



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

(21) **PI 0712830-4 A2**

(22) Data de Depósito: 13/06/2007
(43) Data da Publicação: 24/07/2012
(RPI 2168)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 15/12

(54) Título: FAMÍLIA GÊNICA (LBFL313) ASSOCIADA AO CANCER PANCREÁTICO

(30) Prioridade Unionista: 14/06/2006 KR 10-2006-0053629

(73) Titular(es): LG Life Sciences Ltd.

(72) Inventor(es): Eui-Chul Park, Sang-Seok Koh, Si-Young Song, Sun-A Kim, Sun-Bok Jeon, Yang-Soon Lee, Young-Gu Kim

(74) Procurador(es): Tavares Propriedade Intelectual Ltda

(86) Pedido Internacional: PCT KR2007002848 de 13/06/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/145466de 21/12/2007

(57) Resumo: FAMÍLIA GÊNICA (LBFL313) ASSOCIADA AO CÂNCER PANCREÁTICO. A invenção refere-se em geral a modificações na expressão gênica no adenocarcinoma pancreático humano. A invenção refere de forma específica a uma família de genes humanos que é expressa diferencialmente em tecidos pancreáticos cancerosos comparado aos tecidos pancreáticos não-cancerosos correspondentes.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção
para “**FAMÍLIA GÊNICA (LBFL313) ASSOCIADA AO
CANCER PANCREÁTICO**”.

| Campo Técnico |

5 A presente invenção refere-se às alterações na
expressão gênica nos tecidos do câncer pancreático de pacientes
com câncer pancreático. A invenção refere-se especificamente a
um gene humano que é expresso diferencialmente em tecidos do
câncer pancreático comparado aos tecidos pancreáticos normais
10 correspondentes, e em outros neoplasmas malignos.

| Estado da Técnica |

O câncer pancreático, a quarta causa principal
de morte por câncer em homens e mulheres, é uma grande
questão de saúde no mundo desenvolvido e está associada a um
15 prognóstico extremamente ruim (Faint *e col.* (2004) *Datamonitor*
DMHC2045; Garcea *e col.* (2005) *Pancreatology* 5:514-529;
Kern *e col.* (2002) *Cancer Biol Therapy* 1:607-613; Laheru and
Jaffee (2005) *Nature Rev Cancer* 5: 59-467; Li *e col.* (2004)
Lancet 363:1049-1057). Estima-se que aproximadamente 30.000
20 americanos desenvolvam e morrem desta doença a cada ano.
Apesar do controle médico e cirúrgico ostensivo, a expectativa
média de vida é de cerca de 15 a 18 meses para pacientes com
doença local e regional, e 3 a 6 meses para pacientes com doença
metastática. Quase 100% dos pacientes com câncer pancreático
25 desenvolvem metástases e morrem por causa dos efeitos
metabólicos do seu crescimento desenfreado e a sobrevida geral

de cinco anos para os grupos de pacientes que não se submetem a procedimentos de ressecção é claramente menor do que cinco por cento. Ele é particularmente agressivo com sintomas iniciais não-específicos e de difícil diagnóstico precoce. Os métodos de
5 detecção precoce do câncer pancreático estão sob desenvolvimento, mas ainda não existem na prática e as terapias convencionais para o câncer têm pouco impacto sobre o resultado do prognóstico ou doença. O prognóstico insatisfatório do câncer pancreático pode ser atribuído a sua tendência de aparição tardia,
10 invasão local agressiva, metástase precoce e resposta insatisfatória à quimioterapia.

Como muitas outras doenças malignas, o câncer pancreático resulta do acúmulo de mutações adquiridas. Várias alterações genéticas e epigenéticas, inclusive a ativação dos
15 protooncogenes, a inativação de genes supressores tumorais e anormalidades dos genes de manutenção estão envolvidas no desenvolvimento, crescimento contínuo e metástase do câncer pancreático. Acredita-se que as mutações acumuladas em tais genes ocorram em um curso de tempo previsível durante estágios
20 de “PanINs” (Neoplasia Intraepitelial Pancreática) (Hruban *e col.* (2000) *Clin Cancer Res* 6:2969-2972; Kern *e col.* (2002) *Cancer Biol Therapy* 1:607-613; Li *e col.* (2004) *Lancet* 363:1049-1057). A mutação de K-ras ocorre na metade na PanIN-1. O estágio PanIN-2 é marcado por alterações adicionais e pelo aumento na
25 taxa de mutações em K-ras e pela aparição de numerosas anormalidades em p16, e a superexpressão da proteína p53, que

pode indicar a presença de mutações em p53, aparece ocasionalmente nas PanINs mais avançadas. A perda dos genes supressores tumorais TP53, DPC4 e BRCA2 parece ocorrer tardiamente no desenvolvimento da neoplasia pancreática, PanIN-3.

5 Mais de 85% dos cânceres ductais pancreáticos possuem uma mutação pontual de ativação, o gene K-ras no desenvolvimento do câncer pancreático (Li *e col.* (2004) *Lancet* 363:1049-1057; Xiong (2004) *Cancer Chem Pharm* 54:S69-77). A mutação de K-ras resulta na ativação constitutiva de uma via de
10 sinalização intracelular, Ras-Raf-MEK-ERK, levando à proliferação celular e, dessa forma, conferindo propriedades transformadoras às células contendo mutações pontuais neste gene. A mutação de Ras não está associada ao estágio ou prognóstico do tumor, indicando que o oncogene K-ras pode estar
15 relacionado à iniciação da carcinogênese, mas não está ligado ao potencial maligno ou desenvolvimento do câncer pancreático humano. Um dos principais alvos a jusante da família Ras é a fosfoinositol 3 quinase (PI3K). A ativação da PI3K está envolvida na resistência do câncer pancreática à apoptose induzida por
20 agentes direcionadores quimioterapêuticos ou moleculares.

A inativação do gene supressor tumoral p16 parece ocorrer um pouco depois. O gene p16 é inativo em praticamente todos os adenocarcinomas ductais por mutação, deleção homozigótica ou silenciamento transcricional associado à
25 metilação do promotor (Kern *e col.* (2002) *Cancer Biol Therapy* 1:607-613; Maitra *e col.* (2006) *Best Pract Res Clin*

Gastroenterol 20:211-226). A proteína p16 regula o ciclo celular através da via p16/Rb, portanto, a inativação genética do gene p16 significa que um regulador essencial do ciclo celular é perdido no câncer pancreático. É interessante notar que as mutações hereditárias no gene p16 são uma causa da síndrome do melanoma múltiplo familiar atípico (FAMMM), e os pacientes com FAMMM apresentam maior risco de desenvolver melanoma e câncer pancreático.

A inativação do gene TP53 quase sempre ocorre por uma mutação intragênica em um alelo, somado à perda do segundo alelo (Maitra *e col.* (2006) *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 20:211-226). O mau funcionamento de p53 significa que dois controles essenciais do número celular, o ponto de verificação do ciclo celular G1/S e a manutenção da paragem de G2/M, são desregulados na maioria dos cânceres pancreáticos.

O gene DPC4, também chamado de SMAD4, é inativado geneticamente em quase metade dos cânceres pancreáticos, em 35% por deleção homozigótica, e em 20% por uma mutação intragênica junto com a perda do alelo remanescente (Maitra *e col.* (2006) *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 20:211-226; Wilentz *e col.* (2000) *Am J Pathol* 156:37-43). No entanto, a inativação genética de DPC4 só aparece raramente em outros tipos de tumores. A proteína dpc4 desempenha papel fundamental na sinalização e no controle do crescimento através da via TGF-B.

O gene BRCA2, relacionado ao reparo do DNA, só é almejado em uma pequena porcentagem (~10%) do câncer pancreático, mas causa a agregação familiar do câncer pancreático (Maitra *e col.* (2006) *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 20:211-226; Murphy *e col.* (2002) *Cancer Res* 62:3789-3793). Os portadores de um único par de bases do gene BRCA2 (chamado de mutação do gene 6174delT BRCA2) têm dez vezes mais chances de desenvolver câncer pancreático.

O fator nuclear κB (NF- κB), um fator de transcrição que existe predominantemente como heterodímero p65 (RelA)/p50, também é considerado um dos genes relacionados ao câncer pancreático (Garcea *e col.* (2005) *Pancreatology* 5:514-529; Xiong (2004) *Cancer Chem Pharm* 54:S69-77). RelA, a subunidade p65 de NF- κB , é ativado constitutivamente em cerca de 67% dos adenocarcinomas pancreáticos, mas não nos tecidos pancreáticos saudáveis, e I $\kappa B\alpha$ é superexpresso em tecidos tumorais pancreáticos humanos e em linhagens celulares. A ativação constitutiva de RelA parece estar correlacionada com a via de sinalização a montante, tal como Ras, em células tumorais pancreáticas. Foi sugerido que NF- κB desempenha um papel importante na resistência tumoral à apoptose induzida por agentes citotóxicos no câncer pancreático. Outros resultados também afirmam que o mecanismo principal pelo qual NF- κB parece promover o crescimento das células pancreáticas se dá pela inibição da apoptose.

Persiste na técnica a necessidade de materiais e métodos que possibilitem um diagnóstico mais preciso do adenocarcinoma pancreático. Além disso, há na técnica a necessidade de métodos para tratamento e métodos para
5 identificação de agentes que possam tratar de maneira eficaz esta doença. A presente invenção vai de encontro a essas e outras necessidades.

| Revelação |

| Problema Técnico |

10 A presente invenção propõe um material e um método para o diagnóstico exato do adenocarcinoma pancreático.

A presente invenção também propõe um método de tratamento capaz de tratar o adenocarcinoma pancreático de maneira eficaz.

15 | Solução Técnica |

A presente invenção se baseia em um novo gene (daqui em diante chamado de “LBFL313”) que é expresso diferencialmente em tecidos do adenocarcinoma pancreático comparado aos tecidos pancreáticos normais. A invenção propõe
20 (a) uma molécula de ácido nucléico isolada compreendendo a SEQ ID NO: 1,, (b) uma molécula de ácido nucléico isolada codificando a SEQ ID NO: 2, (c) uma molécula de ácido nucléico isolada apresentando pelo menos 95% de identidade de sequência de nucleotídeos com a SEQ ID NO: 1 e (d) uma molécula de
25 ácido nucléico isolada compreendendo seu complemento.

A presente invenção prevê ainda as moléculas de ácido nucléico operavelmente ligadas a um ou mais elementos de controle de expressão, incluindo vetores compreendendo as moléculas de ácido nucléico isoladas. A invenção também prevê células hospedeiras transformadas para conter as moléculas de ácido nucléico da invenção e métodos para produzir uma proteína compreendendo a etapa de cultivar uma célula hospedeira transformada com uma molécula de ácido nucléico da invenção sob condições na qual a proteína é expressa.

10 A invenção prevê também um polipeptídio ou proteína isolada compreendendo a seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 ou apresentando ao menos 95% de identidade de seqüência de aminoácidos com a SEQ ID NO: 2.

A invenção também oferece métodos para 15 identificar um agente que modula a expressão de uma molécula de ácido nucléico codificando uma proteína da invenção.

A invenção também oferece métodos para identificar um agente que modula o nível de, ou pelo menos uma atividade de uma proteína da invenção.

20 A invenção também oferece métodos para modular a expressão de uma molécula de ácido nucléico codificando uma proteína da invenção.

A invenção também propõe métodos para identificar parceiros de ligação para uma proteína da invenção.

25 A presente invenção também proporciona métodos para identificar agentes que possam bloquear ou modular

a associação de uma proteína da invenção com um parceiro de ligação.

A presente invenção também proporciona métodos para reduzir ou bloquear a associação de uma proteína da invenção com um ou mais de seus parceiros de ligação.

A presente invenção também prevê animais transgênicos não-humanos modificados para conter as moléculas de ácido nucléico da invenção, ou animais transgênico não-humanos modificados para conter as moléculas de ácido nucléico mutadas de modo que a expressão dos polipeptídios codificados da invenção seja impedida.

A presente invenção também prevê animais transgênicos não-humanos em que todo ou uma parte de um gene compreendendo toda ou uma parte da SEQ ID NO: 1 foi nocauteada ou deletada no genoma do animal.

A invenção também prevê composições compreendendo um diluente e um polipeptídio ou proteína, em que o polipeptídio ou proteína compreende a seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 ou apresenta ao menos 95% de identidade de seqüência de aminoácidos com a SEQ ID NO: 2.

Os genes e proteínas da invenção podem ser usados como agentes de diagnóstico ou marcadores para detectar o câncer pancreático ou para diferenciar o adenocarcinoma pancreático do tecido normal em uma amostra. Eles também podem servir de alvo para agentes que modulam a expressão ou atividade gênica. Por exemplo, podem ser identificados agentes

que modulam processos biológicos associados ao crescimento tumoral, inclusive o processo hiperplásico do câncer pancreático.

A. Proteínas Associadas ao Câncer Pancreático

A presente invenção proporciona proteínas isoladas, variantes alélicas das proteínas e substituições de aminoácidos conservadoras das proteínas. Como utilizado em todo o texto, “proteína” ou “polipeptídio” refere-se, em parte, a uma proteína que possui a seqüência de aminoácidos humana representada na SEQ ID NO: 2. Esses termos também se referem a variantes alélicas e proteínas de ocorrência natural que possuem uma seqüência de aminoácidos ligeiramente diferente da mencionada especificamente acima. As variantes alélicas, apesar de possuírem uma seqüência de aminoácidos um pouco diferente das mencionadas acima, ainda terão funções biológicas iguais ou similares associadas a essas proteínas.

Como usado na presente invenção, a família de proteínas relacionada à seqüência de aminoácidos humana da SEQ ID NO: 2 refere-se a proteínas que foram isoladas de organismos em adição a humanos. Os métodos utilizados para identificar e isolar outros membros da família de proteínas relacionados a essas proteínas são descritos adiante.

As proteínas da presente invenção são, de preferência, na forma isolada. Como utilizado na presente invenção, diz-se que uma proteína está isolada quando métodos físicos, mecânicos ou químicos são empregados para remover a proteína dos constituintes celulares que são normalmente

associados à proteína. Qualquer conhecedor da técnica pode empregar sem dificuldades métodos de purificação convencionais para obter uma proteína isolada.

As proteínas da presente invenção também
5 incluem inserção, deleção ou variantes de substituição conservadoras de aminoácidos da SEQ ID NO: 2. Como utilizado na invenção, uma variante conservadora refere-se a alterações na seqüência de aminoácidos que não afetam de maneira adversa as funções biológicas da proteína. Diz-se que uma substituição,
10 inserção ou deleção afeta de maneira adversa a proteína quando a seqüência alterada impede ou perturba uma função biológica associada à proteína. Por exemplo, a carga geral, estrutura ou as propriedades hidrófobas/hidrófilas da proteína, em certos casos, podem ser alteradas sem afetar de maneira adversa uma atividade
15 biológica. Logo, a seqüência de aminoácidos pode ser alterada, por exemplo, para tornar o peptídeo mais hidrófobo ou hidrófilo, sem afetar de maneira adversa as atividades biológicas da proteína.

Normalmente, as variantes alélicas, as variantes
20 de substituição conservadores e os membros da família de proteínas terão uma seqüência de aminoácidos com pelo menos cerca de 50%, 60%, 70% ou 75% de identidade de seqüência de aminoácidos com a seqüência apresentada na SEQ ID NO: 2, mais preferencialmente pelo menos cerca de 80 a 90%, ainda mais
25 preferencialmente pelo menos cerca de 92-94%, e o mais preferível, pelo menos cerca de 95%, 98% ou 99% de identidade

de seqüência. A identidade ou homologia com respeito a tais seqüências é definida aqui como a porcentagem de resíduos de aminoácidos nas seqüências candidatas que são idênticas à SEQ ID NO: 2, após alinhar as seqüências e introduzir intervalos, se necessário, para obter a homologia percentual máxima, e sem considerar quaisquer substituições conservadoras como parte da identidade de seqüência (vide a seção B para parâmetros relevantes). As proteínas de fusão, ou extensões, deleções ou inserções N-terminais, C-terminais ou internas na seqüência de peptídeos não devem ser interpretadas como se afetassem a homologia.

Sendo assim, as proteínas da presente invenção incluem moléculas tendo a seqüência de aminoácidos revelada na SEQ ID NO: 2; fragmentos desta tendo uma seqüência consecutiva de pelo menos cerca de 3, 4, 5, 6, 10, 15, 20, 25, 30, 35 ou mais resíduos de aminoácidos dessas proteínas; variantes de seqüências de aminoácidos, em que um ou mais resíduos de aminoácidos foram inseridos em N- ou C-terminal na ou dentro da seqüência de codificação revelada; e variantes de seqüência de aminoácidos da seqüência revelada, ou seus fragmentos conforme definido acima, que foram substituídos por pelo menos um resíduo. Tais fragmentos, também chamados de peptídeos ou polipeptídios, podem conter regiões antigênicas, regiões funcionais da proteína identificadas como regiões da seqüência de aminoácidos que corresponde a domínios de proteína conhecidos, bem como regiões de hidrofília acentuada. Todas as regiões são

facilmente identificáveis pelo uso de um software de análise de sequência de proteína normalmente encontrado no mercado, como o MacVector (Oxford Molecular).

Variantes contempladas adicionalmente incluem as que contêm mutações predeterminadas, por exemplo, por recombinação homóloga, mutagênese direcionada ao sítio ou por PCR, e as proteínas correspondentes de outras espécies animais, incluindo mas sem se limitar a coelho, camundongo, rato, suínos, bovinos, ovinos, eqüinos e espécies primatas não-humanas, e os alelos ou outras variantes de ocorrência natural da família das proteínas; e derivados, sendo que a proteína foi modificada de forma covalente por substituição, meios químicos, enzimáticos ou outros meios apropriados com outro grupamento que não um aminoácido de ocorrência natural (por exemplo, um grupamento detectável, tal como uma enzima ou radioisótopo).

A presente invenção também proporciona composições que compreendem uma proteína ou polipeptídio da invenção, e um diluente. Diluentes adequados podem ser solventes aquosos ou não aquosos ou uma combinação destes, e podem compreender componentes adicionais, por exemplo, sais hidrossolúveis ou glicerol, que contribuem para a estabilidade, solubilidade, atividade e/ou estocagem da proteína ou polipeptídio.

Como descrito abaixo, podem ser usados membros da família de proteínas: (1) para identificar agentes que modulam o nível de ou em pelo menos uma atividade da proteína,

(2) para identificar parceiros de ligação para a proteína, (3) como antígeno para gerar anticorpos policlonais ou monoclonais, (4) como agente terapêutico ou alvo e (5) como agente de diagnóstico ou marcador de câncer pancreático e outras doenças hiperplásicas.

5 B. Moléculas de Ácido Nucléico

A presente invenção também proporciona moléculas de ácido nucléico que codificam a proteína tendo a SEQ ID NO: 2 e as proteínas relacionadas descritas neste documento, de preferência na forma isolada. Como utilizado na
10 presente invenção, “ácido nucléico” refere-se ao RNA ou DNA que codifica uma proteína ou peptídeo conforme definido acima, é complementar a uma seqüência de ácidos nucléicos codificando tais peptídeos, se hibridiza para o ácido nucléico da SEQ ID NO: 1 e permanece ligado de maneira estável a ele sob condições de
15 estringência apropriadas, codifica um polipeptídio compartilhando pelo menos cerca de 50%, 60%, 70% ou 75%, de preferência pelo menos cerca de 80-90%, mais preferencialmente pelo menos cerca de 92-94%, e o mais preferível, pelo menos cerca de 95%, 98%, 99% ou mais de identidade com a seqüência
20 de peptídeos da SEQ ID NO: 2 ou apresenta pelo menos 50%, 60%, 70% ou 75%, de preferência pelo menos cerca de 80-90%, mais preferencialmente pelo menos cerca de 92-94%, e ainda mais preferencialmente pelo menos cerca de 95%, 98%, 99% ou mais de identidade de seqüência de nucleotídeos ao longo dos
25 quadros de leitura abertos da SEQ ID NO: 1.

A presente invenção adicionalmente inclui moléculas de ácido nucléico isoladas que se hibridizam especificamente para o complemento da SEQ ID NO: 1, particularmente moléculas que se hibridizam especificamente ao longo dos quadros de leitura abertos. Tais moléculas que se hibridizam especificamente para o complemento da SEQ ID NO: 1 tipicamente não o fazem sob condições estringentes de hibridização.

Contemplam-se especificamente o DNA genômico, DNAc, RNAm e moléculas de sentido negativo, bem como ácidos nucléicos baseados em estruturas alternativas ou incluindo bases alternativas, quer derivados de origens naturais ou sintetizados. Tais ácidos nucléicos hibridizantes ou complementares, no entanto, são também definidos como sendo novos e não óbvios em relação a qualquer ácido nucléico do estado da técnica incluindo aquele que codifica, se hibridiza sob condições de estringência apropriada, ou é complementar ao ácido nucléico codificando uma proteína de acordo com a presente invenção.

A homologia ou identidade no nível da seqüência de nucleotídeos ou aminoácidos é determinada pela análise BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) usando o algoritmo empregado pelos programas blastp, blastn, blastx, tblastn e tblastx (Altschul *e col.* (1997), *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402, e Karlin *e col.* (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2264-2268, ambos incorporados na íntegra por referência) que são

adaptados para a pesquisa de similaridade entre seqüências. A abordagem utilizada pelo programa BLAST consiste primeiramente em considerar segmentos similares, com e sem intervalos, entre uma seqüência de consulta e uma seqüência de base de dados, e depois avaliar a significância estatística de todas as correspondências que são identificadas e finalmente resumir apenas as correspondências que satisfazem a um limiar pré-selecionado de significância. Para uma discussão sobre as questões básicas na pesquisa de similaridade das bases de dados de seqüências, consulte Altschul *e col.* (1994), *Nat. Genet.* 6: 119-129, que é incorporado na íntegra por referência. Os parâmetros de pesquisa para histograma, descrições, alinhamentos, suposição (isto é, limiar de significância estatística para relatar correspondências em seqüências da base de dados), corte, matriz e filtro (baixa complexidade) estão nas configurações padrão. A matriz de pontuação padrão utilizada por blastp, blastx, tblastn, e tblastx é a matriz BLOSUM62 (Henikoff *e col.* (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915-10919, incorporada na íntegra por referência), recomendada para seqüências de consulta de aproximadamente 85 nucleotídeos ou aminoácidos de comprimento.

Para blastn, a matriz de pontuação é definida pelas razões de M (isto é, a pontuação de recompensa para um par de resíduos correspondentes) para N (isto é, a pontuação de penalidade para resíduos desalinhados), sendo que os valores padrão para M e N são 5 e -4, respectivamente. Quatro

parâmetros de blastn foram ajustados como segue: Q=10 (penalidade de criação de gap); R=10 (penalidade por extensão de gap); wink=1 (gera resultados de palavra a cada posição “wink”); e gapw=16 (define a largura de janela dentro da qual os alinhamentos com gap são gerados). As configurações do parâmetro de Blastp equivalentes foram Q=9; R=2; wink=1; e gapw=32. Uma comparação de melhor ajuste entre as seqüências, disponível no pacote GCG versão 10.0, utiliza parâmetros do DNA GAP=50 (penalidade por criação de gap) e LEN=3 (penalidade por extensão de gap) e as configurações equivalentes em comparações entre proteínas são GAP=8 e LEN=2.

As “condições de estringência” são aquelas que (1) empregam baixa força iônica e alta temperatura para lavagem, por exemplo, 0,015 M NaCl/0,0015 M citrato de sódio/SDS a 0,1% a 50°C, ou (2) que empregam, durante a hibridização, um agente desnaturante, tal como formamida, por exemplo, formamida a 50% (vol/vol) com soroalbumina bovina a 0,1%/Ficoll a 0,1%/polivinilpirrolidona a 0,1%/50 mM tampão fosfato de sódio ao pH 6,5 com 750 mM NaCl, 75 mM citrato de sódio a 42 °C. Outro exemplo é a hibridização em formamida 50%, 5× SSC (0,75 M NaCl, 0,075 M citrato de sódio), 50 mM fosfato de sódio (pH 6,8), pirofosfato de sódio a 0.1%, 5× solução de Denhardt, DNA de espermatozoides de salmão sonificado (50 µg/mL), SDS a 0,1%, e sulfato de dextrano a 10% a 42 °C, com lavagens a 42 °C em 0,2× SSC e SDS a 0,1%. Os versados na técnica poderão determinar imediatamente e variar as condições de

estringência conforme apropriado para obter um sinal de hibridização claro e detectável. Moléculas preferidas são aquelas que se hibridizam sob as condições acima para o complemento da SEQ ID NO: 1 e que codificam uma proteína funcional ou de
5 sequência completa. Moléculas de hibridização ainda mais preferidas são aquelas que se hibridizam sob as condições acima para o filamento de complemento do quadro de leitura aberto da SEQ ID NO: 1.

Como utilizado na presente invenção, diz-se que
10 uma molécula de ácido nucléico está "isolada" quando a molécula de ácido nucléico é substancialmente separada das moléculas de ácido nucléico contaminantes codificando outros polipeptídios

A presente invenção também proporciona fragmentos das moléculas de ácido nucléico reveladas. Como
15 utilizado neste documento, um fragmento de uma molécula de ácido nucléico se refere a uma pequena parte da sequência codificadora ou não-codificadora. O tamanho do fragmento será determinado pelo uso a que se destina. Por exemplo, se o fragmento for escolhido de forma a codificar uma parte ativa da
20 proteína, o fragmento precisará ser suficientemente grande para codificar a(s) região(ões) funcional(is) da proteína. Por exemplo, podem ser preparados fragmentos que codificam peptídeos correspondendo a regiões antigênicas previstas. Se o fragmento for utilizado como uma sonda de ácido nucléico ou iniciador
25 PCR, então o comprimento do fragmento é escolhido de forma a

obter um número relativamente pequeno de falsos positivos durante a sondagem/iniciação (vide a discussão na Seção G).

Os fragmentos das moléculas de ácido nucléico da presente invenção (isto é, oligonucleotídeos sintéticos) que são
5 usados como sondas ou iniciadores específicos para a reação em cadeia da polimerase (PCR), ou para sintetizar seqüências gênicas codificando as proteínas da invenção, podem ser facilmente sintetizados por técnicas químicas, por exemplo, o método de fosforamidita de Matteucci *e col.*, ((1981) *J. Am. Chem. Soc.* 103:
10 3185-3191) ou usando métodos de síntese automatizados. Além disso, segmentos maiores de DNA podem ser rapidamente preparados por métodos bem conhecidos, tal como a síntese de um grupo de oligonucleotídeos que definem vários segmentos modulares do gene, seguido da ligação dos oligonucleotídeos para
15 construir o gene modificado completo.

As moléculas de ácido nucléico da presente invenção também podem ser modificadas de modo a conter uma marca detectável para fins de diagnóstico e sondagem. Várias dessas marcas são conhecidas na técnica e podem ser empregadas
20 facilmente com as moléculas de codificação descritas neste documento. Marcas adequadas incluem, sem a isto se limitar, biotina, nucleotídeos radiomarcados ou marcados com fluorescência, entre outros. Os versados na técnica poderão empregar de imediato qualquer marca desse tipo para obter
25 variantes marcadas das moléculas de ácido nucléico da invenção.

C. Isolamento de Outras Moléculas de Ácido Nucléico Relacionadas

Como descrito acima, a identificação e caracterização da molécula de ácido nucléico tendo a SEQ ID NO: 1 permite aos versados na técnica isolarem as moléculas de ácido nucléico que codificam outros membros da família de proteína além das seqüências descritas nesta invenção. Além disso, as moléculas de ácido nucléico presentemente reveladas permitem que os versados na técnica isolem as moléculas de ácido nucléico que codificam outros membros da família de proteínas além das proteínas tendo a SEQ ID NO: 2.

Por exemplo, os versados na técnica podem utilizar prontamente a seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 para gerar sondas de anticorpo para examinar as bibliotecas de expressão preparadas a partir de células apropriadas. Tipicamente, o antisoro policlonal de mamíferos, como coelhos imunizados com a proteína purificada (como descrito acima) ou anticorpos monoclonais, pode ser usado para sondar um DNAC de mamífero ou biblioteca de expressão genômica, como a biblioteca gt11 lambda, para obter a seqüência de codificação apropriada para outros membros da família de proteínas. A seqüência de DNAC clonada pode ser expressa como uma proteína de fusão, expressa diretamente usando suas próprias seqüências de controle, ou expressa por construções que utilizam seqüências de controle apropriadas ao hospedeiro específico usado para a expressão da enzima.

Como alternativa, uma parte da seqüência de codificação descrita na presente invenção pode ser sintetizada e usada como uma sonda para recuperar o DNA codificando um membro da família de proteínas de qualquer organismo mamífero.

5 Oligômeros contendo aproximadamente 18-20 nucleotídeos (codificando uma extensão de cerca de 6-7 aminoácidos) são preparados e usados para examinar bibliotecas genômicas de DNA ou DNAc para obter hibridização sob condições de estringência ou condições de estringência suficiente para eliminar

10 um nível inadequado de falsos positivos.

Além disso, pares de oligonucleotídeos iniciadores podem ser preparados para uso na PCR para clonar seletivamente uma molécula de ácido nucléico codificadora. Um ciclo de desnaturação/anelamento/extensão PCR para uso de tais

15 iniciadores PCR é bem conhecido na técnica e podem ser adaptado facilmente para no isolamento de outras moléculas de ácido nucléico codificadoras.

Moléculas de ácido nucléico codificando outros membros da família de proteínas também podem ser identificadas

20 na genômica existente ou em outras informações de seqüência usando qualquer método computacional disponível, incluindo mas sem a isto se limitar: PSI-BLAST (Altschul *e col.* (1997), *Nucl. Acids Res.* 25: 3389-3402); PHI-BLAST (Zhang *e col.* (1998), *Nucl. Acids Res.* 26: 3986-3990), 3D-PSSM (Kelly *e col.* (2000),

25 *J. Mol. Biol.* 299: 499-520); e outros métodos de análise computacionais (Shi *e col.* (1999), *Biochem. Biophys. Res.*

Commun. 262: 132-138 and Matsunami *et. al.* (2000), *Nature* 404: 601-604).

D. moléculas de rDNA Contendo uma Molécula de Ácido Nucléico

5 A presente invenção também proporciona moléculas de DNA recombinante (rDNAs) que contêm uma sequência de codificação. Como usado na presente invenção, uma molécula de rDNA é uma molécula de DNA que foi submetida à manipulação molecular *in situ*. Métodos para gerar
10 moléculas de rDNA são bem conhecidos na técnica, por exemplo, vide Sambrook *e col.*, Molecular Cloning- A Laboratory Manual, Third Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001. Nas moléculas de rDNA preferidas, uma sequência de DNA codificadora é operavelmente ligada a
15 seqüências de controle de expressão e/ou seqüências vetoriais.

A escolha das seqüências de controle de vetor e/ou expressão às quais uma das seqüências codificadoras da família de proteínas da presente invenção é operavelmente ligada depende diretamente, como é sabido na técnica, das propriedades
20 funcionais desejadas, por exemplo, expressão protéica, e da célula hospedeira a ser transformada. Um vetor contemplado pela presente invenção é ao menos capaz de direcionar a replicação ou inserção no cromossomo hospedeiro, e de preferência também a expressão do gene estrutural incluso na molécula de rDNA.

25 Elementos de controle de expressão utilizados para regular a expressão de uma seqüência codificadora de

proteína operavelmente ligada são conhecidos na técnica e incluem, sem a isto se limitar, promotores induzíveis, promotores constitutivos, sinais de secreção e outros elementos reguladores. De preferência, o promotor induzível é controlado prontamente, por exemplo, sendo responsivo a um nutriente no meio da célula hospedeira.

Em uma concretização, o vetor contendo uma molécula de ácido nucléico codificadora irá incluir um replicon procariótico, isto é, uma seqüência de DNA com a capacidade de 10 direcionar a replicação autônoma e a manutenção da molécula de DNA recombinante de maneira extracromossômica em uma célula hospedeira procariótica, tal como uma célula hospedeira bacteriana, transformada com ela. Tais replicons são bem conhecidos na técnica. Além disso, vetores que incluem um 15 replicon procariótico também podem incluir um gene cuja expressão confere um marcador detectável, tal como uma resistência a um fármaco. Genes de resistência a fármaco bacterianos típicos são aqueles que conferem resistência à ampicilina, canamicina, cloramfenicol ou tetraciclina.

20 Vetores que incluem um replicon procariótico podem adicionalmente incluir um promotor procariótico ou bacteriófago capaz de direcionar a expressão (transcrição e tradução) das seqüências de genes codificadoras em uma célula hospedeira bacteriana, tal como *E. coli*. Um promotor é um 25 elemento de controle de expressão formado por uma seqüência de DNA que permite que ocorra a ligação da RNA polimerase e a

transcrição. Sequências promotoras compatíveis com as células bacterianas são geralmente proporcionadas em vetores plasmídeos contendo sítios de restrição adequados para inserção de um fragmento de DNA da presente invenção. Exemplos típicos de tais plasmídeos vetoriais são o pUC8, pUC9, pBR322 e pBR329 disponibilizados pela BioRad Laboratories, (Richmond, CA), pPL e pKK223, disponibilizados pela Pharmacia (Piscataway, NJ).

Vetores de expressão compatíveis com células eucarióticas, de preferência aqueles compatíveis com células vertebradas, também podem ser utilizados para formar moléculas de rDNA que contêm uma sequência codificadora. Os vetores de expressão de célula eucariótica, incluindo vetores virais, são bem conhecidos na técnica e encontram-se disponíveis em várias fontes comerciais. Tipicamente, tais vetores são proporcionados contendo sítios de restrição adequados para inserção do segmento de DNA desejado. Exemplos típicos de tais vetores são o pSVL e pKSV-10 (Pharmacia), pBPV-1/pML2d (International Biotechnologies, Inc.), pTDT1 (ATCC, #31255), o vetor pCDM8 descrito nesta invenção, e outros vetores de expressão eucariótica similares. Os vetores podem ser modificados para incluir promotores específicos de tecidos, caso seja necessário.

Vetores de expressão de célula eucariótica usados para construir as moléculas de rDNA da presente invenção podem incluir um marcador selecionável que é eficaz em uma célula eucariótica, de preferência um marcador de seleção de

resistência a fármaco. Um marcador de resistência a fármaco preferido é o gene cuja expressão resulta em resistência à neomicina, isto é, o gene neomicina fosfotransferase (*neo*) (Southern *et al.* (1982), *J. Mol. Anal. Genet.* 1:327-341). Como
5 alternativa, o marcador selecionável pode estar presente em um plasmídeo separado, e os dois vetores são introduzidos por co-transfecção da célula hospedeira e selecionados por cultura no fármaco apropriado para o marcador selecionável.

E. Células Hospedeiras Contendo uma Molécula
10 de Ácido Nucléico Codificadora Fornecida de Forma Exógena

A presente invenção também proporciona células hospedeiras transformadas com uma molécula de ácido nucléico que codifica uma proteína da presente invenção. A célula hospedeira pode ser procariótica ou eucariótica. As células
15 eucarióticas úteis para expressão de uma proteína da invenção não são limitadas, contanto que a linhagem celular seja compatível com os métodos de cultura celular e compatível com a propagação do vetor de expressão e com a expressão do produto gênico. Células hospedeiras eucarióticas preferidas incluem, sem
20 a isto se limitar, células de levedura, insertos e de mamíferos, células preferencialmente vertebradas, como as de um camundongo, rato, macaco ou linhagem celular humana. Células hospedeiras eucarióticas preferidas incluem células do ovário de hamsters chineses (CHO) disponibilizadas pela ATCC como
25 CCL61, células de embrião de camundongos suíços NIH (NIH/3T3) disponibilizadas pela ATCCC como CRL 1658,

células do rim de hamsters bebês (BHK) e linhagens celulares de cultura de tecidos eucarióticos similares.

Qualquer hospedeiro procariótico pode ser usado para expressar uma molécula de rDNA codificando uma proteína da invenção. O hospedeiro procariótico preferido é *E. coli*.

A transformação de hospedeiros celulares apropriados com uma molécula de rDNA da presente invenção é realizada por métodos bem conhecidos que geralmente dependem do tipo de vetor utilizado e do sistema hospedeiro empregado. Com respeito à transformação das células hospedeiras procarióticas, métodos de eletroporação e tratamento com sal são normalmente empregados (vide, por exemplo, Cohen *e col.* (1972), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 2110; and Sambrook *e col., supra*). Com respeito à transformação de células vertebradas com vetores contendo rDNAs, costumam-se utilizar métodos de eletroporação, tratamento com sal ou lipídio catiônico, vide, por exemplo, Graham *e col.* (1973), *Virol.* 52: 456; Wigler *e col.* (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1373-1376.

Células transformadas com êxito, isto é, células que contêm uma molécula de rDNA da presente invenção, podem ser identificadas por técnicas bem conhecidas, incluindo a seleção para um marcador selecionável. Por exemplo, células resultando da introdução de um rDNA da presente invenção podem ser clonadas para produzir colônias únicas. As células dessas colônias podem ser colhidas, submetidas à lise e ter seu conteúdo

de DNA examinado quanto à presença do rDNA usando um método tal como o descrito por Southern, (1975) *J. Mol. Biol.* 98: 503 ou Berent *e col.*, (1985) *Biotech.* 3: 208, ou as proteínas produzidas a partir da célula ensaiada via um método imunológico. Os presentes inventores prepararam uma *Escherichia coli* DH5@/p313-JF3, e depositaram-na na Korean Collection for type Cultures do Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology em 5 de junho de 2006 (Depósito Nº KCTC 10954BP).

10 F. Produção das Proteínas Recombinantes
 usando uma Molécula de rDNA

A presente invenção também oferece métodos para produzir uma proteína da invenção usando as moléculas de ácido nucléico descritas neste documento. Em termos gerais, a
15 produção de uma forma recombinante de uma proteína geralmente envolve as seguintes etapas:

Primeiro, obtém-se uma molécula de ácido nucléico que codifica uma proteína da invenção, tal como uma molécula de ácido nucléico compreendendo, consistindo
20 essencialmente de ou consistindo da SEQ ID NO: 1, ou os nucleotídeos 53-643 ou 53-640 da SEQ ID NO: 1. Se a seqüência de codificação não for interrompida por íntrons, como são esses quadros de leitura abertos, ela é diretamente adequada para expressão em qualquer hospedeiro.

25 A molécula de ácido nucléico é então colocada preferencialmente em ligação operável com seqüências de

controle adequadas, como descrito acima, para formar uma unidade de expressão contendo o quadro de leitura aberto da proteína. A unidade de expressão é usada para transformar um hospedeiro adequado e o hospedeiro transformado é cultivado sob condições que permitem a produção da proteína recombinante. Opcionalmente, a proteína recombinante é isolada do meio ou das células; a recuperação e a purificação da proteína pode não ser necessária em alguns casos em que algumas impurezas podem ser toleradas.

Cada uma das etapas anteriores pode ser realizada de diversas formas. Por exemplo, as seqüências de codificação desejadas podem ser obtidas de fragmentos genômicos e usadas diretamente em hospedeiros apropriados. A construção dos vetores de expressão que são operáveis em uma variedade de hospedeiros é realizada usando replicons e seqüências de controle apropriadas, conforme estabelecido acima. As seqüências de controle, vetores de expressão e métodos de transformação dependem do tipo de célula hospedeira usada para expressar o gene e foram discutidos em detalhes anteriormente. Sítios de restrição adequados podem, caso não estejam normalmente disponíveis, ser adicionados às extremidades da seqüência de codificação de modo a proporcionar um gene excisável para inserção nesses vetores. Os versados na técnica poderão adaptar facilmente qualquer sistema de hospedeiro/expressão conhecido na técnica para uso com as

moléculas de ácido nucléico da invenção para produzir a proteína recombinante.

G. Métodos para Identificar Agentes que Modulam a Expressão de um Ácido Nucléico Codificando os
5 Genes Associados ao Câncer Pancreático

Outra concretização da presente invenção proporciona métodos para identificar agentes que modulam a expressão de um ácido nucléico codificando uma proteína da invenção, tal como uma proteína contendo a seqüência de
10 aminoácidos da SEQ ID NO: 2. Tais ensaios podem utilizar qualquer meio disponível para monitoração das alterações no nível de expressão dos ácidos nucléicos da invenção. Como usado nesta invenção, diz-se que um agente modula a expressão de um ácido nucléico da invenção se ele for capaz de suprarregular
15 ou infraregular a expressão do ácido nucléico em uma célula.

Em um formato de ensaio, podem-se preparar linhagens celulares que contêm fusões do gene repórter entre os nucleotídeos de dentro do quadro de leitura aberto definido pelos nucleotídeos 53-643 da SEQ ID NO: 1 e/ou os elementos
20 reguladores 5' e/ou 3' e qualquer parceiro de fusão ensaiável. Diversos parceiros de fusão ensaiáveis são conhecidos e encontram-se prontamente disponíveis, incluindo o gene luciferase do vagalume e o gene codificando a cloramfenicol acetiltransferase (Alam *e col.* (1990), *Anal. Biochem.* 188: 245-
25 254). Linhagens celulares contendo as fusões do gene repórter são então expostas ao agente a ser testado sob condições e tempo

apropriados. A expressão diferencial do gene repórter entre as amostras expostas ao agente e as amostras de controle identifica os agentes que modulam a expressão de um ácido nucléico da invenção.

5 Formatos de ensaio adicionais podem ser usados para monitorar a capacidade do agente em modular a expressão de um ácido nucléico codificando uma proteína da invenção, tal como a proteína com a SEQ ID NO: 2. Por exemplo, a expressão de mRNA pode ser monitorada diretamente por hibridização para
10 os ácidos nucléicos da invenção. As linhagens celulares são expostas ao agente a ser testado sob condições e tempo apropriados e o RNA total ou mRNA é isolado por procedimentos convencionais, como os revelados em Sambrook *e col.*, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Third Ed., Cold Spring Harbor
15 Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.

As células preferidas serão aquelas derivadas de tecidos humanos, por exemplo, tecidos de biópsia ou células cultivadas de pacientes com câncer. Podem ser usadas linhagens celulares tal como as linhagens celulares do carcinoma ductal de
20 mama ATCC (N^{os} de Catálogo CRL-2320, CRL-2338, e CRL-7345), linhagens celulares do adenocarcinoma coloretal ATCC (N^{os} de Catálogo CCL-222, CCL-224, CCL-225, CCL-234, CRL-7159, e CRL-7184), linhagens celulares do adenocarcinoma pulmonar ATCC (N^{os} de Catálogo CRL-5944, CRL-7380, e CRL-
25 5907), linhagens celulares do adenocarcinoma ovariano ATCC (N^{os} de Catálogo HTB-161, HTB-75, e HTB-76), linhagens

celulares do adenocarcinoma pancreático ATCC (N^{os} de Catálogo HTB-79, HTB-80, e CRL-2547), linhagens celulares do adenocarcinoma de próstata ATCC (N^{os} de Catálogo CRL-1435, CRL-2422, e CRL-2220) e linhagens celulares do
5 adenocarcinoma gástrico ATCC (N^{os} de Catálogo CRL-1739, CRL-1863, e CRL-1864). Como alternativa, podem ser utilizadas outras células disponíveis ou linhagens celulares.

As sondas para detectar as diferenças nos níveis de expressão de RNA entre as células expostas ao agente e as
10 células de controle podem ser preparadas a partir dos ácidos nucléicos da invenção. É preferível, mas não necessário, projetar sondas que se hibridizam apenas com os ácidos nucléicos alvo sob condições de alta estringência. Apenas híbridos de ácido nucléico altamente complementar se formam sob condições de
15 elevada estringência. Logo, a estringência das condições do ensaio determina a quantidade de complementaridade que deve existir entre duas fitas de ácido nucléico de modo a formar um híbrido. A estringência deve ser escolhida de forma a maximizar a diferença na estabilidade entre a sonda:híbrido alvo e a
20 sonda:híbridos não-alvos.

As sondas podem ser designadas a partir dos ácidos nucléicos da invenção através de métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, o teor de G+C da sonda e o comprimento da sonda podem afetar a ligação da sonda a sua sequência-alvo.
25 Métodos para otimizar a especificidade da sonda encontram-se normalmente disponíveis em Sambrook *e col.*, *supra*, ou Ausubel

e col., Short Protocols in Molecular Biology, Fourth Ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, 1999.

As condições de hibridização são modificadas usando métodos conhecidos, como aqueles descritos por Sambrook *e col.* e Ausubel *e col.* conforme exigido para cada sonda. A hibridização do RNA celular total ou do RNA enriquecido para poliA RNA pode ser realizada em qualquer formato disponível. Por exemplo, o RNA celular total ou o RNA enriquecido para poliA RNA podem ser afixados a um suporte sólido e o suporte sólido exposto a pelo menos uma sonda compreendendo pelo menos uma, ou parte de uma das seqüências da invenção sob condições em que a sonda irá se hibridizar especificamente. Como alternativa, fragmentos de ácido nucléico compreendendo pelo menos uma, ou parte de uma das seqüências da invenção podem ser afixados em um suporte sólido, tal como um chip de silício, pastilha de vidro porosa ou membrana. O suporte sólido pode então ser exposto ao RNA celular total ou ao RNA poliA de uma amostra sob condições em que as seqüências afixadas irão se hibridizar especificamente. Tais suportes sólidos e métodos de hibridização encontram-se extensamente disponíveis, por exemplo, como os revelados por Beattie, (1995) WO 95/11755. Por meio do exame da capacidade de uma dada sonda em hibridizar-se especificamente ara uma amostra de RNA a partir de uma população celular não-tratada e a partir de uma população celular exposta ao agente, os agentes que supraregulam

ou infraregulam a expressão de um ácido nucléico codificando a proteína tendo a seqüência da SEQ ID NO: 2 são identificados.

A hibridização para a análise qualitativa e quantitativa dos mRNAs também pode ser realizada utilizando-se um Ensaio de Proteção RNase (*isto é*, RPA, vide Ma *e col.* (1996), *Methods* 10: 273-238). Resumidamente, um veículo de expressão compreendendo DNAC codificando o produto gênico e um promotor da RNA polimerase dependendo do DNA específico do fago (por exemplo, RNA polimerase T7, T3 ou SP6) é linearizado na extremidade 3' da molécula de DNAC, a jusante do promotor do fago, sendo que tal molécula linearizada é subsequentemente utilizada como modelo para síntese de uma transcrição de sentido negativo marcado do DNAC por transcrição *in vitro*. A transcrição marcada é então hibridizada em uma mistura de RNA isolado (*isto é*, mRNA total ou fracionado) por incubação a 45°C durante a noite em um tampão compreendendo formamida 80% , 40 mM Pipes, pH 6,4, 0,4 M NaCl e 1 mM EDTA. Os híbridos resultantes são então digeridos em um tampão compreendendo 40 ìg/mL de ribonuclease A e 2 ìg/mL de ribonuclease. Após a desativação e extração das proteínas extrínsecas, as amostras são carregadas sobre uréia/géis de poliacrilamida para análise.

Em outro ensaio, para identificar agentes que afetam a expressão dos produtos gênicos instantâneos, identificam-se primeiramente as células ou linhagens celulares que expressam os produtos gênicos da invenção fisiologicamente.

Espera-se que as células e/ou linhagens celulares então identificadas compreendam os mecanismos celulares necessários de modo que a fidelidade de modulação do aparelho de transcrição seja mantida com respeito ao contato exógeno do agente com mecanismos de transdução de superfície apropriados e/ou as cascatas citosólicas. Além disso, tais células ou linhagens celulares seriam transduzidas ou transfectadas com uma construção de veículo de expressão (por exemplo, um plasmídeo ou vetor viral) compreendendo uma extremidade contendo o promotor 5' não traduzido operável do gene estrutural codificando os produtos gênicos instantâneos do gene estrutural codificando os produtos gênicos instantâneos, sendo que os referidos fragmentos estão sob o controle transcricional do referido promotor e são expressos como polipeptídios cujo peso molecular pode ser distinguido dos polipeptídios de ocorrência natural ou podem adicionalmente compreender uma marca imunologicamente distinta ou outro marcador detectável. Tal processo é bem conhecido na técnica (vide Sambrook *e col.*, *supra*).

As células ou linhagens celulares transduzidas ou transfectadas como resumido acima são então colocadas em contato com agentes sob condições apropriadas. Por exemplo, o agente em um excipiente farmacêuticamente aceitável é colocado em contato com células em um tampão fisiológico aquoso, tal como solução salina tamponada de fosfato (PBS) em pH fisiológico, solução salina equilibrada de Eagles (BSS) em pH

fisiológico ou BSS compreendendo soro ou meios condicionados compreendendo PBS ou BSS e/ou soro incubado a 37°C. As referidas condições podem ser moduladas conforme julgado necessário pelo especialista na área. Após colocar as células em
5 contato com os agentes, as referidas células serão rompidas e os polipeptídios do lisato são fracionados de modo que uma fração de polipeptídio seja agrupada e colocada em contato com um anticorpo para ser adicionalmente processada por ensaio imunológico (por exemplo, ELISA, imunoprecipitação ou
10 Western blot). O grupo de proteínas isoladas da amostra “colocada em contato com o agente” será comparado com uma amostra-controle, sendo que apenas o excipiente é colocado em contato com as células e um aumento ou redução no sinal gerado imunologicamente da amostra “colocada em contato com o
15 agente” comparada com o controle será usado para distinguir a eficácia do agente.

H. Métodos para Identificar Agentes que Modulam o Nível ou Pelo Menos Uma Atividade das Proteínas Associadas ao Câncer Pancreático

20 Outra concretização da presente invenção proporciona métodos para identificar agentes que modulam a expressão de pelo menos uma atividade de uma proteína da invenção, tal como a proteína contendo a seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2. Tais métodos ou ensaios podem
25 utilizar qualquer meio para monitorar ou detectar a atividade

desejada e são particularmente úteis para identificar agentes que tratam o câncer pancreático.

Em um formato, as quantidades relativas de uma proteína da invenção entre uma população celular que foi
5 exposta ao agente a ser testado comparado a uma população celular de controle não exposta podem ser ensaiadas. Neste formato, sondas, tais como anticorpos específicos, são utilizadas para monitorar a expressão diferencial da proteína nas diferentes populações celulares. As linhagens celulares ou populações são
10 expostas ao agente a ser testado sob condições e tempo apropriados. Os lisados celulares podem ser preparados a partir da linhagem celular ou população exposta e de uma linhagem celular ou população de controle não exposta. Os lisados celulares são então analisados com a sonda.

15 As sondas de anticorpos são preparadas pela imunização de hospedeiros mamíferos adequados em protocolos de imunização apropriados usando os peptídeos, polipeptídios ou proteínas da invenção se eles tiverem comprimento suficiente, ou, se desejado, caso seja necessário para aprimorar a
20 imunogenicidade, conjugado a veículos adequados. Os métodos de preparação de conjugados imunogênicos com veículos, tal como BSA, KLH ou outras proteínas carreadoras são bem conhecidos na técnica. Em certas circunstâncias, a conjugação direta usando, por exemplo, reagentes de carbodiimida podem ser
25 eficazes; em outros casos, reagentes de ligação, como aqueles fornecidos pela Pierce Chemical Co. (Rockford, IL), podem ser

desejáveis para proporcionar acessibilidade ao hapteno. Os peptídeos de hapteno podem ser estendidos ou no terminal amino ou carbóxi com um resíduo cisteína ou entremeados com resíduos cisteína, por exemplo, para facilitar a ligação a um carreador. A administração dos imunógenos é realizada geralmente por injeção durante um período de tempo adequado e com o uso de adjuvantes adequados, como é geralmente entendido na técnica. Durante o cronograma de imunização, os títulos dos anticorpos são obtidos para determinar a adequação da formação de anticorpos.

Embora os antisoros policlonais produzidos desta forma possam ser satisfatórios para certas aplicações, para composições farmacêuticas, prefere-se o uso de preparações monoclonais. Linhagens celulares imortalizadas que segregam os anticorpos monoclonais desejados podem ser preparadas usando o método convencional de Kohler e Milstein ((1975) *Nature* 256: 495-497) ou modificações que efetuam a imortalização dos linfócitos ou células do baço, como é geralmente sabido. As linhagens celulares imortalizadas segregando os anticorpos desejados são examinadas por imunoensaio, em que o antígeno é o hapteno peptídico, polipeptídio ou proteína. Quando a cultura celular imortalizada apropriada segregando o anticorpo desejado é identificada, as células podem ser cultivadas tanto *in vitro* quanto pela produção em líquido ascítico.

Os anticorpos monoclonais desejados são então recuperados do sobrenadante da cultura ou do sobrenadante

ascítico. Os fragmentos dos anticorpos monoclonais ou os antisoros policlonais que contêm a porção imunologicamente significativa (de ligação ao antígeno) podem ser usados como antagonistas, bem como os anticorpos intactos. O uso de
5 fragmentos de anticorpos (de ligação ao antígeno) imunologicamente reativos, tais como os fragmentos Fab, Fab', ou $F(ab')_2$ é geralmente preferível, especialmente no contexto terapêutico, uma vez que esses fragmentos costumam ser menos imunogênicos do que a imunoglobulina inteira.

10 Os fragmentos de anticorpos ou de ligação ao antígeno também podem ser produzidos usando a tecnologia atual, por meios recombinantes. As regiões de anticorpos que se ligam especificamente às regiões desejadas da proteína também podem ser produzidas no contexto de quimeras com origem de
15 múltiplas espécies, tais como anticorpos humanizados.

Os agentes que são ensaiados no método acima podem ser selecionados aleatoriamente ou selecionados ou projetados racionalmente. Como utilizado nesta invenção, diz-se que um agente é selecionado ao acaso quando o agente é
20 escolhido aleatoriamente sem considerar as seqüências específicas envolvidas na associação de uma proteína da invenção sozinha ou com seus substratos associados, parceiros de ligação, etc. Um exemplo de agentes selecionados ao acaso é o uso de uma biblioteca química ou uma biblioteca combinatória de peptídeos,
25 ou um caldo de crescimento de um organismo.

Como usado na presente invenção, diz-se que um agente é selecionado ou projetado racionalmente quando o agente é escolhido numa base não aleatória que leva em conta a seqüência do sítio alvo e/ou sua conformação em conexão com a
5 ação do agente. Os agentes podem ser selecionados racionalmente ou projetados racionalmente utilizando-se as seqüências de peptídeos que compõem esses sítios. Por exemplo, um agente peptídico selecionado racionalmente pode ser um peptídeo cuja seqüência de aminoácidos é idêntica a, ou um
10 derivado de qualquer sítio consenso funcional.

Os agentes da presente invenção podem ser, por exemplo, peptídeos, moléculas pequenas, derivados vitamínicos, bem como carboidratos. Proteínas negativas dominantes, DNAs codificando essas proteínas, anticorpos dessas proteínas,
15 fragmentos peptídicos dessas proteínas ou mimetizadores dessas proteínas podem ser introduzidos nas células para afetar a função. “Mimetização”, conforme utilizado nesta invenção, refere-se à modificação de uma região ou várias regiões de uma molécula de peptídeo para proporcionar uma estrutura quimicamente diferente
20 do peptídeo pai, mas topográfica e funcionalmente similar ao peptídeo pai (vide Grant em: Molecular Biology and Biotechnology, Meyers, ed., p. 659-664, VCH Publishers, Inc., New York, 1995). Os versados na técnica serão capazes de reconhecer de imediato que não há limite quanto à natureza
25 estrutural dos agentes da presente invenção.

Os agentes peptídicos da invenção podem ser preparados usando métodos de síntese de peptídeo de fase sólida convencionais (ou fase de solução), como conhecido na técnica. Além disso, o DNA codificando esses peptídeos pode ser sintetizado utilizando-se instrumentação de síntese de oligonucleotídeos comercialmente disponível e produzido de forma recombinante pelo uso de sistemas de produção recombinante convencionais. A produção usando síntese de peptídeo de fase sólida é necessária se os aminoácidos não codificados em gene precisarem ser incluídos.

Outra classe de agentes da presente invenção são os anticorpos imunoreativos com posições fundamentais das proteínas da invenção. Os agentes de anticorpos são obtidos pela imunização de pacientes mamíferos adequados com peptídeos, contendo, como regiões antigênicas, as partes da proteína que pretendem ser almejadas pelos anticorpos.

I. Usos para Agentes que Modulam a Expressão ou Pelo Menos uma Atividade das Proteínas Associadas ao Câncer Pancreático

Como apresentado nos Exemplos, as proteínas e ácidos nucleicos da invenção, tal como as proteínas com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2, são expressos diferencialmente no tecido canceroso pancreático. Agentes que supraregulam ou infraregulam ou modulam a expressão da proteína ou pelo menos uma atividade da proteína, como agonistas ou antagonistas, podem ser usados para modular os

processos biológicos e patológicos associados à função e atividade da proteína. Isso inclui agentes identificados empregando homólogos e análogos da presente invenção.

Como usado na presente invenção, um paciente
5 pode ser qualquer mamífero, contanto que o mamífero necessite da modulação de um processo patológico ou biológico mediado por uma proteína da invenção. O termo “mamífero” é definido como um indivíduo que pertence à classe Mammalia. A invenção é particularmente útil no tratamento de pacientes humanos.

10 Os processos patológicos se referem a uma categoria de processos biológicos que produzem um efeito deletério. Por exemplo, a expressão de uma proteína da invenção pode ser associada ao crescimento celular ou à hiperplasia. Como usado na presente invenção, diz-se que um agente modula um
15 processo patológico quando o agente reduz o nível ou gravidade do processo. Por exemplo, o câncer pode ser prevenido ou a progressão da doença modulada pela administração de agentes que supraregulam ou infraregulam ou modulam de alguma forma a expressão ou pelo menos uma atividade de uma proteína da
20 invenção.

Os agentes da presente invenção podem ser proporcionados sozinhos ou em combinação com outros agentes que modulam um processo patológico específico. Por exemplo, um agente da presente invenção pode ser administrado em
25 combinação com outros fármacos conhecidos. Como usado na presente invenção, diz-se que dois agentes são administrados em

combinação quando os dois agentes são administrados simultaneamente ou são administrados de forma independente de tal maneira que os agentes atuem ao mesmo tempo.

Os agentes da presente invenção podem ser administrados pela via parenteral, subcutânea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, ou bucal. Como alternativa, ou simultaneamente, a administração pode ocorrer pela via oral. A dosagem administrada dependerá da idade, saúde e peso do destinatário, do tipo de tratamento simultâneo, caso haja, da frequência de tratamento e da natureza do efeito desejado.

A presente invenção também proporciona composições contendo um ou mais agentes que modulam a expressão ou pelo menos uma atividade de uma proteína da invenção. Embora as necessidades individuais variem, a determinação das faixas ideais das quantidades eficazes de cada componente está dentro do conhecimento da técnica. Dosagens típicas compreendem de 0,1 a 100 µg/kg de peso corporal. As dosagens preferidas compreendem de 0,1 a 10 µg/kg de peso corporal. As dosagens mais preferidas compreendem de 0,1 a 1 µg/kg de peso corporal.

Além do agente farmacologicamente ativo, as composições da presente invenção podem conter veículos farmacêuticamente aceitáveis adequados compreendendo excipientes e auxiliares que facilitam o processamento dos compostos ativos em preparações que podem ser usadas

farmaceuticamente para entrega ao local de ação. Formulações adequadas para administração parenteral incluem soluções aquosas dos compostos ativo na forma hidrossolúvel, por exemplo, sais hidrossolúveis. Além disso, as suspensões dos compostos ativos como suspensões de injeção oleosas apropriadas podem ser administradas. Solventes ou veículos lipofílicos adequados incluem óleos graxos, por exemplo, óleo de gergelim, ou ésteres de ácidos graxos sintéticos, por exemplo, oleato de etila ou triglicerídeos. As suspensões de injeção aquosa podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão, como por exemplo, carboximetil celulose sódica, sorbitol e/ou dextrano. Opcionalmente, a suspensão também pode conter estabilizantes. Lipossomas também podem ser utilizados para encapsular o agente para distribuição à célula.

15 A formulação farmacêutica para administração sistêmica de acordo com a invenção pode ser formulada para administração entérica, parenteral ou tópica. De fato, todos os três tipos de formulações podem ser usados simultaneamente para se obter a administração sistêmica do ingrediente ativo.

20 Formulações adequadas para administração oral incluem cápsulas de gelatina duras ou moles, pílulas, tabletes, inclusive tabletes revestidos, elixires, suspensões, xaropes ou inalações e formas de liberação controlada dos mesmos.

Ao praticar os métodos desta invenção, os compostos desta invenção podem ser usados sozinhos ou em combinação, ou em combinação com outros agentes terapêuticos

e de diagnóstico. Em certas concretizações preferidas, os compostos desta invenção podem ser coadministrados com outros compostos tipicamente prescritos para essas condições de acordo com a prática médica geralmente aceita. Os compostos desta
5 invenção podem ser utilizados *in vivo*, normalmente em mamíferos, como humanos, ovelhas, cavalos, bovinos, porcos, cachorros, gatos, ratos e camundongos, ou *in vitro*.

J. Métodos para Identificação de Parceiros de Ligação

10 Outra concretização da presente invenção proporciona métodos para isolar e identificar parceiros de ligação das proteínas da invenção. Em geral, uma proteína da invenção é misturada com um parceiro de ligação em potencial ou um extrato ou fração de uma célula sob condições que permitem a associação
15 de parceiros de ligação em potencial com a proteína da invenção. Após a mistura, os peptídeos, polipeptídios, proteínas ou outras moléculas que se tornaram associados a uma proteína da invenção são separados da mistura. O parceiro de ligação que se ligou à proteína da invenção pode então ser removido e adicionalmente
20 analisado. Para identificar e isolar um parceiro de ligação, a proteína inteira, por exemplo, uma proteína compreendendo toda a seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2, pode ser utilizada. Como alternativa, pode-se utilizar um fragmento da proteína.

25 Como usado na presente invenção, um extrato celular refere-se a uma preparação ou fração que é formada a partir de uma célula submetida à lise ou rompida. A origem

preferida de extratos celulares serão células derivadas de tumores humanos ou células transformadas, por exemplo, tecido de biópsia ou células de cultura de tecido de carcinomas. Como alternativa, os extratos celulares podem ser preparados a partir de tecidos normais ou linhagens celulares disponíveis.

Uma variedade de métodos pode ser utilizada para se obter um extrato de uma célula. As células podem ser rompidas utilizando-se tanto métodos de rompimento físicos quanto químicos. Exemplos de métodos de rompimento físico incluem, sem a isto se limitar, sonicação e cisalhamento mecânico. Exemplos de métodos de lise química incluem, sem a isto se limitar, lise com detergente e lise com enzima. Os versados na técnica poderão adaptar de imediato métodos para preparar extratos celulares a fim de se obter extratos para uso nos presentes métodos.

Assim que um extrato de uma célula é preparado, o extrato é misturado com a proteína da invenção sob condições nas quais a associação da proteína com o parceiro de ligação pode ocorrer. Diversas condições podem ser utilizadas, sendo as mais preferidas aquelas que remontam bastante às condições encontradas no citoplasma de uma célula humana. Aspectos como a osmolaridade, pH, temperatura e a concentração do extrato celular utilizado podem ser variados para otimizar a associação da proteína ao parceiro de ligação.

Após a mistura sob condições apropriadas, o complexo ligado é separado da mistura. Diversas técnicas podem

ser utilizadas para separar a mistura. Por exemplo, anticorpos específicos a uma proteína da invenção podem ser usados para imunoprecipitar o complexo do parceiro de ligação. Como alternativa, técnicas de separação química convencionais, tal como cromatografia e centrifugação de densidade/sedimento, 5 podem ser utilizadas.

Após a remoção dos constituintes celulares não-associados encontrados no extrato, o parceiro de ligação pode ser dissociado do complexo usando métodos convencionais. Por exemplo, a dissociação pode ser realizada alterando-se a 10 concentração de sal ou o pH da mistura.

Para ajudar na separação dos pares de parceiros de ligação associados a partir do extrato misturado, a proteína da invenção pode ser imobilizada em um suporte sólido. Por exemplo, a proteína pode ser ligada a uma matriz de nitrocelulose 15 ou contas acrílicas. A ligação da proteína a um suporte sólido ajuda a separar os pares de peptídeos/parceiros de ligação dos demais constituintes encontrados no extrato. Os parceiros de ligação identificados podem ser ou uma proteína única ou um complexo formado de duas ou mais proteínas. Como alternativa, 20 os parceiros de ligação podem ser identificados usando um ensaio Far-Western segundo os procedimentos de Takayama *e col.* (1997), *Methods Mol. Biol.* 69: 171-184 or Sauder *e col.* (1996), *J. Gen. Virol.* 77: 991-996 ou identificados através do uso de 25 proteínas marcadas com epítipo ou proteínas de fusão GST.

Como alternativa, as moléculas de ácido nucléico da invenção podem ser usadas em um sistema duplo híbrido em levedura ou em outro sistema de detecção de proteína-proteína *in vivo*. O sistema duplo híbrido em levedura foi
5 utilizado para identificar outros pares de parceiros protéicos e pode ser facilmente adaptado para empregar as moléculas de ácido nucléico aqui descritas.

K. Uso dos Parceiros de Ligação das Proteínas Associadas ao Câncer Pancreático

10 Uma vez isolados, os parceiros de ligação das proteínas da invenção, e seus homólogos e análogos, obtidos pelo uso dos métodos supradescritos, podem ser utilizados para diversos fins. Os parceiros de ligação podem ser usados para gerar anticorpos que se ligam ao parceiro de ligação usando técnicas
15 conhecidas. Anticorpos que se ligam ao parceiro de ligação podem ser usados para ensaiar a atividade da proteína da invenção, como um agente terapêutico para modular um processo biológico ou patológico mediado pela proteína da invenção, ou para purificar o parceiro de ligação. Esses usos são descritos em
20 detalhes abaixo.

L. Métodos para Identificar Agentes que Bloqueiam as Associações entre os Parceiros de Ligação e as Proteínas Associadas ao Câncer Pancreático

Outra concretização da presente invenção
25 também proporciona métodos para identificar agentes que possam reduzir ou bloquear a associação de uma proteína da invenção

com um parceiro de ligação. Especificamente, uma proteína da invenção é misturada com um parceiro de ligação na presença e ausência de um agente a ser testado. Após a mistura sob condições que permitem a associação das proteínas, as duas
5 misturas são analisadas e comparadas para determinar se o agente reduziu o bloqueou a associação da proteína da invenção ao parceiro de ligação. Agentes que bloqueiam ou reduzem a associação da proteína da invenção com o parceiro de ligação serão identificados como diminuindo a quantidade de associação
10 presente na amostra contendo o agente testado.

Como usado na presente invenção, diz-se que um agente reduz ou bloqueia a associação entre uma proteína da invenção e um parceiro de ligação quando a presença do agente diminui o grau em que, ou impede que o parceiro de ligação se
15 torne associado à proteína da invenção. Uma classe de agentes irá reduzir ou bloquear a associação ligando-se ao parceiro de ligação, enquanto outra classe de agentes irá reduzir ou bloquear a associação ligando-se à proteína da invenção.

O parceiro de ligação utilizado no ensaio acima
20 pode ser ou uma proteína isolada e totalmente caracterizada ou uma proteína parcialmente caracterizada que se liga à proteína da invenção ou um parceiro de ligação que foi identificado como estando presente em um extrato celular. Ficará evidente aos versados na técnica que, contanto que o parceiro de ligação tenha
25 sido caracterizado por uma propriedade identificável, por exemplo, peso molecular, o presente ensaio pode ser utilizado.

Os agentes que são ensaiados no método acima podem ser selecionados aleatoriamente ou selecionados ou projetados racionalmente. Como utilizado na presente invenção, diz-se que um agente é selecionado ao acaso quando o agente é
5 selecionado aleatoriamente sem considerar as seqüências específicas envolvidas na associação da proteína da invenção ao parceiro de ligação. Um exemplo de agentes selecionados ao acaso é o uso de uma biblioteca química ou uma biblioteca combinatória de peptídeos, ou um caldo de crescimento de um
10 organismo.

Como utilizado nesta invenção, diz-se que um agente é selecionado ou designado racionalmente quando o agente é escolhido em uma base não aleatória que leva em conta a seqüência do sítio-alvo e/ou sua conformação em conexão com a
15 ação do agente. Os agentes podem ser selecionados racionalmente ou designados racionalmente utilizando-se as seqüências peptídicas que compõem os sítios de contato do parceiro de ligação com a proteína da invenção. Por exemplo, um agente peptídico selecionado racionalmente pode ser um peptídeo
20 cuja seqüência de aminoácidos é idêntica ao sítio de contato da proteína da invenção no parceiro de ligação. Tal agente irá reduzir ou bloquear a associação da proteína da invenção com o parceiro de ligação ligando-se ao parceiro de ligação.

Os agentes da presente invenção podem ser, por
25 exemplo, peptídeos, moléculas pequenas, derivados vitamínicos, bem como carboidratos. Os versados na técnica serão capazes de

reconhecer de imediato que não há limite quanto à natureza estrutural dos agentes da presente invenção.

Uma classe de agentes da presente invenção são os agentes peptídicos cujas seqüências de aminoácidos são
5 escolhidas com base na seqüência de aminoácidos da proteína da invenção. Os agentes peptídicos da invenção podem ser preparados usando métodos de síntese de peptídeo de fase sólida convencionais (ou fase de solução), como conhecido na técnica. Além disso, o DNA codificando esses peptídeos pode ser
10 sintetizado utilizando-se instrumentação de síntese de oligonucleotídeos comercialmente disponível e produzido de forma recombinante pelo uso de sistemas de produção recombinante convencionais. A produção usando síntese de peptídeo de fase sólida é necessária se aminoácidos não
15 codificados em gene precisarem ser incluídos.

Outra classe de agentes da presente invenção são os anticorpos imunoreativos com posições cruciais da proteína da invenção ou do parceiro de ligação. Como descrito acima, os anticorpos são obtidos pela imunização de pacientes
20 mamíferos adequados com peptídeos, contendo, como regiões antigênicas, as partes da proteína da invenção ou do parceiro de ligação que pretendem ser almejadas pelos anticorpos. Regiões cruciais incluem os sítios de contato envolvidos na associação da proteína da invenção com o parceiro de ligação.

25 Como discutido abaixo, a seqüência mínima importante de resíduos envolvidos na atividade da proteína da

invenção define um domínio linear funcional que pode ser utilizado de maneira eficaz como uma isca para triagem em duplo híbrido e identificação de moléculas associadas potenciais. O uso de tais fragmentos irá aumentar de forma significativa a especificidade da triagem em vez de usar a molécula de sequência completa, sendo, portanto, preferido. De forma similar, esta sequência linear também pode ser usada como uma matriz de afinidade também para isolar as proteínas de ligação usando uma estratégia de purificação por afinidade bioquímica.

10 M. Usos para Agentes que Bloqueiam as
Associações entre os Parceiros de Ligação e as Proteínas
Associadas ao Câncer Pancreático

Como apresentado nos Exemplos, as proteínas e ácidos nucleicos da invenção, tal como as proteínas com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2, são expressos diferencialmente no tecido canceroso pancreático. Agentes que reduzem ou bloqueiam as interações de uma proteína da invenção, incluindo aquelas identificadas empregando homólogos e análogos da proteína, com um parceiro de ligação podem ser usados para modular os processo biológicos e patológicos associado à função e atividade da proteína.

Como usado na presente invenção, um paciente pode ser qualquer mamífero, contanto que o mamífero necessite da modulação de um processo patológico ou biológico mediado por uma proteína da invenção. O termo “mamífero” é definido

como um indivíduo que pertence à classe Mammalia. A invenção é particularmente útil no tratamento de pacientes humanos.

Os processos patológicos se referem a uma categoria de processos biológicos que produzem um efeito deletério. Por exemplo, a expressão de uma proteína da invenção pode ser associada ao crescimento celular ou à hiperplasia. Como usado na presente invenção, diz-se que um agente modula um processo patológico quando o agente reduz o nível ou gravidade do processo. Por exemplo, o câncer pancreático pode ser prevenido ou a progressão da doença modulada pela administração de agentes que reduzem ou bloqueiam as interações de uma proteína da invenção com um parceiro de ligação.

Os agentes da presente invenção podem ser administrados pela via parenteral, subcutânea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, ou bucal. Como alternativa, ou simultaneamente, a administração pode ocorrer pela via oral. A dosagem administrada dependerá da idade, saúde e peso do destinatário, do tipo de tratamento simultâneo, caso haja, da frequência de tratamento e da natureza do efeito desejado.

A presente invenção também proporciona composições contendo um ou mais agentes que bloqueiam a associação de uma proteína da invenção com um parceiro de ligação. Embora as necessidades individuais variem, a determinação das faixas ideais das quantidades eficazes de cada componente está dentro do conhecimento da técnica. Dosagens

típicas compreendem de 0,1 a 100 µg/kg de peso corporal. As dosagens preferidas compreendem de 0,1 a 10 µg/kg de peso corporal. As dosagens mais preferidas compreendem de 0,1 a 1 µg/kg de peso corporal.

5 Além do agente farmacologicamente ativo, as composições da presente invenção podem conter veículos farmacêuticamente aceitáveis adequados compreendendo excipientes e auxiliares que facilitam o processamento dos compostos ativos em preparações que podem ser usadas
10 farmacêuticamente para entrega ao local de ação. Formulações adequadas para administração parenteral incluem soluções aquosas dos compostos ativo na forma hidrossolúvel, por exemplo, sais hidrossolúveis. Além disso, as suspensões dos compostos ativos como suspensões de injeção oleosas apropriadas
15 podem ser administradas. Solventes ou veículos lipofílicos adequados incluem óleos graxos, por exemplo, óleo de gergelim, ou ésteres de ácidos graxos sintéticos, por exemplo, oleato de etila ou triglicerídeos. As suspensões de injeção aquosa podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão, como por
20 exemplo, carboximetil celulose sódica, sorbitol e/ou dextrano. Opcionalmente, a suspensão também pode conter estabilizantes. Lipossomas também podem ser utilizadas para encapsular o agente para distribuição à célula.

 A formulação farmacêutica para administração
25 sistêmica de acordo com a invenção pode ser formulada para administração entérica, parenteral ou tópica. De fato, todos os

três tipos de formulações podem ser usados simultaneamente para se obter a administração sistêmica do ingrediente ativo.

Formulações adequadas para administração oral incluem cápsulas de gelatina duras ou moles, pílulas, tabletes, inclusive tabletes revestidos, elixires, suspensões, xaropes ou inalações e formas de liberação controlada dos mesmos.

Ao praticar os métodos desta invenção, os compostos desta invenção podem ser usados sozinhos ou em combinação, ou em combinação com outros agentes terapêuticos e de diagnóstico. Em certas concretizações preferidas, os compostos desta invenção podem ser coadministrados com outros compostos tipicamente prescritos para essas condições de acordo com a prática médica geralmente aceita. Os compostos desta invenção podem ser utilizados *in vivo*, normalmente em mamíferos, como humanos, ovelhas, cavalos, bovinos, porcos, cachorros, gatos, ratos e camundongos, ou *in vitro*.

N. Planejamento Racional de Fármaco e Química Combinatória

A presente invenção também engloba o planejamento racional de fármaco e a química combinatória. Os versados na técnica irão reconhecer métodos apropriados para utilizar e explorar aspectos da presente invenção na identificação de compostos que podem ser desenvolvidos para tratamento do câncer pancreático. O planejamento racional de fármaco envolvendo polipeptídeos requer a identificação e a definição de um primeiro peptídeo com o qual o fármaco projetado irá

interagir, e o uso do primeiro peptídeo alvo para definir as exigências de um segundo peptídeo. Com tais exigências definidas, é possível descobrir ou preparar um peptídeo apropriado ou não-peptídeo que satisfaça a todas ou quase todas as exigências definidas. Sendo assim, um dos objetivos do planejamento racional de fármacos consiste em produzir análogos estruturais ou funcionais de polipeptídios biologicamente ativos de interesse ou de pequenas moléculas com os quais eles interagem (por exemplo, agonistas, antagonistas, compostos nulos) de modo a formar fármacos que sejam, por exemplo, formas mais ou menos potentes do ligante. (vide, por exemplo, Hodgson (1991), *Bio. Technology* 9:19-21). A química combinatória é a ciência que se preocupa em sintetizar e testar compostos para bioatividade em massa, em vez de um a um, com o objetivo de descobrir fármacos e materiais de maneira mais rápida e econômica do que era possível antes. O planejamento racional de fármacos e a química combinatória se tornaram mais intimamente relacionados nos últimos anos por causa do desenvolvimento de abordagens na modelagem protéica e descoberta de fármacos auxiliadas por computador. (vide, por exemplo, a Patente US. No. 4,908,773; 5,884,230; 5,873,052; 5,331,573; e 5,888,738).

O uso de modelagem molecular como ferramenta para planejamento racional de fármacos e química combinatória sofreu um aumento drástico em virtude do advento dos gráficos de computador. É possível não apenas visualizar

moléculas na tela do computador em três dimensões, mas também examinar as interações das macromoléculas, como as enzimas e receptores e moléculas derivadas planejadas racionalmente para teste. (Vide Boorman (1992), *Chem. Eng. News* 70:18-26). Uma

5 vasta quantidade de softwares e hardwares amigáveis ao usuário encontram-se disponíveis hoje em dia e praticamente todas as empresas farmacêuticas possuem grupos de modelagem por computador dedicados ao planejamento racional de fármacos. A Molecular Simulations Inc. (www.msi.com), por exemplo, vende

10 diversos programas sofisticados que possibilitam ao usuário partir de uma seqüência de aminoácidos, construir um modelo bi ou tridimensional da proteína ou polipeptídio, compará-lo com outros modelos bi e tridimensionais, e analisar as interações dos compostos, fármacos e peptídeos com um modelo tridimensional

15 em tempo real. Logo, em algumas concretizações da invenção, utiliza-se o software para comparar as regiões da proteína da invenção e das moléculas que interagem com ela (conjuntamente denominadas “parceiros de ligação” - por exemplo, anticorpos anti-proteicos), e fragmentos ou derivados dessas moléculas com

20 outras moléculas, como peptídeos, peptideomiméticos e substâncias químicas, de modo que as interações terapêuticas possam ser previstas e planejadas. (vide Schneider (1998), *Genetic Engineering News* dezembro: página 20; Tempczyk e col. (1997), Molecular Simulations Inc. Solutions abril; e Butenhof

25 (1998), Molecular Simulations Inc. Case Notes (agosto de 1998) para ler uma discussão sobre a modelagem molecular).

O. Terapia Gênica

Em outra concretização, a terapia genética pode ser usada como um meio para modular os processo biológicos e patológicos associados à função e atividade da proteína. Isto
5 compreende inserir, em uma célula cancerosa, uma construção gênica codificando uma proteína que compreende todas ou pelo menos uma parte das seqüências da SEQ ID NO: 2, ou, como alternativa, uma construção gênica que compreende toda ou uma parte da região não-codificadora da SEQ ID NO: 1,
10 operavelmente ligada a um promotor um elemento reforçador de modo que a expressão da referida proteína provoque a supressão do referido câncer, sendo que o referido promotor ou elemento reforçador é um promotor ou elemento reforçador modulando a referida construção gênica.

15 Nas construções descritas, a expressão da referida proteína pode ser direcionada a partir de qualquer promotor adequado (por exemplo, o citomegalovírus humano (CMV), o vírus símio 40 (SV40) ou promotores de metalotioneína) e regulada por qualquer elemento regulador de
20 mamífero apropriado. Por exemplo, se desejado, seqüências reforçadores conhecidas por direcionar preferencialmente a expressão gênica em células neurais, células T ou células B podem ser usadas para direcionar a expressão. As seqüências reforçadoras utilizadas poderiam incluir, sem limitação, aquelas
25 caracterizadas como específicas ao tecido ou célula em sua expressão. Como alternativa, se um clone genômico de

LBHL313 for utilizado como uma construção terapêutica (por exemplo, seguindo-se seu isolamento pela hibridização com a molécula de ácido nucléico da invenção descrita acima), a regulação pode ser mediada pelas seqüências reguladoras cognatas, ou, se desejado, por seqüências reguladoras derivadas de uma origem heteróloga, incluindo qualquer um dos promotores ou elementos reguladores descritos acima.

A inserção da construção em uma célula cancerosa é realizada *in vivo*, por exemplo, usando um vetor viral ou plasmideal. Tais métodos também podem ser aplicados a usos *in vitro*. Sendo assim, os métodos da presente invenção são imediatamente aplicáveis a diferentes formas de terapia gênica, tanto quando as células são geneticamente modificadas *ex vivo* e então administradas a um hospedeira como quando a modificação gênica é realizada *in vivo* usando qualquer um dentre uma série de métodos adequados envolvendo vetores especialmente adequados a tais terapias.

Vetores retrovirais, vetores adenovirais, vetores virais adenoassociados ou outros vetores virais com o tropismo apropriado para células com grande probabilidade de estarem envolvidas no câncer (por exemplo, células epiteliais) podem ser utilizados como um sistema de distribuição de transferência gênica para uma construção gênica terapêutica. Numerosos vetores úteis para essa finalidade são em geral conhecidos (Cozzi PJ, e col., (2002) *Prostate*, 53(2):95-100; Bitzer M, Lauer U., (2002) *Dtsch Med Wochenschr.* 127(31-32):1623-1624; Mezzina

and Danos (2002), *Trends Genet.* 8:241-256; Loser *e col.* (2002) *Curr. Gene Ther.* 2:161-171; Pfeifer and Verma (2001), *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2:177-211). Os vetores retrovirais são particularmente bem desenvolvidos e têm sido utilizados em

5 configurações clínicas (Anderson *e col.* (1995), Patente US Nº 5,399,346). Abordagens não-virais também podem ser empregadas para a introdução de DNA terapêutico em células que de outra forma seriam prognosticadas para sofrer câncer (Jeschke

e col. (20002) *Curr. Gene Ther.* 1:267-278; Wu *e col.* (1988), *J. Biol. Chem.* 263:14621-14624; Wu *e col.* (1989), *J. Biol. Chem.* 264:16985-16987). Por exemplo, pode-se introduzir um gene em

10 um neurônio ou em uma célula T por lipofecção, conjugação de polilisina asialorosonucóide, ou menos preferencialmente, microinjeção sob condições cirúrgicas.

15 Para qualquer um dos métodos de aplicação descritos acima, a construção de ácido nucléico terapêutica é preferencialmente aplicada ao sítio do evento de câncer (por exemplo, por injeção). Entretanto, ela também pode ser aplicada aos tecido na vizinhança do evento de câncer ou a um vaso

20 sanguíneo alimentando as células prognosticadas como sujeitas ao câncer.

P. Animais Transgênicos

Animais transgênicos contendo genes mutantes, “nocaute” ou modificados correspondente à seqüência DNAC da

25 SEQ ID NO: 1, ou o quadro de leitura aberto codificando a seqüência de polipeptídios da SEQ ID NO: 2, ou fragmentos

destas tendo uma seqüência consecutiva de pelo menos cerca de 3, 4, 5, 6, 10, 15, 20, 25, 30, 35 ou mais resíduos de aminoácidos, também são incluídos na invenção. Os animais transgênicos são animais geneticamente modificados para os quais um material genético recombinante, exógeno ou clonado foi transferido experimentalmente. Tal material genético é geralmente chamado de “transgene”. A seqüência de ácidos nucleicos do transgene, neste caso, uma forma da SEQ ID NO: 1, pode ser integrada ou em um locus de um genoma em que essa seqüência de ácidos nucleicos específica não seria de outra forma normalmente encontrada ou no locus normal para os transgene. O transgene pode consistir de seqüências de ácido nucleico derivadas do genoma das mesmas espécies ou de uma espécie diferente da espécie do animal alvo.

Em algumas concretizações, animais transgênicos nos quais todo ou uma parte de um gene compreendendo a SEQ ID NO: 1 é deletado podem ser construídos. Nestes casos, quando o gene correspondendo à SEQ ID NO: 1 contiver um ou mais íntons, o gene inteiro, todos os éxons, íntrons e seqüências reguladoras podem ser deletados. Como alternativa, menos do que o gene inteiro pode ser deletado. Por exemplo, um único éxon e/ou íntron pode ser deletado com o intuito de criar um animal expressando uma versão modificada de uma proteína da invenção.

O termo “animal transgênico de linhagem celular germinativa” refere-se a um animal transgênico no qual a

alteração genética ou informação genética foi introduzida em uma célula de linhagem germinativa, conferindo assim ao animal transgênico a capacidade de transferir a informação genética para sua prole. Se tal prole de fato possuir parte ou toda essa alteração
5 ou informação genética, então ela também será de animais transgênicos.

A alteração ou informação genética pode ser estranha às espécies do animal ao qual pertence o receptor, estranha apenas ao receptor individual específico, ou pode ser
10 uma informação genética já possuída pelo receptor. No último caso, o gene alterado ou introduzido pode ser expresso de maneira diferente do gene nativo.

Os animais transgênicos podem ser produzidos por uma variedade de métodos diferentes, inclusive transfecção, eletroporação, microinjeção, direcionamento gênico em células-tronco embriônicas e infecção viral e retroviral recombinante
15 (*vide*, por exemplo, a Patente US Nº 4,736,866; Patente US Nº 5,602,307; Mullins *e col.* (1993), *Hypertension* 22: 630-633; Brenin *e col.* (1997), *Surg. Oncol.* 6: 99-110; Recombinant Gene Expression Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 62),
20 Tuan, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 1997).

Diversos camundongos recombinantes ou transgênicos foram produzidos, incluindo aqueles que expressam uma seqüência de oncogene ativada (Patente US Nº 4,736,866);
25 expressam o antígeno-T símio SV40 (Patente US Nº 5,728,915); carecem da expressão do fator regulador de interferon 1 (IRF-1)

(Patente US Nº 5,731,490); exibem disfunção dopaminérgica (Patente US Nº 5,723,719); expressam pelo menos um gene humano que participa no controle da pressão sanguínea (Patente US Nº 5,731,489); exigem maior similaridade às condições
 5 existentes na doença de Alzheimer de ocorrência natural (Patente US Nº 5,720,936); possuem capacidade reduzida de mediar a adesão celular (Patente US Nº 5,602,307); possuem um gene do hormônio de crescimento bovino (Clutter *e col.* (1996), *Genetics* 143: 1753-1760); ou são capazes de gerar uma resposta de
 10 anticorpo totalmente humana (McCarthy (1997), *Lancet* 349: 405).

Embora os camundongos e ratos continuem sendo os animais de escolha para a maioria das experimentações transgênicas, em alguns casos, é preferível ou até mesmo
 15 necessário usar espécies de animais alternativas. Os procedimentos transgênicos vêm sendo utilizados com êxito em uma variedade de animais não murinos, inclusive em ovelhas, cabras, porcos, cachorros, gatos, macacos, chipanzés, hamsters, coelhos, vacas e porquinhos-da-índia (vide, *por exemplo.*, Kim *e*
 20 *col.* (1997), *Mol. Reprod. Dev.* 46: 515-526; Houdebine (1995), *Reprod. Nutr. Dev.* 35: 609-617; Petters (1994), *Reprod. Fertil. Dev.* 6: 643-645; Schnieke *e col.* (1997), *Science* 278: 2130-2133; e Amoah (1997), *J. Animal Sci.* 75: 578-585).

O método de introdução dos fragmentos de
 25 ácido nucléico em células mamíferas competentes de recombinação pode ser qualquer método que favoreça a co-

transformação de múltiplas moléculas de ácido nucléico. Procedimentos detalhados para produção de animais transgênicos serão facilmente assimilados pelos versados na técnica, inclusive nas revelações na Patente US Nº 5,489,743 e na Patente US Nº
5 5,602,307.

Q. Métodos de Diagnóstico

Uma vez que os genes e proteínas da invenção são expressos diferencialmente em tecidos de câncer pancreático comparado aos tecidos pancreáticos não cancerosos, os genes e
10 proteínas da invenção podem ser usados para diagnosticar ou monitorar o câncer pancreático, acompanhar a progressão da doença ou para diferenciar o tecido pancreático de amostras de tecido pancreático não cancerosas. Um meio de diagnosticar o
câncer usando as moléculas de ácido nucléico ou proteínas da
15 invenção envolve obter o tecido de pacientes vivos.

Os ensaios para detecção das moléculas de ácido nucléico ou proteína da invenção podem ser em qualquer um dos formatos disponíveis. Ensaios típicos para moléculas de ácido nucléico incluem hibridização ou formatos baseados na
20 PCR. Ensaios típicos para detecção das proteínas, polipeptídios ou peptídeos da invenção incluem o uso de sondas de anticorpo em qualquer formato disponível, tais como ensaios de ligação *in situ*, etc. (vide Harlow & Lane, Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring
25 Harbor, NY, 1988). Nas concretizações preferidas, os ensaios são realizados com controles apropriados.

Geralmente, os diagnósticos da invenção podem ser classificados de acordo com se a concretização é um ensaio baseado em ácido nucléico ou proteína. Alguns ensaios de diagnóstico detectam mutações ou polimorfismos nos ácidos nucléicos ou proteínas da invenção, que contribuem para 5 aberrações cancerosas. Outros ensaios de diagnóstico identificam e distinguem defeitos na atividade protéica detectando o nível de RNA ou proteína da invenção em um organismo testado que remonta ao nível de RNA ou proteína da invenção em um organismo sofrendo de uma doença, tal como câncer, ou 10 detectando um nível de RNA ou proteína em um organismo testado que é diferente de um organismo que não sofre de uma doença.

Além disso, a fabricação de kits que incorporam 15 os reagentes e métodos descritos nas concretizações a seguir de modo a permitir a rápida detecção e identificação de aberrações na atividade ou nível protéico é contemplada. Os kits de diagnóstico podem incluir uma sonda de ácido nucléico ou um anticorpo ou suas combinações, que detectam especificamente 20 uma forma mutante da proteína da invenção, ou de uma sonda de ácido nucléico, um anticorpo ou combinações dos mesmos, que pode ser utilizado para determinar o nível da expressão de RNA ou proteína de uma ou mais proteínas da invenção. O componente de detecção desses kits será geralmente fornecido em 25 combinação com um ou mais dos seguintes reagentes. Um suporte capaz de absorver ou de alguma outra forma se ligar ao

DNA, RNA ou proteína será geralmente fornecido. Suportes disponíveis incluem membranas de nitrocelulose, náilon ou náilon derivatizado que podem ser caracterizadas por portar um arranjo de substituintes positivamente carregados. Uma ou mais enzimas
5 de restrição, reagentes de controle, tampões, enzimas de amplificação e polinucleotídeos não-humanos como o DNA de timo de bezerro ou espermatozoides de salmão podem ser fornecidas nesses kits.

Técnicas de diagnóstico úteis baseadas em ácido
10 nucléico incluem, sem a isto se limitar, sequenciamento direto do DNA, eletroforese em gel de gradiente, análise Southern Blot, análise de confirmação de fita única (SSCA), ensaio de proteção de RNase, análise de hibridização em pontos (dot-blot), amplificação do ácido nucléico, PCR específica ao alelo e
15 combinações dessas abordagens. O ponto inicial para essas análises é ácido nucléico purificado ou isolado de uma amostra biológica. Contempla-se que as biópsias de tecidos proporcionariam uma boa origem de amostra. O ácido nucléico é extraído da amostra e pode ser amplificado por uma técnica de
20 amplificação de DNA, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando iniciadores. Os versados na técnica irão reconhecer de imediato métodos disponíveis para confirmar a presença de polimorfismos. Além disso, qualquer tecnologia de arranjo endereçável conhecida na técnica pode ser empregada
25 com este aspecto da invenção. Uma concretização particular de arranjos de polinucleotídeos é conhecida como GenechipsTM, e foi

descrita em geral na Patente US 5,143,854; nas publicações PCT WO 90/15070 e 92/10092.

Uma grande variedade de marcas e técnicas de conjugação é conhecida pelos versados na técnica e pode ser usada em vários ensaios de ácidos nucleicos. Há diversas formas de se produzir ácidos nucleicos marcados para hibridização ou PCR, incluindo, sem a isto se limitar, oligomarkação, tradução por cortes, marcação de extremidade ou amplificação PCR usando um nucleotídeo marcado. Como alternativa, um ácido nucleico codificando uma proteína da invenção pode ser clonado em um vetor para a produção de uma sonda de mRNA. Tais vetores são conhecidos na técnica, são comercialmente disponíveis e podem ser usados para sintetizar sondas de RNA *in vitro* pela adição de uma RNA polimerase apropriada, tal como T7, T3 ou SP6 e nucleotídeos marcados. Diversas empresas, como a Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), Promega (Madison, WI), e a U.S. Biochemical Corp (Cleveland, OH) fornecem kits comerciais e protocolos para esses procedimentos. Moléculas repórter ou marcas adequadas incluem esses radionuclídeos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminescentes ou cromogênicos, bem como substratos, cofatores, inibidores, partículas magnéticas e similares.

No diagnóstico baseado em proteína preferido, os anticorpos da invenção são ligados a um suporte em um arranjo ordenado, sendo que vários anticorpos são ligados a regiões distintas do suporte que não se sobrepõem. Os versados na

técnica irão reconhecer de imediato ensaios disponíveis que são diagnósticos baseados em proteína. As proteínas são obtidas de amostras biológicas e são marcadas por abordagens convencionais (por exemplo, radioatividade, colorimetricamente ou por fluorescência). Empregando padrões marcados de uma concentração conhecida da proteína da invenção mutante e/ou tipo selvagem, um investigador poderá determinar precisamente a concentração da proteína da invenção em uma amostra, e, com base nessa informação, pode avaliar o nível de expressão da forma específica da proteína. Métodos convencionais na densitometria também podem ser usados para determinar mais precisamente a concentração ou nível de expressão de tal proteína. Essas abordagens também são facilmente automatizadas usando a tecnologia conhecida pelos versados na técnica de análise de diagnóstico de alto rendimento. Como detalhado acima, qualquer tecnologia de arranjo endereçável conhecida na técnica pode ser empregada com este aspecto da invenção e exibir os arranjos protéicos nos chips numa tentativa de maximizar os padrões de ligação dos anticorpos e as informações de diagnóstico.

Como discutido acima, a presença ou detecção de um polimorfismo em um gene ou proteína da invenção pode oferecer um diagnóstico de um câncer ou enfermidade similar em um organismo. Concretizações adicionais incluem a preparação de kits de diagnóstico compreendendo componentes de detecção, como anticorpos, específicos para uma variante polimórfica

específica do gene ou proteína da invenção. O componente de detecção será geralmente fornecido em combinação com um ou mais dos seguintes reagentes. Um suporte capaz de absorver ou de alguma outra forma se ligar ao RNA ou proteína será
5 geralmente fornecido. Suportes disponíveis para esse fim incluem, sem a isto se limitar, membranas de nitrocelulose, náilon ou náilon derivatizado, que podem ser caracterizadas por portar um arranjo de substituintes carregados positivamente, e GenechipsTM ou seus equivalentes. Uma ou mais enzimas, como
10 a Transcriptase Reversa e/ou a Taq polimerase, podem ser fornecidas no kit, assim como dNTPs, tampões ou polinucleotídeos não humanos, como DNA de timo de cabra ou esperma de salmão. Os resultados dos ensaios do kit podem ser interpretados por um profissional de saúde ou um laboratório de
15 diagnóstico. Como alternativa, os kits de diagnóstico são fabricados e vendidos para indivíduos particulares para auto-diagnóstico.

Além de diagnosticar a doença de acordo com a presença ou ausência de um polimorfismo, algumas doenças
20 envolvendo o câncer resultam de níveis distorcidos da proteína ou gene da invenção, em particular tecidos ou padrões aberrantes da expressão da proteína da invenção. Por meio da monitoração do nível de expressão em vários tecidos, por exemplo, pode-se fazer um diagnóstico ou identificar o estado de uma doença. De forma
25 similar, determinando-se as razões do nível de expressão das várias proteínas da invenção em tecidos específicos (por exemplo,

padrões de expressão), é possível realizar um prognóstico da saúde. Os níveis de expressão da proteína da invenção em vários tecidos de indivíduos saudáveis, bem como de indivíduos sofrendo de cânceres, são determinados. Esses valores podem ser gravados em um banco de dados e comparados com valores obtidos de indivíduos testados. Além disso, as razões ou padrões de expressão em vários tecidos tanto de indivíduos saudáveis como doentes são registrados em um banco de dados. Essas análises são chamadas de “perfis de estado de doença”, e comparando-se um perfil de estado de doença (por exemplo, de um indivíduo saudável ou doente) com um perfil de estado de doença de um indivíduo testado, o clínico poderá diagnosticar rapidamente a presença ou ausência da doença.

As técnicas de diagnóstico baseadas em proteína e ácido nucléico descritas acima podem ser usadas para detectar o nível ou quantidade ou razão de expressão dos genes ou proteínas da invenção em um tecido. Através de hibridizações “Northern” quantitativas, análise *in situ*, imunohistoquímica, ELISA, tecnologia de arranjo genechip (chip de DNA), PCR e “Western blots”, por exemplo, a quantidade ou nível de expressão do RNA ou proteína para uma proteína específica da invenção (tipo selvagem ou mutante) pode ser rapidamente determinado, e com base nessa informação, determinam-se as razões de expressão. Como alternativa, as proteínas da invenção a serem analisadas podem ser membros de família atualmente desconhecidos, mas

que são identificados com base em se possuem uma ou mais das regiões de homologia descritas acima.

| Descrição dos Desenhos |

Figura 1 A Figura 1 ilustra a seqüência de
5 sinais prevista para secreção de LBFL313 (SEQ ID NO: 2). A análise foi efetuada utilizando o SignalIP 3.0 Server (www.cbs.dtu.dk/services/SignalIP/).

Figura 2 A Figura 2 é resultado na análise Western mostrando que LBFL313 é detectado no sobrenadante da
10 cultura de células.

Figura 3 A Figura 3 mostra os efeitos da superexpressão de LBFL313 em células CHO sobre a proliferação celular (Painel A), motilidade (Painel B) e invasividade (Painel C).

15 Figura 4 A Figura 4 mostra os efeitos da superexpressão de LBFL313 em camundongos nus sobre a tumorigênese (Painel A) e sobre a formação de microvasos (Painel B).

Figura 5 A Figura 5 mostra resultados
20 representativos da análise imunohistoquímica da expressão de LBFL313 usando amostras de biópsia pancreática e anticorpo anti-LBFL313.

Figura 6 A Figura 6 representa gráficos mostrando os efeitos do anticorpo policlonal anti-LBFL313 sobre
25 a invasividade das linhagens celulares de câncer pancreático.

| Melhor Modo |

Sem descrição adicional, acredita-se que os versados na técnica serão capazes, usando a descrição anterior e os exemplos ilustrativos a seguir, de formar e utilizar os compostos da presente invenção e praticar os métodos reivindicados. Os exemplos funcionais a seguir, portanto, apontam de maneira específica concretizações preferidas da presente invenção, não devendo ser interpretados de forma alguma como limitações do restante da revelação.

EXEMPLOS

10

Exemplo 1

Identificação do mRNA Expresso

Diferencialmente no Adenocarcinoma Pancreático

Amostras de tecidos de pacientes foram derivadas de pacientes coreanos e classificadas em dois grupos. Um grupo consistiu de pacientes que foram diagnosticados com adenocarcinoma pancreático. Os pacientes neste grupo, seis homens e três mulheres, tinham idades entre 51 e 70 anos. O segundo grupo de pacientes foi diagnosticado com pâncreas normal. Neste grupo de três homens, os pacientes tinham idades variando entre 63 e 66 anos. A análise histológica de cada uma das amostras de tecido foi realizada e as amostras foram segregadas em categorias cancerosas ou não-cancerosas.

Com pequenas modificações, o protocolo de preparação de amostra seguiu o Manual de Análise de Expressão Affymetrix GeneChip. O tecido congelado foi primeiro triturado até virar pó usando o Spex Certiprep 6800 Freezer Mill. O RNA

total foi então extraído usando Trizol (Life Technologies). Em seguida, o mRNA foi isolado usando o kit Oligotex mRNA Midi (Qiagen). Usando 1-5 mg de mRNA, o DNAc de fita dupla foi criado usando o sistema SuperScript Choice (Gibco-BRL). A
5 síntese da primeira fita de DNAc foi iniciada com um oligonucleotídeo T7-(dT24). O DNAc foi então extraído com fenol-clorofórmio e precipitado em etanol a uma concentração final de 1 mg/mL.

A partir de 2 mg de DNAc, o RNAc foi
10 sintetizado de acordo com os procedimentos convencionais. Para marcar o RNAc com biotina, os nucleotídeos Bio-11-CTP e Bio-16-UTP (Enzo Diagnostics) foram adicionados à reação. Após incubação a 37 °C por seis horas, o RNAc marcado foi limpo de acordo com o protocolo Rneasy Mini kit (Qiagen). O RNAc foi
15 então fragmentado (tampão de fragmentação 5': 200 mM Tris-Acetato (pH 8,1), 500 mM KOAc, 150 mM MgOAc) por trinta e cinco minutos a 94°C.

55 mg de RNAc fragmentado foram hibridizados no conjunto de arranjos Affymetrix Human Genome
20 U133 por 24 horas a 60 rpm em uma estufa de hibridização a 45°C. Os chips foram lavados e corados com Estreptavidina Ficoeritrina (SAPE) (Molecular Probes) em estações fluídicas Affymetrix. Para amplificar a coloração, a solução SAPE foi adicionada duas vezes com uma etapa de coloração com anticorpo
25 biotinilado anti-estreptavidina (Vector Laboratories) no meio. A hibridização para os arranjos de sonda foi detectada por varredura

fluorométrica (Hewlett Packard Gene Array Scanner). Após a hibridização e a varredura, as imagens de microarranjo foram analisadas quanto ao controle de qualidade, buscando defeitos maiores no chip ou anormalidades no sinal de hibridização.

5 Depois, os chips passaram por QC, Affymetrix Microarray Suite (v5.0) e LIMS (v3.0).

A expressão diferencial dos genes entre as amostras pancreáticas cancerosas e não-cancerosas foi determinada usando os conjuntos GeneChip humanos Affymetrix U133, com os seguintes métodos estatísticos: (1) Para cada gene,
10 os valores de sinal para U133 foram determinados pelo Affymetrix Microarray Suite (v5.0), que também efetuou chamadas “Ausente” (=não detectado), “Presente” (=detectado) ou “Marginal” (=não claro se está Ausente ou Presente) para cada
15 elemento GeneChip. (2) Usando o critério de chamada pelo menos 40% presente nos grupos de amostra pancreática cancerosa, um conjunto de genes foi selecionado para análise adicional. (3) Todos os valores de sinal foram transformados em uma escala logarítmica. (4) O método de Análise da Variância
20 (ANOVA) foi utilizado para análise dos dados (Steel e col., Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach, Third Ed., McGraw-Hill, 1997).

A análise dos dados do chip mostrou que a expressão do marcador LBFL313 foi supraregulada de forma
25 significativa (11,13 vezes, $p = 0$) nas amostras de adenocarcinoma pancreático em comparação com as amostras de tecido

pancreático normal. Esses dados indicam que a suprarregulação de LBFL313 pode ser diagnóstica para o câncer pancreático.

O nível de expressão de LBFL313 (SEQ ID NO: 1) pode ser medido pelo fragmento de sequência de chips no. 228058_at no Affymetrix GeneChip U133. Através da extração combinada dos dados acima com o GeneExpress Oncology DatasuiteTM da Gene Logic, Inc. (Gaithersburg, MD), os níveis de expressão de 228058_at em vários neoplasmas malignos, comparado aos tecidos controle normais, são apresentados na Tabela 1, em que o múltiplo de modificação e a direção da modificação (suprarregulação ou infraregulação) também são indicados. Um múltiplo de modificação maior do que 1,5 foi considerado significativo.

Os resultados da expressão de GeneChip, determinados pela ligação da amostra ao fragmento de sequência de chip no. 228058_at, foram validados por RT-PCR quantitativa (Q-RT-PCR) usando o ensaio Taqman® (Perkin-Elmer). Iniciadores da PCR designados a partir do arquivo de informações de seqüências do fragmento Affymetrix específico (228058_at) foram utilizados no ensaio. O gene alvo em cada amostra de RNA (10 ng de RNA total) foi ensaiado em relação a um gene de referência marcado exogenamente. Para essa finalidade, o gene de resistência à tetraciclina foi usado como a referência adicionada de forma exógena. Essa abordagem proporciona a expressão relativa, conforme medida pelo valor de limiar de ciclo (Ct) do RNAm alvo em relação a uma quantidade constante de

valores Ct de referência Tet. O painel de amostra incluiu RNAs de tecido que foram analisados em GeneChips U133. Além disso, várias amostras novas que não foram analisadas no GeneChip foram usadas para validações de expressão por Q-RT-PCR. Os dados da Q-RT-PCR confirmam a supregulação de LBFL313 observada no adenocarcinoma pancreático comparado às amostras de biópsia pancreática.

Tabela 1.

Expressão de LBFL313 em neoplasmas

10 malignos

Tecido	Patologia/Morfologia	Múltiplo de Modificação	Direção	valor de p
Mama	Carcinoma Lobular Infiltrante	1,64	SUPRA	0,19
	Carcinoma ductal & Lobular Infiltrante	1,59	SUPRA	0,06
Colo do Útero	Carcinoma Celular Escamoso	1,61	SUPRA	0,38
Cólon	Adenocarcinoma Mucinoso	1,88	SUPRA	0,05
Duodeno	Adenocarcinoma	1,69	SUPRA	0,19
Esôfago	Adenocarcinoma	1,83	SUPRA	0,15
Fígado	Carcinoma Hepatocelular	1,52	SUPRA	0,02
Pulmão	Adenocarcinoma	1,52	SUPRA	0,21
Ovário	Cistadenocarcinoma Mucinoso	9,65	SUPRA	0
	Cistadenocarcinoma Seroso	2,15	SUPRA	0,13
Pâncreas	Adenocarcinoma	8,62	SUPRA	0
Pele	Carcinoma Celular Basal	-3,01	INFRA	0,01
	Melanoma Maligno	-6,61	INFRA	0
	Carcinoma Celular Escamoso	-3,82	INFRA	0,03
Estômago	Carcinoma com Células em Anel de Sinete	2,40	SUPRA	0,03

Exemplo 2

Clonagem do DNAC Humano de Seqüência Completa (LBFL313) Correspondendo a Espécies de RNAm Expressas Diferencialmente

5 O DNAC de seqüência completa com a SEQ ID NO: 1 foi obtido pelo método "oligo-pulling". Em suma, um oligo específico ao gene foi planejado com base na seqüência de LBFL313. O oligo foi marcado com biotina e usado para hibridizar-se com 2 µg de DNA plasmideal de fita única (DNAC
10 recombinantes) de uma biblioteca de placenta humana seguindo os procedimentos de Sambrook e col. Os DNACs hibridizados foram separados por contas conjugadas com estreptavidina e eluídos por aquecimento. O DNAC eluído foi convertido em DNA plasmideal de fita dupla e usado para transformar células de
15 *E. coli* (DH10B) e o DNAC mais longo foi submetido à triagem. Após a seleção positiva ter sido confirmada por PCR usando iniciadores específicos do gene, o clone do DNAC foi submetido ao sequenciamento do DNA.

A seqüência de nucleotídeos dos DNACs
20 humanos de seqüência completa correspondendo ao RNAm regulado diferencialmente detectado acima é apresentada na SEQ ID NO: 1. O DNAC compreende 777 pares de bases.

Um quadro de leitura aberto dentro da seqüência de nucleotídeos de DNAC da SEQ ID NO: 1, nos nucleotídeos 53-
25 640 (53-643 incluindo o códon de parada), codifica uma proteína de 196 aminoácidos. A seqüência de aminoácidos

correspondendo a uma proteína prognosticada codificada pela SEQ ID NO: 1 é apresentada na SEQ ID NO: 2.

A SEQ ID NO: 2 contém um domínio de lectina relacionada à Jacalina; as proteínas contendo esse domínio são lectinas. Ele é encontrado em 1 a 6 cópias nessas proteínas. O domínio também é encontrado na proteína de ligação à espermina prostática animal (Raval *e col.* (2004) *Glycobiology* 14:1247-1263). A Figura 1 mostra o resultado da análise de sequência de sinal usando o SignalIP 3.0 Server (www.cbs.dtu.dk/services/SignalIP/). O sítio de clivagem de sequência de sinais potencial para secreção é prognosticado entre a posição de aminoácido 40 (Ala) e 41 (Gly).

A análise por Northern blot foi realizada para determinar o tamanho das transcrições de RNAm que correspondem a LBFL313. Um Northern blot contendo RNAs totais de vários tecidos humanos foi utilizado (Human 12-Lane MTN Blot, Clontech, Palo Alto, CA), e um EST contendo a sequência 228058_at foi marcado radioativamente pelo método de iniciador aleatório e usado para sondar o “blot”. O blot foi hibridizado em formamida a 50%, 5X SSPE, SDS a 0,1%, 5X solução de Denhart e 0,2 mg/mL de DNA de esperma de arenque a 42°C e lavado com 0,2X SSC contendo SDS a 0,1% à temperatura ambiente. O Northern blot apresentou uma única transcrição para esse gene, cujo tamanho é de aproximadamente 0,8 kb. Isso corresponde ao tamanho do clone LBFL313 (SEQ ID NO: 1).

Exemplo 3

Produção de Linhagens Celulares Transfectadas com LBFL313

A região de codificação de LBFL313 foi
5 amplificada por PCR usando o iniciador direto (5'-TTG
GGATCCGTATAAAGGCGATGTGGAGG-3') incorporando o
sítio *Bam*HI e o iniciador reverso (5'-ACC ATC TAG AGC GAC
CCA CGG GTG AGT-3') incorporando o sítio *Xba*I. A PCR foi
realizada usando a DNA polimerase TaqPlus precision
10 (Stratagene, CA) segundo a instrução do fabricante. Os ciclos de
amplificação PCR envolveram a desnaturação inicial a 94 °C por
2 min, e 27 ciclos ; 94°C por 30 seg, 50°C por 30 seg, 72°C por 1
min, seguido de uma extensão final a 72°C por 10 min. O produto
da PCR foi clonado no sítio *Bam*HI e *Xba*I do vetor de expressão
15 mamífero pcDNA3.1-mycHis (Invitrogen). O plasmídeo clonado
(pLFG250) foi seqüenciado através da região do sítio de
clonagem para confirmar sua estrutura primária.

As células CHO subconfluentes foram
transfectadas de maneira estável com pLFG250 ou com o vetor
20 pcDNA3.1-mycHis sozinho usando o reagente
LipofectaminePLUS (Invitrogen) segundo as instruções do
fabricante. Após 24 h, as células transfectadas foram cultivadas
em F12 de Ham (Invitrogen) contendo FBS 10% e 400 µg/ml de
G418 (Sigma) para seleção. Esse meio de seleção foi trocado a
25 cada 2 dias, e após 10-12 dias, os anéis de clonagem foram usados
para isolar os clones positivos. As culturas foram adicionalmente

expandidas e examinadas quanto à expressão de LBFL313. As células foram submetidas à lise em um tampão de lise contendo 50 mM de HEPES (pH 7,2), 150 mM de NaCl, 25mM de beta-gliserofosfato, 25mM de NaF, 5mM de EGTA, 1mM de EDTA, 1% NP-40, 1mM de ortovanadato de sódio, 0,1mM de PMSF. Os meios de cultura foram concentrados por 10k cut-off microcon (Amicon) perfazendo até 15 µl de volume. As proteínas foram reduzidas por incubação por 5 min a 95°C em 4x SDS tampão de carregamento. Os polipeptídios foram dissolvidos em 10 mA / gel em géis SDS-PAGE 12% e transfectados eletroforéticamente para uma membrana Immobilon P-transfer de 0,45 µm (Millipore) por 2 horas a 200 mA / gel a 4°C. As membranas foram bloqueadas por 1 hora em tampão TBST (25 mM Tris, pH 7,5; 125 mM NaCl e Tween-20 0,1% (v/v)) contendo leite desnatado a 5% (p/v). Os “blots” foram então sondados à noite com o anticorpo HRP anti-His (Santa Cruz). O material imunoreativo foi então visualizado por quimiluminescência aperfeiçoada (Elpis Biotech,) segundo as instruções do fabricante. Como mostra a Figura 2, a proteína LBFL313 foi detectada apenas no sobrenadante da cultura, mas não no extrato celular. Isso confirma a previsão de que LBFL313 codifica uma proteína segregada.

Exemplo 4

Análise da Superexpressão de LBFL313 na Proliferação Celular, Migração e Invasão

Para determinar o efeito da superexpressão de LBFL313 sobre a proliferação celular, a taxa de crescimento foi

medida por contagem celular. Em placas de 12 poços, 4×10^4 células foram plaqueadas. As placas foram incubadas a 37°C e a CO_2 a 5% por 12 dias e o número de células foi contado com hemocítômetro a cada dia. O resultado representa os valores médios + desvio padrão de triplicação. Como mostra a Figura 3A, em células CHO, a superexpressão de LBFL313 induziu proliferação mais rápida. Um efeito similar foi observado na linhagem celular do câncer pancreático PANC-1 superexpressando LBFL313.

A migração e a invasão foram estudadas pelo ensaio em Câmara de Boyden. Os dois ensaios foram realizados em uma Câmara de Boyden de 48 poços “Neuro Probe 48 well micro chamber” (Neuroprobe). As células foram tripsinizadas e resuspensas em inibidor de tripsina, solução de inibidor de tripsina de soja (Sigma). As células foram precipitadas e suspensas a uma concentração final de 2×10^6 células/mL em meio isento de soro. Os poços inferiores da câmara foram preenchidos com 30 μl de meio padrão. A câmara foi montada usando filtros de polycarbonato (polycarbonato, tamanho de poro de 8 μm de diâmetro, Neuroprobe). Para ensaios de invasão celular, 1mg/mL de MatrigelTM Basement Membrane Matrix (BS biosciences) foi colocado em camada sobre cada filtro (500 μg /filtro) e seco a ar. Uma amostra de 50 μl de suspensão celular (1×10^5 células/poço) foi adicionada ao compartimento superior. A câmara foi incubada a 37°C e CO_2 a 5% e o tempo de incubação foi variado dependendo dos tipos de células a serem analisados: Por 24 horas

no caso do ensaio de migração de CHO, por 48 horas no caso do ensaio de invasão de CHO e por 18 horas no caso do ensaio de migração e invasão de PANC-1. Ao término da incubação, as células na superfície superior dos filtros foram removidas
5 mecanicamente. Os filtros foram fixados em metanol e corados em corante Giemsa, solução modificada (Sigma). O número de células migradas por campo (100x) foi contado sob o microscópio de luz (Olympus). Cada amostra foi ensaiada em triplicata. Como mostra a Figura 3B e a Figura 3C, a motilidade e a
10 invasividade das células CHO foram aumentadas pela superexpressão de LBFL313. Efeitos similares foram observados na linhagem celular do câncer pancreático PANC-1 superexpressando LBFL313.

Exemplo 5

15 Efeitos da Superexpressão de LBFL313 sobre a Tumorigênese em Camundongos Nus

Os efeitos biológicos da superexpressão de LBFL313 sobre o crescimento tumoral *in vivo* foram determinados. As células CHO foram injetadas subcutaneamente
20 nos flancos de camundongos nus imunodeficientes. Células CHO confluentes, não transfectadas ou transfectadas de forma estável com o vetor LBFL313 (pLFG250) ou com o vetor sozinho, foram tripsinizadas e resuspensas em PBS a uma densidade de $3,3 \times 10^7$ células/mL. Cinco milhões de células CHO de cada tipo foram
25 injetados subcutaneamente no flanco de camundongos Balb/C (nu/nu) fêmeas de 8 semanas de idade. No processo de

crescimento dos camundongos, os comprimentos e larguras dos tumores foram medidos. O volume do tumor foi calculado com a fórmula $\text{Volume do Tumor} = (\text{comprimento}) \times (\text{largura})^2 / 2$. Passados 37 dias, os camundongos foram sacrificados, analisando-se então os tumores. Como mostra a Figura 4A, o tamanho dos tumores gerados pelas células transfectadas com LBFL313 foi maior do que 5 vezes o daqueles gerados por células controle não expostas ao vetor viral (mock).

Para determinar o grau de angiogênese induzida por tumor, a secção de parafina dos xenoenxertos tumorais foi corada com o anticorpo monoclonal anti-Fator VIII (Dako). As secções de tecido embebidas em parafina (3 a 5 μm de espessura) obtidas dos tumores de cada grupo de camundongos foram desparafinizadas em xileno e reidratadas em uma série de etanol gradativa (100-90-80-70-50-30%) e na lavagem com PCS. A peroxidase endógena foi bloqueada imergindo-se a lâmina em peróxido de hidrogênio a 0,3 % (v/v) em metanol por 15 min à temperatura ambiente. Após lavagem três vezes com PBS, cada uma durante 4 minutos, as secções foram bloqueadas por imersão em soro de burro normal a 10 % (v/v) em PBS por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem três vezes com PBS, cada uma durante 4 min, as secções bloqueadas foram incubadas em anticorpo monoclonal anti-Fator VIII (fator von Willebrand, diluição de 1:50) (Dako) por 2 horas à temperatura ambiente. Após 2 horas e lavagem três vezes com PBS durante 4 minutos cada, as lâminas foram incubadas por 30 min com “Link

universal” biotinilada à temperatura ambiente, lavada três vezes em PBS por 4 minutos cada, e incubadas com estreptoavidina-HRP conjugados (Dako) por 15 min à temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS, as secções foram incubadas com cromogênio e lavadas em água destilada. As secções de Fator VIII não foram contracoradas.

O número de microvasos foi determinado como descrito por Padro (Padro *et al.* (2000) *Blood* 95:2637-2644). A contagem de microvasos foi avaliada simultaneamente por dois investigadores independentes experientes usando microscopia de luz. Os investigadores não estavam cientes da descoberta clinico-patológica. Toda a secção foi varrida sistematicamente, isto é, campo por campo, à ampliação de 100x para descobrir as áreas que apresentam a vascularização mais intensa. A ampliação foi então alterada para x200 ou x400, e os investigadores puderam reposicionar a lâmina até que o maior número de microvasos estivesse dentro do campo de x400. Essa área foi definida como um ponto ativo após os dois investigadores chegarem a um consenso, reduzindo assim o erro da contagem de microvasos entre os observadores. Em cada ponto ativo, os dois investigadores realizaram a contagem individual de microvasos em um campo de x400. Como mostra a Figura 4B, os resultados revelaram contagens de microvasos superiores nos tumores dos camundongos injetados com células transfectadas com LBFL313 do que nas células controle não expostas ao vetor viral (mock).

Experimentos *in vivo* implicam em formação de tumor agressivo e angiogênese acentuada por LBFL313.

Exemplo 6

Produção do Anticorpo Policlonal Anti-LBFL313

5 O DNAC de seqüência completa de LBFL313 foi amplificado por PCR usando o iniciador direto (5'-CTAAGGCCCGAGCCGGCCGGGAAGATGTATGGCCCTGGA-3') e o iniciador reverso (5-
10 'CATAGGCCCCACCGGCCGAGCGACCCACGGGTGAGTT-3'). A PCR foi realizada usando a DNA polimerase TaqPlus precision (Stratagene, CA) segundo a instrução do fabricante. Os ciclos de amplificação PCR envolveram a desnaturação inicial a 94°C por 5 min, e 30 ciclos ; 94°C por 30 seg, 58°C por 30 seg, 72°C por 30 seg, seguido de uma extensão final a 72°C por 10
15 min. O produto da PCR foi visualizado em um gel TAE a 1,5%, e foi purificado em gel usando o kit de recuperação de DNA Zymoclean Gel (Zymo Research, CA) segundo a instrução do fabricante. Esse DNA purificado foi inserido no sítio *Sfi*I do vetor pLFG106 para produzir a proteína de fusão recombinante
20 LBFL313-Fc. O pLFG106 é um vetor de expressão contendo seqüência de sinais, região Fc da IgG humana e genes DHFR na espinha dorsal de pcDNA3.1 (Invitrogen). O PLFG106 também contém uma seqüência de reconhecimento de trombina entre o sítio de clonagem e a região Fc. O plasmídeo de expressão
25 LBFL313-Fc foi transfectado de forma estável em linhagens celulares mutantes CHO deficientes em DHFR usando reagentes

ExGen 500 (Fermentas, Lituânia) segundo a instrução do fabricante. As células transfectadas de forma estável foram selecionadas em MEM- α livre de nucleotídeos (Invitrogen, CA) contendo 800 μ g/ml de G418 (Invitrogen, CA) e FBS dializado a 10% por 2
5 semanas. Transfectantes estáveis foram adicionalmente adaptados sob uma concentração de 100 nM de metotrexato (Sigma, MO) por 2 semanas. A proteína de fusão LBFL313-Fc recombinante, segregada no meio de cultura, foi identificada por análise Western blot e ELISA usando anticorpo anti-Fc humano (Sigma, MO).

10 A expressão em larga escala da proteína de fusão recombinante LBFL313-Fc foi realizada usando garrafas Roller (1750 $\times$ 2). Transfectantes estáveis expressando as proteínas de fusão recombinantes LBFL313-Fc foram cultivados em IMDM mais FBS 5%. A cultura em garrafa roller foi
15 inoculada com 3×10^8 células e o dispositivo foi girado a 5 rpm em incubadora a 37°C. As células foram cultivadas por 5 dias, e o meio foi trocado com meio isento de soro a cada três dias. Os resíduos celulares no meio isento de soro coletado foram removidos pela centrifugação a 6.000 rpm por 10 min. Para
20 purificar a proteína de fusão recombinante LBFL313-Fc, o meio livre de células foi adicionalmente processado por concentração usando o Concentrador ProFlux M12 (Amicon) através de uma Membrana 10K MWCO Pellicon 2 (Millipore). O meio concentrado foi então passado através de uma coluna de agarose
25 contendo proteína A de 10 mL (Pierce) pré-equilibrada em 20 mM de fosfato de Sódio, pH 8,0. A proteína não ligada foi

removida da coluna por lavagem com tampão fosfato de sódio 20 mM. A coluna foi então eluída com 0,1M de Citrato, pH 3,0, coletando 4,5 mL frações em tubos contendo 500 μ l 1M Tris-HCl, pH 9,0. A proteína de fusão recombinante LBFL313-Fc contendo frações foi
5 concentrada e adicionalmente purificada com cromatografia de exclusão por tamanho usando a resina sefarose 200HR (Amersham, IL).

O Fc C-terminal foi clivado da proteína de fusão recombinante LBFL313-Fc pelo “Thrombin Cleavage Capture Kit” (Novagen) e então removido pela “ImmunoPureR
10 Immobilized Protein A” (Pierce). Resumidamente, a proteína de fusão recombinante LBFL313-Fc foi incubada com trombina biotinilada a 20°C durante a noite. Após a proteólise, a trombina biotinilada foi removida por contas de estreptavidina-agarose. A solução resultante, mistura de LBFL313 e Fc recombinante, foi
15 separada passando-a duas vezes através da coluna de Proteína A Imobilizada ImmunoPureR (Pierce). A pureza da LBFL313 recombinante foi verificada em géis SDS-PAGE.

A LBFL313 recombinante purificada foi usada para imunizar dois coelhos usando técnicas convencionais. O
20 soro imunizado foi coletado e então purificado usando o Kit de Purificação IgG ImmunoPureR (A Plus) (Pierce) segundo a instrução do fabricante. A purificação adicional foi realizada usando o Kit de Imobilização AminoLink^R(A Plus) (Pierce) ligado à Fc recombinante humana. O anticorpo policlonal
25 purificado detecta a proteína de aproximadamente 21 kDa nos Western blots de meios condicionados obtidos a partir de células

pancreáticas expressando LBFL313. A especificidade do anticorpo foi adicionalmente demonstrada pela detecção aperfeiçoada da proteína LBFL313 obtida a partir do meio condicionado de células PANC-1 transfectada com LBFL313, embora não tenha havido aperfeiçoamento da do vetor apenas com células PANC-1 transfectadas.

Exemplo 7

Análise Imunohistoquímica da Expressão de LBFL313

Lâminas de microarranjo de tecidos foram desparafinizadas em xileno e reidratadas em álcool graduado. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com metanol contendo peróxido de hidrogênio a 0,3% à temperatura ambiente por 20 min. A recuperação do antígeno por microondas foi realizada em tampão citrato (0,01M, pH 6,0) por 4 min. Depois, as lâminas foram incubadas com solução de soro de burro normal a 10% por 1 hora para reduzir a coloração não específica de fundo.

O anticorpo primário era o anticorpo policlonal anti-LBFL313, a uma diluição de 1:500. As secções bloqueadas foram incubadas em anticorpo primário durante a noite a 4°C. A reação subsequente foi realizada usando um kit LSAB+ (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) e o procedimento recomendado. Finalmente, as lâminas foram incubadas com 3-amino-9-etil carbazol (DakoCytomation, Carpinteria, CA, EUA) e contracoradas com solução de hematoxilina de Harris, modificada (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, EUA).

Em todos os casos, foi observada imunoreatividade no citoplasma das células tumorais. A imunoreatividade foi avaliada pelo método “H-score”. A intensidade da coloração foi pontuada como 0, 1, 2 e 3 correspondendo à presença de coloração marrom negativa, fraca, intermediária e forte, respectivamente. A porcentagem de células coradas em diferentes intensidades foi determinada, e a seguinte fórmula foi aplicada: $H\text{-score} = (\% \text{ de células coradas ao grau de intensidade } 1) + 2 \times (\% \text{ de células coradas ao grau de intensidade } 2) + 3 \times (\% \text{ de células coradas ao grau de intensidade } 3)$. Os “H-scores” do tecido tumoral e dos tecidos não-tumorais adjacentes foram analisados usando o teste de postos com sinais de Wilcoxon. Como mostra a Figura 5, os tecidos tumorais tiveram uma expressão de LBFL313 significativamente maior do que a dos tecidos não-tumorais (14 de 16 casos) ($p < 0,05$).

Exemplo 8

Efeito do Anticorpo Anti-LBFL313 sobre a Invasividade das Células do Câncer Pancreático

Para determinar o efeito do anticorpo anti-LBFL313 sobre a invasão das linhagens celulares do câncer pancreático humano, realizou-se o ensaio da Câmara de Boyden na presença do anticorpo anti-LBFL313 ou da IgG normal de coelho. Resumidamente, cinco espécies de linhagens celulares de câncer pancreático, CFPAC-1, MiaPaCa-2, PANC-1, AsPC-1 e BxPC-3, foram tripsinizadas e resuspensas em solução inibidora de tripsina (Sigma). As células foram precipitadas e suspensas em

meio isento de soro na presença de PBS, do anticorpo anti-LBFL313 ou da IgG normal de coelho a uma concentração final de $1\sim 5 \times 10^6$ células/mL. Os poços inferiores da câmara foram preenchidos com 30 μ l de meio padrão. A câmara foi montada usando filtros de polycarbonato de tamanho de poro de 8 μ m de diâmetro (Neuroprobe) revestidos no lado superior com 1 mg/mL de Matrigel™ Basement Membrane Matrix (BD biosciences). 50 μ l da suspensão celular foram adicionados ao compartimento superior. A câmara foi incubada a 37°C e CO₂ a 5% por 24 horas. Ao término da incubação, as células na superfície superior dos filtros foram removidas mecanicamente. Os filtros foram fixados em metanol e corados em corante Giemsa, solução modificada (Sigma). O número de células migradas por campo (100x) foi contado sob o microscópio de luz (Olympus). Cada amostra foi ensaiada em triplicata. Como mostra a Figura 6, o anticorpo anti-LBFL313 inibiu com eficácia a invasividade das linhagens celulares do câncer pancreático humano de maneira dependente da dose. Efeitos similares foram observados em linhagens celulares do câncer gástrico, AGS e N87.

| Aplicabilidade Industrial |

Embora a presente invenção tenha sido descrita em detalhes com referência aos exemplos acima, entende-se que várias modificações podem ser realizadas sem divergir da essência da invenção. Logo, a invenção se limita apenas às reivindicações a seguir. Todas as patentes citadas, pedidos de patente e publicações mencionadas no presente pedido são aqui incorporadas na íntegra para fins de referência.

REIVINDICAÇÕES

1. – Molécula de ácido nucléico isolada, caracterizada por ser selecionada dentre o grupo que consiste de: (a) uma molécula de ácido nucléico isolada compreendendo a
5 SEQ ID NO: 1, (b) uma molécula de ácido nucléico isolada codificando a SEQ ID NO: 2, (c) uma molécula de ácido nucléico isolada que codifica uma proteína que é expressa no câncer e que apresenta pelo menos cerca de 95% de identidade de seqüência de nucleotídeos ao longo de toda a seqüência contígua da SEQ ID
10 NO: 1, e (d) uma molécula de ácido nucléico isolada compreendendo o complemento de uma molécula de ácido nucléico de (a), (b) ou (c).

2. – Molécula de ácido nucléico isolada, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a
15 molécula de ácido nucléico compreende os nucleotídeos 53-640 da SEQ ID NO: 1.

3. – Molécula de ácido nucléico isolada, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a molécula de ácido nucléico compreende os nucleotídeos 53-643
20 da SEQ ID NO: 1.

4. – Molécula de ácido nucléico isolada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que a referida molécula de ácido nucléico é operavelmente ligada a um ou mais elementos de controle de
25 expressão.

5. – Vetor, caracterizado por compreender uma molécula de ácido nucléico isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3.

6. – Célula hospedeira, caracterizada por ser transformada para conter a molécula de ácido nucléico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3.

7. – Célula hospedeira, caracterizada por compreender um vetor de acordo com a reivindicação 5.

8. – Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que a referida célula hospedeira é selecionada dentre o grupo que consiste de células hospedeiras procarióticas e células hospedeiras eucarióticas.

9. – Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que a referida célula hospedeira é *Escherichia coli* DH5@/p313-JF3(Depósito N° KCTC 10954BP).

10. – Método de produção de um polipeptídio, caracterizado por compreender cultivar uma célula hospedeira transformada com a molécula de ácido nucléico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3.

11. – Método, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a referida célula hospedeira é selecionada dentre o grupo que consiste de células hospedeiras procarióticas e células hospedeiras eucarióticas.

12. – Polipeptídio isolado, caracterizado por ser produzido pelo método de acordo com a reivindicação 10.

13. – Polipeptídio ou proteína isolada, caracterizado por ser selecionado dentre o grupo que consiste de uma proteína compreendendo a seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 e uma proteína com pelo menos 95% de
5 identidade de seqüência de aminoácidos com a SEQ ID NO: 2.

14. – Anticorpo isolado ou fragmento de anticorpo de ligação a antígeno, caracterizado por se ligar a um polipeptídio de acordo com a reivindicação 13.

15. – Anticorpo, de acordo com a reivindicação
10 14, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo é um anticorpo monoclonal ou policlonal.

16. – Método para identificar um agente que modula a expressão de um ácido nucléico codificando uma proteína, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por
15 compreender:

expor células que expressam o ácido nucléico ao agente; e

determinar se o agente modula a expressão do referido ácido nucléico, desse modo identificando um agente que
20 modula a expressão de um ácido nucléico codificando a proteína.

17. – Método para identificar um agente que modula o nível ou pelo menos uma atividade de uma proteína, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por compreender:

expor células que expressam a proteína ao
25 agente;

determinar se o agente modula o nível ou pelo menos uma atividade da referida proteína, identificando assim um agente que modula o nível ou pelo menos uma atividade da proteína.

5 18. – Método, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o agente modula uma atividade da proteína.

19. – Método para modular a expressão de um ácido nucléico codificando uma proteína, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por compreender:

10 administrar uma quantidade eficaz de um agente que modula a expressão de um ácido nucléico codificando a proteína.

20. – Método para modular pelo menos uma atividade de uma proteína, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por compreender:

15 administrar uma quantidade eficaz de um agente que modula pelo menos uma atividade da proteína.

21. – Método para identificar parceiros de ligação para uma proteína, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por compreender:

20 expor a referida proteína a um parceiro de ligação potencial; e

determinar se o parceiro de ligação potencial se liga à referida proteína, identificando assim parceiros de ligação para a proteína.

25 22. – Método para identificar um agente que modula a interação entre um parceiro de ligação da reivindicação

21 e uma proteína da reivindicação 13, caracterizado por compreender:

expor a referida proteína com o referido parceiro ao agente; e

5 determinar se o agente modula a associação do parceiro de ligação à referida proteína, identificando assim um agente que modula a associação de um parceiro de ligação à referida proteína.

23. – Método para modular a interação entre um
10 parceiro de ligação da reivindicação 21 e uma proteína da reivindicação 13, caracterizado por compreender:

administrar uma quantidade eficaz de um agente que modula a associação de um parceiro de ligação à referida proteína.

24. – Animal transgênico não-humano,
15 caracterizado por ser modificado para conter uma molécula de ácido nucléico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3.

25. – Animal transgênico, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a molécula de ácido nucléico contém uma mutação que impede a expressão da
20 proteína codificada.

26. – Composição, caracterizada por compreender um diluente e um polipeptídio ou proteína, em que o polipeptídio ou proteína compreende a seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 ou apresenta ao menos 95% de identidade de
25 seqüência de aminoácidos com a SEQ ID NO: 2.

RESUMO

Patente de Invenção para “**FAMÍLIA GÊNICA (LBFL313) ASSOCIADA AO CANCER PANCREÁTICO**”.

5 A invenção refere-se em geral a modificações na expressão gênica no adenocarcinoma pancreático humano. A invenção refere de forma específica a uma família de genes humanos que é expressa diferencialmente em tecidos pancreáticos cancerosos comparado aos tecidos pancreáticos não-cancerosos correspondentes.