo" descrita por Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) proporcionou um mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticorpos biespecíficos. Os fragmentos incluem um domínio variável de cadeia pesada ( $V_H$ ) ligado a um domínio variável de cadeia leve ( $V_L$ ) através de um ligante que é demasiado curto para permitir emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia. Assim, os domínios  $V_H$  e  $V_L$  de um fragmento são forçados a emparelhar com os domínios  $V_L$  e  $V_H$  complementares de outro fragmento, formando assim dois locais de ligação ao antigénio. Foi também relatada outra estratégia para preparar fragmentos de anticorpos biespecíficos por utilização de dímeros Fv de cadeia simples (sFv). Veja-se, Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994).

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

Anticorpos biespecíficos exemplificativos podem ligar-se a dois epítomos diferentes numa determinada proteína "Pro". Alternativamente, pode combinar-se um braço anti-proteína "PRO" com um braço que se liga a uma molécula desencadeadora num leucócito, tal como uma molécula de receptor de célula T (e.g., CD2, CD3, CD28 ou B7) ou receptores Fc para IgG (Fc $\gamma$ R), tais como Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32) e Fc $\gamma$ RIII (CD16) de modo a focar os mecanismos de defesa celular na célula que expressa a proteína "PRO" particular. Os anticorpos biespecíficos podem ser também utilizados para localizar agentes citotóxicos em

células que expressam um polipéptido "PRO" particular. Estes anticorpos possuem um braço de ligação a "PRO" e um braço que se liga a um agente citotóxico ou um quelante de radionuclídeos, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA ou TETA. Outro anticorpo biespecífico de interesse liga o polipéptido "PRO" e liga adicionalmente o factor tissular (TF).

## 6. Anticorpos heteroconjugados

Os anticorpos heteroconjugados estão também no âmbito da presente invenção. Os anticorpos heteroconjugados são compostos por dois anticorpos ligados covalentemente. Estes anticorpos foram, por exemplo, propostos para direccionar células do sistema imunitário para células indesejadas [Patente U.S. 4,676,980] e para tratamento de infecção por VIH [WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089]. Está contemplado que os anticorpos possam ser preparados *in vitro* utilizando métodos conhecidos em química de síntese de proteínas, incluindo os que envolvem agentes de reticulação. Por exemplo, podem construir-se imunotoxinas utilizando uma reacção de permuta de dissulfureto ou por formação de uma ligação tioéter. Os exemplos de reagentes adequados para este fim incluem iminotiolato e metil-4-mercaptobutirimidato e os descritos, por exemplo, em Patente U.S. 4,676,980.

## 7. Manipulação da Função Efectora

Pode ser desejável modificar o anticorpo utilizado no invento relativamente à função efectora, de modo a aumentar a eficácia do anticorpo. Por exemplo, pode(m) introduzir-se resíduo(s) de cisteína na região Fc, permitindo assim formação de ligação dissulfureto intercadeia nesta região. O anticorpo homodimérico assim gerado pode ter capacidade de internalização melhorada e/ou morte celular mediada por complemento e citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) melhoradas. Veja-se, Caron *et al.*, J. Exp. Med., 176:1191-1195 (1992) e Shopes, B., J. Immunol., 148:2918-2922 (1992). Podem também preparar-se anticorpos homodiméricos com actividade antitumoral aumentada utilizando agentes de reticulação heterobifuncionais, tal como descrito em Wolff *et al.*, Cancer Research 53:2560-2565 (1993). Alternativamente, pode manipular-se um anticorpo que tem regiões Fc duplas e

pode portanto apresentar capacidades de lise de complemento e ADCC melhoradas. Veja-se, Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3:219-230 (1989).

## 8. Imunoconjugados

O invento refere-se também a imunoconjugados compreendendo um anticorpo conjugado com um agente citotóxico, tal como um agente quimioterapêutico, uma toxina (por exemplo, uma toxina activa enzimaticamente de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal ou seus fragmentos ou uma toxina de molécula pequena) ou um isótopo radioactivo (i.e., um radioconjugado).

Foram descritos acima agentes quimioterapêuticos úteis na geração destes imunoconjugados. As toxinas de proteína enzimaticamente activas e seus fragmentos que podem ser utilizados incluem, cadeia A de difteria, fragmentos activos não ligantes de toxina de difteria, toxina da cólera, toxina botulínica, cadeia A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia A de ricina, cadeia A de abrina, cadeia A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, protões de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII e PAPS), inibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, saporina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina e os tricotecenos. As toxinas de molécula pequena incluem, por exemplo, caliqueamicinas, maitansinóides, palitoxina e CC1065. Encontram-se disponíveis vários radionuclídeos para a produção de anticorpos radioconjugados. Os exemplos incluem,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$  e  $^{186}\text{Re}$ .

Os conjugados do anticorpo e agente citotóxico são preparados utilizando vários agentes de acoplamento de proteínas bifuncionais, tais como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como adipimidato de dimetilo HCL), ésteres activos (tais como suberato de dissuccinimidilo), aldeídos (tais como glutaraldeído), compostos bis-azido (tais como bis(p-azidobenzoíl)hexanodiamina), derivados bis-diazónio (tal como bis-(p-diazónio-benzoíl)etilenodiamina), diisocianatos (tal como 2,6-diisocianato de tolueno) compostos de flúor bis-

activos (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por exemplo, pode ser preparada uma imunotoxina de ricina tal como descrito em Vitetta et al., Science, 238:1098 (1987). Constitui um exemplo de agente quelante para a conjugação de radionucleótidos ao anticorpo, o ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietilenotriaminopenta-acético (MX-DTPA) marcado com carbono-14. Veja-se WO94/11026.

Noutra concretização, o anticorpo pode ser conjugado com um "receptor" (tal como estreptavidina) para utilização no pré-direccionamento a tumores em que o conjugado anticorpo-receptor é administrado ao doente, seguido de remoção do conjugado não ligado da circulação utilizando um agente de depuração e seguidamente administração de um "ligando" (e.g., avidina) que está conjugado a um agente citotóxico (e.g., um radionucleótido).

#### 9. Imunolipossomas

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

Podem gerar-se lipossomas particularmente úteis pelo método de evaporação de fase inversa com uma composição de lípidos incluindo fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina derivatizada com PEG (PEG-PE). Extrudem-se os lipossomas através de filtros de tamanho de poro definido para obter lipossomas com o diâmetro pretendido. Podem conjugar-se aos lipossomas fragmentos Fab' do anticorpo do presente invento tal como descrito em Martin et al., J. Biol. Chem., 257:286-288 (1982) através de uma reacção de permuta de dissulfureto. O lipossoma contém no seu interior opcionalmente um agente quimioterapêutico (tal como doxorubicina). Veja-se, Gabizon et al., J. National Cancer Inst., 81(19):1484 (1989).

## 10. Composições Farmacêuticas de Anticorpos

Podem administrar-se anticorpos que se ligam especificamente a um polipéptido PRO1122 aqui identificado, bem como outras moléculas identificadas pelos ensaios de pesquisa aqui revelados, para o tratamento várias desordens, sob a forma de composições farmacêuticas.

Se um polipéptido PRO1122 é intracelular e se são utilizados anticorpos completos como inibidores, são preferidos anticorpos de internalização. Contudo, podem também utilizar-se lipofecções ou lipossomas para entregar o anticorpo ou um fragmento de anticorpo às células. Quando se utilizam fragmentos de anticorpo, é preferido o fragmento de inibição mais pequeno que liga especificamente o domínio de ligação da proteína alvo. Por exemplo, com base nas sequências da região variável de um anticorpo, podem conceber-se moléculas de péptidos que retêm a capacidade de ligar a sequência da proteína alvo. Estes péptidos podem ser sintetizados quimicamente e/ou ser produzidos por tecnologia de ADN recombinante. Veja-se, e.g., Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7889-7893 [1993].

A formulação aqui pode também conter mais do que um composto activo, conforme necessário para a indicação particular a tratar, preferivelmente os que apresentam actividades complementares que não se afectam adversamente entre si. Alternativa ou adicionalmente, a composição pode incluir um agente que melhore a sua função, tal como, por exemplo, um agente citotóxico, citoquinas, agentes quimioterapêuticos ou um agente inibidor do crescimento. Estas moléculas encontram-se presentes adequadamente em combinação em quantidades que são eficazes para o objectivo pretendido.

Os ingredientes activos podem também ser aprisionados em microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial, por exemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulose ou de gelatina e microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, em sistemas de entrega de fármacos coloidais (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Estas

técnicas estão descritas em Remington's Pharmaceutical Sciences, supra.

As formulações para utilização em administração *in vivo* têm que ser estéreis. Isto pode ser facilmente conseguido por filtração através de membranas de filtração estéreis.

Podem preparar-se preparações de libertação sustentada. Os exemplos adequados de preparações de libertação sustentada incluem matrizes semi-permeáveis de polímeros hidrófobos sólidos contendo o anticorpo, matrizes essas que se encontram sob a forma de artigos conformados, e.g., filmes ou microcápsulas. Os exemplos de matrizes de libertação sustentada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato) ou poli(álcool vinílico)), polilactidos (Patente U.S. 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutâmico e L-glutamato de etilo, etileno-acetato de vinilo não degradável, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradáveis, tais como o LUPRON DEPOT™ (microesferas injectáveis compostas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolida) e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Enquanto que os polímeros tal como etileno-acetato de vinilo e ácido láctico-ácido glicólico permitem a libertação de moléculas durante mais de 100 dias, determinados hidrogéis libertam proteínas durante períodos de tempo mais curtos. Quando os anticorpos encapsulados permanecem no corpo durante um longo período de tempo podem desnaturar ou agregar como resultado de exposição a humidade a 37°C, resultando em perda de actividade biológica e possíveis alterações de imunogenicidade. Podem ser concebidas estratégias racionais para estabilização dependendo do mecanismo envolvido. Por exemplo, quando se verifica que o mecanismo de agregação é formação de ligação S-S intermolecular através de permuta de tiossulfureto, pode conseguir-se estabilização por modificação de resíduos sulfidrílo, liofilização a partir de soluções ácidas, controlo do teor de humidade, utilização de aditivos adequados e desenvolvimento de composições de matrizes poliméricas específicas.

### **G. Utilizações para Anticorpos anti-PRO1122**

Os anticorpos anti-PRO1122 da presente invenção têm várias utilidades. Por exemplo, os anticorpos anti-PRO1122 podem ser utilizados em ensaios de diagnóstico para polipéptidos PRO1122, e.g., detectando a sua expressão em células, tecidos ou soros específicos. Podem ser utilizadas várias técnicas de ensaio de diagnóstico conhecidas na especialidade, tais como ensaios de ligação competitiva, ensaios em sanduíche directos ou indirectos, ensaios de imunoprecipitação conduzidos em fases heterogéneas ou homogéneas [Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987) pp. 147-158]. Os anticorpos utilizados nos ensaios podem ser marcados com uma porção detectável. A porção detectável deverá ser capaz de produzir, quer directa ou indirectamente, um sinal detectável. Por exemplo, a porção detectável pode ser um radioisótopo, tal como  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{S}$  ou  $^{125}\text{I}$ , um composto fluorescente ou quimioluminescente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina ou luciferina, ou uma enzima, tal como fosfatase alcalina, beta-galactosidase ou peroxidase de rábano. Qualquer método conhecido na especialidade para a conjugação do anticorpo à porção detectável pode ser empregue, incluindo os métodos descritos por Hunter et al., Nature, 144:945 (1962); David et al., Biochemistry, 13:1014 (1974); Pain et al., J. Immunol. Meth., 40:219(1981); e Nygren, J. Histochem. and Cytochem., 30:407 (1982).

Os anticorpos anti-PRO1122 também são úteis para a purificação por afinidade de polipéptidos PRO1122 a partir de uma cultura de células recombinantes ou fontes naturais. Neste processo, os anticorpos contra um polipéptido PRO1122 são imobilizados num suporte adequado, tal como uma resina Sephadex ou um papel de filtro, utilizando métodos bem conhecidos na especialidade. O anticorpo imobilizado é então colocado em contacto com uma amostra contendo o polipéptido PRO1122 a purificar, e depois o suporte é lavado com um solvente adequado que irá remover substancialmente todo o material na amostra excepto o polipéptido PRO1122, que fica ligado ao anticorpo imobilizado. Finalmente, o suporte é lavado com outro solvente adequado que irá libertar o polipéptido PRO1122 do anticorpo.

## **H. Antagonistas/Agonistas de PRO1122**

A presente descrição abrange métodos de pesquisa de compostos para identificar aqueles que imitam o polipéptido PRO1122 (agonistas) ou que previnem o efeito do polipéptido PRO1122 (antagonistas). Os ensaios de pesquisa para fármacos antagonistas candidatos são desenhados para identificar compostos que se ligam ou complexam aos polipéptidos PRO1122 codificados pelos genes aqui identificados, ou que de outro modo interferem com a interacção dos polipéptidos codificados com outras proteínas celulares. Estes ensaios de pesquisa incluirão ensaios susceptíveis a pesquisa de alto rendimento de bibliotecas químicas, o que os torna particularmente adequados para a identificação de candidatos a fármacos de molécula pequena.

Os ensaios podem ser realizados numa variedade de formatos, incluindo ensaios de ligação proteína-proteína, ensaios de pesquisa bioquímicos, imunoensaios e ensaios à base de células, que estão bem caracterizados na especialidade. Por exemplo, para pesquisar antagonistas e/ou agonistas de sinalização de PRO1122, a mistura de ensaio é incubada sob condições nas quais, excepto quanto à presença do agente farmacológico candidato, o PRO1122 induz a libertação de TNF- $\alpha$  pelas células THP-1 com uma actividade de referência. Alternativamente, a actividade testada pode ser a libertação de óxido nítrico (NO) e proteoglicanos por cartilagem articular tratada com IL17 e/ou IL-1 $\alpha$ .

Em ensaios de ligação, a interacção é a ligação e o complexo formado pode ser isolado ou detectado na mistura reaccional. Numa concretização particular o polipéptido PRO1122 codificado pelo gene aqui identificado ou o candidato a fármaco é imobilizado numa fase sólida, e.g., numa placa de microtítulo, por fixação covalente ou não covalente. A fixação não covalente é geralmente conseguida através do revestimento da superfície sólida com uma solução do polipéptido PRO1122 e secagem. Alternativamente, pode ser utilizado um anticorpo imobilizado, e.g., um anticorpo monoclonal, específico para o polipéptido PRO1122 a imobilizar, para o ancorar à superfície sólida. O ensaio é realizado por adição do componente não

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

Se o composto candidato interaccua com, mas não se liga a, um polipéptido PRO1122 particular codificado por um gene aqui identificado, a sua interacção com esse polipéptido pode ser ensaiada por métodos bem conhecidos para a detecção de interacções proteína-proteína. Estes ensaios incluem abordagens tradicionais, tais como, e.g., ligação cruzada, co-imunoprecipitação e co-purificação através de gradientes ou colunas cromatográficas. Em adição, as interacções proteína-proteína podem ser monitoradas através de gradientes ou colunas cromatográficas. Em adição, as interacções proteína-proteína podem ser monitoradas utilizando um sistema genético à base de levedura descrito por Fields e colaboradores (Fields e Song, Nature 340: 245-246 (1989); Chien et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 9578-9582 (1991) como descrito por Chevray e Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5789-5-791 (1991)). Muitos activadores da transcrição, tais como GAL4 de levedura, consistem em dois domínios modulares fisicamente discretos, um que actua como domínio de ligação ao ADN, enquanto o outro funciona como domínio de activação da transcrição. O sistema de expressão em levedura descrito nas publicações anteriores (genericamente referido como "sistema de dois híbridos") toma a vantagem desta propriedade, e emprega proteínas de dois híbridos, uma em que a proteína alvo está fundida com o domínio de ligação ao ADN de GAL4, e outra em que as proteínas de activação candidatas estão fundidas com o domínio de activação. A expressão do gene repórter GAL1-lacZ sob o controlo de um promotor activado por GAL4 depende da

reconstituição da actividade de GAL4 por via da interacção proteína-proteína. As colónias que contêm polipéptido com interacção são detectadas com substrato cromogénico para a  $\beta$ -galactosidase. Está comercialmente disponível na Clontech um kit completo (MATCHMAKER™) para a identificação de interacções proteína-proteína entre duas proteínas específicas utilizando a técnica dos dois híbridos. Este sistema pode também ser estendido ao mapeamento de domínios de proteínas envolvidos em interacções específicas da proteína assim como para apontar resíduos de aminoácido que são cruciais para estas interacções.

Os compostos que interferem com a interacção de um gene que codifica um polipéptido PRO 1122 aqui identificado e outros componentes intra- ou extracelulares, podem ser testados como se segue: usualmente, prepara-se uma mistura reaccional contendo o produto do gene e o componente intra- ou extracelular sob condições e durante um tempo que permitam a interacção e a ligação dos dois produtos. Para testar a capacidade de um composto candidato inibir a ligação, a reacção é realizada na ausência e na presença do composto de teste. Em adição, pode ser adicionado um placebo a uma terceira mistura reaccional, para servir como controlo positivo. A ligação (formação do complexo) entre o composto de teste e o componente intra- ou extracelular presente na mistura é monitorada como atrás descrito. A formação de um complexo na(s) reacção(ões) de controlo mas não na mistura reaccional contendo o composto de teste indica que o composto de teste interfere na interacção do composto de teste com o seu parceiro de reacção.

Os antagonistas podem ser detectados combinando o polipéptido PRO1122 e um antagonista potencial com receptores de polipéptido PRO1122 ligados à membrana ou receptores recombinantes sob condições apropriadas para um ensaio de inibição competitiva. O polipéptido PRO1122 pode ser marcado, por exemplo por radioactividade, de modo que o número de moléculas de polipéptido PRO1122 ligadas ao receptor pode ser utilizado para determinar a eficácia do antagonista potencial. O gene que codifica o receptor pode ser identificado por números métodos conhecidos dos peritos na especialidade, por exemplo, *panning* de ligandos e selecção por FACS, Coligan et

al., Current Protocols in Immun. 1(2): Ch. 5 (1991). Preferivelmente, emprega-se clonagem de expressão em que se prepara ARN poliadenilado a partir de uma célula responsiva ao polipéptido PRO1122 e uma biblioteca de ADNc criada a partir deste ARN é dividida em conjuntos e utilizada para transfectar células COS ou outras células que não sejam responsivas ao polipéptido PRO1122. As células transfectadas que são crescidas sobre lâminas de vidro são expostas a polipéptido PRO1122 marcado. O polipéptido PRO1122 pode ser marcado através de uma variedade de meios incluindo iodação ou inclusão de um local de reconhecimento para uma proteína-quinase específica do local. Após fixação e incubação, as lâminas são submetidas a análise autorradiográfica. Os conjuntos positivos são identificados e preparam-se sub-conjuntos e re-transfectam-se utilizando um processo interactivo de divisão em sub-conjuntos e nova pesquisa, eventualmente originando um único clone que codifica o receptor putativo.

Como abordagem alternativa para a identificação de receptores, o polipéptido PRO1122 marcado pode ser ligado por fotoafinidade a preparações de membrana ou extracto celular que expressam a molécula receptora. O material ligado cruzadamente é resolvido por PAGE e exposto a filme para raios-X. O complexo marcado contendo o receptor pode ser excisado, resolvido em fragmentos peptídicos e submetido a micro-sequenciação de proteínas. A sequência de aminoácidos obtida a partir da micro-sequenciação seria utilizada para desenhar um conjunto de sondas oligonucleotídicas degeneradas para pesquisar uma biblioteca de ADNc para identificar o gene que codifica o receptor putativo.

Noutro ensaio para antagonistas, células de mamífero ou uma preparação de membrana que expressa o receptor seriam incubadas com polipéptido PRO1122 marcado na presença do composto candidato. A capacidade do composto para aumentar ou bloquear esta interacção pode então ser removida.

Exemplos mais específicos de potenciais antagonistas incluem um oligonucleótido que se liga às fusões de imunoglobulina com polipéptido PRO1122, e, em particular, anticorpos incluindo, sem limitação, anticorpos poli- e

monoclonais ou fragmentos de anticorpos, anticorpos de cadeia única, anticorpos anti-idiotípicos e versões quiméricas ou humanizadas destes anticorpos ou fragmentos, assim como anticorpos e fragmentos de anticorpos humanos. Alternativamente, um potencial antagonista pode ser uma proteína estreitamente relacionada, por exemplo, uma forma mutada do polipéptido PRO1122 que reconhece o receptor mas não confere efeito, inibindo assim competitivamente a acção do polipéptido PRO1122.

Outro potencial antagonista de polipéptido PRO1122 é uma construção de ADN ou ARN anti-sentido preparada utilizando a tecnologia anti-sentido, onde, *e.g.*, uma molécula de ARN ou ADN anti-sentido actua para bloquear directamente a tradução de ARNm por hibridação com ARNm alvo e prevenir a sua tradução numa proteína. A tecnologia anti-sentido pode ser utilizada para controlar a expressão génica através da formação de hélices triplas ou ADN ou ARN anti-sentido, sendo ambos os métodos baseados na ligação de um polinucleótido a ADN ou ARN. Por exemplo, a porção de codificação a 5' da sequência polinucleotídica, que codifica aqui os polipéptidos PRO1122 maduros, é utilizada para desenhar uma sequência oligonucleotídica de ARN anti-sentido, que codifica aqui os polipéptidos PRO1122 maduros, é utilizada para desenhar um oligonucleótido de ARN anti-sentido de cerca de 10 a 40 pares de bases de comprimento. Um oligonucleótido de ADN é desenhado para ser complementar a uma região do gene envolvida na transcrição (hélice tripla - veja-se Lee et al., Nucl. Acids Res. 6: 3073 (1979); Cooney et al., Science 241: 456 (1988); Dervan et al., Science 251: 1360 (1991)), desse modo evitando a transcrição e a produção do polipéptido PRO1122. O oligonucleótido de ARN anti-sentido hibrida com o ARNm *in vivo* e bloqueia a tradução da molécula de ARNm no polipéptido PRO1122 (anti-sentido - Okano, Neurochem. 546: 560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL. 1988). Os oligonucleótidos atrás descritos podem também entregues às células de modo a que o ARN ou ADN anti-sentido possam ser expressos *in vivo* para inibir a produção do polipéptido PRO1122. Quando se utiliza ADN anti-sentido, preferem-se oligodesoxirribonucleótidos derivados do local de iniciação da

tradução, e.g., entre cerca das posições -10 e +10 da sequência nucleotídica do gene alvo.

Os antagonistas potenciais incluem pequenas moléculas que se ligam ao local activo, ao local de ligação ao receptor ou factor de crescimento ou outro local de ligação relevante do polipéptido PRO1122, desse modo bloqueando a actividade biológica normal do polipéptido PRO1122. Os exemplos de moléculas pequenas incluem, mas não se lhes limitam, péptidos pequenos ou moléculas tipo péptido, preferivelmente péptidos solúveis e compostos orgânicos ou inorgânicos não peptídico sintéticos.

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

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

## **I. Utilizações de Diagnóstico**

Outra utilização dos compostos aqui revelados (e.g., variantes de PRO1122 e anticorpos anti-PRO1122) aqui descrita consiste em auxiliar o diagnóstico de se uma desordem é conduzida, em algum grau, por sinalização modulada por PRO1122.

Um ensaio de diagnóstico para determinar se uma desordem em particular (e.g., desordem cartilaginosa degenerativa) é conduzida por sinalização de PRO1122, pode ser realizado utilizando os passos seguintes: (1) cultura de células ou tecidos de teste que expressam PRO1122; (2) administração de um composto que pode inibir a sinalização modulada por PRO1122; e (3) medição dos efeitos fenotípicos mediados por PRO1122 nas células de teste. Os passos podem ser realizados utilizando técnicas *standard* à luz da presente descrição. Por exemplo, podem ser utilizadas técnicas *standard* para isolar células ou tecidos e cultura ou *in vivo*.

Compostos com vários graus de selectividade são úteis para o diagnóstico do papel do PRO1122. Por exemplo, compostos que PRO1122 em adição a outra forma de molécula adaptadora podem ser utilizados como composto de teste inicial para determinar se uma de várias moléculas adaptadoras conduzem a desordem. Os compostos selectivos podem então ser utilizados para adicionalmente eliminar o possível papel das outras proteínas adaptadoras na condução da desordem. Os compostos de teste deverão ser mais potentes na inibição de actividade de sinalização intracelular do que a exercer um efeito citotóxico (e.g., uma  $IC_{50}/LD_{50}$  superior a um). As  $IC_{50}$  e  $LD_{50}$  podem ser medidas por técnicas *standard*, tais como um ensaio MTT, ou por medição da quantidade de LDH libertada. O grau de  $IC_{50}/LD_{50}$  de um composto deverá ser tomado em conta na avaliação do ensaio de diagnóstico. Geralmente, quanto maior a razão mais relativa a informação. Os controlos apropriados têm em conta o possível efeito citotóxico de um composto, tal como o tratamento de células não associadas a uma desordem proliferativa celular (e.g., células de controlo) com um composto de teste, podem também ser utilizados como parte do ensaio de diagnóstico. Os métodos de diagnóstico da invenção envolvem a pesquisa de agentes que modulam os efeitos de PRO1122 após desordens cartilaginosas degenerativas. Os exemplos de técnicas de detecção incluem marcação radioactiva e imunoprecipitação (U.S.P. 5,385,915).

Por exemplo, anticorpos, incluindo fragmentos de anticorpo, podem ser utilizados para qualitativa ou quantitativamente detectar a expressão de proteínas codificadas pelos genes relacionados com doenças ("produtos de

genes marcadores"). O anticorpo preferivelmente é equipado com um marcador detectável, e.g. fluorescente, e a ligação pode ser monitorada por microscopia óptica, citometria de fluxo, fluorimetria, ou outras técnicas conhecidas na arte.

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

#### **J. Composições Farmacêuticas**

O PRO1122 ou seus antagonistas (e.g., anticorpos), assim como outras moléculas identificadas pelos ensaios de pesquisa aqui descritos, podem ser empregues como agentes terapêuticos. Estes agentes terapêuticos são formulados de acordo com métodos conhecidos para preparar composições farmacêuticamente úteis, através das quais o PRO 1122, os seus antagonistas ou agonistas, são combinados em mistura com um transportador farmacêuticamente aceitável.

No caso de anticorpos antagonistas de PRO1122, se a proteína codificada pelo gene amplificado for intracelular e forem utilizados anticorpos completos como inibidores, preferem-se anticorpos internalizantes. Contudo, podem também utilizar-se lipofecções ou lipossomas para entregar o anticorpo, ou um fragmento de anticorpo, às células. Quando se utilizam fragmentos de anticorpo, prefere-se o menor fragmento inibidor que se liga especificamente ao domínio de ligação da proteína alvo. Por exemplo, com base nas sequências da região variável de um anticorpo, podem-se desenhar moléculas peptídicas que retêm a capacidade para se ligarem à sequência da proteína alvo. Estes péptidos podem ser sintetizados quimicamente e/ou produzidos por tecnologia de ADN

recombinante (veja-se, e.g. Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7889-7893 [1993]).

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

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

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

As formulações a utilizar para administração *in vivo* têm que ser estéreis. Isto é prontamente conseguido por filtração através de membranas de filtração estéreis.

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

Podem preparar-se preparações de libertação sustentada. Os exemplos adequados de preparações de libertação sustentada incluem matrizes semi-permeáveis de polímeros hidrófobos sólidos contendo o anticorpo, matrizes estas que são na forma de artigos conformados, e.g. filmes ou microcápsulas. Os exemplos de matrizes de libertação sustentada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato), ou poli(álcool vinílico)), polilactidos (Pat. U.S. 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutâmico e  $\gamma$ -etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo não degradável, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradáveis tais como LUPRON DEPOT<sup>™</sup> (microesferas injectáveis compostas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolida), e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. A microencapsulação de proteínas recombinantes para libertação sustentada foi realizada com sucesso com hormona de crescimento humana (rhGH), interferão- rhIFN-), interleucina-2, e MN rpg 120. Johnson et al., Nat. Med. 2: 795-799 (1996); Yasuda et al., Biomed. Ther. 27: 1221-1223 (1993); Hora et al., Bio/Technology 8: 755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide

Polyglycolide Microsphere Systems." Em Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell and Newman. eds., (Penum Press: New York, 1995), pp. 439-462; WO 97/03692; WO 96/40072; WO 96/07399; e Pat. U.S. 5,654,010.

As formulações de libertação sustentada destas proteínas podem ser desenvolvidas utilizando polímero ácido poliláctico-glicólico (PLGA) devido à sua biocompatibilidade e ampla gama de propriedades biodegradáveis. Os produtos da degradação de PLGA, ácidos láctico e glicólico, podem ser rapidamente eliminados do corpo humano. Adicionalmente, a degradabilidade deste polímero pode ser ajustada de meses a anos, dependendo do seu peso molecular e composição. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer", em Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker; New York, 1990), M. Chasin e R. Langer (Eds.) pp. 1-41.

Enquanto polímeros como etileno-acetato de vinilo e ácido láctico-ácido glicólico permitem a libertação de moléculas durante mais de 100 dias, certos hidrogéis libertam proteínas durante períodos de tempo mais curtos. Quando anticorpos encapsulados permanecem no corpo durante um longo período de tempo, podem desnaturar ou agregar-se em resultado de exposição a humidade a 37°C, resultando uma perda de actividade biológica e possíveis alterações de imunogenicidade. Podem ser deduzidas estratégias racionais para estabilização dependendo do mecanismo envolvido. Por exemplo, quando se verifica que o mecanismo de agregação é a formação de ligações S-S intermoleculares através de permuta de tiodissulfureto, a estabilização pode ser conseguida por modificação de resíduos de sulfidriolo, liofilização a partir de soluções ácidas, controlo do teor de humidade, utilização de aditivos apropriados, e desenvolvimento de composições de matrizes poliméricas específicas.

#### **K. Métodos de Tratamento**

Está contemplado que os compostos da presente invenção possam ser utilizados para tratar várias condições, incluindo as que são caracterizadas por sobre-expressão e/ou activação dos genes associados à doença aqui identificados. A invenção

proporciona utilizações relacionadas para polipéptidos PRO1122 e antagonistas assim como antagonistas para utilização nestes métodos, ambos como definido nas reivindicações. Os exemplos de condições ou desordens a tratar com estes anticorpos e outros compostos, incluindo, mas não se lhes limitando, moléculas anti-sentido, etc. incluem desordens inflamatórias e imunológicas, especialmente aquelas que são caracterizadas por quebra da matriz de cartilagem tais como artrite, (e.g., osteoartrite, artrite psoriática, artrite reumatóide) ou outras doenças inflamatórias degenerativas.

Os agentes activos da presente invenção, e.g. anticorpos, são administrados a um mamífero, preferivelmente um ser humano, de acordo com métodos conhecidos, tais como por administração intravenosa na forma de *bolus* ou por infusão continua ao longo de um período de tempo, por administração intramuscular, intraperitoneal, intracerebral, intracerebrospinal, subcutânea, intra-acucutar, intra-sinovial, intratecal, intra-ocular, intralesional, oral, tópica, por inalação ou através de libertação sustentada.

Podem combinar-se outros regimes terapêuticos com a administração do PRO1122, ou dos antagonistas, e.g. anticorpos da presente invenção.

Para a prevenção ou tratamento de doenças, a dosagem apropriada de um agente activo, (e.g. um anticorpo) dependerá do tipo de doença a tratar, como atrás definido, da gravidade e decurso da doença, se o agente é administrado para fins preventivos ou terapêuticos, da terapia prévia, da história clínica do paciente e da resposta ao agente, e da opinião do medico assistente. O agente é adequadamente administrado ao paciente de uma só vez ou ao longo de uma série de tratamentos.

As dosagens e a concentração de fármaco desejadas das composições farmacêuticas da presente invenção podem variar dependendo da utilização particular pretendida. A determinação da dosagem ou via de administração apropriadas está bem dentro das competências de um perito. Experiências com animais proporcionam directrizes fiáveis para a determinação das doses eficazes para terapia humana. A passagem de escala inter-

espécies de doses eficazes pode ser realizada seguindo os princípios estabelecidos por Mordenti, J. e Chappell. W. "The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics." Em Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi et al., Eds, Pergamon Press, New York 1989, pp.42-46.

Quando se emprega a administração *in vivo* de um polipéptido PRO1122 ou um seu agonista ou antagonista, as quantidades de dosagem normais podem variar de cerca de 10 ng/kg até 100 mg/kg de peso corporal do mamífero ou mais, por dia, preferivelmente cerca de 1 µg/kg/dia até 100 mg/kg de peso corporal do mamífero ou mais, por dia, dependendo da via de administração. É proporcional orientação quanto a dosagens e métodos de entrega particulares na literatura; veja-se, por exemplo, Pat. U.S. 4,657,760, 5,206,344 ou 5,255,212. Está no âmbito da invenção que diferentes formulações serão eficazes para diferentes compostos de tratamento e diferentes desordens, que a administração com alvo num órgão ou tecido, por exemplo, pode necessitar de entrega de uma maneira diferente da que é usada para outro órgão ou tecido. Adicionalmente, as dosagens podem ser administradas através de uma ou mais administrações separadas, ou por infusão contínua. Para administrações repetidas ao longo de vários dias ou mais, dependendo da condição, o tratamento é sustentado até que ocorra uma supressão desejada dos sintomas da doença. Contudo, outros regimes de dosagem podem ser úteis. A progressão desta terapia é facilmente monitorada por técnicas e ensaios convencionais.

#### **L. Artigos de Fabrico**

Pode ser proporcionado um artigo de fabrico contendo materiais úteis para o diagnóstico ou tratamento das desordens atrás descritas. O artigo de fabrico compreende um recipiente e um rótulo. Os recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos, seringas e tubos de ensaio. Os recipientes podem ser formados a partir de uma variedade de materiais tais como vidro ou plástico. O recipiente retém uma composição que é eficaz para o diagnóstico ou tratamento da condição e pode ter uma porta de acesso estéril (por exemplo o recipiente pode ser um saco ou frasco de solução intravenosa possuindo uma tampa perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica). O

agente active na composição é tipicamente um polipéptido PRO1122, um seu antagonista ou agonista. O rótulo sobre, ou associado ao, recipiente indica que a composição é utilizada para o diagnóstico ou tratamento da condição de eleição. O artigo de fabrico pode ainda compreender um segundo recipiente compreendendo um tampão farmacologicamente aceitável, tal como solução salina tamponada com fosfato, solução de Ringer e solução de dextrose. Pode ainda incluir outros materiais desejáveis de um ponto de vista comercial e do utilizador, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas e bulas com instruções de utilização.

Os exemplos que se seguem são oferecidos apenas para fins ilustrativos, e não se destinam a limitar o âmbito da presente invenção de nenhum modo.

### **EXEMPLOS**

Os reagentes disponíveis no comércio referidos nos exemplos foram utilizados conforme as instruções do fabricante a menos que indicado de outro modo. A fonte das células identificadas nos exemplos que se seguem, e em todo o fascículo, pelos números de acesso ATCC é a American Type Culture Collection, Rockville, Maryland.

#### **EXEMPLO 1 Antecedente: Isolamento de Clones de ADNC que Codificam PRO1031 Humano**

As sequências do domínio extracelular (ECD) (incluindo o sinal de secreção, se existir) de cerca de 950 proteínas segregadas conhecidas da base de dados de proteínas pública Swiss-Prot, foram utilizadas para a pesquisa de bases de dados de marcadores de sequências expressas (EST). As bases de dados de EST incluíam bases de dados de EST públicas (e.g., GenBank, Merck/Wash.U.), e uma base de dados de ADN de EST privada (LIFESEQ<sup>TM</sup>, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA). A pesquisa foi realizada utilizando o programa de computador BLAST ou BLAST2 (Altshul, et al., *Methods in Enzymology* 266: 460-480 (1996)) na forma de uma comparação das sequências de proteínas ECD com uma tradução através de "6 frame translation" das sequências de EST. Estas comparações que resultam numa pontuação BLAST de 70 (ou em alguns casos de 90) ou mais que

não codificavam proteínas conhecidas foram agrupadas e montadas em sequências de ADN de consenso com o programa "phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington).

Um fragmento de sequência virtual inicial (montagem de consenso) foi montado relativamente a outras sequências EST utilizando phrap. A sequência de ADN de consenso inicial foi prolongada utilizando ciclos repetidos de BLAST e phrap para estender a sequência de consenso tanto quanto possível utilizando as fontes de sequências EST atrás discutidas. O resultado desta montagem é mostrado na Figura 5 (SEQ ID NO:5), também referida como DNA47332.

Uma sequência compreendendo a montagem de consenso, W74558 (clone 344649) (SEQ ID NO:6) foi adicionalmente examinada. A sequência foi obtida do consórcio IMAGE e analisada, Lennon *et al.*, Genomics 33: 151 (1996). A sequenciação do ADN originou a sequência de ADN de comprimento completo para PRO1031 [aqui designada como DNA59294-1381] (SEQ ID NO:2) e a sequência da proteína derivada PRO1031 (UNQ516) (SEQ ID NO:1).

A totalidade da sequência nucleotídica de DNA59294-1381 é apresentada na Figura 2 (SEQ ID NO:2). O Clone DNA59294-1381 contém um único quadro de leitura aberto com um aparente local de iniciação da tradução nas posições de nucleótido 42-44 e terminando no codão de paragem nas posições de nucleótido 582-584 (Figura 2) (SEQ ID NO:2). O polipéptido precursor previsto tem 180 aminoácidos de comprimento (Figura 1) (SEQ ID NO:1). A proteína PRO1031 de comprimento completo (UNQ5.16) mostrada na Figura 2 (SEQ ID NO:1) possui um peso molecular estimado de cerca de 20437 e um pI de cerca de 9,58. O clone DNA59294-1381 (SEQ ID NO:2) foi depositado na ATCC e foi-lhe atribuído o número de depósito 209866. No caso de quaisquer irregularidades ou erros de sequenciação com as sequências aqui proporcionadas, entende-se que o clone depositado contém a sequência correcta para DNA59624 (SEQ ID NO:2). Adicionalmente, as sequências aqui proporcionadas são o resultado de técnicas de sequenciação conhecidas.

A análise da sequência de aminoácidos do polipéptido PRO1031 de comprimento completo (UNQ516) (SEQ ID NO:1) sugere que esta é uma nova citoquina.

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

#### **EXEMPLO 1: Isolamento de clones de ADNc que Codificam PRO1122 Humano**

Uma base de dados de ADN de sequências marcadoras expressas (EST) (LIFESEQ®, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) foi pesquisada e foi identificada uma EST. A EST era Incyte 1347533 (SEQ ID NO:7) também denominada DNA49665. Com base em DNA49665 (SEQ ID NO:7), sintetizaram-se oligonucleótidos: 1) para identificar por PCR uma biblioteca de ADNc que continha a sequência de interesse, e 2) para utilização como sondas para isolar um clone da sequência de codificação de comprimento completo para o PRO1122, [e.g., Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989); Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Os iniciadores directo e inverso de PCR geralmente variam de 20 a 30 nucleótidos e são muitas vezes desenhados para originar um produto de PCR de cerca de 100-1000 pb de comprimento. As sequências de sondas têm tipicamente 40-55 pb de comprimento. Em alguns casos, são sintetizados oligonucleótidos adicionais quando a sequência de consenso é superior a cerca de 1-1,5 kpb. De modo a efectuar a pesquisa de várias bibliotecas quanto a um clone de comprimento completo, o ADN das bibliotecas foi pesquisado por amplificação por PCR, seguindo Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, com o par de iniciadores de PCR. Foi então utilizada uma biblioteca positiva para isolar

clones que codificam o gene de interesse utilizando a sonda oligonucleotídica e um dos pares de iniciadores.

iniciador de PCR directo:

5'-ATCCACAGAAGCTGGCCTTCGCCG-3' (SEQ ID NO:8)

iniciador de PCR inverso:

5'-GGGACGTGGATGAACTCGGTGTGG-3' (SEQ ID NO:9)

sonda de hibridação:

5'-TATCCACAGAAGCTGGCCTTCGCCGAGTGCCTGTGCAGAG-3' (SEQ ID NO:10).

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

O ARN para a construção das bibliotecas de ADNc foi isolado a partir de tecido de rim fetal humano. As bibliotecas de ADNc utilizadas para isolar os clones de ADNc foram construídas utilizando métodos *standard* utilizando reagentes disponíveis no comércio tais como os da Invitrogen, San Diego, CA. O ADNc foi iniciado com oligo dT contendo um local *NotI*, ligado com extremidades lisas a adaptadores tratados com hemiquinase *SalI*, clivado com *NotI*, apropriadamente dimensionado por electroforese em gel, e clonado numa orientação definida num vector de clonagem adequado (tal como pRKB ou pRKD; pRK5B é um precursor de pRK5D que não contém o local *SfiI*; veja-se, Holmes et al., *Science*, 235:1278-1280 (1991)) nos locais únicos *XhoI* e *NotI*.

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

A totalidade da sequência nucleotídica de DNA62377-1381-1 (SEQ ID NO:4) está apresentada nas Figuras 4A-4B (SEQ ID NO:4). O clone DNA62377-1381-1 (SEQ ID NO:4) contém um único quadro de leitura aberto com um local de iniciação da tradução

aparente nas posições de nucleótido 50-52 e terminando no codão de paragem nas posições de nucleótido 641-643 de SEQ ID NO:4 (Figuras 4A-4B). O precursor polipeptídico previsto tem 197 aminoácidos de comprimento (Figura 3) (SEQ ID NO:3). A proteína PRO1122 de comprimento completo mostrada na Figura 3 (UNQ561) (SEQ ID NO:3) tem um peso molecular estimado de cerca de 21765 daltons e um pI de cerca de 8,53. O clone DNA62377-1381-1 foi depositado na ATCC em 22 de Dezembro, 1998, e foi-lhe atribuído o número de depósito 203552. Entende-se que na eventualidade de uma irregularidade de sequenciação ou erro nas sequências aqui proporcionadas, a sequência correcta é a sequência depositada. Adicionalmente, todas as sequências aqui proporcionadas são o resultado de técnicas de sequenciação conhecidas.

A análise da sequência de aminoácidos do PRO1122 (UNQ561) de comprimento completo isolado sugere que esta possui similaridade com IL-17, indicando assim que PRO1122 (UNQ561) pode ser uma nova citocina. A Figura 3 (SEQ ID NO:3) mostra também as localizações aproximadas do péptido de sinal, do padrão de fecho-de-correr de leucinas e uma região possuindo identidade de sequência com IL-17. Os nucleótidos correspondentes podem ser rotineiramente determinados, e.g., por referência a Figuras 4A-4B.

#### **EXEMPLO 2: Utilização de ADN que codifica PRO1122 como sonda de hibridação**

O método seguinte descreve a utilização de uma sequência de nucleótidos que codifica PRO1122 na forma de sonda de hibridação.

ADN compreendendo a sequência de codificação de PRO1122 de comprimento completo (conforme mostrado na Figura 4, SEQ ID NO:4) ou um seu fragmento, é empregue como sonda para a pesquisa de ADN homólogos (tais como os que codificam variantes de ocorrência natural de PRO1122) em bibliotecas de ADNc de tecido humano ou bibliotecas genómicas de tecido humano.

A hibridação e a lavagem de filtros contendo ADN das bibliotecas são realizadas sob as seguintes condições de

elevado rigor. A hibridação da sonda derivada do polipéptido PRO1122 radiomarcada aos filtros é realizada numa solução de formamida a 50%, 5x SSC, SDS a 0,1%, pirofosfato de sódio a 0,1%, fosfato de sódio 50 mM, pH 6,8, 2x Solução de Denhardt e sulfato de dextrano a 10%, a 42°C durante 20 horas. A lavagem dos filtros é realizada numa solução aquosa de 0,1x SSC e SDS a 0,1%, a 42°C.

Os ADN possuindo uma identidade de sequências desejada com o ADN que codifica o polipéptido PRO1122 de comprimento completo de sequência nativa podem então ser identificados utilizando técnicas *standard* conhecidas na arte.

### **EXEMPLO 3: Expressão de Polipéptidos PRO1122 em *E. coli***

Este exemplo ilustra a preparação de formas não glicosiladas de polipéptidos PRO1122 por expressão recombinante em *E. coli*.

A sequência de ADN que codifica o PRO1122 de comprimento completo ou um seu fragmento ou variante, é inicialmente amplificada utilizando iniciadores de PCR seleccionados. Os iniciadores deverão conter locais para enzimas de restrição que correspondem aos locais para enzimas de restrição no vector de expressão seleccionado. Pode ser empregue uma variedade de vectores de expressão. Um exemplo de um vector adequado é o pBR322 (derivado de *E. coli*; veja-se Bolivar et al., *Gene*, 2:95 (1977)) que contém genes para resistência a ampicilina e a tetraciclina. O vector é digerido com enzimas de restrição e desfosforilado. As sequências amplificadas por PCR são então ligadas ao vector. O vector incluirá preferivelmente sequências que codificam para um gene de resistência a antibiótico, um promotor *trp*, um comando poli-His (incluindo os primeiros seis codões de STII, a sequência poli-His e o local de clivagem para a enteroquinase), a região de codificação de PRO1122, o terminador de transcrição lambda e um gene *argU*.

A mistura de ligação é então utilizada para transformar uma estirpe de *E. coli* seleccionada utilizando os métodos descritos em Sambrook et al., *supra*. Os transformantes são identificados pela sua capacidade para crescer em placas LB e

as colónias resistentes ao antibiótico são então seleccionadas. O ADN plasmídico pode ser isolado e confirmado por análise de restrição e sequenciação do ADN.

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

Após cultura das células durante mais várias horas, as células podem ser recolhidas por centrifugação. A pelete celular obtida na centrifugação pode ser solubilizada utilizando vários agentes conhecidos na arte, e o polipéptido PRO1122 solubilizado pode então ser purificado utilizando uma coluna quelante de metais sob condições que permitam uma forte ligação do polipéptido.

#### **EXEMPLO 4: Expressão de polipéptidos PRO1122 em células de mamífero**

Este exemplo ilustra a preparação de formas glicosiladas de polipéptidos PRO1122 por expressão recombinante em células de mamífero.

O vector, pRK5 (veja-se EP 307 247, publicado em 15 de Março de 1989), é empregue como vector de expressão. Opcionalmente, o ADN que codifica o PRO1122 é ligado a pRK5 com enzimas de restrição seleccionadas para permitir a inserção do ADN que codifica PRO1122 utilizando métodos de ligação tal como descrito em Sambrook et al., *supra*. O vector resultante é denominado pRK5-PRO1122.

Numa concretização, as células hospedeiras seleccionadas podem ser células 293. As células 293 humanas (ATCC CCL 1573) são crescidas até à confluência em placas de cultura de tecidos num meio tal como DMEM suplementado com soro de vitelo fetal e opcionalmente, componentes nutrientes e/ou antibióticos. Cerca de 10 µg de ADN de pRK5-PRO1122 são misturados com cerca de 1 µg de ADN que codifica o gene VA ARN

[Thimmappaya *et al.*, *Cell*, 31:543 (1982)] e dissolvidos em 500  $\mu$ l de Tris-HCl 1 mM, EDTA 0,1 mM,  $\text{CaCl}_2$  0,227 M. A esta mistura adicionaram-se, gota a gota, 500  $\mu$ l de HEPES 50 mM (pH 7,35), NaCl 280 mM,  $\text{NaPO}_4$  1,5 mM, e deixa-se o precipitado formar durante 10 minutos a 25°C. O precipitado é suspenso e adicionado às células 293 e deixa-se assentar durante cerca de quatro horas a 37°C. O meio de cultura é aspirado e adicionam-se 2 ml de glicerol a 20% em PBS durante 30 segundos. As células 293 são então lavadas com meio isento de soro, adiciona-se meio fresco e incubam-se as células durante cerca de 5 dias.

Aproximadamente 24 horas depois das transfecções, o meio de cultura é removido e substituído por meio de cultura (sozinho) ou meio de cultura contendo 200  $\mu$ Ci/ml de  $^{35}\text{S}$ -cisteína e 200  $\mu$ Ci/ml de  $^{35}\text{S}$ -metionina. Após uma incubação de 12 horas, o meio condicionado é recolhido, concentrado num filtro rotativo, e carregado sobre um gel de SDS a 15%. O gel processado pode ser seco e exposto a um filme durante um período de tempo seleccionado para revelar a presença de polipéptido PRO1122. As culturas contendo células transfectadas podem sofrer uma incubação adicional (em meio isento de soro) e o meio é testado em bioensaios seleccionados.

Numa técnica alternativa, o ADN que codifica PRO1122 pode ser introduzido em células 293 transientemente utilizando o método do sulfato de dextrano descrito por Sompariyac *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 12:7575 (1981). As células 293 são crescidas até uma densidade máxima num balão rotativo e adicionaram-se 700  $\mu$ g de ADN de pRK5-PRO1122. As células são primeiro concentradas a partir do balão rotativo por centrifugação e lavadas com PBS. O precipitado de ADN-dextrano é incubado na pelete de células durante quatro horas. As células são tratadas com glicerol a 20% durante 90 segundos, lavadas com meio de cultura de tecidos, e reintroduzidas no balão rotativo contendo o meio de cultura de tecidos, 5  $\mu$ g/ml de insulina bovina e 0,1  $\mu$ g/ml de transferrina bovina. Após cerca de quatro dias, o meio condicionado é centrifugado e filtrado para remover as células e os detritos. A amostra contendo o polipéptido PRO1122 expresso pode então ser

concentrada e purificada por qualquer método seleccionado, tal como diálise e/ou cromatografia em coluna.

Noutra concretização, o polipéptido PRO1122 pode ser expresso em células CHO. O vector pRK5-PRO1122 pode ser transfectado para células CHO utilizando reagentes conhecidos tais como  $\text{CaPO}_4$  ou DEAE-dextrano. Tal como atrás descrito, as culturas de células podem ser incubadas, e o meio substituído por meio de cultura (sozinho) ou meio contendo um marcador radioactivo tal como S-metionina. Após determinação da presença de PRO1122, o meio de cultura pode ser substituído por meio isento de soro. Preferivelmente, as culturas são incubadas durante cerca de 6 dias, e depois o meio condicionado é recolhido. O meio contendo o polipéptido PRO1122 expresso pode então ser concentrado e purificado por qualquer método seleccionado.

O polipéptido PRO1122 marcado com um epítopo pode também ser expresso em células hospedeiras CHO. O ADN que codifica PRO1122 pode ser subclonado fora vector pRK5. A inserção do subclone pode sofrer PCR para fundir em enquadramento com um marcador epitópico seleccionado tal como um marcador poli-His num vector de expressão de baculovírus. A inserção de ADN que codifica PRO1122 marcada com poli-His pode então ser subclonada num vector de SV40 contendo um marcador de selecção tal como DHFR para a selecção de clones estáveis. Finalmente, as células CHO podem ser transfectadas (como descrito atrás) com o vector de SV40. A marcação pode ser realizada, como descrito atrás, para verificar a expressão. O meio de cultura contendo o polipéptido PRO1122 marcado com poli-His expresso pode então ser concentrado e purificado por qualquer método seleccionado, tal como por cromatografia de afinidade em quelato de  $\text{Ni}^{2+}$ .

#### **EXEMPLO 5: Expressão de um Polipéptido PRO1122 em Levedura**

O método seguinte descreve a expressão recombinante de polipéptidos PRO1122 em levedura.

Primeiro, constroem-se vectores de expressão em levedura para a produção intracelular ou secreção de polipéptido PRO1122 a partir do promotor ADH2/GAPDH, ADN que codifica o

polipéptido PRO1122 de interesse, um péptido de sinal seleccionado e o promotor é inserido nos locais adequados para enzimas de restrição no plasmídeo seleccionado para dirigir a expressão intracelular do polipéptido PRO1122. Para secreção, o ADN que codifica o polipéptido PRO1122 pode ser clonado no plasmídeo seleccionado, juntamente com ADN que codifica o promotor ADH2/GAPDH, a sequência sinal de secreção/de comendo do factor alfa de levedura e sequências ligantes (se necessário) para a expressão do polipéptido PRO1122.

Células de levedura, tais como a estirpe de levedura AB 110, podem então ser transformadas com os plasmídeos de expressão atrás descritos e cultivadas em meios de fermentação seleccionados. Os sobrenadantes de levedura transformada podem ser analisados por precipitação com ácido tricloroacético a 10% e separação por SDS-PAGE, seguida por coloração dos géis com corante Azul de Coomassie.

O polipéptido PRO1122 recombinante pode ser subsequentemente isolado e purificado por remoção das células de levedura do meio de fermentação por centrifugação e depois concentração do meio utilizando filtros de cartucho seleccionados. O concentrado contendo o polipéptido PRO1122 pode ser adicionalmente purificado utilizando resinas de cromatografia em coluna seleccionadas.

#### **EXEMPLO 6: Expressão de Polipéptidos PRO1122 em Células de Insecto Infectadas com Baculovírus**

O método seguinte descreve a expressão recombinante de polipéptidos PRO1122 em células de insecto infectadas com Baculovírus.

O ADN que codifica PRO1122 é fundido a montante de um marcador epitópico contido num vector de expressão em baculovírus. Estes marcadores epitópicos incluem marcadores de poli-His e marcadores de imunoglobulina (como regiões Fc de IgG). Pode ser empregue uma variedade de plasmídeos, incluindo plasmídeos derivados de plasmídeos comercialmente disponíveis tais como pVL1393 (Novagen). Resumidamente, o ADN que codifica PRO1122 ou a porção desejada do ADN que codifica PRO1122 (tal como a sequência que codifica o domínio extracelular de uma

proteína transmembranar) é amplificado por PCR com iniciadores complementares às regiões 5' e 3'. O iniciador 5' pode incorporar locais de enzimas de restrição (seleccionados) flanqueadores. O produto é depois digerido com essas enzimas de restrição seleccionadas e subclonado no vector de expressão.

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

O polipéptido PRO1122 marcado com poli-His expresso pode ser então purificado, por exemplo, por cromatografia de afinidade em quelato de  $\text{Ni}^{2+}$  como se segue. Preparam-se extractos a partir de células Sf9 recombinantes infectadas com vírus como descrito por Rupert et al., Nature, 362:175-179 (1993). Resumidamente, as células Sf9 são lavadas, ressuspensas em tampão de ultra-sons (25 mL de Hepes, pH 7,9;  $\text{MgCl}_2$  12,5 mM; EDTA 0,1 mM; Glicerol a 10%; NP-40 a 0,1%; KCl 0,4 M), e tratadas com ultra-sons duas vezes durante 20 segundos em gelo. Os resultantes do tratamento com ultra-sons são clarificados por centrifugação e o sobrenadante é diluído 50 vezes em tampão de carga (fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, Glicerol a 10%, pH 7,8) e filtrado através de um filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ . Prepara-se uma coluna de agarose  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA (comercialmente disponível de Qiagen) com um volume de leito de 5 mL, lava-se com 25 mL de água e equilibra-se com 25 mL de tampão de carga. O extracto celular filtrado é carregado na coluna a 0,5 mL por minuto. A coluna é lavada até à  $A_{280}$  da linha de base com tampão de carga, ponto em que se inicia a recolha de fracções. Em seguida, a coluna é lavada com um tampão de lavagem secundário (fosfato 50 mM; NaCl 300 mM, Glicerol a 10%, pH 6,0), que eluiu a proteína ligada de forma não específica. Depois de atingir novamente a linha de base a  $A_{280}$ , desenvolve-se a coluna com um gradiente de Imidazole de 0 a 500 mM no tampão de lavagem secundário. Recolhem-se fracções

de mL e analisam-se por SDS-PAGE e coloração com prata ou *Western blot* com  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA conjugado a fosfatase alcalina (Qiagen). Reúnem-se as fracções que contêm o polipéptido PRO1122 marcado com  $\text{His}_{10}$  e dialisam-se contra tampão de carga. Alternativamente, a purificação do polipéptido PRO1122 marcado com IgG (ou marcado com Fc) pode ser realizada utilizando técnicas de cromatografia conhecidas, incluindo por exemplo, cromatografia em coluna de Proteína A ou Proteína G.

#### **EXEMPLO 7: Preparação de anticorpos que se ligam a polipéptidos PRO1122**

Este exemplo ilustra a preparação de anticorpos monoclonais que podem ligar-se especificamente a um polipéptido PRO1122.

As técnicas para a produção dos anticorpos monoclonais são conhecidas na arte e estão descritas, por exemplo, em Goding, *supra*. Os imunogénios que podem ser empregues incluem polipéptido PRO1122 purificado, proteínas de fusão contendo um polipéptido PRO1122 e células que expressam polipéptido PRO1122 recombinante na superfície celular. A selecção do imunogénio pode ser feita por um perito na especialidade sem experimentação desnecessária.

Ratinhos, tais como Balb/c, são imunizados com o imunogénio PRO1122 emulsionado em adjuvante de Freund completo e injectado subcutaneamente ou intraperitonealmente numa quantidade de 1-100 microgramas. Alternativamente, o imunogénio é emulsionado em adjuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) e injectado nas almofadas das patas dos animais. Os ratinhos imunizados recebem então reforços 10 a 12 dias mais tarde com imunogénio adicional emulsionado no adjuvante seleccionado. Posteriormente, durante várias semanas, os ratinhos podem também receber reforços com injeções de imunização adicionais. Amostras de soro podem ser periodicamente obtidas dos ratinhos por sangria retro-orbital para teste em ensaios ELISA para detectar anticorpos anti-polipéptido PRO1122.

Após detectar um anticorpo adequado, os animais "positivos" para anticorpos pode ser injectados com uma

injecção intravenosa final de polipéptido PRO1122. Três a quatro dias mais tarde, os ratinhos são sacrificados e as células do baço são recolhidas. As células do baço são então fundidas (utilizando polietilenoglicol a 35%) a uma linha celular de mieloma murino seleccionada tal como P3X63AgU.1, disponível na ATCC, No. CRL 1597. As fusões geram células de hibridoma que podem então ser plaqueadas em placas de cultura de tecidos de 96 poços contendo meio HAT (hipoxantina, aminopterina e timidina) para inibir a proliferação de células não fundidas, híbridos de mieloma e híbridos de células do baço.

As células de hibridoma serão pesquisadas num ELISA quanto à reactividade contra polipéptido PRO1122. A determinação de células de hibridoma "positivas" que segregam os anticorpos monoclonais desejados contra polipéptido PRO1122 faz parte das qualificações do perito na especialidade.

As células de hibridoma positivas podem ser injectadas intraperitonealmente em ratinhos Balb/c singénicos para produzir ascites contendo os anticorpos monoclonais anti-polipéptido PRO1122. Alternativamente, as células de hibridoma podem ser crescidas em balões de cultura de tecidos ou frascos rotativos. A purificação dos anticorpos monoclonais produzidos nos ascites pode ser realizada utilizando precipitação com sulfato de amónio, seguida por cromatografia de exclusão em gel. Alternativamente, pode ser empregue cromatografia de afinidade baseada na ligação de anticorpo a proteína A ou proteína G.

#### **Exemplo 8: Expressão de ARN**

Adquiriram-se *blots* de tecidos múltiplos contendo ARN poli A<sup>+</sup> (2µg por pista) de vários tecidos humanos a Clontech (Palo Alto, CA). Utilizaram-se a totalidade das regiões de codificação de IL-17B humana (LINQ516) (700 pb) (SEQ ID NO:17) e IL-17C (UNQ561) (1,1 kpb) (SEQ ID NO:18) como sondas de hibridação. Marcaram-se as sondas de ADN com [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP por iniciação aleatória de contas de marcação de ADN (Pharmacia Biotech). A hibridação foi realizada utilizando Expresshyb (Clontech) contendo as sondas radiomarcadas a 68°C durante 1 hora. Os *blots* foram então lavados com solução de SSC 2X/SDS

a 0,05% à temperatura ambiente durante 40 minutos, seguida de lavagens com solução de SSC 0,1X/SDS a 0,05% a 55°C durante 40 minutos com uma troca por solução fresca. Os *blots* foram expostos num *Phosphorimager* e a imagem resultante está aqui apresentada na Figura 8.

Para a IL-17B (SEQ ID NO:1), encontrou-se um transcrito de ARNm de 800 pb no pâncreas, intestino delgado e no estômago de tecidos humanos adultos: detectou-se uma banda mais fraca nos testículos, (Figura 8). A expressão de IL-17C (SEQ ID NO:2) foi examinada no mesmo conjunto de tecidos humanos adultos, mas não se observaram sinais detectáveis.

### **Exemplo 9: Geração de proteínas de fusão com Fc/His**

As sequências de codificação de IL17B (SEQ ID NO:17) e de IL17C (SEQ ID NO:18) foram amplificadas por PCR e subclonadas nos locais *EcoRI* e *SmaI* de pBPH.His.c para gerar um marcador GHHHHHHHH C-terminal (SEQ ID NO:19) ou nos locais *EcoRI* e *StuI* de pBPH.IgG para gerar uma fusão C-terminal com a região Fc de IgG1 humana. Os vectores pBPH.His.c e pBPH.IgG são derivados do vector de expressão de baculovírus pVL1393 (Pharmingen). Construiu-se uma proteína de controlo marcada com Fc ou His de maneira semelhante por ligação no terminal C da proteína associada a pancreatite (175 aminoácidos) à porção Fc da IgG1 humana ou um marcador His8.

As proteínas de fusão foram expressas em células H5 utilizando o procedimento recomendado pelo fabricante (Invitrogen). Em resumo, as construções de ADN foram co-transfectadas com ADN de Baculovírus BaculoGold (Pharmingen) numa razão de 7:1 em células Sf9 aderentes. As células foram incubadas a 28°C durante 4 dias e recolheu-se o sobrenadante. O sobrenadante da transfecção foi amplificado e foi submetido a purificação de afinidade em contas de proteína A-Sepharose (Pharmacia) para proteínas de fusão com Fc ou contas de Ni-NTA agarose (QIAGEN) para proteínas marcadas com His.

Para examinar a expressão de proteína, aplicou-se análise por SDS-PAGE às proteínas recombinantes purificadas por afinidade sob condições redutoras e não redutoras, seguida de coloração com prata.

**Exemplo 10: Indução de IL-6 e libertação de TNF- $\alpha$** 

Utilizando o procedimento delineado em Yao et al., J. Immunol 155: 5483 (1995) (Yao-2) para a libertação de IL-6 (SEQ ID NO:14), cultivaram-se células fibroblastos de prepúcio humano (ATCC CRL-2091) em meio MEM (FBS a 10%) com a citoquina de teste. Após incubação durante 18 horas a 37°C e CO<sub>2</sub> a 5%, ensaiaram-se os meios condicionados quanto a IL-6 utilizando um kit de ELISA (R&D Systems). Para a secreção de TNF- $\alpha$ , cultivaram-se células THP-1 monocíticas de leucemia humana em meio RPMI (FBS a 10%) com a citoquina de teste. Após incubação durante 18 horas a 37°C e CO<sub>2</sub> a 5%, quantificaram-se os meios condicionados quanto a TNF- $\alpha$  (SEQ ID NO:20) utilizando e um kit de ensaio de ELISA (R&D Systems).

Células fibroblastos de prepúcio humano (ATCC) foram separadamente cultivadas em meio MEM (FBS a 10%) na presença de IL-17B (UNQ516) (SEQ ID NO:1) e IL-17C (UNQ561) (SEQ ID NO:3). Após incubação durante 18 horas a 37°C e CO<sub>2</sub> a 5%, ensaiaram-se os meios condicionados quanto a IL-6 (SEQ ID NO:14) utilizando um kit de ELISA (R&D Systems). Em contraste com o elevado nível de IL-6 (SEQ ID NO:14) induzida por IL-17 (SEQ ID NO:11), nem IL-17B (SEQ ID NO:1) nem IL17C (SEQ ID NO:3) estimularam a secreção de IL-6 (SEQ ID NO:14) em células fibroblastos (Figura 9A).

Utilizando o procedimento delineado em Yao et al., Cytokine 9: 794 (1997) [Yao-3], utilizou-se uma linha celular monocítica leucémica humana, THP-1, para o ensaio à estimulação da libertação TNF- $\alpha$  (SEQ ID NO:20) por IL-17 (SEQ ID NO:11), UNQ516 (SEQ ID NO:1) e UNQ561 (SEQ ID NO:3) por cultura em meio RPMI (FBS a 10%). Após incubação durante 18 horas a 37°C e CO<sub>2</sub> a 5%, quantificaram-se os meios condicionados quanto a TNF- $\alpha$  (SEQ ID NO:19) utilizando um kit de ensaio de ELISA (R&D Systems). Enquanto a IL-17 (SEQ ID NO:11) induziu apenas um baixo nível de TNF- $\alpha$  (SEQ ID NO:19) em células THP-1, tanto a IL-17B como a IL-17C (na forma de proteínas de fusão com Fc) estimularam a produção de TNF- $\alpha$  em células THP-1 (Figura 9B). Uma proteína de fusão com Fc de controlo não teve efeito.

De modo a adicionalmente caracterizar a estimulação da libertação de TNF- $\alpha$  por IL-17B e IL-17C, ensaiaram-se a dependência da concentração e do decorrer de tempo da resposta em células THP-1. A Figura 10 ilustra que a IL-17B (UNQ516) (SEQ ID NO:1) e a IL-17C (UNQ561) (SEQ ID NO:3) estimulam a libertação de TNF- $\alpha$  (SEQ ID NO:19) de uma maneira dependente da concentração e do tempo. A EC<sub>50</sub> para IL-17B (UNQ516) (SEQ ID NO:1) estimulação é de 2,4 nM, enquanto para a IL-17C (UNQ561) (SEQ ID NO:3), é 25 nM.

Embora as preparações de IL-17B (UNQ516) (SEQ ID NO:1) e de IL-17C (UNQ561) (SEQ ID NO:3) utilizadas nestas experiências contivessem um nível indetectável de endotoxina (inferior a 1 EU/ml), realizaram-se experiências de controlo adicionais para confirmar que a libertação de TNF- $\alpha$  (SEQ ID NO:19) pelas células THP-1 era real e não artefactual. As actividades de IL-17B (UNQ516) (SEQ ID NO:1) e IL-17C (UNQ561) (SEQ ID NO:3) não foram afectadas por tratamento com polimixina B e foram eliminadas por tratamento térmico, o que suporta adicionalmente a noção de que eram as próprias proteínas as responsáveis pelas actividades e não qualquer endotoxina contaminante.

### **Exemplo 11: Ligação ao Receptor de IL-17**

#### ***Clonagem do ECD de Receptor de hIL-17:***

De modo a clonar o ECD do receptor de IL-17 humana, desenharam-se dois iniciadores oligonucleotídicos nas extremidades 5' e 3' de ECD de IL-17R (SEQ ID NO:15) baseados na sequência publicada. Yao *et al.*, *supra* (Yao-3). As duas sondas tinham as sequências seguintes:

iniciador 1: 5'-CTG TAC CTC GAG GGT GCA GAG-3' (SEQ ID NO:20)

iniciador 2: 5'-CCC AAG CTT GGG TCA ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG CCA CAG GGG CAT GTA GTC C-3' (SEQ ID NO:21)

Utilizaram-se os iniciadores anteriores em reacções PCR para amplificar o ADNc de comprimento completo de uma biblioteca de ADNc de testículo humano com ADN-polimerase Pfu Turbo (Promega). Introduziu-se um marcador de His C-terminal por PCR através da adição de nucleótidos que codificam oito

histidinas ao iniciador da extremidade 3'. O produto da PCR foi então subclonado num vector plasmídico de expressão pRK5B. A análise da sequência confirmou que a inserção contém um fragmento de ADN que codifica o domínio extracelular (1-320 aminoácidos) do receptor de hIL-17 publicado (SEQ ID NO:15).

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

A actividade diferencial de IL-17 comparativamente com a IL-17B (UNQ516) (SEQ ID NO:1) e a IL-17C (UNQ561) (SEQ ID NO:3) sugeriu que estas podem ligar e activar diferentes receptores de superfície celular. De modo a testar se a IL-17B (UNQ516) (SEQ ID NO:1) ou a IL-17C (UNQ561) (SEQ ID NO:3) se ligam directamente ao receptor, transfectou-se um plasmídeo de expressão contendo o IL-17R (C-terminal, marcado com His) (SEQ ID NO:22) em células 293, utilizando o reagente de transfecção SuperFect (Qiagen). Realizou-se uma marcação metabólica de células 293, 16 horas após a transfecção, utilizando uma mistura de 50 µCi/ml de [<sup>35</sup>S]-Cys/Met durante 6 horas. Recolheu-se o meio condicionado e concentrou-se (Centricon-10, Amicon). Para examinar a expressão do ECD de IL-17R (SEQ ID NO:15), utilizaram-se contas de Ni-NTA (Qiagen) para precipitar por afinidade o ECD de IL-17R marcado com His (SEQ ID NO:22) a partir do meio condicionado.

Diluiu-se o meio condicionado em tampão RIPA (NP40 a 1%, desoxicolato de sódio a 0,5%, SDS a 0,1% em PBS), incubou-se com IL-17 (SEQ ID NO:11) e as proteínas de fusão com Fc, durante a noite a 4°C. Adicionaram-se contas de proteína A-agarose (Pierce) para precipitar as proteínas de fusão com Fc. Lavaram-se os precipitados três vezes para precipitar as proteínas de fusão com Fc. Lavaram-se os precipitados três vezes em tampão RIPA, desnaturaram-se em tampão de amostra de SDS, e submeteram-se a electroforese em géis NuPAGE 4-12% Bis-Tris (Novex). Para a imunoprecipitação de IL-17 (SEQ ID NO:11), adicionou-se anticorpo anti-IL-17 (R&D Systems). Numa experiência de ligação competitiva, realiza-se a imunoprecipitação de ECD de IL-17R (SEQ ID NO:15) por IL-17 (SEQ ID NO:11) na presença de um excesso molar de 5 vezes de IL-17B.his (SEQ ID NO:23, IL-17C.his (SEQ ID NO:24 e proteína marcada com His de controlo.

O ECD de IL-17R (SEQ ID NO:15) migrou na forma de uma banda de 60 kDa quando purificada por via do seu marcador de histidina (Fig. 11A, pista 1). Adicionalmente, o ECD de IL-17R (SEQ ID NO:15) também precipitou em combinação com IL-17 (SEQ ID NO:11) (pista 3). Contudo, nem a IL-17B (SEQ ID NO:1) nem a IL-17C (SEQ ID NO:3) competiram pela ligação de IL-17 (SEQ ID NO:11) para o ECD do receptor de IL-17 marcado (SEQ ID NO:15, Fig. 11B, pista 15 e 16).

#### **Exemplo 12: Análise por Separação de Células Activadas por Fluorescência (FACS) da Ligação a Células THP-1**

Células THP-1 ( $5 \times 10^5$ ) foram pré-incubadas em PBS contendo 5% de soro de cavalo a 4°C durante 30 minutos para bloquear ligação não específica. Adicionaram-se IL-17 (SEQ ID NO:11), IL-17B.fc (SEQ ID NO:12), IL-17C.Fc (SEQ ID NO:13) ou Fc de controlo (1 µg de cada) e incubou-se com as células THP-1 num volume de 0,25 ml em gelo durante 1 hora. Para a experiência de ligação a IL-17, adicionaram-se anticorpo anti-hIL-17 primário (diluição de 1:100) e anticorpo de cabra anti-ratinho secundário conjugado a FITC (Jackson Immunology Lab, diluição de 1:100), sequencialmente, com incubação de 30-60 minutos e lavagens extensivas antes de cada adição. Para as proteínas de fusão com Fc, coraram-se as células com IgG de cabra anti-humana conjugada com FITC (específica de Fc, Jackson Immunology Lab., diluição de 1:100). Após lavagens intensas, analisou-se um mínimo de 5000 células utilizando um aparelho FACScan (Becton Dickinson).

O resultante do anterior procedimento foi que ambas as proteínas de fusão com Fc de IL-17B (SEQ ID NO:12) e IL-17C (SEQ ID NO:13) apresentaram ligação a células THP-1 comparativamente com uma proteína de fusão com Fc de controlo (Fig. 13).

#### **EXEMPLO 13: Purificação de Polipéptidos PRO1122 Utilizando Anticorpos Específicos**

Os polipéptidos PRO1122 nativos ou recombinantes podem ser purificados através de uma variedade de técnicas *standard* na especialidade da purificação de proteínas. Por exemplo,

purifica-se pró-polipéptido PRO1122, polipéptido PRO1122 maduro ou pré-polipéptido PRO1122 por cromatografia de imunoafinidade utilizando anticorpos específicos para o polipéptido PRO1122 de interesse. Em geral, constrói-se uma coluna de imunoafinidade por acoplamento covalente do anticorpo anti-polipéptido PRO1122 a uma resina cromatográfica activada.

As imunoglobulinas policlonais são preparadas a partir de soros imunes quer por precipitação com sulfato de amónio quer por purificação em Proteína A imobilizada (Pharmacia LKB BioTechnology, Piscataway, N.J.). Do mesmo modo, os anticorpos monoclonais são preparados a partir de fluido ascítico de ratinhos por precipitação com sulfato de amónio ou cromatografia em Proteína A imobilizada. A imunoglobulina parcialmente purificada é covalentemente ligada a uma resina cromatográfica tal como SEPHAROSE<sup>®</sup> activada por CnBr (Pharmacia LKB BioTechnology). O anticorpo é acoplado à resina, a resina é bloqueada e a resina derivada é lavada de acordo com as instruções do fabricante.

Uma tal coluna de imunoafinidade é utilizada na purificação de polipéptido PRO1122 preparando uma fracção de células contendo polipéptido PRO1122 numa forma solúvel. Esta preparação é derivada por solubilização da célula completa ou de uma fracção subcelular obtida por centrifugação diferencial pela adição de detergente ou por outros métodos bem conhecidos na especialidade. Alternativamente, polipéptido PRO1122 solúvel contendo uma sequência de sinal pode ser segregado em quantidade útil para o meio em que as células são crescidas.

Uma preparação contendo polipéptido PRO1122 solúvel é passada através da coluna de imunoafinidade e a coluna é lavada sob condições que permitem a absorvância preferencial de polipéptido PRO1122 (e.g., tampões de elevada força iónica na presença de detergente). Então, a coluna é eluída sob condições que rompem a ligação anticorpo-polipéptido PRO1122 (e.g., um tampão de baixo pH tal como aproximadamente pH 2-3, ou uma elevada concentração de um caotrope tal como ureia ou ião tiocianato) e recolhe-se o polipéptido PRO1122.

**EXEMPLO 14: Pesquisa de Fármacos**

A presente invenção é particularmente útil para a pesquisa de compostos utilizando polipéptidos PRO1122 ou seus fragmentos de ligação em qualquer uma de uma variedade de técnicas de pesquisa de fármacos. O polipéptido PRO1122 ou fragmento empregues nestes testes podem estar livres em solução, afixados num suporte sólido, suportados numa superfície celular ou localizados intracelularmente. Um método de pesquisa de fármacos utiliza células hospedeiras eucariotas ou procariotas que são transformadas estavelmente com ácidos nucleicos recombinantes que expressam o polipéptido PRO1122 ou o fragmento. Os fármacos são pesquisados contra essas células transformadas em ensaios de ligação competitiva. Estas células, quer na forma viável quer fixadas, podem ser utilizadas para ensaios de ligação *standard*. Pode-se medir, por exemplo, a formação de complexos entre polipéptido PRO1122 ou um fragmento e o agente a testar. Alternativamente, pode-se examinar a diminuição na formação de complexos entre o polipéptido PRO1122 e a sua célula alvo ou receptores alvo, causada pelo agente a testar.

Assim, a presente invenção proporciona métodos de pesquisa para fármacos ou quaisquer outros agentes que possam afectar uma doença ou desordem associadas ao polipéptido PRO1122. Estes métodos compreendem o contacto de um tal agente com um polipéptido PRO1122 ou seu fragmento e o ensaio (i) quanto à presença de um complexo entre o agente e o polipéptido PRO1122 ou o fragmento, ou (ii) quanto à presença de um complexo entre o polipéptido PRO1122 ou o fragmento e a célula, por métodos bem conhecidos na especialidade. Nestes ensaios de ligação competitiva, o polipéptido PRO1122 ou o fragmento são tipicamente marcados. Após incubação adequada, o polipéptido PRO1122 ou o fragmento livres são separados daqueles que estão presentes na forma ligada, e a quantidade de marcador livre ou não complexado é uma medida da capacidade do agente particular se ligar ao PRO1122 ou interferir com o complexo polipéptido PRO1122/célula.

Outra técnica para a pesquisa de fármacos proporciona uma pesquisa de alto rendimento para compostos possuindo afinidade de ligação adequada para com um polipéptido e está descrita com detalhes em WO 84/03564, publicado em 13 de Setembro,

1984. Resumidamente, grandes números de diferentes compostos de teste peptídicos pequenos são sintetizados sobre um substrato sólido, tal como pinos de plástico ou alguma outra superfície. Como aplicado a um polipéptido PRO1122, os compostos de teste peptídicos são feitos reagir com polipéptido PRO1122 e lavados. O PRO1122 ligado é detectado por métodos bem conhecidos na especialidade. O polipéptido PRO1122 purificado pode também ser utilizado para revestir directamente placas para utilização nas técnicas de pesquisa de fármacos atrás mencionadas. Em adição, podem-se utilizar anticorpos não neutralizantes para capturar o péptido e imobilizá-lo sobre o suporte sólido.

A presente invenção também contempla a utilização de ensaios de pesquisa de fármacos competitivos em que anticorpos neutralizantes capazes de ligação ao polipéptido PRO1122 competem especificamente com um composto de teste pela ligação ao polipéptido PRO1122 ou a seus fragmentos. Desta maneira, os anticorpos podem ser utilizados para detectar a presença de qualquer péptido que partilhe um ou mais determinantes antigénicos com o polipéptido PRO1122.

#### **EXEMPLO 15: Desenho Racional de Fármacos**

O objectivo do desenho racional de fármacos consiste em produzir análogos estruturais de polipéptidos de interesse biologicamente activos (*i.e.*, um polipéptido PRO1122) ou de moléculas pequenas com as quais interactuam, *e.g.*, agonistas, antagonistas ou inibidores. Qualquer destes exemplos pode ser utilizado para desenhar fármacos que são formas mais activas ou estáveis do polipéptido PRO1122 ou que aumentam ou interferem com a função do polipéptido PRO1122 *in vivo* (*c.f.* Hodgson, Bio/Technology, 9: 19-21 (1991)).

Numa abordagem, a estrutura tridimensional do polipéptido PRO1122, ou de um complexo polipéptido PRO1122-inibidor, é determinada por cristalografia de raios-x, por modelação em computador ou, mais tipicamente, pela combinação das duas abordagens. Tanto o formato como as cargas do PRO1122 têm que ser determinadas para elucidar a estrutura e para determinar local(ais) activo(s) da molécula. Menos frequentemente, informação útil relativa à estrutura do PRO1122 pode ser obtida através de modelação baseada na

estrutura de proteínas homólogas. Em ambos os casos, utiliza-se a informação estrutural relevante para desenhar moléculas análogas semelhantes a polipéptido PR01122 ou para identificar inibidores eficientes. Os exemplos úteis de desenho racional de fármacos podem incluir moléculas que têm actividade ou estabilidade melhoradas como mostrado por Braxton e Wells, Biochemistry, 31:7796-7801 (1992) ou que actuam como agonistas, inibidores, ou antagonistas de péptidos nativos como mostrado por Athauda et al., J. Biochem., 113:742-746 (1993).

É também possível isolar um anticorpo específico do alvo, seleccionado por ensaio funcional, como descrito atrás, e depois resolver a sua estrutura cristalina. Esta abordagem, em princípio, produz uma estrutura nuclear de fármaco ("pharmacore") na qual se pode basear um subsequente desenho de fármacos. É possível circundar completamente a cristalografia da proteína gerando anticorpos anti-idiotípicos (anti-id) contra um anticorpo funcional, farmacologicamente activo. Tal como uma imagem no espelho de uma imagem no espelho, é de esperar que o local de ligação dos anti anti-id seja um análogo do receptor original. O anti-id pode então ser utilizado para identificar e isolar péptidos a partir de bancos de péptidos produzidos quimicamente ou biologicamente. Os péptidos isolados actuariam então como estrutura nuclear de fármaco.

Em virtude da presente invenção, podem ser tornadas disponíveis suficientes quantidades do polipéptido PR01122 para realizar estudos analíticos como a cristalografia de raios-x. Em adição, o conhecimento da sequência de aminoácidos do polipéptido PR01122 aqui proporcionada proporcionará orientação aos que empregam técnicas de modelação em computador em vez de, ou em adição a, cristalografia de raios-x.

#### **Exemplo 16: Ensaio de Explante de Cartilagem Articular**

##### ***Introdução:***

Como mencionado anteriormente, a IL-17 provavelmente desempenha um papel na iniciação ou na manutenção da resposta pró-inflamatória. A IL-17 é uma citocina expressa por células  $T_h$   $CD4^+$  e induz a secreção de citocinas pró-inflamatórias e

hematopoiéticas (e.g., IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, GM-CSF. Aarvak et al., J. Immunol 162: 1246-1251 (1999); Fossiez et al., J. Exp. Med. 183: 2593-2603 (1996); Jovanovic et al., J. Immunol. 160: 3513-3521 (1998) em vários dos tipos celulares incluindo sinoviócitos e macrófagos. Na presença de IL-17, fibroblastos sustentam a proliferação de progenitores hematopoiéticos CD34+ e induzem a sua maturação preferencial em neutrófilos. Em resultado, a IL-17 pode constituir um iniciador precoce da reacção inflamatória dependente de células T e ser parte da rede de citocinas que faz a ponte entre o sistema imunitário e a hematopoiese.

Verificou-se que a expressão de IL-17 no sinóvio de pacientes com artrite reumatóide, artrite psoriática ou osteoartrite, mas não em tecidos de articulações normais. A IL-17 pode ter efeito sinérgico com as citocinas pré-inflamatórias derivadas de monócitos, IL-1 $\beta$  ou TNF- $\alpha$ , para induzir IL-6 e GM-CSF. Ao actuar directamente sobre sinoviócitos, a IL-17 pode aumentar a secreção de citocinas pró-inflamatórias *in vivo* e assim exacerbar a inflamação e destruição da articulação.

Para adicionalmente entender o possível papel da IL-17, os Requerentes testaram os efeitos de IL-17 sobre o metabolismo da matriz da cartilagem. À luz dos efeitos catabólicos conhecidos do óxido nítrico (NO) sobre a cartilagem, e da existência de elevados níveis de NO em articulações artríticas, mediu-se também a produção de NO.

### **Métodos:**

Explantes de Cartilagem Articular: A articulação metacarpofalângica de um porco fêmea de 4-6 meses de idade foi dissecada assepticamente, e a cartilagem articular é removida por laminação manual de maneira cuidadosa de modo a evitar o osso subjacente. A cartilagem foi triturada e cultivada *in vitro* durante pelo menos 24 horas numa atmosfera humidificada de 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> em meio isento de soro (SF) (DME/F12 1:1) com 0,1% de BSA e antibióticos. Após lavagem, três vezes, dividiu-se a cartilagem articular em alíquotas de aproximadamente 80 mg em tubos micrónicos e incubou-se durante pelo menos 24 horas no meio SF anterior. Foram então adicionadas proteínas de teste a 1%, sozinhas ou em combinação

com IL-1 $\alpha$  (10 ng/ml) (SEQ ID NO:25). Recolheu-se o meio e trocou-se em vários pontos de tempo (0, 24, 48, 72 horas) e ensaiou-se quanto ao teor de proteoglicano utilizando o ensaio colorimétrico com azul de 1,9-dimetilmetileno (DMB) descrito em Farnham e Buttle, Biochem. Biophys. Acta 883: 173-177 (1985). Após marcação (durante a noite) com  $^{35}\text{S}$ -enxofre, pesaram-se os tubos para determinar a quantidade de tecido. Após digestão durante uma noite, determinou-se a quantidade de proteoglicano restante no tecido assim como a síntese de proteoglicano (incorporação de  $^{35}\text{S}$ ).

Medição da produção de NO: O ensaio é baseado no princípio de que o 2,3-diaminonaftaleno (DAN) reage com nitrito sob condições ácidas para formar 1-(H)-naftotriazole, um produto fluorescente. Como o NO é rapidamente metabolizado em nitrito ( $\text{NO}_2^{-1}$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^{-1}$ ), a detecção de nitrito constitui um meio de detecção (apesar de subvalorizado) do NO realmente produzido. Adicionam-se 10  $\mu\text{L}$  de DAN (0,05 mg. mL em HCl 0,62M) a 100  $\mu\text{L}$  de amostra (sobrenadante de cultura celular), mistura-se e incuba-se à temperatura ambiente durante 10-20 minutos. A reacção é terminada com 5 mL de NaOH 2,8N. A formação de 2,3-diaminonaftotriazole foi medida utilizando um leitor de placas fluorescentes Cytoflor com excitação a 360 nm e leitura de emissão a 450 nm. Para uma medição óptima da intensidade de fluorescência, utilizaram-se placas pretas com fundos transparente.

### **Resultados e Discussão:**

Observou-se que a IL-17 (SEQ ID NO:11) aumenta a libertação, e diminui a síntese de proteoglicanos (Figura 13). Adicionalmente, este efeito foi aditivo ao efeito observado a partir de IL-1 $\alpha$ . (Figura 13) (SEQ ID NO:25). Os efeitos da IL-17 não se limitam à produção de óxido nítrico, nem a inibição da libertação de óxido nítrico aumenta a quebra da matriz. UNQ561 (SEQ ID NO:3) aumenta a quebra da matriz e inibe a síntese da matriz. Assim, a expressão de PRO1122 está provavelmente associada a desordens cartilaginosas degenerativas. Por outro lado, UNQ516 (SEQ ID NO:1) aumenta a síntese de matriz e inibe a libertação de óxido nítrico por explantes de cartilagem articular.

Em conclusão, a IL-17 contribui provavelmente para a perda de cartilagem articular em articulações artríticas, e assim a inibição da sua actividade poderá limitar a inflamação e a destruição da cartilagem. A IL-1 e a IL-17 têm actividades similares ainda que distintas, devido à sua utilização de diferentes receptores e mecanismos de sinalização a montante sobrepostos.

Dadas as constatações dos potentes efeitos catabólicos da IL-17 sobre explantes de cartilagem articular e a homologia de UNQ516 e UNQ561 relativamente a IL-17, antagonistas de qualquer uma ou todas estas proteínas podem ser úteis para o tratamento de condições inflamatórias e defeitos da cartilagem tais como artrite. Contudo, a nossa constatação de que UNQ 516 inibe a produção de NO e aumenta a síntese de matriz, sugere que esta proteína e os seus agonistas podem ter efeitos benéficos na articulação e podem assim, em si e de si, ser úteis para o tratamento das desordens atrás mencionadas.

Finalmente, é bem conhecido que os factores de crescimento podem ter efeitos bifásicos e que o tecido doente pode responder de forma diferente do tecido normal a um determinado factor *in vivo*. Por estas razões, antagonistas ou agonistas (e.g., as próprias proteínas) de UNQ 561 podem ser úteis para o tratamento de condições inflamatórias e desordens articulares tais como artrite.

### **Depósito de Material**

Os seguintes materiais foram depositados na American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA USA 20110-2209 (ATCC):

| Material        | N.º Dep. ATCC | Data do Depósito       |
|-----------------|---------------|------------------------|
| DNA59294-1381   | 209866        | 14 de Maio de 1998     |
| DNA62377-1381-1 | 203552        | 22 de Dezembro de 1998 |

Este depósito foi realizado segundo as disposições do Tratado de Budapeste para o Reconhecimento Internacional do Depósito de Microorganismos para Efeitos do Procedimentos em Matéria de Patentes e seus Regulamentos (Tratado de Budapeste). Isto assegura a manutenção de uma cultura viável

do depósito durante 30 anos desde a data do depósito. O depósito será disponibilizado pela ATCC segundo os termos do Tratado de Budapeste, e sujeito a um acordo entre a Genentech, Inc. e a ATCC, que assegura a disponibilidade permanente e sem restrições da progénie da cultura do depósito ao público após a publicação da patente U.S. pertinente ou após disponíveis ao público qualquer pedido de patente U.S. ou estrangeira, aquele que primeiro acontecer, e assegura a disponibilidade da progénie a quem determinado pelo U.S. Commissioner of Patents and Trademarks estar para isso qualificado de acordo com 35 USC § 122 e as regras do Commissioner correspondentes (incluindo 37 CFR § 1.14 com particular referência para 886 OG 638).

A cessionária do presente pedido de patente concordou que se uma cultura dos materiais depositados vier a morrer ou se perder ou for destruída quando cultivada sob condições adequadas, os materiais serão prontamente substituídos após notificação por outros iguais. A disponibilidade do material depositado não deve ser entendida como uma licença para a prática da invenção em contravenção dos direitos concedidos pela autoridade de qualquer governo de acordo com as suas leis sobre patentes.

A descrição escrita anterior é considerada suficiente para permitir que um perito na especialidade ponha em prática a invenção. A presente invenção não deve ser limitada em âmbito pela construção depositada, pois a concretização depositada pretende ser uma mera ilustração de certos aspectos da. O depósito de material não constitui uma admissão de que a presente descrição escrita é inadequada para permitir a prática de qualquer aspecto da invenção, incluindo o seu melhor modo, nem deve ser entendido como limitante do âmbito das reivindicações às ilustrações específicas que representa.

**Listagem de Sequências**

<110> Jian Chen,  
 Ellen Filvaroff,  
 Audrey Goddard,  
 Austin Gurney,  
 Hanzhong Li,  
 William I.Wood,

<120> POLIPÉPTIDOS HOMÓLOGOS DE IL-17 E UTILIZAÇÕES TERAPÊUTICAS

<130> P1381-R1

<141> 1999-05-14

<150> US 60/085,579

<151> 1998-05-15

<150> US 60/113,621

<151> 1998-12-23

<160> 26

<210> 1

<211> 180

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asn | His | Asp | Pro | Ser | Arg | Ile | Pro | Val | Asp | Leu | Pro | Glu | Ala | Arg |
|     |     |     | 110 |     |     |     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |
| Cys | Leu | Cys | Leu | Gly | Cys | Val | Asn | Pro | Phe | Thr | Met | Gln | Glu | Asp |
|     |     |     | 125 |     |     |     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |
| Arg | Ser | Met | Val | Ser | Val | Pro | Val | Phe | Ser | Gln | Val | Pro | Val | Arg |
|     |     |     | 140 |     |     |     |     |     | 145 |     |     |     |     | 150 |
| Arg | Arg | Leu | Cys | Pro | Pro | Pro | Pro | Arg | Thr | Gly | Pro | Cys | Arg | Gln |
|     |     |     | 155 |     |     |     |     |     | 160 |     |     |     |     | 165 |
| Arg | Ala | Val | Met | Glu | Thr | Ile | Ala | Val | Gly | Cys | Thr | Cys | Ile | Phe |
|     |     |     | 170 |     |     |     |     |     | 175 |     |     |     |     | 180 |

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 687

&lt;212&gt; ADN

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 2

```

aggcgggcag cagctgcagg ctgaccttgc agcttggcgg aatggactgg 50
cctcacaacc tgctgtttct tcttaccatt tccatcttcc tggggctggg 100
ccagcccagg agcccaaaa gcaagaggaa ggggcaaggg cggcctgggc 150
ccctggcccc tggccctcac caggtgccac tggacctggt gtcacggatg 200
aaaccgtatg cccgcatgga ggagtatgag aggaacatcg aggagatggt 250
ggcccagctg aggaacagct cagagctggc ccagagaaag tgtgaggtca 300
acttgcagct gtggatgtcc aacaagagga gcctgtctcc ctggggctac 350
agcatcaacc acgacccag cegtatcccc gtggacctgc cggaggcacg 400
gtgcctgtgt ctgggctgtg tgaaccctt caccatgcag gaggaccgca 450
gcatggtgag cgtgccggtg ttcagccagg ttctgtgcg ccgccgcctc 500
tgcccgcac cgcccgcac agggccttgc cgccagcgcg cagtcatgga 550
gaccatcgct gtgggctgca cctgcatctt ctgaatcacc tggcccagaa 600
gccaggccag cagcccagaa ccctctcct tgcaccttg tgccaagaaa 650
ggcctatgaa aagtaaacac tgacttttga aagcaag 687

```

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 197

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 3

```

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

Ser Val
 197

```

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 1047

&lt;212&gt; ADN

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 4

g ccagggtgtg caggccgctc caagcccagc ctgccccgct gccgccacca 50  
tgacgctcct ccccggcctc ctgtttctga cctgggtgca cacatgcctg 100  
gccaccatg acccctccct cagggggcac cccacagtc acggtacccc 150  
aactgctac tcgggtgagg aactgcccct cggccaggcc cccccacacc 200  
tgctggctcg aggtgccaag tgggggcagg ctttgctgt agccctggtg 250  
tccagcctgg aggcagcaag ccacaggggg aggcacgaga ggccctcagc 300  
tacgaccag tgcccggtgc tgcgccgga ggagggtgtg gaggcagaca 350  
cccaccagc ctccatctca ccctggagat accgtgtgga cacggatgag 400  
gaccgctatc cacagaagct ggccttcgcc gagtgcctgt gcagaggctg 450  
tatcgatgca cggacggggc gcgagacagc tgcgctcaac tccgtgcggc 500  
tgctccagag cctgctggtg ctgcgccgcc ggccctgctc ccgcgacggc 550  
tcggggctcc ccacacctgg ggcctttgcc ttccacaccg agttcatcca 600  
cgtecccgctc ggctgcacct gcgtgctgcc ccgttcagtg tgaccgccga 650  
ggcgtgggg cccctagact ggacacgtgt gctccccaga gggcaccccc 700  
tatttatgtg tatttattgt tatttatatg cttcccccaa cactaccctt 750  
ggggtctggg cattccccgt gtctggagga cagccccca ctgttctcct 800  
catctccagc ctcagtagtt gggggtagaa ggagctcagc acctcttcca 850  
gcccttaaag ctgcagaaaa ggtgtcacac ggctgcctgt accttggtc 900  
cctgtcctgc tcccggcttc ccttacccta tcaactggcct caggccccgc 950  
aggtgcctc ttcccaacct ccttgaagt acccctgttt cttaaacaat 1000  
tatttaagtg tacgtgtatt attaaactga tgaacacatc ccaaaaa 1047

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 830

&lt;212&gt; ADN

<213> *Homo sapiens*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; desconhecida

&lt;222&gt; 105-115

&lt;223&gt; base desconhecida

&lt;400&gt; 5

ggcagcaggg accaagagag gcacgcttgc ccttttatga catcagagct 50  
cctgggttctt gctccttggg actctgggac ttacaccagt ggcacccctg 100  
gctcnnnnnn nnnnaattc ggtacgaggg tggggttcag gcgggcagca 150  
gctgcaggct gaccttgcag cttggcgga tggactggcc tcacaacctg 200  
ctgtttcttc ttaccatttc catcttcctg gggctgggcc agcccaggag 250  
cccaaaaagc aagaggaagg ggcaagggcg gcctggggcc ctggtccttg 300  
gcccacacca ggtgccactg gacctggtgt cacggatgaa accgtatgcc 350  
cgcatggagg agtatgagag gaacatcgag gagatgttgg ccagctgag 400  
gaacagtcca gagctggccc agagaaagtg tgaggtcaac ttgcagctgt 450  
ggatgtccaa caagaggagc ctgtctccct ggggctacag catcaaccac 500  
gaccccagcc gtatccccgt ggacctccgg aggcacggtg cctgtgtctg 550  
ggcttgtgtg aacccttcca ccatgcagga ggaccgcagc atggtgagcg 600  
tgccggtgtt cagccaggtt cctgtgcgcc gccgcctctg cccgccaccg 650  
ccccgcacag ggccttgccg ccagcgcgca gtcatggaga ccatcgctgt 700  
gggctgcacc tgcattctct gaatcgacct ggcccagaag ccaggccagc 750  
agcccagagc catcctcctt gcaccttctg gccaaagaa gacctatgaaa 800  
agtaaact gacttttgaa agcaaaaaaa 830

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 397

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; desconhecida

&lt;222&gt; 10, 150, 267

&lt;223&gt; base desconhecida

&lt;400&gt; 6

aggcgggcan agctgcaggc tgaccttgca gcttggcgga atggactggc 50  
ctcacaaect gctgtttctt cttaccattt ccatcttcct ggggttgggc 100  
agccaggagc cccaaaagca agaggaaggg gcaagggcgg cctgggccc 150  
tggcctggcc tcaccagggtg cactggacc tgggtgtcacg gatgaaaccg 200  
tatgcccgc tggaggagta tgagaggaac atcgaggaga tgggtggcca 250  
gctgaggaac agctcanaag ctggcccaga gaaagtgtga ggtcaacttg 300  
cagctgtgga tgtccaaca gaaggagcct gtctcccttg gggctacaag 350  
catcaaccac cgacccagc cgtatccccg tgggaccttg ccgggac 397

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 230

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Artificial

&lt;400&gt; 7

cacggatgag gaccgtatc cacagaagct ggccttcgcc gagtgctgt 50  
gcagaggctg tatcgatgca cggacgggcc gcgagacagc tgcgtcaac 100  
tcggtgcggc tgctccagag cctgctggtg ctgcgccgcc ggccctgtc 150  
ccgcgacggc tcggggctcc ccacacctgg ggcctttgcc ttccacaccg 200  
agttcatcca cgtecccgtc ggtgcacct 230

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Sequência artificial

&lt;400&gt; 8

atccacagaa gctggccttc gccg 24

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Sequência artificial

&lt;400&gt; 9

gggacgtgga tgaactcggg gtgg 24

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Sequência artificial

&lt;400&gt; 10

tatccacaga agctggcctt cgccgagtgc ctgtgcagag 40

<210> 11  
 <211> 155  
 <212> PRT  
 <213> Humana

<400> 11

```

Met Thr Pro Gly Lys Thr Ser Leu Val Ser Leu Leu Leu Leu Leu
 1          5          10          15

Ser Leu Glu Ala Ile Val Lys Ala Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn
          20          25          30

Pro Gly Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys Asn Phe Pro Arg Thr Val
          35          40          45

Met Val Asn Leu Asn Ile His Asn Arg Asn Thr Asn Thr Asn Pro
          50          55          60

Lys Arg Ser Ser Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr Ser Pro Trp Asn
          65          70          75

Leu His Arg Asn Glu Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser Val Ile Trp
          80          85          90

Glu Ala Lys Cys Arg His Leu Gly Cys Ile Asn Ala Asp Gly Asn
          95          100          105

Val Asp Tyr His Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile Leu
          110          115          120

Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu
          125          130          135

Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Ile
          140          145          150

Val His His Val Ala
          155

```

<210> 12  
 <211> 408  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Sequência artificial 1-408

&lt;400&gt; 12

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Met | Asp | Trp | Pro | His | Asn | Leu | Leu | Phe | Leu | Leu | Thr | Ile | Ser | Ile |  |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |  |
| Phe | Leu | Gly | Leu | Gly | Gln | Pro | Arg | Ser | Pro | Lys | Ser | Lys | Arg | Lys |  |
|     |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |  |
| Gly | Gln | Gly | Arg | Pro | Gly | Pro | Leu | Ala | Pro | Gly | Pro | His | Gln | Val |  |
|     |     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |  |
| Pro | Leu | Asp | Leu | Val | Ser | Arg | Met | Lys | Pro | Tyr | Ala | Arg | Met | Glu |  |
|     |     |     |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |  |
| Glu | Tyr | Glu | Arg | Asn | Ile | Glu | Glu | Met | Val | Ala | Gln | Leu | Arg | Asn |  |
|     |     |     |     | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |  |
| Ser | Ser | Glu | Leu | Ala | Gln | Arg | Lys | Cys | Glu | Val | Asn | Leu | Gln | Leu |  |
|     |     |     |     | 80  |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |  |
| Trp | Met | Ser | Asn | Lys | Arg | Ser | Leu | Ser | Pro | Trp | Gly | Tyr | Ser | Ile |  |
|     |     |     |     | 95  |     |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |  |
| Asn | His | Asp | Pro | Ser | Arg | Ile | Pro | Val | Asp | Leu | Pro | Glu | Ala | Arg |  |
|     |     |     |     | 110 |     |     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |  |
| Cys | Leu | Cys | Leu | Gly | Cys | Val | Asn | Pro | Phe | Thr | Met | Gln | Glu | Asp |  |
|     |     |     |     | 125 |     |     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |  |
| Arg | Ser | Met | Val | Ser | Val | Pro | Val | Phe | Ser | Gln | Val | Pro | Val | Arg |  |
|     |     |     |     | 140 |     |     |     |     | 145 |     |     |     |     | 150 |  |
| Arg | Arg | Leu | Cys | Pro | Pro | Pro | Pro | Arg | Thr | Gly | Pro | Cys | Arg | Gln |  |
|     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |     |     |     |     | 165 |  |
| Arg | Ala | Val | Met | Glu | Thr | Ile | Ala | Val | Gly | Cys | Thr | Cys | Ile | Phe |  |
|     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |     |     |     | 180 |  |
| Pro | Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu |  |
|     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |     |     | 195 |  |
| Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp |  |
|     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |     | 210 |  |
| Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val |  |
|     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     | 225 |  |

|                                                             |     |     |     |
|-------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val | 230 | 235 | 240 |
| Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu | 245 | 250 | 255 |
| Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu | 260 | 265 | 270 |
| His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser | 275 | 280 | 285 |
| Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala | 290 | 295 | 300 |
| Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser | 305 | 310 | 315 |
| Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val | 320 | 325 | 330 |
| Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn | 335 | 340 | 345 |
| Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp | 350 | 355 | 360 |
| Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys | 365 | 370 | 375 |
| Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His | 380 | 385 | 390 |
| Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser | 395 | 400 | 405 |
| Pro Gly Lys                                                 | 408 |     |     |

<210> 13  
 <211> 425  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Sequência artificial 1-425

&lt;400&gt; 13

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| Met | Thr | Leu | Leu | Pro | Gly | Leu | Leu | Phe | Leu | Thr | Trp | Leu | His | Thr | 1   | 5   | 10  | 15 |
| Cys | Leu | Ala | His | His | Asp | Pro | Ser | Leu | Arg | Gly | His | Pro | His | Ser | 20  | 25  | 30  |    |
| His | Gly | Thr | Pro | His | Cys | Tyr | Ser | Ala | Glu | Glu | Leu | Pro | Leu | Gly | 35  | 40  | 45  |    |
| Gln | Ala | Pro | Pro | His | Leu | Leu | Ala | Arg | Gly | Ala | Lys | Trp | Gly | Gln | 50  | 55  | 60  |    |
| Ala | Leu | Pro | Val | Ala | Leu | Val | Ser | Ser | Leu | Glu | Ala | Ala | Ser | His | 65  | 70  | 75  |    |
| Arg | Gly | Arg | His | Glu | Arg | Pro | Ser | Ala | Thr | Thr | Gln | Cys | Pro | Val | 80  | 85  | 90  |    |
| Leu | Arg | Pro | Glu | Glu | Val | Leu | Glu | Ala | Asp | Thr | His | Gln | Arg | Ser | 95  | 100 | 105 |    |
| Ile | Ser | Pro | Trp | Arg | Tyr | Arg | Val | Asp | Thr | Asp | Glu | Asp | Arg | Tyr | 110 | 115 | 120 |    |
| Pro | Gln | Lys | Leu | Ala | Phe | Ala | Glu | Cys | Leu | Cys | Arg | Gly | Cys | Ile | 125 | 130 | 135 |    |
| Asp | Ala | Arg | Thr | Gly | Arg | Glu | Thr | Ala | Ala | Leu | Asn | Ser | Val | Arg | 140 | 145 | 150 |    |
| Leu | Leu | Gln | Ser | Leu | Leu | Val | Leu | Arg | Arg | Arg | Pro | Cys | Ser | Arg | 155 | 160 | 165 |    |
| Asp | Gly | Ser | Gly | Leu | Pro | Thr | Pro | Gly | Ala | Phe | Ala | Phe | His | Thr | 170 | 175 | 180 |    |
| Glu | Phe | Ile | His | Val | Pro | Val | Gly | Cys | Thr | Cys | Val | Leu | Pro | Arg | 185 | 190 | 195 |    |
| Ser | Val | Pro | Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | 200 | 205 | 210 |    |
| Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | 215 | 220 | 225 |    |
| Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | 230 | 235 | 240 |    |
| Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | 245 | 250 | 255 |    |

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg  
 260 265 270  
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
 275 280 285  
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
 290 295 300  
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 305 310 315  
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 320 325 330  
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 335 340 345  
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
 350 355 360  
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 365 370 375  
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 380 385 390  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
 395 400 405  
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 410 415 420  
 Leu Ser Pro Gly Lys  
 425

<210> 14  
 <211> 212  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 14  
 Met Asn Ser Phe Ser Thr Ser Ala Phe Gly Pro Val Ala Phe Ser  
 1 5 10 15  
 Leu Gly Leu Leu Leu Val Leu Pro Ala Ala Phe Pro Ala Pro Val  
 20 25 30

```

Pro Pro Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln
      35                      40                      45

Pro Leu Thr Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile
      50                      55                      60

Leu Asp Gly Ile Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser
      65                      70                      75
-

Asn Met Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu
      80                      85                      90

Asn Leu Pro Lys Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly
      95                      100                     105

Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu
      110                     115                     120

Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser
      125                     130                     135

Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln Met Ser Thr Lys Val Leu
      140                     145                     150

Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr
      155                     160                     165

Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu Thr Lys Leu Gln
      170                     175                     180

Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His Leu Ile Leu
      185                     190                     195

Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala Leu Arg
      200                     205                     210

Gln Met
      212

```

<210> 15  
 <211> 320  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 15  
 Met Gly Ala Ala Arg Ser Pro Pro Ser Ala Val Pro Gly Pro Leu  
   1                  5                  10                  15  
 Leu Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Val Leu Ala Pro Gly Gly  
                   20                  25                  30

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Asn | Leu | Lys | Gly | Cys | Cys | Arg | His | Gln | Val | Gln | Ile | Gln | Pro |
|     |     |     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Phe | Phe | Ser | Ser | Cys | Leu | Asn | Asp | Cys | Leu | Arg | His | Ser | Ala | Thr |
|     |     |     |     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Val | Ser | Cys | Pro | Glu | Met | Pro | Asp | Thr | Pro | Glu | Pro | Ile | Pro | Asp |
|     |     |     |     | 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Tyr | Met | Pro | Leu | Trp |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     | 320 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 16  
 <211> 543  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 16  
 atggactggc ctcacaacct gctgtttctt cttaccattt ccatcttcct 50  
 ggggctgggc cagcccagga gcccacaaag caagaggaag gggcaagggc 100  
 ggccctgggcc cctggcccct ggccctcacc aggtgccact ggacctggtg 150  
 tcacggatga aaccgtatgc ccgcatggag gagtatgaga ggaacatcga 200  
 ggagatggtg gccagctga ggaacagctc agagctggcc cagagaaagt 250  
 gtgaggtcaa cttgcagctg tggatgtcca acaagaggag cctgtctccc 300  
 tggggctaca gcatcaacca cgacccagc cgtatccccg tggacctgcc 350  
 ggaggcacgg tgcctgtgtc tgggctgtgt gaaccccttc accatgcagg 400  
 aggaccgcag catggtgagc gtgccggtgt tcagccaggt tcctgtgcgc 450  
 cgccgcctct gcccgcacc gcccgcaca gggccttgcc gccagcgcgc 500  
 agtcatggag accatcgtg tgggctgcac ctgcatcttc tga 543

<210> 17  
 <211> 594  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 17  
 atgaagctcc tccccggcct cctgtttctg acctggctgc acacatgcct 50  
 ggcccaccat gacccctccc tcagggggca ccccacagt cacggtaccc 100

cacactgcta ctcggtgag gaactgcccc tcggccaggc cccccacac 150  
 ctgctggctc gaggtgccaa gtgggggcag gctttgctg tagccctggt 200  
 gtccagcctg gaggcagcaa gccacagggg gaggcacgag aggccctcag 250  
 ctacgaccca gtgcccgtg ctgcgggcgg aggaggtgtt ggaggcagac 300  
 acccaccagc gctccatctc accctggaga taccgtgtgg acacggatga 350  
 ggaccgctat ccacagaagc tggccttcgc cgagtgcctg tgcagaggct 400  
 gtatcgatgc acggacgggc cgcgagacag ctgcgctcaa ctccgtgcgg 450  
 ctgctccaga gctgctggt gctgcgccgc cggccctgct cccgcgacgg 500  
 ctcggggctc cccacacctg gggcctttgc cttccacacc gagttcatcc 550  
 acgtccccgt cggctgcacc tgcgtgctgc cccgttcagt gtga 594

<210> 18  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Sequência artificial 1-9

<400> 18  
 Gly His His His His His His His His  
 1 5 9

<210> 19  
 <211> 157  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 19  
 Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His  
 1 5 10 15  
 Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn  
 20 25 30  
 Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp  
 35 40 45  
 Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser  
 50 55 60

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Val | Leu | Phe | Lys | Gly | Gln | Gly | Cys | Pro | Ser | Thr | His | Val | Leu |
|     |     |     |     | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |
| Leu | Thr | His | Thr | Ile | Ser | Arg | Ile | Ala | Val | Ser | Tyr | Gln | Thr | Lys |
|     |     |     |     | 80  |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |
| Val | Asn | Leu | Leu | Ser | Ala | Ile | Lys | Ser | Pro | Cys | Gln | Arg | Glu | Thr |
|     |     |     |     | 95  |     |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |
| Pro | Glu | Gly | Ala | Glu | Ala | Lys | Pro | Trp | Tyr | Glu | Pro | Ile | Tyr | Leu |
|     |     |     |     | 110 |     |     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |
| Gly | Gly | Val | Phe | Gln | Leu | Glu | Lys | Gly | Asp | Arg | Leu | Ser | Ala | Glu |
|     |     |     |     | 125 |     |     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |
| Ile | Asn | Arg | Pro | Asp | Tyr | Leu | Asp | Phe | Ala | Glu | Ser | Gly | Gln | Val |
|     |     |     |     | 140 |     |     |     |     | 145 |     |     |     |     | 150 |
| Tyr | Phe | Gly | Ile | Ile | Ala | Leu |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     | 155 |     | 157 |     |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 20  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Sequência artificial 1-21

<400> 20  
**ctgtacctcg aggggtgcaga g 21**

<210> 21  
 <211> 58  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Sequência artificial 1-58

<400> 21  
**cccaagcttg ggtcaatgat gatgatgatg atgatgatgc cacaggggca 50**  
**tgtagtcc 58**

<210> 22  
 <211> 328  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 22

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| Met | Gly | Ala | Ala | Arg | Ser | Pro | Pro | Ser | Ala | Val | Pro | Gly | Pro | Leu | 1   | 5   | 10  | 15 |
| Leu | Gly | Leu | Leu | Leu | Leu | Leu | Leu | Gly | Val | Leu | Ala | Pro | Gly | Gly | 20  | 25  | 30  |    |
| Ala | Ser | Leu | Arg | Leu | Leu | Asp | His | Arg | Ala | Leu | Val | Cys | Ser | Gln | 35  | 40  | 45  |    |
| Pro | Gly | Leu | Asn | Cys | Thr | Val | Lys | Asn | Ser | Thr | Cys | Leu | Asp | Asp | 50  | 55  | 60  |    |
| Ser | Trp | Ile | His | Pro | Arg | Asn | Leu | Thr | Pro | Ser | Ser | Pro | Lys | Asp | 65  | 70  | 75  |    |
| Leu | Gln | Ile | Gln | Leu | His | Phe | Ala | His | Thr | Gln | Gln | Gly | Asp | Leu | 80  | 85  | 90  |    |
| Phe | Pro | Val | Ala | His | Ile | Glu | Trp | Thr | Leu | Gln | Thr | Asp | Ala | Ser | 95  | 100 | 105 |    |
| Ile | Leu | Tyr | Leu | Glu | Gly | Ala | Glu | Leu | Ser | Val | Leu | Gln | Leu | Asn | 110 | 115 | 120 |    |
| Thr | Asn | Glu | Arg | Leu | Cys | Val | Arg | Phe | Glu | Phe | Leu | Ser | Lys | Leu | 125 | 130 | 135 |    |
| Arg | His | His | His | Arg | Arg | Trp | Arg | Phe | Thr | Phe | Ser | His | Phe | Val | 140 | 145 | 150 |    |
| Val | Asp | Pro | Asp | Gln | Glu | Tyr | Glu | Val | Thr | Val | His | His | Leu | Pro | 155 | 160 | 165 |    |
| Lys | Pro | Ile | Pro | Asp | Gly | Asp | Pro | Asn | His | Gln | Ser | Lys | Asn | Phe | 170 | 175 | 180 |    |
| Leu | Val | Pro | Asp | Cys | Glu | His | Ala | Arg | Met | Lys | Val | Thr | Thr | Pro | 185 | 190 | 195 |    |
| Cys | Met | Ser | Ser | Gly | Ser | Leu | Trp | Asp | Pro | Asn | Ile | Thr | Val | Glu | 200 | 205 | 210 |    |
| Thr | Leu | Glu | Ala | His | Gln | Leu | Arg | Val | Ser | Phe | Thr | Leu | Trp | Asn | 215 | 220 | 225 |    |
| Glu | Ser | Thr | His | Tyr | Gln | Ile | Leu | Leu | Thr | Ser | Phe | Pro | His | Met | 230 | 235 | 240 |    |

|                                                             |     |     |     |
|-------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| Glu Asn His Ser Cys Phe Glu His Met His His Ile Pro Ala Pro | 245 | 250 | 255 |
| Arg Pro Glu Glu Phe His Gln Arg Ser Asn Val Thr Leu Thr Leu | 260 | 265 | 270 |
| Arg Asn Leu Lys Gly Cys Cys Arg His Gln Val Gln Ile Gln Pro | 275 | 280 | 285 |
| Phe Phe Ser Ser Cys Leu Asn Asp Cys Leu Arg His Ser Ala Thr | 290 | 295 | 300 |
| Val Ser Cys Pro Glu Met Pro Asp Thr Pro Glu Pro Ile Pro Asp | 305 | 310 | 315 |
| Tyr Met Pro Leu Trp His His His His His His His His         | 320 | 325 | 328 |

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 175

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Sequência artificial 1-175

&lt;400&gt; 23

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Arg | Ser | Met | Val | Ser | Val | Pro | Val | Phe | Ser | Gln | Val | Pro | Val |
|     |     |     | 125 |     |     |     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Arg | Arg | Leu | Cys | Pro | Pro | Pro | Pro | Arg | Thr | Gly | Pro | Cys | Arg |
|     |     |     | 140 |     |     |     |     |     | 145 |     |     |     |     | 150 |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Arg | Ala | Val | Met | Glu | Thr | Ile | Ala | Val | Gly | Cys | Thr | Cys | Ile |
|     |     |     | 155 |     |     |     |     |     | 160 |     |     |     |     | 165 |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Gly | His | His | His | His | His | His | His | His | His | His | His | His | His |
|     |     |     | 170 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 175 |

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 206

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Sequência artificial 1-206

&lt;400&gt; 24

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Thr | Leu | Leu | Pro | Gly | Leu | Leu | Phe | Leu | Thr | Trp | Leu | His | Thr |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cys | Leu | Ala | His | His | Asp | Pro | Ser | Leu | Arg | Gly | His | Pro | His | Ser |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| His | Gly | Thr | Pro | His | Cys | Tyr | Ser | Ala | Glu | Glu | Leu | Pro | Leu | Gly |
|     |     |     | 35  |     |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Ala | Pro | Pro | His | Leu | Leu | Ala | Arg | Gly | Ala | Lys | Trp | Gly | Gln |
|     |     |     | 50  |     |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Leu | Pro | Val | Ala | Leu | Val | Ser | Ser | Leu | Glu | Ala | Ala | Ser | His |
|     |     |     | 65  |     |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Gly | Arg | His | Glu | Arg | Pro | Ser | Ala | Thr | Thr | Gln | Cys | Pro | Val |
|     |     |     | 80  |     |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Arg | Pro | Glu | Glu | Val | Leu | Glu | Ala | Asp | Thr | His | Gln | Arg | Ser |
|     |     |     | 95  |     |     |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ile | Ser | Pro | Trp | Arg | Tyr | Arg | Val | Asp | Thr | Asp | Glu | Asp | Arg | Tyr |
|     |     |     | 110 |     |     |     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Pro | Gln | Lys | Leu | Ala | Phe | Ala | Glu | Cys | Leu | Cys | Arg | Gly | Cys | Ile |
|     |     |     | 125 |     |     |     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Asp | Ala | Arg | Thr | Gly | Arg | Glu | Thr | Ala | Ala | Leu | Asn | Ser | Val | Arg |  |
|     |     |     |     | 140 |     |     |     |     | 145 |     |     |     |     | 150 |  |
| Leu | Leu | Gln | Ser | Leu | Leu | Val | Leu | Arg | Arg | Arg | Pro | Cys | Ser | Arg |  |
|     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |     |     |     |     | 165 |  |
| Asp | Gly | Ser | Gly | Leu | Pro | Thr | Pro | Gly | Ala | Phe | Ala | Phe | His | Thr |  |
|     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |     |     |     | 180 |  |
| Glu | Phe | Ile | His | Val | Pro | Val | Gly | Cys | Thr | Cys | Val | Leu | Pro | Arg |  |
|     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |     |     | 195 |  |
| Ser | Val | Gly | His | His | His | His | His | His | His | His |     |     |     |     |  |
|     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 | 206 |     |     |     |     |  |

<210> 25  
 <211> 271  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 25

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Met | Ala | Lys | Val | Pro | Asp | Met | Phe | Glu | Asp | Leu | Lys | Asn | Cys | Tyr |  |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |  |
| Ser | Glu | Asn | Glu | Glu | Asp | Ser | Ser | Ser | Ile | Asp | His | Leu | Ser | Leu |  |
|     |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |  |
| Asn | Gln | Lys | Ser | Phe | Tyr | His | Val | Ser | Tyr | Gly | Pro | Leu | His | Glu |  |
|     |     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |  |
| Gly | Cys | Met | Asp | Gln | Ser | Val | Ser | Leu | Ser | Ile | Ser | Glu | Thr | Ser |  |
|     |     |     |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |  |
| Lys | Thr | Ser | Lys | Leu | Thr | Phe | Lys | Glu | Ser | Met | Val | Val | Val | Ala |  |
|     |     |     |     | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |  |
| Thr | Asn | Gly | Lys | Val | Leu | Lys | Lys | Arg | Arg | Leu | Ser | Leu | Ser | Gln |  |
|     |     |     |     | 80  |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |  |
| Ser | Ile | Thr | Asp | Asp | Asp | Leu | Glu | Ala | Ile | Ala | Asn | Asp | Ser | Glu |  |
|     |     |     |     | 95  |     |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |  |
| Glu | Glu | Ile | Ile | Lys | Pro | Arg | Ser | Ala | Pro | Phe | Ser | Phe | Leu | Ser |  |
|     |     |     |     | 110 |     |     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |  |
| Asn | Val | Lys | Tyr | Asn | Phe | Met | Arg | Ile | Ile | Lys | Tyr | Glu | Phe | Ile |  |
|     |     |     |     | 125 |     |     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |  |
| Leu | Asn | Asp | Ala | Leu | Asn | Gln | Ser | Ile | Ile | Arg | Ala | Asn | Asp | Gln |  |
|     |     |     |     | 140 |     |     |     |     | 145 |     |     |     |     | 150 |  |

Tyr Leu Thr Ala Ala Ala Leu His Asn Leu Asp Glu Ala Val Lys  
 155 160 165  
 Phe Asp Met Gly Ala Tyr Lys Ser Ser Lys Asp Asp Ala Lys Ile  
 170 175 180  
 Thr Val Ile Leu Arg Ile Ser Lys Thr Gln Leu Tyr Val Thr Ala  
 185 190 195  
 Gln Asp Glu Asp Gln Pro Val Leu Leu Lys Glu Met Pro Glu Ile  
 200 205 210  
 Pro Lys Thr Ile Thr Gly Ser Glu Thr Asn Leu Leu Phe Phe Trp  
 215 220 225  
 Glu Thr His Gly Thr Lys Asn Tyr Phe Thr Ser Val Ala His Pro  
 230 235 240  
 Asn Leu Phe Ile Ala Thr Lys Gln Asp Tyr Trp Val Cys Leu Ala  
 245 250 255  
 Gly Gly Pro Pro Ser Ile Thr Asp Phe Gln Ile Leu Glu Asn Gln  
 260 265 270  
 Ala  
 271

<210> 26  
 <211> 177  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 26  
 Met Glu Ile Cys Arg Gly Leu Arg Ser His Leu Ile Thr Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Phe Leu Phe His Ser Glu Thr Ile Cys Arg Pro Ser Gly Arg  
 20 25 30  
 Lys Ser Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln  
 35 40 45  
 Lys Thr Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala Gly Tyr Leu  
 50 55 60  
 Gln Gly Pro Asn Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val Val Pro  
 65 70 75

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Ile | Glu | Pro | His | Ala | Leu | Phe | Leu | Gly | Ile | His | Gly | Gly | Lys | Met |  |
|     |     |     |     | 80  |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |  |
| Cys | Leu | Ser | Cys | Val | Lys | Ser | Gly | Asp | Glu | Thr | Arg | Leu | Gln | Leu |  |
|     |     |     |     | 95  |     |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |  |
| Glu | Ala | Val | Asn | Ile | Thr | Asp | Leu | Ser | Glu | Asn | Arg | Lys | Gln | Asp |  |
|     |     |     |     | 110 |     |     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |  |
| Lys | Arg | Phe | Ala | Phe | Ile | Arg | Ser | Asp | Ser | Gly | Pro | Thr | Thr | Ser |  |
|     |     |     |     | 125 |     |     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |  |
| Phe | Glu | Ser | Ala | Ala | Cys | Pro | Gly | Trp | Phe | Leu | Cys | Thr | Ala | Met |  |
|     |     |     |     | 140 |     |     |     |     | 145 |     |     |     |     | 150 |  |
| Glu | Ala | Asp | Gln | Pro | Val | Ser | Leu | Thr | Asn | Met | Pro | Asp | Glu | Gly |  |
|     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |     |     |     |     | 165 |  |
| Val | Met | Val | Thr | Leu | Phe | Tyr | Phe | Gln | Glu | Asp | Glu |     |     |     |  |
|     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     | 177 |     |     |     |  |

#### Listagem de Sequências

<110> Genentech, Inc., et al.

<120> POLIPÉPTIDOS HOMÓLOGOS DE IL-17 E SUAS UTILIZAÇÕES TERAPÊUTICAS

<130> P1381-R1-PCT

<140> PCT/US99/10733

<141> 1999-05-14

<150> US 60/085,579

<151> 1998-05-15

<150> US 60/113,621

<151> 1998-12-23

<160> 26

<210> 1

<211> 180

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 1

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

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 687

&lt;212&gt; ADN

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 2

```

aggcgggcag cagctgcagg ctgaccttgc agcttggcgg aatggactgg 50
cctcacaacc tgctgtttct tcttaccatt tccatcttcc tggggctggg 100
ccagcccagg agcccccata gcaagaggaa ggggcaaggg cggcctgggc 150
ccctggcccc tggccctcac caggtgccac tggacctggt gtcacggatg 200
aaaccgtatg ccgcatgga ggagtatgag aggaacatcg aggagatggt 250
ggcccagctg aggaacagct cagagctggc ccagagaaag tgtgaggcca 300
acttgcagct gtggatgtcc aacaagagga gcctgtctcc ctggggctac 350
agcatcaacc acgacccag cgtatcccc gtggacctgc cggaggcacg 400
gtgcctgtgt ctgggctgtg tgaacccctt caccatgcag gaggaccgca 450
gcatggtgag cgtgccggtg ttcagccagg ttctgtgtcg ccgccgcctc 500
tgcccggcac cgccccgcac agggccttgc cgccagcgcg cagtcattga 550
gaccatcgct gtgggctgca cctgcatctt ctgaatcacc tggcccagaa 600
gccaggccag cagcccagaa ccacctctct tgcacctttg tgccaagaaa 650
ggcctatgaa aagtaaaccac tgacttttga aagcaag 687

```

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 197

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 3

```

Met Thr Leu Leu Pro Gly Leu Leu Phe Leu Thr Trp Leu His Thr
  1             5             10             15

Cys Leu Ala His His Asp Pro Ser Leu Arg Gly His Pro His Ser
          20             25             30

His Gly Thr Pro His Cys Tyr Ser Ala Glu Glu Leu Pro Leu Gly
          35             40             45

Gln Ala Pro Pro His Leu Leu Ala Arg Gly Ala Lys Trp Gly Gln

```

|                 |                                             |                         |    |  |     |
|-----------------|---------------------------------------------|-------------------------|----|--|-----|
|                 | 50                                          |                         | 55 |  | 60  |
| Ala Leu Pro Val | Ala Leu Val Ser Ser                         | Leu Glu Ala Ala Ser His |    |  |     |
|                 | 65                                          | 70                      |    |  | 75  |
| Arg Gly Arg His | Glu Arg Pro Ser Ala Thr Thr                 | Gln Cys Pro Val         |    |  |     |
|                 | 80                                          | 85                      |    |  | 90  |
| Leu Arg Pro Glu | Glu Val Leu Glu Ala Asp Thr                 | His Gln Arg Ser         |    |  |     |
|                 | 95                                          | 100                     |    |  | 105 |
| Ile Ser Pro Trp | Arg Tyr Arg Val Asp Thr Asp                 | Glu Asp Arg Tyr         |    |  |     |
|                 | 110                                         | 115                     |    |  | 120 |
| Pro Gln Lys Leu | Ala Phe Ala Glu Cys Leu Cys Arg Gly Cys Ile |                         |    |  |     |
|                 | 125                                         | 130                     |    |  | 135 |
| Asp Ala Arg Thr | Gly Arg Glu Thr Ala Ala Leu Asn Ser Val Arg |                         |    |  |     |
|                 | 140                                         | 145                     |    |  | 150 |
| Leu Leu Gln Ser | Leu Leu Val Leu Arg Arg Arg Pro Cys Ser Arg |                         |    |  |     |
|                 | 155                                         | 160                     |    |  | 165 |
| Asp Gly Ser Gly | Leu Pro Thr Pro Gly Ala Phe Ala Phe His Thr |                         |    |  |     |
|                 | 170                                         | 175                     |    |  | 180 |
| Glu Phe Ile His | Val Pro Val Gly Cys Thr Cys Val Leu Pro Arg |                         |    |  |     |
|                 | 185                                         | 190                     |    |  | 195 |
| Ser Val         |                                             |                         |    |  |     |
|                 | 197                                         |                         |    |  |     |

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 1047

&lt;212&gt; ADN

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 4

```

gccaggtgtg caggccgctc caagcccagc ctgccccgct gccgccacca 50
tgacgtcct ccccgccctc ctgtttctga cctgggtgca cacatgcctg 100
gccaccatg acccctccct cagggggcac cccacagtc acggtacccc 150
acactgctac tcggtgagg aactgcccct cggccaggcc ccccccacacc 200
tgetggctcg aggtgccaag tgggggcagg ctttgctgt agccctggtg 250
tcagcctgg aggcagcaag ccacaggggg aggcacgaga ggccctcagc 300
tacgaccag tgcccgtgc tgcggccgga ggaggtgtg gaggcagaca 350
cccaccagc ctccatctca ccctggagat accgtgtgga caggatgag 400
gaccgtatc cacagaagct ggccttcgcc gagtgcctgt gcagaggctg 450

```

tatcgatgca cggacgggccc gcgagacagc tgcgctcaac tccgtgcggc 500  
 tgctccagag cctgctgggtg ctgcgcccgc ggccctgctc ccgcgacggc 550  
 tcggggctcc ccacacctgg ggcctttgcc ttccacaccg agttcatcca 600  
 cgtccccgtc ggctgcacct gcgtgctgcc ccgttcagtg tgaccgcccga 650  
 ggccgtgggg cccttagact ggacacgtgt gctccccaga gggcaccccc 700  
 tatttatgtg tatttattgt tatttatatg cctcccccaa cactaccctt 750  
 ggggtctggg cattccccgt gtctggagga cagcccccca ctgttctcct 800  
 catctccagc ctcaagtagt gggggtagaa ggagctcagc acctcttcca 850  
 gcccttaaag ctgcagaaaa ggtgtcacac ggctgcctgt accttggtctc 900  
 cctgtcctgc tccccgcttc ccttacccta tcaactggcct caggccccgc 950  
 aggctgcctc tcccacacct ccttgaagt acccctgttt cttaacaat 1000  
 tatttaagtg tacgtgtatt attaaactga tgaacacatc cccaaaa 1047

<210> 5  
 <211> 830  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <221> desconhecida  
 <222> 105-115  
 <223> base desconhecida

<400> 5  
 ggacgaggg accaagagag gcacgcttc ccttttatga catcagagct 50  
 cctgggtctt gtccttggg actctgggac ttacaccagt ggcacccctg 100  
 gctcnnnnn nnnnnaattc ggtacgagc tggggttcag gcgggcagca 150  
 gctgcaggct gaccttcag cttggcggaa tggactggcc tcacaacctg 200  
 ctgtttcttc ttaccatttc catcttctg gggtgggccc agcccaggag 250  
 ccccaaaagc aagaggaagg ggcaaggcgc gcctgggccc ctggtccctg 300  
 gccctcacca ggtgccactg gacctggtgt cacggatgaa accgtatgcc 350  
 cgcattggagg agtatgagag gaacatcgag gagatgttgg ccagctgag 400  
 gaacagttca gagctggccc agagaaagtg tgaggtaac ttgcagctgt 450  
 ggatgtccaa caagaggagc ctgtctccct ggggctacag catcaaccac 500  
 gacccagcc gtatccccgt ggacctccg aggcacggtg cctgtgtctg 550

ggcttggtg aaccccttca ccatgcagga ggaccgcagc atggtgagcg 600  
tgccgggtgtt cagccaggtt cctgtgcgcc gccgcctctg cccgccaccg 650  
ccccgcacag ggccttgccg ccagcgcgca gtcattggaga ccacgctgt 700  
gggctgcacc tgcattctct gaatcgacct ggcccagaag ccaggccagc 750  
agcccgagac catcctcctt gcacctttgt gccaaagaaag gcctatgaaa 800  
agtaaacact gacttttgaa agcaaaaaaa 830

<210> 6  
<211> 397  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> Sequência artificial 1-397

<220>  
<221> desconhecida  
<222> 10, 150, 267  
<223> base desconhecida

<400> 6  
aggcgggcan agctgcaggc tgaccttgca gcttggcgga atggactggc 50  
ctcacaacct gctgtttctt cttaccattt ccattctcct ggggctgggc 100  
agccaggagc cccaaaagca agagggaagg gcaagggcgg cctgggccc 150  
tgccctggcc tcaccaggtg ccactggacc tgggtgcacg gatgaaaccg 200  
tatgcccgca tggaggagta tgagaggaa atcgaggaga tggtgccca 250  
gctgaggaa agctcanaag ctggcccaga gaaagtgtga ggtcaacttg 300  
cagctgtgga tgtccaacaa gaaggagcct gtctcccttg gggctacaag 350  
catcaaccac cgacccagc cgtatccccg tgggaccttg ccgggac 397

<210> 7  
<211> 230  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> Sequência artificial 1-230

<400> 7  
caccgatgag gaccgctatc cacagaagct ggccttcgcc gactgcctgt 50  
gcagaggctg tatcgatgca cggacgggac gcgagacagc tgcgctcaac 100

tccgtgcggc tgctccagag cctgctggtg ctgcgcggcc ggccctgctc 150  
 ccgcgacggc tcgggggtcc ccacacctgg ggcctttgcc ttccacaccg 200  
 agttcatcca cgtccccgtc ggctgcacct 230

<210> 8  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Sequência artificial

<220>  
 <223> Sequência artificial 1-24

<400> 8  
**atccacagaa gctggccttc gccg 24**

<210> 9  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Sequência artificial

<220>  
 <223> Sequência artificial 1-24

<400> 9  
**gggacgtgga tgaactcggg gtgg 24**

<210> 10  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Sequência artificial

<220>  
 <223> Sequência artificial 1-40

<400> 10  
**tatccacaga agctggcctt cgccgagtgc ctgtgcagag 40**

<210> 11  
 <211> 155  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 11  
 Met Thr Pro Gly Lys Thr Ser Leu Val Ser Leu Leu Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Glu Ala Ile Val Lys Ala Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn  
 20 25 30  
 Pro Gly Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys Asn Phe Pro Arg Thr Val  
 35 40 45  
 Met Val Asn Leu Asn Ile His Asn Arg Asn Thr Asn Thr Asn Pro  
 50 55 60

Lys Arg Ser Ser Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr Ser Pro Trp Asn  
 65 70 75  
 Leu His Arg Asn Glu Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser Val Ile Trp  
 80 85 90  
 Glu Ala Lys Cys Arg His Leu Gly Cys Ile Asn Ala Asp Gly Asn  
 95 100 105  
 Val Asp Tyr His Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile Leu  
 110 115 120  
 Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu  
 125 130 135  
 Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Ile  
 140 145 150  
 Val His His Val Ala  
 155

<210> 12  
 <211> 408  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Sequência artificial 1-408

<400> 12  
 Met Asp Trp Pro His Asn Leu Leu Phe Leu Leu Thr Ile Ser Ile  
 1 5 10 15  
 Phe Leu Gly Leu Gly Gln Pro Arg Ser Pro Lys Ser Lys Arg Lys  
 20 25 30  
 Gly Gln Gly Arg Pro Gly Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Gln Val  
 35 40 45  
 Pro Leu Asp Leu Val Ser Arg Met Lys Pro Tyr Ala Arg Met Glu  
 50 55 60  
 Glu Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Glu Met Val Ala Gln Leu Arg Asn  
 65 70 75  
 Ser Ser Glu Leu Ala Gln Arg Lys Cys Glu Val Asn Leu Gln Leu  
 80 85 90  
 Trp Met Ser Asn Lys Arg Ser Leu Ser Pro Trp Gly Tyr Ser Ile  
 95 100 105  
 Asn His Asp Pro Ser Arg Ile Pro Val Asp Leu Pro Glu Ala Arg  
 110 115 120  
 Cys Leu Cys Leu Gly Cys Val Asn Pro Phe Thr Met Gln Glu Asp

|                                     |                         |     |
|-------------------------------------|-------------------------|-----|
| 125                                 | 130                     | 135 |
| Arg Ser Met Val Ser Val Pro Val Phe | Ser Gln Val Pro Val Arg |     |
| 140                                 | 145                     | 150 |
| Arg Arg Leu Cys Pro Pro Pro Pro Arg | Thr Gly Pro Cys Arg Gln |     |
| 155                                 | 160                     | 165 |
| Arg Ala Val Met Glu Thr Ile Ala Val | Gly Cys Thr Cys Ile Phe |     |
| 170                                 | 175                     | 180 |
| Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro | Cys Pro Ala Pro Glu Leu |     |
| 185                                 | 190                     | 195 |
| Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe | Pro Pro Lys Pro Lys Asp |     |
| 200                                 | 205                     | 210 |
| Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu | Val Thr Cys Val Val Val |     |
| 215                                 | 220                     | 225 |
| Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val | Lys Phe Asn Trp Tyr Val |     |
| 230                                 | 235                     | 240 |
| Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys | Thr Lys Pro Arg Glu Glu |     |
| 245                                 | 250                     | 255 |
| Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val | Ser Val Leu Thr Val Leu |     |
| 260                                 | 265                     | 270 |
| His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu | Tyr Lys Cys Lys Val Ser |     |
| 275                                 | 280                     | 285 |
| Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu | Lys Thr Ile Ser Lys Ala |     |
| 290                                 | 295                     | 300 |
| Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val | Tyr Thr Leu Pro Pro Ser |     |
| 305                                 | 310                     | 315 |
| Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val | Ser Leu Thr Cys Leu Val |     |
| 320                                 | 325                     | 330 |
| Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala | Val Glu Trp Glu Ser Asn |     |
| 335                                 | 340                     | 345 |
| Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr | Thr Pro Pro Val Leu Asp |     |
| 350                                 | 355                     | 360 |
| Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser | Lys Leu Thr Val Asp Lys |     |
| 365                                 | 370                     | 375 |
| Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe | Ser Cys Ser Val Met His |     |
| 380                                 | 385                     | 390 |
| Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln | Lys Ser Leu Ser Leu Ser |     |
| 395                                 | 400                     | 405 |
| Pro Gly Lys                         |                         |     |
| 408                                 |                         |     |

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 425

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Sequência artificial 1-425

&lt;400&gt; 13

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Thr | Leu | Leu | Pro | Gly | Leu | Leu | Phe | Leu | Thr | Trp | Leu | His | Thr |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     | 15  |     |
| Cys | Leu | Ala | His | His | Asp | Pro | Ser | Leu | Arg | Gly | His | Pro | His | Ser |
|     |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     | 30  |     |
| His | Gly | Thr | Pro | His | Cys | Tyr | Ser | Ala | Glu | Glu | Leu | Pro | Leu | Gly |
|     |     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     | 45  |     |
| Gln | Ala | Pro | Pro | His | Leu | Leu | Ala | Arg | Gly | Ala | Lys | Trp | Gly | Gln |
|     |     |     |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |
| Ala | Leu | Pro | Val | Ala | Leu | Val | Ser | Ser | Leu | Glu | Ala | Ala | Ser | His |
|     |     |     |     | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |
| Arg | Gly | Arg | His | Glu | Arg | Pro | Ser | Ala | Thr | Thr | Gln | Cys | Pro | Val |
|     |     |     |     | 80  |     |     |     |     | 85  |     |     |     | 90  |     |
| Leu | Arg | Pro | Glu | Glu | Val | Leu | Glu | Ala | Asp | Thr | His | Gln | Arg | Ser |
|     |     |     |     | 95  |     |     |     |     | 100 |     |     |     | 105 |     |
| Ile | Ser | Pro | Trp | Arg | Tyr | Arg | Val | Asp | Thr | Asp | Glu | Asp | Arg | Tyr |
|     |     |     |     | 110 |     |     |     |     | 115 |     |     |     | 120 |     |
| Pro | Gln | Lys | Leu | Ala | Phe | Ala | Glu | Cys | Leu | Cys | Arg | Gly | Cys | Ile |
|     |     |     |     | 125 |     |     |     |     | 130 |     |     |     | 135 |     |
| Asp | Ala | Arg | Thr | Gly | Arg | Glu | Thr | Ala | Ala | Leu | Asn | Ser | Val | Arg |
|     |     |     |     | 140 |     |     |     |     | 145 |     |     |     | 150 |     |
| Leu | Leu | Gln | Ser | Leu | Leu | Val | Leu | Arg | Arg | Arg | Pro | Cys | Ser | Arg |
|     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |     |     |     | 165 |     |
| Asp | Gly | Ser | Gly | Leu | Pro | Thr | Pro | Gly | Ala | Phe | Ala | Phe | His | Thr |
|     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |     |     | 180 |     |
| Glu | Phe | Ile | His | Val | Pro | Val | Gly | Cys | Thr | Cys | Val | Leu | Pro | Arg |
|     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |     | 195 |     |
| Ser | Val | Pro | Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro |
|     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     | 210 |     |
| Glu | Leu | Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro |
|     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     | 225 |     |

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 230 235 240  
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 245 250 255  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg  
 260 265 270  
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
 275 280 285  
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
 290 295 300  
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 305 310 315  
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 320 325 330  
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 335 340 345  
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
 350 355 360  
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 365 370 375  
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 380 385 390  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
 395 400 405  
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 410 415 420  
 Leu Ser Pro Gly Lys  
 425

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 212

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 14

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

|                                                             |     |     |     |
|-------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
|                                                             | 35  | 40  | 45  |
| Pro Leu Thr Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile | 50  | 55  | 60  |
| Leu Asp Gly Ile Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser | 65  | 70  | 75  |
| Asn Met Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu | 80  | 85  | 90  |
| Asn Leu Pro Lys Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly | 95  | 100 | 105 |
| Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu | 110 | 115 | 120 |
| Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser | 125 | 130 | 135 |
| Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln Met Ser Thr Lys Val Leu | 140 | 145 | 150 |
| Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr | 155 | 160 | 165 |
| Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu Thr Lys Leu Gln | 170 | 175 | 180 |
| Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His Leu Ile Leu | 185 | 190 | 195 |
| Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala Leu Arg | 200 | 205 | 210 |
| Gln Met                                                     | 212 |     |     |

<210> 15  
 <211> 320  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 15

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

```

Ser Trp Ile His Pro Arg Asn Leu Thr Pro Ser Ser Pro Lys Asp
      65                      70                      75

Leu Gln Ile Gln Leu His Phe Ala His Thr Gln Gln Gly Asp Leu
      80                      85                      90

Phe Pro Val Ala His Ile Glu Trp Thr Leu Gln Thr Asp Ala Ser
      95                      100                     105

Ile Leu Tyr Leu Glu Gly Ala Glu Leu Ser Val Leu Gln Leu Asn
      110                     115                     120

Thr Asn Glu Arg Leu Cys Val Arg Phe Glu Phe Leu Ser Lys Leu
      125                     130                     135

Arg His His His Arg Arg Trp Arg Phe Thr Phe Ser His Phe Val
      140                     145                     150

Val Asp Pro Asp Gln Glu Tyr Glu Val Thr Val His His Leu Pro
      155                     160                     165

Lys Pro Ile Pro Asp Gly Asp Pro Asn His Gln Ser Lys Asn Phe
      170                     175                     180

Leu Val Pro Asp Cys Glu His Ala Arg Met Lys Val Thr Thr Pro
      185                     190                     195

Cys Met Ser Ser Gly Ser Leu Trp Asp Pro Asn Ile Thr Val Glu
      200                     205                     210

Thr Leu Glu Ala His Gln Leu Arg Val Ser Phe Thr Leu Trp Asn
      215                     220                     225

Glu Ser Thr His Tyr Gln Ile Leu Leu Thr Ser Phe Pro His Met
      230                     235                     240

Glu Asn His Ser Cys Phe Glu His Met His His Ile Pro Ala Pro
      245                     250                     255

Arg Pro Glu Glu Phe His Gln Arg Ser Asn Val Thr Leu Thr Leu
      260                     265                     270

Arg Asn Leu Lys Gly Cys Cys Arg His Gln Val Gln Ile Gln Pro
      275                     280                     285

Phe Phe Ser Ser Cys Leu Asn Asp Cys Leu Arg His Ser Ala Thr
      290                     295                     300

Val Ser Cys Pro Glu Met Pro Asp Thr Pro Glu Pro Ile Pro Asp
      305                     310                     315

Tyr Met Pro Leu Trp
      320

```

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 543

&lt;212&gt; ADN

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 16

atggactggc ctcacaacct gctgtttctt cttaccattt ccatcttct 50  
 ggggctgggc cagcccagga gccccaaaag caagaggaag gggcaagggc 100  
 ggctgggcc cctggcccct ggccctcacc aggtgccact ggacctggtg 150  
 tcacggatga aaccgtatgc ccgcatggag gagtatgaga ggaacatcga 200  
 ggagatggtg gccagctga ggaacagctc agagctggcc cagagaaagt 250  
 gtgaggtaaa cttgcagctg tggatgtcca acaagaggag cctgtctccc 300  
 tggggctaca gcatcaacca cgacccagc cgtatccccg tggacctgcc 350  
 ggaggcacgg tgctgtgtc tgggtgtgt gaacccttc accatgcagg 400  
 aggaccgag catggtgagc gtgccggtgt tcagccaggt tcctgtgcgc 450  
 cggcgctct gcccgccacc gcccgcaca gggccttgc gccagcgcg 500  
 agtcatggag accatcgctg tgggtgcac ctgcatcttc tga 543

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 594

&lt;212&gt; ADN

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 17

atgacgtcc tccccggcct cctgtttctg acctggctgc acacatgcct 50  
 gggccaccat gacccctccc tcagggggca ccccacagt cagggtaccc 100  
 cacactgcta ctgggtgag gaactgccc tggccaggc cccccacac 150  
 ctgctggctc gaggtgcaa gtggggcag gctttgctg tagccctggt 200  
 gtccagcctg gaggcagcaa gccacaggg gaggcagag aggccctcag 250  
 ctacgacca gtgcccgggt ctgcccggg aggggtgtt ggaggcagac 300  
 acccaccagc gctccatctc accctggaga taccgtgtgg acacggatga 350  
 ggaccgtat ccacagaagc tggccttcgc cgagtgcctg tgcagaggct 400  
 gtatcgatgc acggacgggc cgcgagacag ctgcgtcaa ctccgtgcgg 450  
 ctgctccaga gcctgctggt gctgcgccgc cgccctgct cccgcgacgg 500  
 ctgggggctc cccacacctg gggccttgc cttccacacc gattcatcc 550  
 acgtccccgt cggctgcacc tgcgtgctgc cccgttcagt gtga 594

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Sequência artificial 1-9

&lt;400&gt; 18

Gly His His His His His His His His  
 1 5 9

<210> 19  
 <211> 157  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 19  
 Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His  
 1 5 10 15  
 Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn  
 20 25 30  
 Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp  
 35 40 45  
 Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser  
 50 55 60  
 Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu  
 65 70 75  
 Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys  
 80 85 90  
 Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr  
 95 100 105  
 Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu  
 110 115 120  
 Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu  
 125 130 135  
 Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val  
 140 145 150  
 Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu  
 155 157

<210> 20  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Sequência artificial 1-21

<400> 20  
**ctgtacctcg aggggtgcaga g 21**

<210> 21  
 <211> 58  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Sequência artificial 1-58

<400> 21  
**cccaagcttg ggtcaatgat gatgatgatg atgatgatgc cacaggggca 50**  
**tgtagtcc 58**

<210> 22  
 <211> 328  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 22

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| Met | Gly | Ala | Ala | Arg | Ser | Pro | Pro | Ser | Ala | Val | Pro | Gly | Pro | Leu | 1   | 5   | 10  | 15 |
| Leu | Gly | Leu | Leu | Leu | Leu | Leu | Leu | Gly | Val | Leu | Ala | Pro | Gly | Gly | 20  | 25  | 30  |    |
| Ala | Ser | Leu | Arg | Leu | Leu | Asp | His | Arg | Ala | Leu | Val | Cys | Ser | Gln | 35  | 40  | 45  |    |
| Pro | Gly | Leu | Asn | Cys | Thr | Val | Lys | Asn | Ser | Thr | Cys | Leu | Asp | Asp | 50  | 55  | 60  |    |
| Ser | Trp | Ile | His | Pro | Arg | Asn | Leu | Thr | Pro | Ser | Ser | Pro | Lys | Asp | 65  | 70  | 75  |    |
| Leu | Gln | Ile | Gln | Leu | His | Phe | Ala | His | Thr | Gln | Gln | Gly | Asp | Leu | 80  | 85  | 90  |    |
| Phe | Pro | Val | Ala | His | Ile | Glu | Trp | Thr | Leu | Gln | Thr | Asp | Ala | Ser | 95  | 100 | 105 |    |
| Ile | Leu | Tyr | Leu | Glu | Gly | Ala | Glu | Leu | Ser | Val | Leu | Gln | Leu | Asn | 110 | 115 | 120 |    |
| Thr | Asn | Glu | Arg | Leu | Cys | Val | Arg | Phe | Glu | Phe | Leu | Ser | Lys | Leu | 125 | 130 | 135 |    |
| Arg | His | His | His | Arg | Arg | Trp | Arg | Phe | Thr | Phe | Ser | His | Phe | Val | 140 | 145 | 150 |    |
| Val | Asp | Pro | Asp | Gln | Glu | Tyr | Glu | Val | Thr | Val | His | His | Leu | Pro |     |     |     |    |

|                                                             |     |     |
|-------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 155                                                         | 160 | 165 |
| Lys Pro Ile Pro Asp Gly Asp Pro Asn His Gln Ser Lys Asn Phe |     |     |
| 170                                                         | 175 | 180 |
| Leu Val Pro Asp Cys Glu His Ala Arg Met Lys Val Thr Thr Pro |     |     |
| 185                                                         | 190 | 195 |
| Cys Met Ser Ser Gly Ser Leu Trp Asp Pro Asn Ile Thr Val Glu |     |     |
| 200                                                         | 205 | 210 |
| Thr Leu Glu Ala His Gln Leu Arg Val Ser Phe Thr Leu Trp Asn |     |     |
| 215                                                         | 220 | 225 |
| Glu Ser Thr His Tyr Gln Ile Leu Leu Thr Ser Phe Pro His Met |     |     |
| 230                                                         | 235 | 240 |
| Glu Asn His Ser Cys Phe Glu His Met His His Ile Pro Ala Pro |     |     |
| 245                                                         | 250 | 255 |
| Arg Pro Glu Glu Phe His Gln Arg Ser Asn Val Thr Leu Thr Leu |     |     |
| 260                                                         | 265 | 270 |
| Arg Asn Leu Lys Gly Cys Cys Arg His Gln Val Gln Ile Gln Pro |     |     |
| 275                                                         | 280 | 285 |
| Phe Phe Ser Ser Cys Leu Asn Asp Cys Leu Arg His Ser Ala Thr |     |     |
| 290                                                         | 295 | 300 |
| Val Ser Cys Pro Glu Met Pro Asp Thr Pro Glu Pro Ile Pro Asp |     |     |
| 305                                                         | 310 | 315 |
| Tyr Met Pro Leu Trp His His His His His His His His         |     |     |
| 320                                                         | 325 | 328 |

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 175

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Sequência artificial 1-175

&lt;400&gt; 23

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

```

Asn Ser Ser Glu Leu Ala Gln Arg Lys Cys Glu Val Asn Leu Gln
      65              70              75

Leu Trp Met Ser Asn Lys Arg Ser Leu Ser Pro Trp Gly Tyr Ser
      80              85              90

Ile Asn His Asp Pro Ser Arg Ile Pro Val Asp Leu Pro Glu Ala
      95              100             105

Arg Cys Leu Cys Leu Gly Cys Val Asn Pro Phe Thr Met Gln Glu
      110             115             120

Asp Arg Ser Met Val Ser Val Pro Val Phe Ser Gln Val Pro Val
      125             130             135

Arg Arg Arg Leu Cys Pro Pro Pro Pro Arg Thr Gly Pro Cys Arg
      140             145             150

Gln Arg Ala Val Met Glu Thr Ile Ala Val Gly Cys Thr Cys Ile
      155             160             165

Phe Gly His His His His His His His
      170             175

```

<210> 24  
 <211> 206  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Sequência artificial 1-206

```

<400> 24
Met Thr Leu Leu Pro Gly Leu Leu Phe Leu Thr Trp Leu His Thr
  1              5              10              15

Cys Leu Ala His His Asp Pro Ser Leu Arg Gly His Pro His Ser
      20              25              30

His Gly Thr Pro His Cys Tyr Ser Ala Glu Glu Leu Pro Leu Gly
      35              40              45

Gln Ala Pro Pro His Leu Leu Ala Arg Gly Ala Lys Trp Gly Gln
      50              55              60

Ala Leu Pro Val Ala Leu Val Ser Ser Leu Glu Ala Ala Ser His
      65              70              75

Arg Gly Arg His Glu Arg Pro Ser Ala Thr Thr Gln Cys Pro Val
      80              85              90

Leu Arg Pro Glu Glu Val Leu Glu Ala Asp Thr His Gln Arg Ser
      95              100             105

Ile Ser Pro Trp Arg Tyr Arg Val Asp Thr Asp Glu Asp Arg Tyr
      110             115             120

```

```

Pro Gln Lys Leu Ala Phe Ala Glu Cys Leu Cys Arg Gly Cys Ile
      125                      130                      135

Asp Ala Arg Thr Gly Arg Glu Thr Ala Ala Leu Asn Ser Val Arg
      140                      145                      150

Leu Leu Gln Ser Leu Leu Val Leu Arg Arg Arg Pro Cys Ser Arg
      155                      160                      165

Asp Gly Ser Gly Leu Pro Thr Pro Gly Ala Phe Ala Phe His Thr
      170                      175                      180

Glu Phe Ile His Val Pro Val Gly Cys Thr Cys Val Leu Pro Arg
      185                      190                      195

Ser Val Gly His His His His His His His His
      200                      205 206

```

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 271

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 25

```

Met Ala Lys Val Pro Asp Met Phe Glu Asp Leu Lys Asn Cys Tyr
  1              5              10              15

Ser Glu Asn Glu Glu Asp Ser Ser Ser Ile Asp His Leu Ser Leu
      20              25              30

Asn Gln Lys Ser Phe Tyr His Val Ser Tyr Gly Pro Leu His Glu
      35              40              45

Gly Cys Met Asp Gln Ser Val Ser Leu Ser Ile Ser Glu Thr Ser
      50              55              60

Lys Thr Ser Lys Leu Thr Phe Lys Glu Ser Met Val Val Val Ala
      65              70              75

Thr Asn Gly Lys Val Leu Lys Lys Arg Arg Leu Ser Leu Ser Gln
      80              85              90

Ser Ile Thr Asp Asp Asp Leu Glu Ala Ile Ala Asn Asp Ser Glu
      95              100             105

Glu Glu Ile Ile Lys Pro Arg Ser Ala Pro Phe Ser Phe Leu Ser
      110             115             120

Asn Val Lys Tyr Asn Phe Met Arg Ile Ile Lys Tyr Glu Phe Ile
      125             130             135

Leu Asn Asp Ala Leu Asn Gln Ser Ile Ile Arg Ala Asn Asp Gln
      140             145             150

Tyr Leu Thr Ala Ala Ala Leu His Asn Leu Asp Glu Ala Val Lys

```

|                                     |                         |     |
|-------------------------------------|-------------------------|-----|
| 155                                 | 160                     | 165 |
| Phe Asp Met Gly Ala Tyr Lys Ser Ser | Lys Asp Asp Ala Lys Ile |     |
| 170                                 | 175                     | 180 |
| Thr Val Ile Leu Arg Ile Ser Lys Thr | Gln Leu Tyr Val Thr Ala |     |
| 185                                 | 190                     | 195 |
| Gln Asp Glu Asp Gln Pro Val Leu Leu | Lys Glu Met Pro Glu Ile |     |
| 200                                 | 205                     | 210 |
| Pro Lys Thr Ile Thr Gly Ser Glu Thr | Asn Leu Leu Phe Phe Trp |     |
| 215                                 | 220                     | 225 |
| Glu Thr His Gly Thr Lys Asn Tyr Phe | Thr Ser Val Ala His Pro |     |
| 230                                 | 235                     | 240 |
| Asn Leu Phe Ile Ala Thr Lys Gln Asp | Tyr Trp Val Cys Leu Ala |     |
| 245                                 | 250                     | 255 |
| Gly Gly Pro Pro Ser Ile Thr Asp Phe | Gln Ile Leu Glu Asn Gln |     |
| 260                                 | 265                     | 270 |
| Ala                                 |                         |     |
| 271                                 |                         |     |

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 177

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 26

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Arg | Phe | Ala | Phe | Ile | Arg | Ser | Asp | Ser | Gly | Pro | Thr | Thr | Ser |
|     |     |     |     | 125 |     |     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |
| Phe | Glu | Ser | Ala | Ala | Cys | Pro | Gly | Trp | Phe | Leu | Cys | Thr | Ala | Met |
|     |     |     |     | 140 |     |     |     |     | 145 |     |     |     |     | 150 |
| Glu | Ala | Asp | Gln | Pro | Val | Ser | Leu | Thr | Asn | Met | Pro | Asp | Glu | Gly |
|     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |     |     |     |     | 165 |
| Val | Met | Val | Thr | Leu | Phe | Tyr | Phe | Gln | Glu | Asp | Glu |     |     |     |
|     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     | 177 |     |     |     |

Lisboa,

REIVINDICAÇÕES

**1.** Utilização de um polipéptido PRO1122 para a preparação de um medicamento para o tratamento de uma desordem cartilaginosa degenerativa,

em que o referido polipéptido PRO1122 é um polipéptido isolado possuindo pelo menos 80% de identidade de sequência de aminoácidos com um polipéptido seleccionado do grupo que consiste em:

- (i) um polipéptido PRO1122 consistindo na sequência de resíduos de aminoácido 1 a 197 apresentada na Figura 3 (SEQ ID NO:3),
- (ii) um polipéptido PRO1122 consistindo na sequência de resíduos de aminoácido 19 a 197 apresentada na Figura 3 (SEQ ID NO:3),
- (iii) um polipéptido PRO1122 codificado pela sequência de codificação de comprimento completo do ADNc depositado na ATCC com o número de acesso 203552, e
- (iv) um polipéptido PRO1122 codificado pela sequência de codificação de comprimento completo do ADNc depositado na ATCC com o número de acesso 203552, a que falta o seu péptido de sinal associado,

sendo a identidade de sequências de aminoácidos determinada ao longo da totalidade do comprimento do polipéptido PRO1122 de (i), (ii), (iii) ou (iv), e sendo o polipéptido isolado capaz de induzir a libertação de TNF- $\alpha$  por células THP-1 e/ou aumentar a quebra de matriz e inibir a síntese de matriz em explantes de cartilagem articular.

**2.** Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a identidade de sequências de aminoácidos é de pelo menos 90%.

**3.** Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a identidade de sequências de aminoácidos é de pelo menos 95%.

**4.** Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a identidade de sequências de aminoácidos é de pelo menos 98%.

**5.** Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a identidade de sequências de aminoácidos é de pelo menos 99%.

**6.** Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o polipéptido PRO1122 isolado compreende os aminoácidos 1 ou 19 a 197 da Figura 3 (SEQ ID NO:3).

**7.** Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o polipéptido PRO1122 isolado é codificado pela sequência de codificação de comprimento completo do ADNc depositado na ATCC com o número de acesso 203552, e possui ou não o seu péptido de sinal associado.

**8.** Utilização de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, em que o tratamento é de artrite.

**9.** Antagonista de um polipéptido PRO1122, em que o referido antagonista compreende:

- (1) um anticorpo anti-PRO1122 que se liga especificamente a um polipéptido PRO1122 consistindo na sequência de resíduos de aminoácido 1 ou 19 a 197 apresentada na Figura 3 (SEQ ID NO:3), ou
- (2) um antagonista de ácido nucleico dirigido contra o ácido nucleico da Figura 4 (SEQ ID NO:4), que é um ácido nucleico anti-sentido, um oligonucleotídico de ácido desoxinucleico adaptado para a formação de hélices triplas, ou uma ribozima,

e antagoniza a actividade do polipéptido PRO1122 consistindo na sequência de resíduos de aminoácido 1 ou 19 a 197 apresentada na Figura 3 (SEQ ID NO:3) para induzir a libertação de TNF- $\alpha$  por células THP-1 e/ou aumentar a quebra de matriz e inibir a síntese de matriz em explantes de cartilagem articular.

**10.** Composição farmacêutica terapêutica compreendendo o antagonista de PRO1122 de acordo com a reivindicação 9 em mistura com um transportador farmaceuticamente aceitável.

**11.** Antagonista de um polipéptido PRO1122, para utilização num método de tratamento, em que o antagonista é tal como definido na reivindicação 9.

**12.** Antagonista de acordo com a reivindicação 11, em que o tratamento é de uma condição inflamatória e/ou uma desordem cartilaginosa degenerativa.

**13.** Antagonista de acordo com a reivindicação 12, em que o tratamento é de artrite.

**14.** Utilização de um antagonista tal como definido na reivindicação 9 no fabrico de um medicamento para o tratamento de uma condição inflamatória e/ou uma desordem cartilaginosa degenerativa.

**15.** Utilização de acordo com a reivindicação 14, em que o tratamento é de artrite.

Lisboa,

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

FIG. 1

aggcgggcag cagctgcagg ctgaccttgc agcttggcgg aatggactgg 50  
cctcacaacc tgctgtttct tcttaccatt tccatcttcc tggggctggg 100  
ccagcccagg agccccaaaa gcaagaggaa ggggcaaggg cggcctgggc 150  
ccctggcccc tggccctcac caggtgccac tggacctggg gtcacggatg 200  
aaaccgtatg cccgcatgga ggagtatgag aggaacatcg aggagatggg 250  
ggcccagctg aggaacagct cagagctggc ccagagaaag tgtgagggtca 300  
acttgagctg gtggatgtcc aacaagagga gcctgtctcc ctggggctac 350  
agcatcaacc acgaccccag ccgtatcccc gtggacctgc cggaggcacg 400  
gtgcctgtgt ctgggctgtg tgaaccctt caccatgcag gaggaccgca 450  
gcatggtgag cgtgccggtg ttcagccagg ttcctgtgcg ccgccgcctc 500  
tgcccgccac cggcccgcac agggccttgc cggcagcgcg cagtcatgga 550  
gaccatcgct gtgggctgca cctgcatctt ctgaatcacc tggcccagaa 600  
gccaggccag cagcccgaga ccatcctcct tgcacctttg tgccaagaaa 650  
ggcctatgaa aagtaaacac tgacttttga aagcaag 687

**FIG. 2**

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

Ser Val  
197

FIG. 3

gccaggtgtg caggccgctc caagcccagc ctgccccgct gccgccacca 50  
tgacgctcct ccccggcctc ctgtttctga cctgggtgca cacatgcctg 100  
gccaccatg acccctccct cagggggcac cccacagtc acggtacccc 150  
acactgctac tcggctgagg aactgcccct cggccaggcc ccccccacacc 200  
tgctggctcg aggtgccaaag tgggggcagg ctttgctgt agccctggtg 250  
tcagcctgg aggcagcaag ccacaggggg aggcacgaga ggccctcagc 300  
tacgaccag tgcccgggtgc tgcggccgga ggaggtgttg gaggcagaca 350  
cccaccagcg ctccatctca ccctggagat accgtgtgga cacggatgag 400  
gaccgctatc cacagaagct ggccctcgcc gagtgcctgt gcagaggctg 450  
tatcgaatgca cggacggggc gcgagacagc tgcgctcaac tccgtgcggc 500  
tgctccagag cctgctgggtg ctgcgccgcc ggccctgctc ccgacggc 550  
tcggggctcc ccacacctgg ggcccttgcc ttccacaccg agttcatcca 600  
cgtccccgtc ggctgcacct gcgtgctgcc ccgttcagtg tgaccgccga 650  
ggcgtgggg cccctagact ggacacgtgt gctccccaga gggcaccccc 700  
tatttatgtg tatttattgt tatttatatg cttcccccaa cactaccctt 750  
gggtcttggg cattccccgt gtctggagga cagccccca ctgttctcct 800  
catctccagc ctcaatgatt ggggtagaa ggagctcagc acctcttcca 850  
gcccttaaag ctgcagaaaa ggtgtcacac ggctgcctgt accttggctc 900  
cctgtcctgc tcccggcttc ccttacccta tcaatggcct cagggccgc 950  
aggtgcctc ttcccaacct ccttgggaagt acccctgttt cttaaacaat 1000  
tatttaagtg tacgtgtatt attaaactga tgaacacatc cccaaaa 1047

**FIG. 4**

ggcagcaggg accaagagag gcacgcttgc ccttttatga catcagagct 50  
cctggttctt gctccttggg actctgggac ttacaccagt ggcacccctg 100  
gctcnnnnnn nnnnnaattc ggtacgaggc tggggttcag gcgggcagca 150  
gctgcaggct gaccttgcag cttggcgga tggactggcc tcacaacctg 200  
ctgtttcttc ttaccatttc catcttcctg gggctgggcc agcccaggag 250  
ccccaaaagc aagaggaagg ggcaagggcg gcctggggcc ctggtccctg 300  
gccctcacca ggtgccactg gacctggtgt cacggatgaa accgtatgcc 350  
cgcatggagg agtatgagag gaacatcgag gagatgttgg ccagctgag 400  
gaacagttca gagctggccc agagaaagtg tgagggtcaac ttgcagctgt 450  
ggatgtccaa caagaggagc ctgtctccct ggggctacag catcaaccac 500  
gacccagcc gtatccccgt ggacctccgg aggcacggtg cctgtgtctg 550  
ggcttgtgtg aacccttca ccatgcagga ggaccgcagc atggtgagcg 600  
tgccggtgtt cagccaggtt cctgtgcgcc gccgcctctg cccgccaccg 650  
ccccgcacag ggcttgccg ccagcgcgca gtcattggaga ccacgctgt 700  
gggctgcacc tgcattctct gaatcgacct ggcccagaag ccaggccagc 750  
agcccagagc catctcctt gcaccttctg gccaaagaaag gcctatgaaa 800  
agtaaact gacttttgaa agcaaaaaaa 830

**FIG. 5**

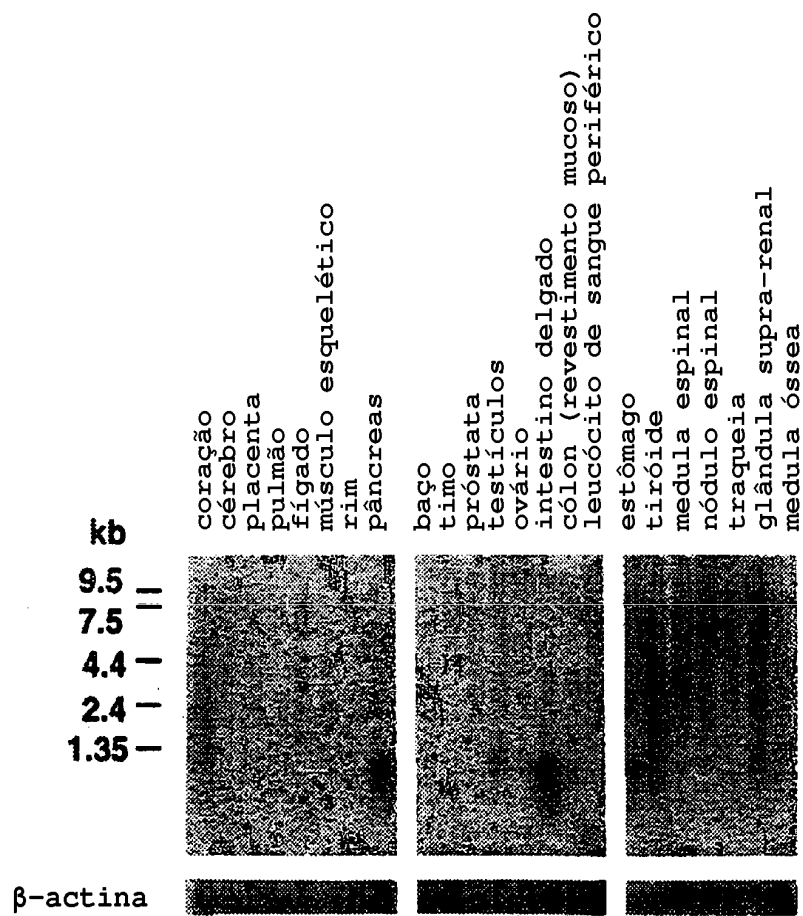
**cacggatgag gaccgctatc cacagaagct ggccttcgcc gagtgcctgt 50**  
**gcagaggctg tatcgatgca cggacgggcc gcgagacagc tgcgctcaac 100**  
**tccgtgcggc tgotccagag cctgctggtg ctgcgcgcgcc ggccctgctc 150**  
**ccgcgacggc tcggggctcc ccacacctgg ggcctttgcc ttccacaccg 200**  
**agttcatcca cgtccccgtc ggctgcacct 230**

**FIG. 6**



|       |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-------|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 59294 | 1   | M | D | W | P | H | N | L | L | F | L | L | T | I | S | I | F | L | G | L | G | Q | P | R | S | P | K | S | K | R | K | G | Q | G | R | P | G | P | L | A | P | G | P | - | - | - | Q | V | P | L |   |
| 62377 | 1   | M | T | L | L | P | G | L | L | F | L | T | W | L | H | T | C | L | A | H | H | D | P | - | S | L | R | G | H | P | H | S | H | G | T | P | H | C | Y | S | A | E | E | L | P | L | G | Q | A | P | P |
| 59294 | 48  | D | L | V | S | R | M | K | P | Y | A | R | M | - | - | E | E | Y | E | R | N | I | E | E | M | V | A | Q | L | R | N | S | S | E | L | A | Q | R | K | C | E | V | - | - | - | N | L | Q | L | W |   |
| 62377 | 50  | H | L | L | A | R | G | A | K | W | G | Q | A | L | P | V | A | L | V | S | S | L | E | A | A | S | H | R | G | R | H | E | R | P | S | A | T | T | Q | C | P | V | L | R | P | E | E | V | L | E | A |
| 59294 | 92  | M | S | N | K | R | S | L | S | P | W | G | Y | S | I | N | H | D | P | S | R | I | P | V | D | L | P | E | A | R | C | L | C | L | G | C | V | N | P | F | T | M | Q | E | D | R | S | M | V | S | V |
| 62377 | 100 | D | T | H | Q | R | S | I | S | P | W | R | Y | R | V | D | T | D | E | D | R | Y | P | Q | K | L | A | F | A | E | C | L | C | R | G | C | I | D | A | R | T | G | R | E | T | A | A | L | N | S | V |
| 59294 | 142 | P | V | F | - | S | Q | V | P | V | R | R | R | L | C | P | P | P | - | - | - | P | R | T | G | P | C | R | Q | R | A | V | M | E | T | I | A | V | G | C | T | C | I | F |   |   |   |   |   |   |   |
| 62377 | 150 | R | L | L | Q | S | L | L | V | L | R | R | R | P | C | S | R | D | G | S | G | L | P | T | P | G | A | F | A | F | H | T | E | F | I | H | V | P | V | G | C | T | C | V | L | P | R | S | V |   |   |

FIG. 7B



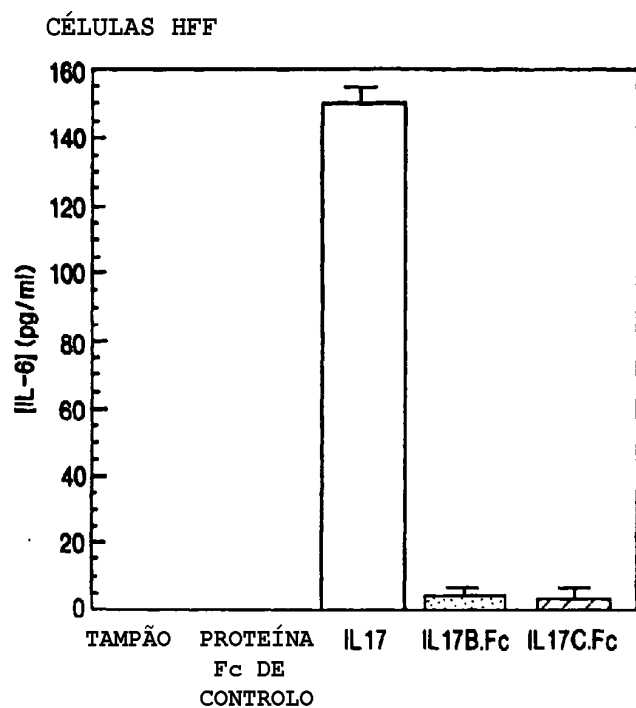


FIG. 9A

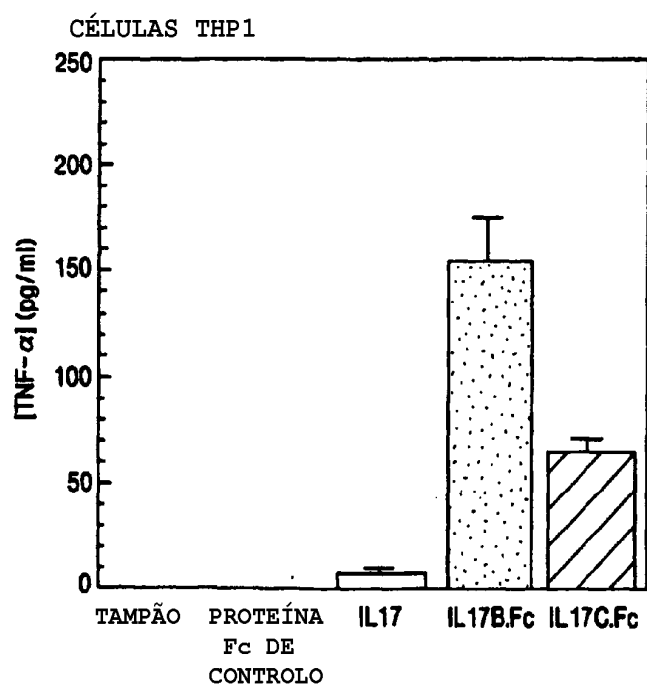
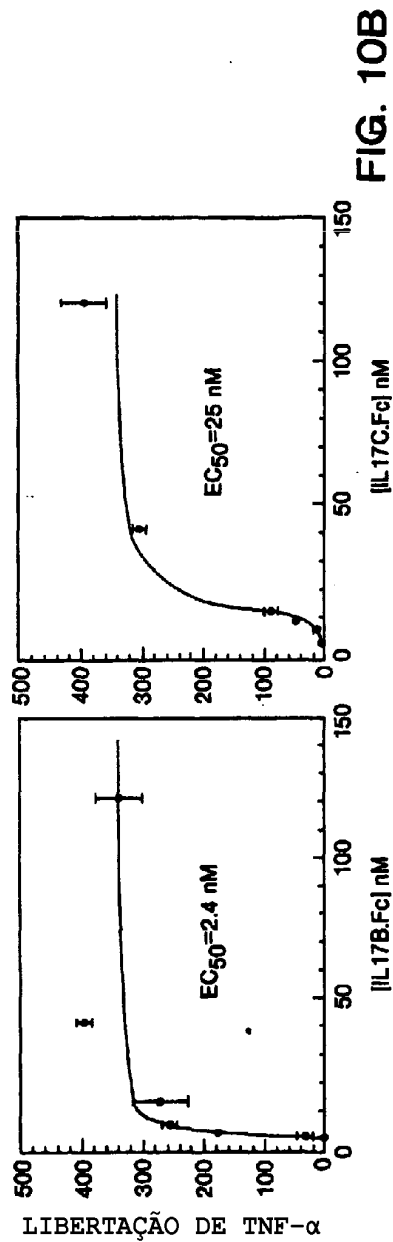
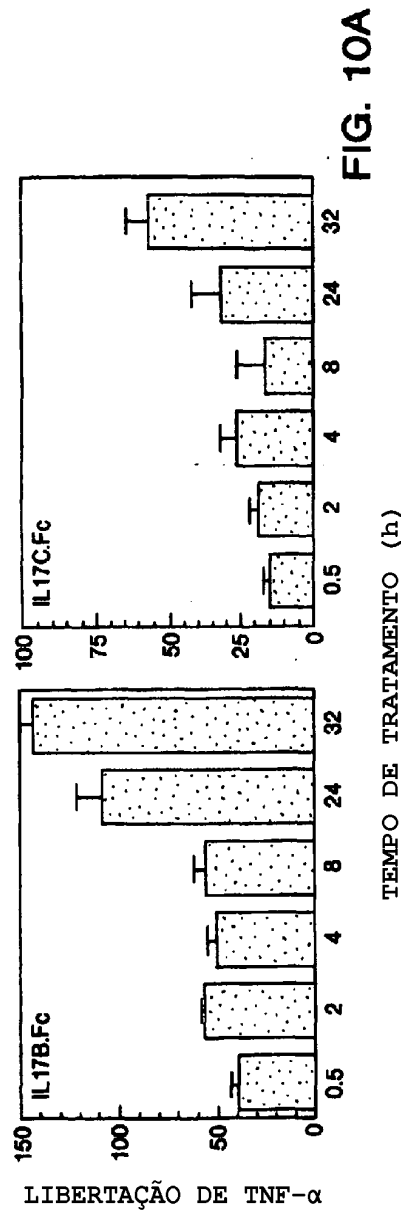
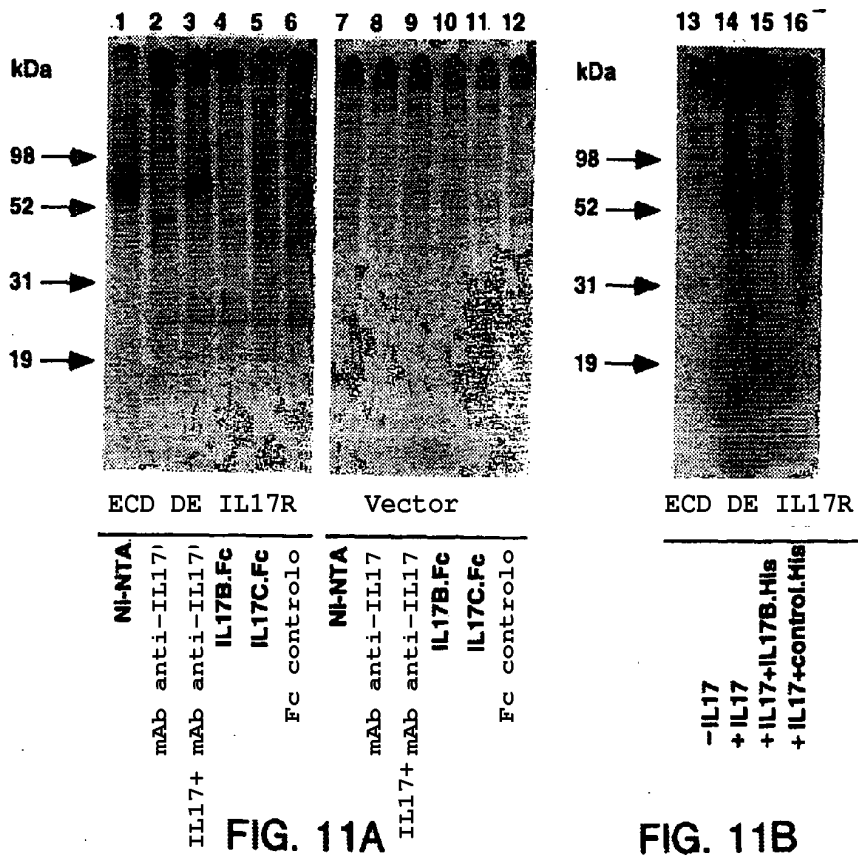


FIG. 9B





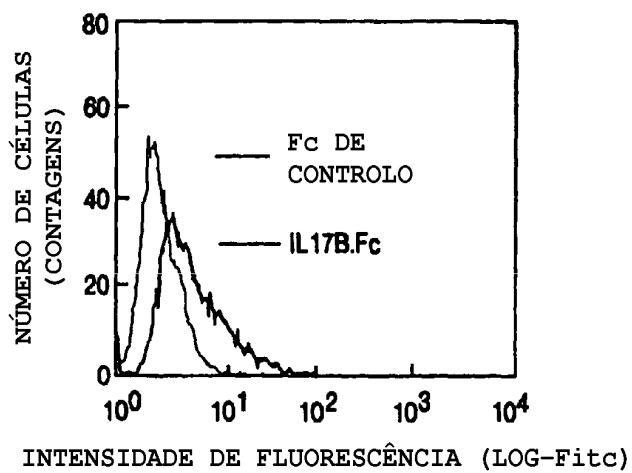


FIG. 12A

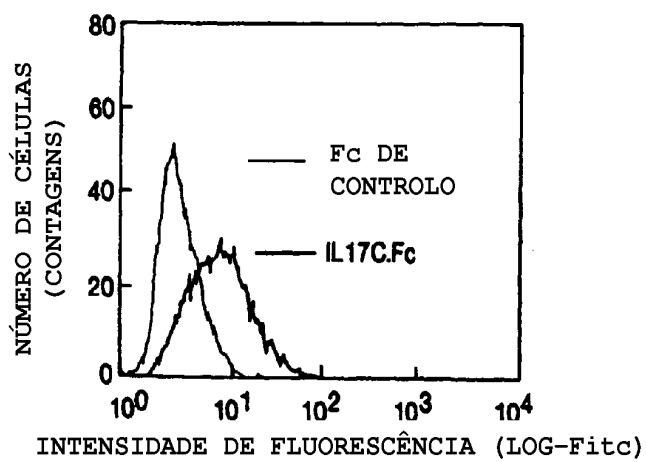


FIG. 12B

IL-17 INDUZ A QUEBRA E INIBE A SÍNTESE DE MATRIZ  
DE CARTILAGEM

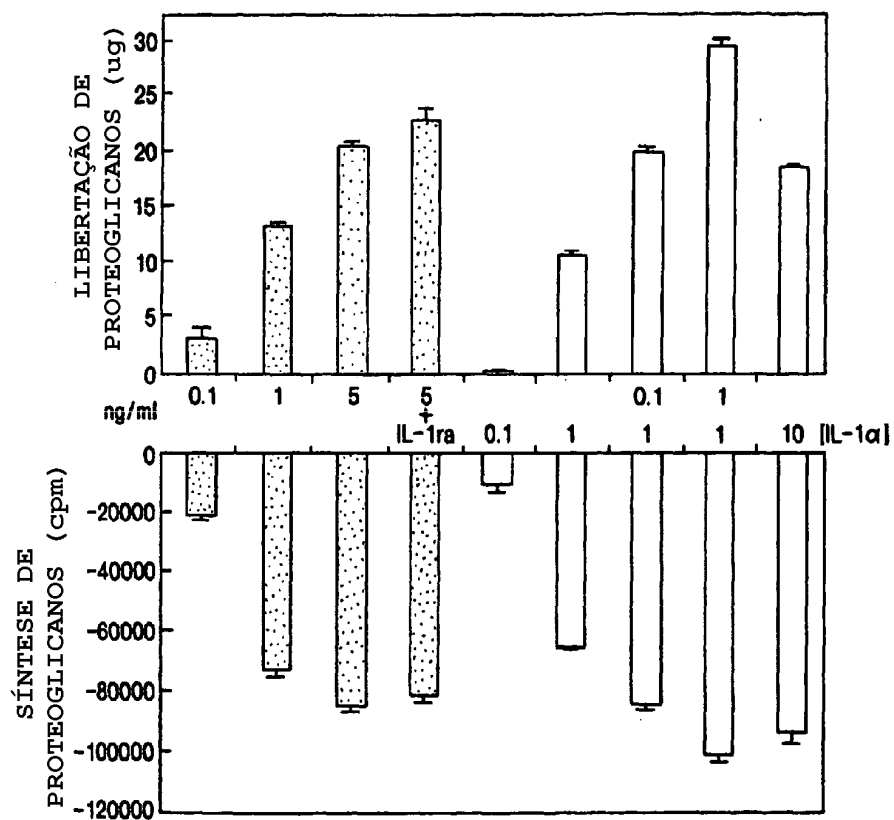


FIG. 13

IL17 AUMENTA A LIBERTAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO BASAL  
E INDUZIDA POR IL-1 $\alpha$

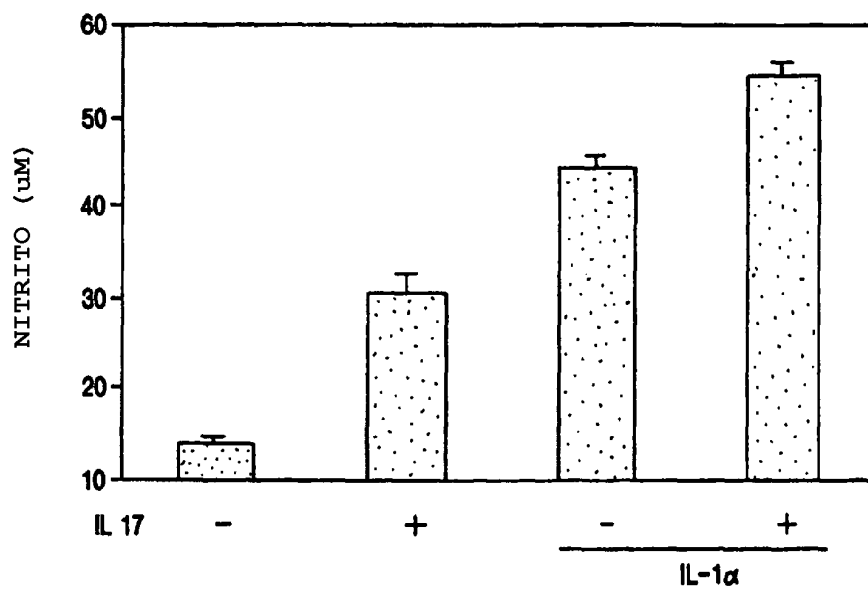


FIG. 14

INIBIÇÃO DA LIBERTAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NÃO BLOQUEIA OS  
EFEITOS PREJUDICIAIS DA IL17 SOBRE A QUEBRA OU A  
SÍNTESE DE MATRIZ

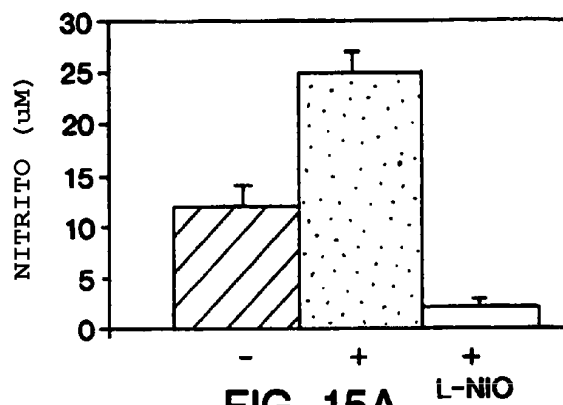


FIG. 15A

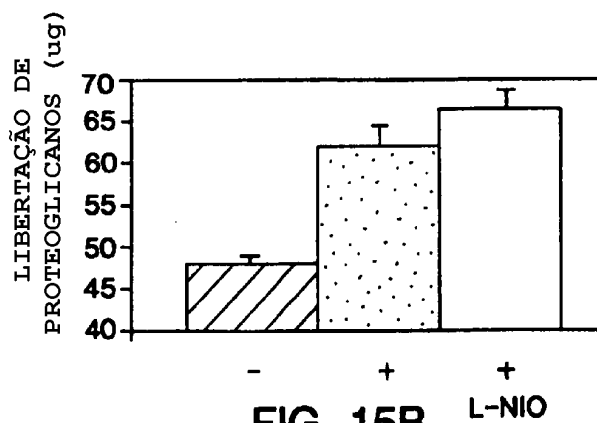


FIG. 15B

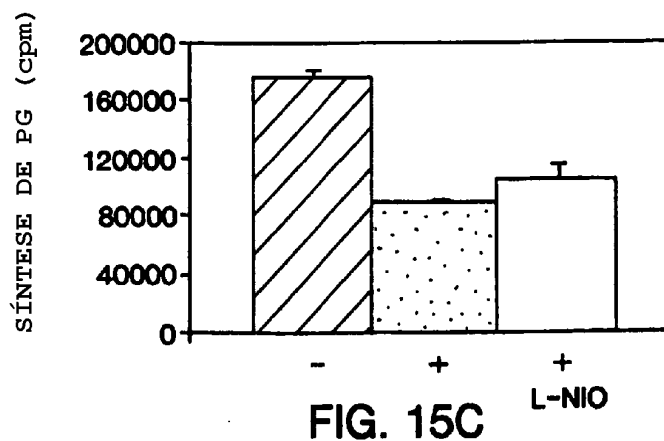


FIG. 15C

INIBIÇÃO DE AUSÊNCIA DE LIBERTAÇÃO AUMENTA A QUEBRA DE  
MATRIZ INDUZIDA POR IL-1 $\alpha$  MAS NÃO A SÍNTESE DE MATRIZ

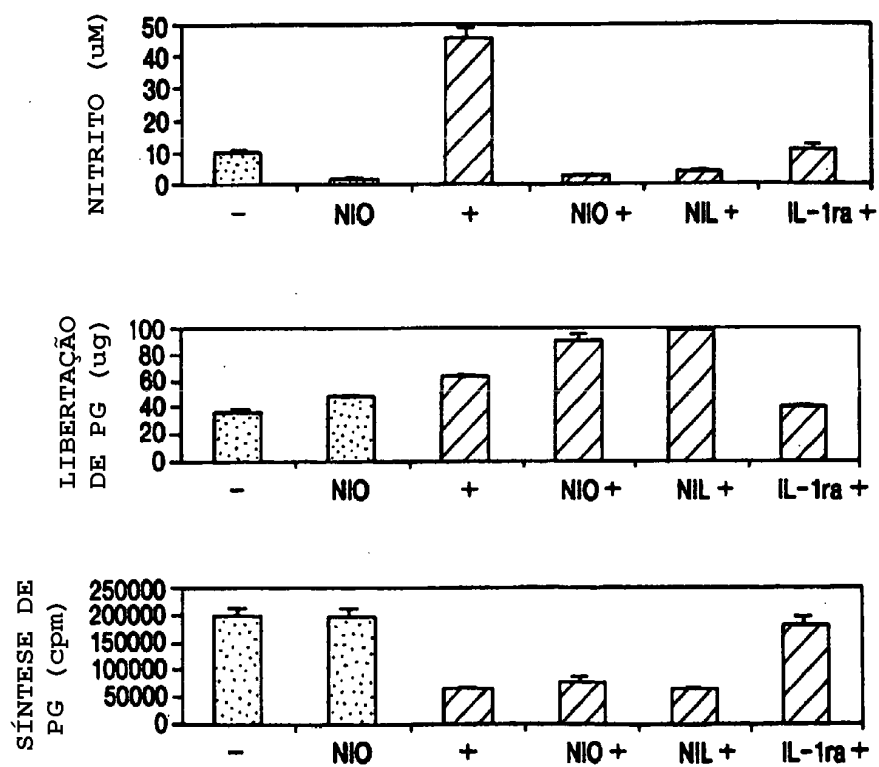


FIG. 16

HOMÓLOGO 1 DE IL 17 (UNQ 516) TEM EFEITOS POSITIVOS  
SOBRE A CARTILAGEM ARTICULAR

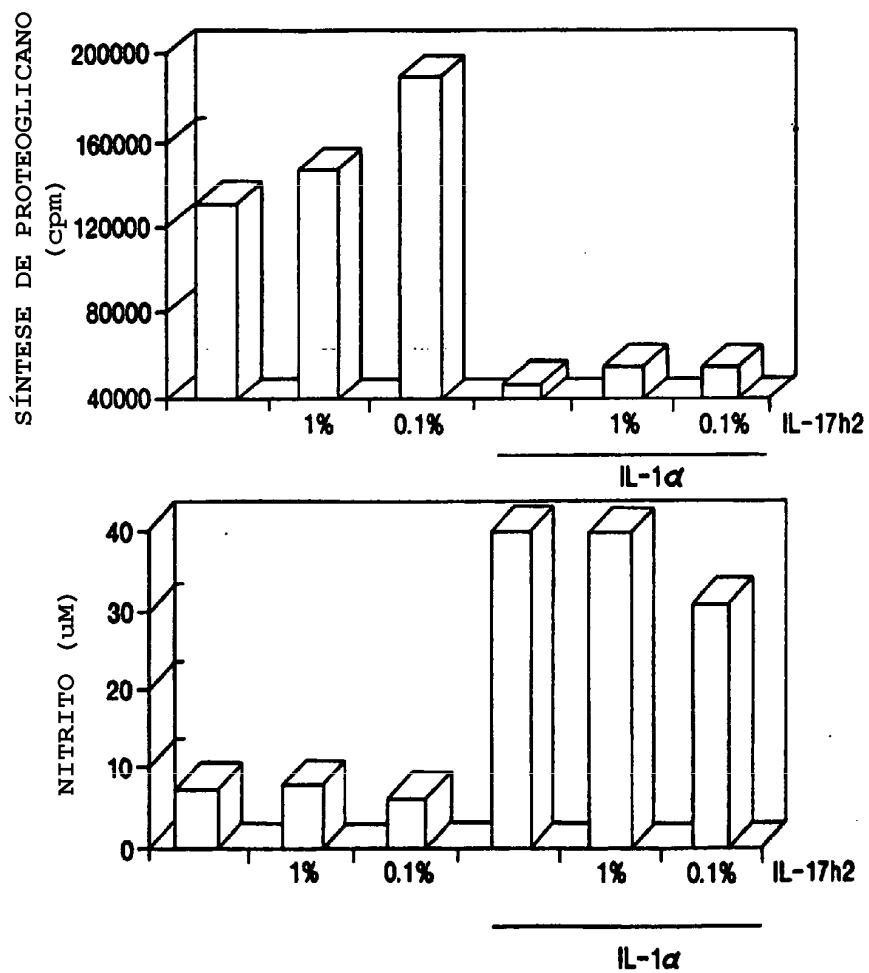


FIG. 17

HOMÓLOGO DE IL 17 (UNQ 561) TEM EFEITOS  
PREJUDICIAIS SOBRE A CARTILAGEM ARTICULAR

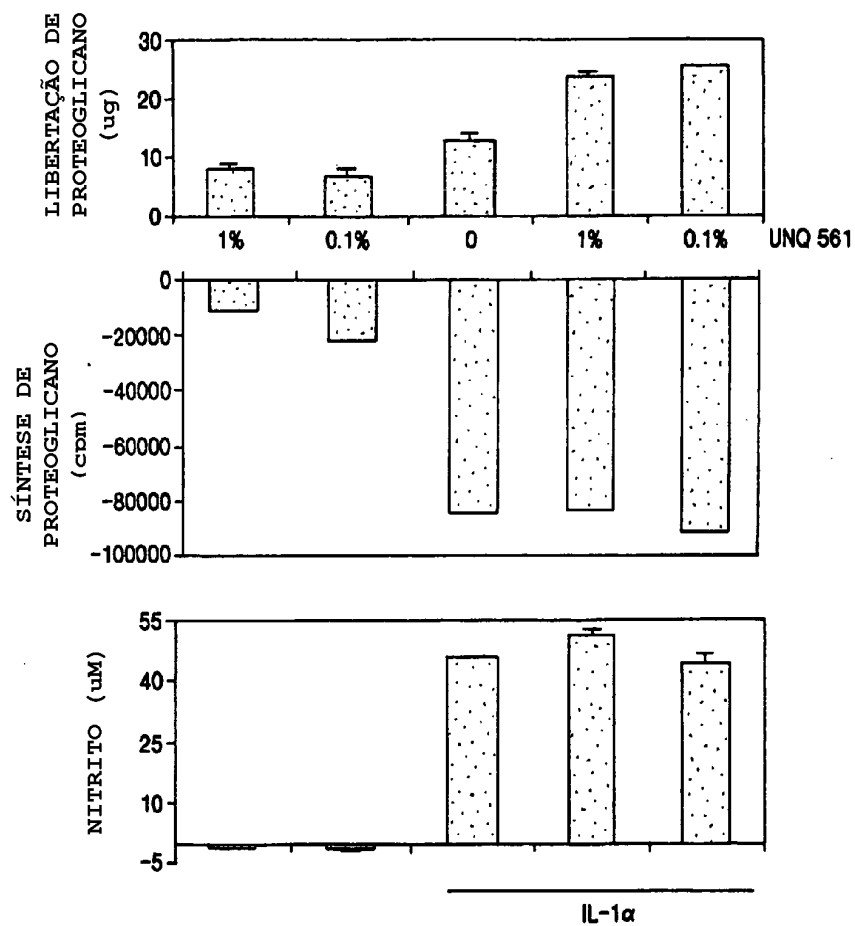


FIG. 18