

(11) Número de Publicação: **PT 1115863 E**

(51) Classificação Internacional:

C12N 15/12 (2007.10) **C07K 14/47** (2007.10)
C12Q 1/02 (2007.10) **C12Q 1/68** (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **1999.09.15**

(30) Prioridade(s): **1998.09.22 US 101279 P**
1998.12.30 US 114223 P
1999.04.16 US 129674 P

(43) Data de publicação do pedido: **2001.07.18**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.11.28**
048/2008

(73) Titular(es):

GENENTECH, INC.

1 DNA WAY SOUTH SAN FRANCISCO, CA
94080-4990 US

(72) Inventor(es):

SEAN ADAMS

JAMES PAN

ALAN ZHONG

(74) Mandatário:

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

PT

(54) Epígrafe: **UCP4**

(57) Resumo:

RESUMO

"UCP4"

O presente invento refere-se a novos polipéptidos com homologia com determinadas proteínas de desacoplamento ("UCP") humanas e a moléculas de ácido nucleico que codificam esses polipéptidos. Também se proporcionam aqui vectores e células hospedeiras incluindo essas sequências de ácido nucleico, moléculas polipeptídicas químéricas incluindo os polipéptidos do presente invento fundidos com sequências polipeptídicas heterólogas, anticorpos que ligam os polipéptidos do presente invento e métodos para produzir os polipéptidos do presente invento.

DESCRIÇÃO

"UCP4"

CAMPO DO INVENTO

O presente invento refere-se na generalidade à identificação e isolamento de novos ADN com homologia com determinadas proteínas de desacoplamento humanas e à produção recombinante de novos polipeptídos, aqui denominados "proteína de desacoplamento 4" ou "UCP4".

ANTECEDENTES DO INVENTO

As proteínas de desacoplamento ou "UCP", que se pensa que desempenham um papel no processo metabólico, têm sido relatadas na literatura. As UCP foram inicialmente detectadas e descritas em adipócitos castanhos de animais hibernantes, tais como ursos. Pensa-se que as UCP auxiliam estes hibernantes e outros animais adaptados a climas frios a manter as temperaturas corporais em climas frios por aumento da sua taxa metabólica do corpo em repouso. Dado que os seres humanos possuem quantidades relativamente pequenas de tecido adiposo castanho, pensou-se originalmente que as UCP desempenhavam um papel pouco relevante no metabolismo humano.

Actualmente encontram-se descritas várias proteínas de desacoplamento humanas diferentes. [Consultar, na generalidade, Gura, *Science*, 280: 1369-1370 (1998)]. A proteína de desacoplamento humana denominada UCP1 foi identificada por Nicholls *et al.* Nicholls *et al.* demonstraram que a membrana interna de mitocôndrias de adipócitos castanhos era muito permeável a proteínas e os investigadores relacionaram a permeabilidade observada com uma proteína, denominada UCP1, na membrana das mitocôndrias. Nicholls *et al.* relataram que a UCP1, criando tal permeabilidade, reduz o número de ATP que pode ser produzido a partir de uma fonte alimentar, aumentando assim a taxa metabólica corporal e gerando calor. [Nicholls *et al.*, *Physiol. Rev.*, 64, 1-64 (1984)].

Mais tarde verificou-se que a UCP1 é de facto expressa apenas no tecido adiposo castanho [Bouillaud *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 82:445-448 (1985); Jacobsson *et al.*, J. Biol. Chem., 260:16250-16254 (1985)]. Demonstrou-se através de estudos de mapeamento genético que o gene da UCP1 humano se localiza no cromossoma 4. [Cassard *et al.*, J. Cell. Biochem., 43:255-264 (1990)].

Também foi descrita outra UCP humana, denominada UCPH ou UCP2. [Gimeno *et al.*, Diabetes, 46:900-906 (1997); Fleury *et al.*, Nat. Genet., 15:269-272 (1997); Boss *et al.*, FEBS Letters, 408:39-42 (1997); consultar também, Wolf, Nutr. Rev., 55:178-179 (1997)]. Fleury *et al.* informam que a proteína UCP2 apresenta 59% de identidade de aminoácidos com UCP1 e que a UCP2 se localiza em regiões do cromossoma 11 humano que tinham sido relacionadas com hiperinsulinemia e obesidade. [Fleury *et al.*, *supra*]. Foi também relatado que a UCP2 é expressa em vários tecidos de adulto, tais como células cerebrais, musculares e gordas. [Gimeno *et al.*, *supra* e Fleury *et al.*, *supra*].

Foi descrita recentemente uma terceira UCP humana, UCP3, em Boss *et al.*, *supra*; Vidal-Puig *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 235:79-82 (1997); Solanes *et al.*, J. Biol. Chem., 272:25433-25436 (1997); e Gong *et al.*, J. Biol. Chem., 272:24129-24132 (1997). [Consultar também Patente do Reino Unido N.º 9716886]. Solanes *et al.* relataram que, contrariamente à UCP1 e à UCP2, a UCP3 é expressa preferivelmente em músculo-esquelético humano e que o gene de UCP3 se localiza no cromossoma 11 humano, adjacente ao gene de UCP2. [Solanes *et al.*, *supra*]. Gong *et al.* descrevem que a expressão de UCP3 pode ser regulada por estímulos termogénicos conhecidos, tais como hormona da tireoide, agonistas adrenérgicos beta3 e leptina. [Gong *et al.*, *supra*].

RESUMO DO INVENTO

Foi identificado um clone de ADNc (DNA77568-1626), com determinadas homologias com algumas proteínas de desacoplamento humanas conhecidas, que codifica um novo polipeptídeo, denominado no presente pedido como "UCP4".

Numa concretização, o invento proporciona uma molécula de ácido nucleico isolada incluindo ADN que codifica um polipéptido UCP4.

Num aspecto, o ácido nucleico isolado inclui (a) ADN que codifica um polipéptido UCP4 e com pelo menos 80% de identidade de sequência, preferivelmente pelo menos 85% de identidade de sequência, com maior preferência pelo menos 90% de identidade de sequência e com a maior preferência pelo menos 95% de identidade de sequência com uma molécula de ADN que codifica um polipéptido UCP4 incluindo a sequência de resíduos de aminoácidos de 1 a 323, inclusive da figura 1 (SEQ ID NO:1) ou (b) o complementar da molécula de ADN de (a).

Noutro aspecto, o invento refere-se a uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica um polipéptido UCP4 incluindo ADN que hibrida com o complementar do ácido nucleico entre os nucleótidos 40 e 1011 inclusive, da figura 2 (SEQ ID NO:2). Preferivelmente, a hibridação ocorre em condições de hibridação e lavagem rigorosas.

Num aspecto adicional, o invento refere-se a uma molécula de ácido nucleico isolada incluindo (a) ADN que codifica um polipéptido UCP4 e com pelo menos 80% de identidade de sequência, preferivelmente pelo menos 85% de identidade de sequência, com maior preferência pelo menos 90% de identidade de sequência, com a maior preferência pelo menos 95% de identidade de sequência com uma molécula de ADN que codifica o mesmo polipéptido maduro codificado pelo ADNc no depósito ATCC N.º 203134, ou (b) o complementar da molécula de ADN de (a). Numa concretização preferida, o ácido nucleico inclui um ADN que codifica o mesmo polipéptido maduro codificado pelo ADNc no depósito ATCC N.º 203134.

Ainda num aspecto adicional, o invento refere-se a uma molécula de ácido nucleico isolada incluindo (a) ADN que codifica um polipéptido UCP4 com pelo menos 80% de identidade de sequência, preferivelmente pelo menos 85% de identidade de sequência, com maior preferência pelo menos cerca de 90% de identidade de sequência, com a maior preferência pelo menos 95% de identidade de sequência com a sequência de resíduos de

aminoácidos de 1 a 323, inclusive da figura 1 (SEQ ID NO:1), ou o complementar do ADN de (a).

O fascículo revela uma molécula de ácido nucleico isolada incluindo (a) ADN que codifica um polipéptido que apresenta uma pontuação de pelo menos cerca de 80% de positivos, preferivelmente pelo menos cerca de 85% de positivos, com maior preferência pelo menos cerca de 90% de positivos, com a maior preferência pelo menos cerca de 95% de positivos quando comparada com a sequência de aminoácidos dos resíduos 1 a cerca de 323, inclusive da figura 1 (SEQ ID NO:1), ou (b) o complementar do ADN de (a).

O fascículo também revela fragmentos da sequência de codificação de UCP4, que são suficientemente longos para serem utilizados como sondas de hibridação. Preferivelmente, tais fragmentos contêm pelo menos cerca de 20 a cerca de 80 bases consecutivas incluídas na sequência da figura 2 (SEQ ID NO:2). Opcionalmente, tais fragmentos incluem o terminal N ou o terminal C da sequência da figura 2 (SEQ ID NO:2).

Noutra concretização, o invento proporciona um vector incluindo ADN que codifica UCP4 ou suas variantes. O vector pode incluir qualquer das moléculas de ácido nucleico isoladas aqui definidas acima.

Também se proporciona uma célula hospedeira incluindo tal vector. Como exemplo, as células hospedeiras podem ser células CHO, *E. coli* ou levedura. Proporciona-se ainda um processo para produzir polipéptidos UCP4 e inclui cultura de células hospedeiras em condições adequadas para expressão de UCP4 e recuperação de UCP4 da cultura celular.

Noutra concretização, o invento proporciona um polipéptido UCP4 isolado codificado por qualquer das sequências de ácido nucleico isoladas aqui definidas acima.

Num aspecto específico, o invento proporciona a sequência de um polipéptido UCP4 nativa isolada, que numa concretização inclui uma sequência de aminoácidos incluindo os resíduos 1 a 323 da figura 1 (SEQ ID NO:1).

Noutro aspecto, o invento refere-se a um polipéptido UCP4 isolado, incluindo uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de identidade de sequência, preferivelmente pelo menos 85% de identidade de sequência, com maior preferência pelo menos 90% de identidade de sequência, com a maior preferência pelo menos 95% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de resíduos 1 a cerca de 323, inclusive da figura 1 (SEQ ID NO:1).

O fascículo também revela um polipéptido UCP4 isolado, incluindo uma sequência de aminoácidos pontuada com pelo menos cerca de 80% de positivos, preferivelmente pelo menos cerca de 85% de positivos, com maior preferência pelo menos cerca de 90% de positivos, com a maior preferência pelo menos cerca de 95% de positivos quando comparada com a sequência de aminoácidos dos resíduos 1 a 323 da figura 1 (SEQ ID NO:1).

O fascículo também revela um polipéptido UCP4 isolado, incluindo a sequência de aminoácidos de resíduos 1 a cerca de 323, inclusive da figura 1 (SEQ ID NO:1), ou um seu fragmento suficiente para, por exemplo, proporcionar um local de ligação para um anticorpo anti-UCP4. Preferivelmente, o fragmento de UCP4 retém pelo menos uma actividade biológica de um polipéptido UCP4 nativo.

Ainda num aspecto adicional, o invento proporciona um polipéptido UCP4 produzido por (i) hibridação de uma molécula de ADN de ensaio em condições rigorosas com (a) uma molécula de ADN que codifica um polipéptido UCP4 com a sequência de aminoácido de resíduos de 1 a 323, inclusive da figura 1 (SEQ ID NO:1), ou (b) o complementar da molécula de ADN de (a) e se a molécula de ADN de ensaio tem pelo menos 80% de identidade de sequência, preferivelmente pelo menos 85% de identidade de sequência, com maior preferência pelo menos 90% de identidade de sequência, com a maior preferência pelo menos 95% de identidade de sequência com (a) ou (b), (ii) cultura de uma célula hospedeira incluindo a molécula de ADN de ensaio em condições adequadas para expressão do polipéptido e (iii) recuperação do polipéptido da cultura celular.

Noutra concretização, o invento proporciona moléculas químéricas incluindo um polipéptido UCP4 fundido a um

polipéptido ou sequência de aminoácidos heterólogos. Um exemplo de tal molécula quimérica inclui um polipéptido UCP4 fundido a uma sequência de marcação de epítopo ou uma região Fc de uma imunoglobulina.

Noutra concretização, o invento proporciona um anticorpo que liga especificamente o polipéptido UCP4. Opcionalmente, o anticorpo é um anticorpo monoclonal.

O fascículo releva agonistas e antagonistas de um polipéptido UCP4 nativo. Numa concretização particular, o agonista ou antagonista é um anticorpo anti-UCP4.

Numa concretização adicional, o invento refere-se a um método de identificação de agonistas ou antagonistas de um polipéptido UCP4 nativo, incluindo pôr em contacto o polipéptido UCP4 nativo com uma molécula candidata e monitorizar a actividade pretendida. O fascículo revela métodos terapêuticos e métodos de diagnóstico utilizando UCP4.

O fascículo também revela uma composição incluindo um polipéptido UCP4, ou um agonista ou antagonista tal como aqui definido acima, em combinação com um transportador.

DESCRIÇÃO SUCINTA DOS ESQUEMAS

A figura 1 apresenta a sequência de aminoácidos derivada de uma sequência de UCP4 nativa.

A figura 2 apresenta a sequência nucleotídica de um ADNc que codifica a sequência de UCP4 nativa.

A figura 3 apresenta um alinhamento de sequência de aminoácidos de UCP4 com outras proteínas de desacoplamento conhecidas, UCP1 (SEQ ID NO:16), UCP2 (SEQ ID NO:17) e UCP3 (SEQ ID NO:18). Apresentam-se os seis supostos domínios transmembranares e encontram-se sublinhados (e marcados I a VI, respectivamente). Os asteriscos (*) apresentados por baixo da sequência de proteína indicam três (3) supostos motivos de proteína de transporte mitocondrial. Encontra-se duplamente sublinhado um suposto domínio de ligação de nucleótido.

As figuras 4A-4H apresentam os resultados de análise de transferência de "Northern". Ensaíaram-se tecidos de humano adulto e tecidos de cérebro humano (Clontech), além de leucócitos de sangue periférico (PBL), células de cancro e tecidos fetais com ADNc de UCP₄. As figuras ilustram que o produto de transcrição de UCP4 foi detectado em tecidos de cérebro humano, medula espinal, medula, corpo caloso e substância negra.

As figuras 5A-5B apresentam os resultados de ensaios *in vitro* efectuados para determinar os efeitos de expressão de UCP4 no potencial de membrana mitocondrial.

As figuras 6A-6F apresentam os resultados de ensaios *in vitro* efectuados para determinar a localização subcelular de UCP4.

A figura 7 apresenta uma sequência de "ADN de partida" montada a partir de sequências EST seleccionadas.

As figuras 8A-8C apresentam os resultados de ensaios *in vitro* efectuados para determinar o efeito do consumo de alimentos na expressão de ARNm de UCP4.

As figuras 9A-9D apresentam os resultados de ensaios *in vitro* efectuados para determinar o efeito do consumo de gorduras na expressão de ARNm de UCP4.

As figuras 10A-10G apresentam os resultados de ensaios *in vitro* efectuados para determinar o efeito de *stress* de temperatura na expressão de ARNm de UCP4.

DESCRÍÇÃO DETALHADA DAS CONCRETIZAÇÕES PREFERIDAS

I. Definições

As expressões "polipéptido UCP4", "proteína UCP4" e "UCP4" quando aqui utilizadas abrangem UCP4 de sequência nativa e variantes de UCP4 (que são aqui definidas adicionalmente). A UCP4 pode ser isolada de várias fontes, tais como tipos de tecidos humanos ou de outra fonte, ou preparada por métodos recombinantes e/ou sintéticos.

Uma "sequência de UCP4 nativa" inclui um polipéptido com a mesma sequência de aminoácidos de uma UCP4 derivada da natureza. Tal sequência de UCP4 nativa pode ser isolada da natureza ou pode ser produzida por meios recombinantes e/ou sintéticos. A expressão "sequência de UCP4 nativa" abrange especificamente formas truncadas ou solúveis de ocorrência natural, formas variantes de ocorrência natural (por exemplo, formas de *splicing* alternativo) e variantes alélicas de ocorrência natural de UCP4. Numa concretização do invento, a sequência de UCP4 nativa é uma sequência de UCP4 nativa madura ou de comprimento completo incluindo os aminoácidos 1 a 323 da figura 1 (SEQ ID NO:1).

"Variante de UCP4" significa qualquer outra sequência diferente da sequência de UCP4 nativa e inclui UCP4 com pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos incluindo os resíduos 1 a 323 da sequência polipeptídica de UCP4 apresentada na figura 1 (SEQ ID NO:1). Tais variantes de UCP4 incluem, por exemplo, polipéptidos UCP4 em que se adicionam ou eliminam um ou mais resíduos de aminoácidos no terminal N ou C, bem como dentro de um ou mais domínios internos, da sequência da figura 1 (SEQ ID NO:1). Usualmente, uma variante de UCP4 terá pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência de aminoácidos, com maior preferência pelo menos cerca de 85% de identidade de sequência de aminoácidos, ainda com maior preferência pelo menos cerca de 90% de identidade de sequência de aminoácidos e com a maior preferência pelo menos cerca de 95% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos incluindo os resíduos 1 a 323 da figura 1 (SEQ ID NO:1).

Define-se "percentagem (%) de identidade de sequência de aminoácidos" relativamente às sequências de UCP4 aqui identificadas como a percentagem de resíduos de aminoácidos numa sequência candidata que são idênticos aos resíduos de aminoácidos na sequência de UCP4, após alinhamento das sequências e introdução de intervalos, caso necessário, para atingir a percentagem máxima de identidade de sequência e sem considerar quaisquer substituições conservativas como parte da identidade de sequência. A % de identidade pode ser determinada por WU-BLAST-2, obtido de [Altschul et al., Methods in Enzymology, 266: 460-480 (1996);

<http://blast.wustl.edu/blast/README.html>]. WU-BLAST-2 utiliza vários parâmetros de busca, a maioria dos quais é ajustado em valores padrão. Aos parâmetros ajustáveis são atribuídos os seguintes valores: "overlap span =1", "overlap fraction = 0.125", "word threshold (T) = 11". Os parâmetros HSP S e HSP S2 são valores dinâmicos e são estabelecidos pelo próprio programa dependendo da composição da sequência específica e da composição da base de dados específica na qual a sequência de interesse está a ser procurada; contudo, os valores podem ser ajustados para aumentar a sensibilidade. Determina-se um valor de % de identidade de sequência de aminoácidos pelo número de resíduos idênticos correspondentes dividido pelo número total de resíduos da sequência "mais longa" na região alinhada. A sequência "mais longa" é a que tem de facto mais resíduos na região alinhada (ignoram-se os intervalos introduzidos por WU-Blast-2 para maximizar a pontuação do alinhamento).

O termo "positivos", no contexto da comparação de sequências efectuada tal como descrito acima, inclui resíduos nas sequências comparadas que não são idênticos mas que têm propriedades semelhantes (e.g., como resultado de substituições conservativas). O valor da % de positivos é determinada pela fracção de resíduos pontuados com um valor positivo na matriz BLOSUM62 divididos pelo número total de resíduos na sequência mais longa, tal como definida acima.

De igual modo, a "percentagem (%)" de identidade de sequência de ácido nucleico" é definida como a percentagem de nucleótidos numa sequência candidata que são idênticos aos nucleótidos na sequência de codificação de UCP4. Os valores de identidade podem ser gerados pelo módulo BLASTN de WU-BLAST-2 ajustado nos parâmetros padrão, com intervalo de sobreposição ("overlap span") e fracção de sobreposição ("overlap fraction") fixados a 1 e 0,125, respectivamente.

"Isolado", quando utilizado para descrever os vários polipéptidos aqui revelados, significa um polipéptido que foi identificado e separado e/ou recuperado de uma componente do seu ambiente natural. As componentes contaminantes do seu ambiente natural são materiais que interfeririam tipicamente com utilizações em diagnóstico ou terapêuticas para o polipéptido e podem incluir enzimas, hormonas e outros solutos

proteináceos ou não proteináceos. Em concretizações preferidas, o polipéptido será purificado (1) até um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos da sequência de aminoácidos N-terminal ou interna, utilizando um sequenciador de copo rotativo ou (2) até homogeneidade por SDS-PAGE em condições não redutoras ou redutoras utilizando coloração com azul de Coomassie ou, preferivelmente, com prata. O polipéptido isolado inclui o polipéptido *in situ* dentro de células recombinantes, dado que pelo menos um componente do ambiente natural de UCP4 não estará presente. Usualmente, contudo, o polipéptido isolado será preparado através de pelo menos uma etapa de purificação.

Uma molécula de ácido nucleico que codifica um polipéptido UCP4 "isolada" é uma molécula de ácido nucleico que é identificada e separada de pelo menos uma molécula de ácido nucleico contaminante com a qual se encontra normalmente associada na fonte natural do ácido nucleico que codifica UCP4. Uma molécula de ácido nucleico que codifica UCP4 isolada encontra-se noutra forma ou condição diferente da que se encontra na natureza. As moléculas de ácido nucleico isoladas distinguem-se consequentemente da molécula de ácido nucleico que codifica UCP4 tal como existe em células naturais. Contudo, uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica um polipéptido UCP4 inclui moléculas de ácido nucleico que codificam UCP4 contidas em células que normalmente não expressam UCP4, por exemplo, a molécula de ácido nucleico encontra-se numa localização cromossómica diferente da de células naturais.

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

O ácido nucleico encontra-se "ligado operativamente" quando está posicionado numa relação funcional com outra sequência de ácido nucleico. Por exemplo, o ADN para uma pré-

sequência ou comando de secreção encontra-se ligado operativamente a ADN para um polipéptido caso seja expresso como uma pré-proteína que participa na secreção do polipéptido; um promotor ou facilitador encontra-se ligado operativamente a uma sequência de codificação se afecta a transcrição da sequência; ou um local de ligação de ribossoma encontra-se ligado operativamente a uma sequência de codificação se está posicionado de modo a facilitar a tradução. Em geral, "ligado operativamente" significa que as sequências de ADN que estão ligadas são contíguas e, no caso de um comando de secreção, contíguas e em fase de leitura. No entanto, não é necessário que os facilitadores sejam contíguos. A ligação é conseguida através de ligação em locais de restrição convenientes. Caso tais locais não existam, utilizam-se adaptadores ou ligantes de oligonucleótidos sintéticos de acordo com a prática convencional.

A expressão "anticorpo" é utilizada no seu sentido mais abrangente e inclui especificamente anticorpos monoclonais anti-UCP4 simples (incluindo anticorpos agonistas, antagonistas e de neutralização) e composições de anticorpo anti-UCP4 com especificidade polipeptídica. A expressão "anticorpo monoclonal" tal como aqui utilizada refere-se a um anticorpo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogénea, ou seja, os anticorpos individuais que constituem a população são idênticos excepto em possíveis mutações de ocorrência natural que podem estar presentes em quantidades diminutas.

O "rigor" das reacções de hibridação é facilmente determinável por um perito na especialidade e é em geral um cálculo empírico dependente do comprimento da sonda, temperatura de lavagem e concentração de sal. Em geral, as sondas mais longas necessitam de temperaturas mais elevadas para hibridação correcta, enquanto que as sondas mais curtas necessitam de temperaturas inferiores. A hibridação depende geralmente da capacidade do ADN desnaturado voltar a hibridar com cadeias complementares que se encontram presentes num ambiente abaixo da sua temperatura de fusão. Quanto maior o grau de homologia pretendido entre a sonda e a sequência a hibridar, maior a temperatura relativa que pode ser utilizada. Como resultado, as temperaturas relativas superiores tenderiam

a tornar as condições de reacção mais rigorosas, enquanto que as temperaturas inferiores as tornam menos rigorosas. Para detalhes adicionais e explicação do rigor das reacções de hibridação, consultar Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

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

"Condições de rigor moderado" podem ser identificadas como as descritas por Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989 e incluem a utilização de solução de lavagem e condições de hibridação (por exemplo, temperatura, força iónica e % de SDS) menos rigorosas do que as descritas acima. Constitui um exemplo de condições de rigor moderado incubação durante a noite a 37°C numa solução contendo: formamida a 20%, SSC 5x (NaCl 150 mM, citrato de trissódio 15 mM), fosfato de sódio 50 mM (pH 7,6), solução de Denhardt 5x, sulfato de dextrano a 10% e ADN de esperma de salmão cortado desnaturado a 20 mg/mL, seguida por lavagem dos filtros em SSC 1x a cerca de 37-50°C. O perito na especialidade reconhecerá como ajustar a temperatura, força iónica, etc. como necessário para acomodar factores tais como comprimento da sonda e semelhantes.

A expressão "marcado com epítopo" quando aqui utilizada refere-se a um polipéptido quimérico incluindo um polipéptido UCP4 fundido com um "polipéptido marcador". O polipéptido marcador tem resíduos suficientes para proporcionar um epítopo contra o qual se pode preparar um anticorpo, no entanto é suficientemente curto para não interferir com a actividade do polipéptido ao qual está fundido. O polipéptido marcador é também preferivelmente razoavelmente único de modo que o anticorpo não sofra reacção cruzada substancial com outros epítopos. Os polipéptidos marcadores adequados têm em geral pelo menos seis resíduos de aminoácidos e usualmente entre cerca de 8 e 50 resíduos de aminoácidos (preferivelmente entre cerca de 10 e 20 resíduos de aminoácidos).

Tal como aqui utilizada, a expressão "imunoadesina" denomina moléculas do tipo anticorpo que combinam a especificidade de ligação de uma proteína heteróloga (uma "adesina") com as funções de efector dos domínios constantes de imunoglobulina. Estruturalmente, as imunoadesinas incluem uma fusão de uma sequência de aminoácidos com a especificidade de ligação pretendida diferente do reconhecimento de抗énio e local de ligação de um anticorpo (ou seja, é "heteróloga") e uma sequência de domínio constante de imunoglobulina. A porção adesina de uma molécula de imunoadesina é tipicamente uma sequência de aminoácidos contíguos contendo pelo menos o local de ligação de um receptor ou de um ligando. A sequência do domínio constante de imunoglobulina na imunoadesina pode ser obtida de qualquer imunoglobulina, tal como subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 ou IgG-4, IgA (incluindo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD ou IgM.

"Activa" ou "actividade" para os objectivos aqui expressos refere-se a forma(s) de UCP4 que mantém(êm) as actividades biológicas e/ou imunológicas de UCP4 nativa ou de ocorrência natural. Constitui uma actividade preferida a capacidade de afectar o potencial de membrana mitocondrial de um modo que resulta em regulação positiva ou negativa da taxa metabólica e/ou produção de calor. Uma tal actividade inclui a geração de fuga de protões na membrana mitocondrial que resulta num aumento da taxa metabólica. A actividade pode ser medida ou quantificada *in vitro* ou *in vivo*.

O termo "antagonista" é utilizado no seu sentido mais lato e inclui qualquer molécula que bloqueie, iniba ou neutralize parcial ou completamente uma actividade biológica e/ou imunológica de um polipéptido UCP4 nativo aqui revelado. De igual modo, a expressão "agonista" é utilizada no seu sentido mais lato e inclui qualquer molécula que mimetize uma actividade biológica e/ou imunológica de um polipéptido UCP4 nativo aqui revelado. As moléculas de agonistas ou antagonistas adequadas incluem especificamente anticorpos ou fragmentos de anticorpos agonistas ou antagonistas, imunoadesinas de polipéptidos UCP4 ou fragmentos ou variantes de sequência de aminoácidos de polipéptidos UCP4 nativos.

"Tratamento" refere-se tanto a tratamento terapêutico como a tratamento profilático ou medidas preventivas, em que o objectivo é evitar ou diminuir (aliviar) a condição ou doença patológica alvo. Os indivíduos que necessitam de tratamento incluem aqueles que já sofrem da doença, bem como os que têm tendência para sofrer da doença ou os indivíduos nos quais se deve evitar a doença.

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

Para os objectivos de tratamento, "mamífero" refere-se a qualquer animal classificado como um mamífero, incluindo humanos, domésticos e de quinta e de jardim zoológico, de desporto, ou animais de estimação, tais como cães, gatos, cavalos, ovelhas, porcos, etc. Preferivelmente, o mamífero é humano.

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

II. Composições e métodos

A. UCP4 de comprimento completo

O presente invento proporciona sequências nucleotídicas identificadas e isoladas pela primeira vez que codificam polipéptidos denominados no presente pedido como UCP4. Em particular, identificou-se e isolou-se ADNc que codifica um polipéptido UCP4, tal como revelado mais detalhadamente nos exemplos adiante. Por motivos de simplificação, no presente fascículo a proteína codificada por DNA77568-1626 bem como todos os homólogos e variantes nativos adicionais incluídos na definição de UCP4 anterior serão denominados "UCP4", independentemente da sua origem ou modo de preparação.

Tal como revelado nos exemplos adiante, foi depositado na ATCC um clone DNA77568-1626. A sequência de nucleótidos real do clone pode ser facilmente determinada pelo perito na especialidade por sequenciação do clone depositado utilizando métodos de rotina na especialidade. A sequência de aminoácidos prevista pode ser determinada a partir da sequência nucleotídica utilizando conhecimentos de rotina. Para o UCP4 aqui, os requerentes identificaram o que se pensa ser o quadro de leitura mais bem identificável com a informação da sequência disponível na altura da apresentação.

Utilizando o programa de computador Megalign DNASTAR (e algoritmos e parâmetros deste conjunto de software estabelecidos pelo fabricante) (Oxford Molecular Group, Inc.), verificou-se que a sequência de UCP4 nativa de comprimento completo (apresentada na figura 1 e SEQ ID NO:1) tem cerca de 34% de identidade de sequência de aminoácidos com UCP3, cerca de 33% de identidade de sequência de aminoácidos com UCP2 e cerca de 29% de identidade de sequência de aminoácidos com UCP1. Assim, pensa-se presentemente que o UCP4 revelado no presente pedido é um novo membro identificado da família de proteínas de desacoplamento humanas e pode apresentar actividade(s) e/ou propriedade(s) típica(s) dessa família de proteínas, tais como a capacidade de aumentar ou diminuir a taxa metabólica afectando o potencial de membrana mitocondrial.

B. Variantes de UCP4

Além dos polipéptidos UCP4 de sequência de nativa de comprimento completo aqui descritos, considera-se que se podem preparar variantes de UCP4. As variantes de UCP4 podem ser preparadas por introdução de alterações de nucleótidos adequadas no ADN de UCP4 e/ou por síntese do polipéptido UCP4 pretendido. Os peritos na especialidade terão em consideração que as alterações de aminoácidos podem alterar os processos pós-tradução de UCP4, tal como alterar o número ou posição dos locais de glicosilação ou alterar as características de ancoragem à membrana.

As variações no UCP4 de sequência nativa de comprimento completo ou em vários domínios do UCP4 aqui descritas podem ser feitas, por exemplo, utilizando qualquer das técnicas e orientações para mutações conservativas ou não conservativas estabelecidos, por exemplo, na patente U.S. 5 364 934. As variações podem ser uma substituição, deleção ou inserção de um ou mais codões que codificam o UCP4 que resulta numa alteração da sequência de aminoácidos de UCP4 comparativamente com a sequência de UCP4 nativa. Opcionalmente, a variação é por substituição de pelo menos um aminoácido por qualquer outro aminoácido num ou mais domínios do UCP4. Podem encontrar-se orientações sobre como determinar qual o resíduo de aminoácido que pode ser inserido, substituído ou eliminado sem afectar adversamente a actividade pretendida, por comparação da sequência do UCP4 com a de moléculas de proteínas homólogas conhecidas e minimizando o número de alterações da sequência de aminoácidos efectuadas em regiões de homologia elevada. As substituições de aminoácidos podem ser em resultado de substituir um aminoácido por outro aminoácido com propriedades estruturais e/ou químicas semelhantes, tal como a substituição de uma leucina por uma serina, ou seja, substituições de aminoácidos conservativas. As inserções ou deleções podem ser opcionalmente na gama de 1 a 5 aminoácidos. A variação permitida pode ser determinada fazendo inserções, deleções ou substituições de aminoácidos na sequência sistematicamente e, caso se pretenda, ensaiando as variantes resultantes relativamente à actividade em ensaios conhecidos na especialidade ou aqui descritos.

O fascículo revela variantes de UCP4 que são fragmentos da UCP4 de comprimento completo. Preferivelmente, estes fragmentos mantêm uma actividade ou propriedade pretendida da UCP4 de comprimento completo.

As variações podem ser efectuadas utilizando métodos conhecidos na especialidade, tal como mutagénese mediada por oligonucleótidos (dirigida ao local), varrimento de alaninas e mutagénese por PCR. Podem ser efectuadas mutagénese dirigida ao local [Carter *et al.*, Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller *et al.*, Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)], mutagénese por cassette [Wells *et al.*, Gene, 34:315 (1985)], mutagénese por selecção de restrição [Wells *et al.*, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)] ou outras técnicas conhecidas, no ADN clonado para produzir ADN variante de UCP₄.

Pode também utilizar-se análise por varrimento de aminoácidos para identificar um ou mais aminoácidos ao longo de uma sequência contígua. Os aminoácidos para varrimento preferidos são aminoácidos relativamente pequenos e neutros. Tais aminoácidos incluem alanina, glicina, serina e cisteína. A alanina é tipicamente um aminoácido preferido para varrimento neste grupo porque elimina a cadeia lateral depois do carbono beta e é menos provável que altere a conformação da cadeia principal da variante [Cunningham e wells, Science, 244: 1081-1085 (1989)]. A alanina também é tipicamente preferida porque é o aminoácido mais comum. Além disso, encontra-se frequentemente tanto em posições internas como expostas [Creighton, The Proteins, (W. H. Freeman & Co., New York); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976)]. Caso a substituição por alanina não produza quantidades adequadas de variante pode utilizar-se um aminoácido isotérico.

C. Modificações de UCP4

Estão incluídas modificações covalentes de UCP4 no âmbito do presente invento. Um tipo de modificação covalente inclui a reacção de resíduos de aminoácidos alvo de um polipéptido UCP4 com um agente de derivatização orgânico que é capaz de reagir com cadeias laterais seleccionadas ou com os resíduos do terminal N ou C de UCP4. A derivatização com agentes bifuncionais é útil, por exemplo, para reticular UCP4 com uma

superfície ou matriz de suporte insolúvel em água para utilização no método para purificar anticorpos anti-UCP4 e vice-versa. Os agentes de reticulação usualmente utilizados incluem, e.g., 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldeído, ésteres de N-hidroxissuccinimida, por exemplo, ésteres com ácido 4-azidossalícílico, imidoésteres homobifuncionais, incluindo ésteres de dissuccinimidilo tais como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidas bifuncionais tais como bis-N-maleimido-1,8-octano e agentes tais como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato.

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

Outro tipo de modificação covalente do polipéptido UCP4 incluída no âmbito deste invento inclui alteração do padrão de glicosilação nativo do polipéptido. Para os objectivos do presente documento "alterar o padrão de glicosilação nativo" significa remover uma ou mais porções hidrato de carbono encontradas na UCP4 de sequência nativa (quer por remoção do local de glicosilação subjacente, quer por remoção da glicosilação por meios químicos e/ou enzimáticos) e/ou adição de um ou mais locais de glicosilação que não se encontram presentes na UCP4 de sequência nativa. Além disso, a expressão inclui alterações qualitativas na glicosilação das proteínas nativas, envolvendo uma alteração da natureza e proporções das várias porções hidrato de carbono presentes.

A adição de locais de glicosilação ao polipéptido UCP4 pode ser conseguida por alteração da sequência de aminoácidos. A alteração pode ser feita, por exemplo, por adição de um ou mais resíduos serina ou treonina ou por substituição com um destes resíduos na sequência de UCP4 nativa (para locais de glicosilação ligada a O). A sequência de aminoácidos de UCP4 pode ser alterada opcionalmente através de alterações ao nível

do ADN, em particular por mutação do ADN que codifica o polipéptido UCP4 em bases pré-selecionadas de modo a gerar codões que se traduzirão nos aminoácidos pretendidos.

Outro meio de aumentar o número de porções hidrato de carbono no polipéptido UCP4 é por acoplamento químico ou enzimático de glicósidos ao polipéptido. Tais métodos encontram-se descritos na especialidade, por exemplo, em WO 87/05330 publicado a 11 de Setembro de 1987 e em Aplin e Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., p. 259-306 (1981).

A remoção de porções hidrato de carbono presentes no polipéptido UCP4 pode ser conseguida química ou enzimaticamente ou por substituição por mutação de codões que codificam resíduos de aminoácidos que servem como alvos para glicosilação. São conhecidas na especialidade técnicas de desglicosilação químicas e são descritas, por exemplo, por Hakimuddin, et al., Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987) e por Edge et al., Anal. Biochem., 118:131 (1981). A clivagem enzimática de porções hidrato de carbono em polipéptidos pode ser conseguida utilizando várias endoglicosidases e exoglicosidases, tal como descrito por Thotakura et al., Meth. Enzymol., 138:350 (1987).

Outro tipo de modificação covalente de UCP4 inclui ligar o polipéptido UCP4 a um de vários polímeros não proteináceos, por exemplo, polietilenoglicol (PEG), polipropilenoglicol ou polioxialquilenos, de um modo apresentado nas patentes U.S. 4 640 835; 4 496 689; 4 301 144; 4 670 417; 4 791 192 ou 4 179 337.

O UCP4 do presente invento pode também ser modificado de modo a formar uma molécula químérica incluindo UCP4 fundido com outro polipéptido ou sequência de aminoácidos heterólogos.

Numa concretização, esta molécula químérica inclui uma fusão de UCP4 com um polipéptido marcador que proporciona um epítopo ao qual se pode ligar selectivamente um anticorpo anti-marcador. O marcador epítópico é usualmente colocado no terminal amino ou carboxilo de UCP4. A presença de tais formas marcadas com epítopo do UCP4 pode ser detectada utilizando um anticorpo contra o polipéptido marcador. Adicionalmente, a

presença do marcador epitópico permite a fácil purificação de UCP4 por purificação por afinidade utilizando um anticorpo anti-marcador ou outro tipo de matriz de afinidade que se liga ao marcador epitópico. São bem conhecidos na especialidade vários polipéptidos marcadores e os seus anticorpos respectivos. Os exemplos incluem marcadores poli-histidina (poli-his) ou poli-histidina-glicina (poli-his-gly); o polipéptido marcador HA da gripe e o seu anticorpo 12CA5 [Field et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:2159-2165 (1988)]; o marcador c-myc e os seus anticorpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 e 9E10 [Evan et al., *Molecular and Cellular Biology*, 5:3610-3616 (1985)]; e o marcador glicoproteína D (gD) de vírus Herpes Simplex e o seu anticorpo [Paborsky et al., *Protein Engineering*, 3(6):547-553 (1990)]. Outros polipéptidos marcadores incluem o péptido Flag [Hopp et al., *BioTechnology*, 6:1204-1210 (1988)]; o péptido epitópico KT3 [Martin et al., *Science*, 255:192-194 (1992)]; um péptido epitópico de α -tubulina [Skinner et al., *J. Biol. Chem.*, 266:15163-15166 (1991)]; e o marcador peptídico de proteína do gene 10 de T7 [Lutz-Freyermuth et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6393-6397 (1990)].

Numa concretização alternativa, a molécula quimérica pode incluir uma fusão de UCP4 com uma imunoglobulina ou uma região determinada de uma imunoglobulina. Para uma forma bivalente da molécula quimérica (também denominada "imunoadesina"), tal fusão pode ser a região Fc de uma molécula de IgG. As fusões de Ig incluem preferivelmente a substituição por uma forma solúvel (domínio transmembranar eliminado ou inactivado) de um polipéptido UCP4 no lugar de pelo menos uma região variável no interior de uma molécula de Ig. Numa concretização particularmente preferida, a fusão de imunoglobulina inclui as regiões de charneira, CH2 e CH3 ou charneira, CH1, CH2 e CH3 de uma molécula de IgG1. Para a produção de fusões de imunoglobulina consultar também a patente US 5 428 130 concedida em 27 de Junho de 1995.

O UCP4 do invento pode também ser modificado de modo a formar uma molécula quimérica incluindo UCP4 fundido com um "fecho de correr" de leucinas. Foram descritos na especialidade vários polipéptidos "fecho de correr" de leucinas. Consultar, por exemplo, Landschulz et al., *Science*,

240:1759 (1988); WO 94/10308; Hoppe *et al.*, FEBS Letters, 344:1991 (1994); Maniatis *et al.*, Nature, 341:24 (1989). Os peritos na especialidade considerarão que o "fecho de correr" de leucinas pode estar fundido quer na extremidade 5', quer na 3' da molécula de UCP4.

D. Preparação de UCP4

A descrição adiante refere-se principalmente à produção de UCP4 por cultura de células transformadas ou transfecadas com um vector contendo ácido nucleico de UCP4. Considera-se obviamente que se podem utilizar métodos alternativos, que são bem conhecidos na especialidade, para preparar UCP4. Por exemplo, a sequência de UCP4, ou suas porções, podem ser produzidas por síntese peptídica directa utilizando técnicas de fase sólida [consultar, por exemplo, Stewart *et al.*, Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, California (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)]. Pode ser efectuada a síntese de proteínas *in vitro* utilizando técnicas manuais ou automatizadas. A síntese automatizada pode ser efectuada, por exemplo, utilizando um sintetizador de péptidos da Applied Biosystems (Foster City, California) utilizando as instruções do fabricante. Podem sintetizar-se quimicamente várias partes de UCP4 separadamente e combinarem-se utilizando métodos químicos ou enzimáticos para produzir UCP4 de comprimento completo.

1. Isolamento de ADN que codifica UCP4

Pode obter-se ADN que codifica UCP4 a partir de uma biblioteca de ADNc preparada a partir de tecido que se pensa conter ARNm de UCP4 e que o expressa a um nível detectável. Assim, pode obter-se convenientemente ADN de UCP4 a partir de uma biblioteca de ADNc preparada a partir de tecido humano, tal como descrito nos exemplos. O gene que codifica UCP4 pode também ser obtido a partir de uma biblioteca genómica ou por síntese de oligonucleótidos.

As bibliotecas podem ser rastreadas com sondas (tais como anticorpos para UCP4 ou oligonucleótidos de pelo menos cerca de 20-80 bases) concebidas para identificar o gene de interesse ou a proteína por ele codificada. O rastreio da

biblioteca de ADNc ou genómica com a sonda seleccionada pode ser efectuado utilizando procedimentos padrão, tais como os descritos em Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Constitui um meio alternativo para isolar o gene que codifica UCP4 a utilização de metodologia de PCR [Sambrook *et al.*, *supra*; Dieffenbach *et al.*, PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Os exemplos adiante descrevem técnicas para o rastreio de uma biblioteca de ADNc. As sequências oligonucleotídicas seleccionadas como sondas devem ter um comprimento suficiente e ser suficientemente desambíguas para minimizar falsos positivos. O oligonucleótido é preferivelmente marcado de modo a poder ser detectado por hibridação a ADN na biblioteca a ser rastreada. Os métodos de marcação são bem conhecidos na especialidade e incluem a utilização de marcadores radioquímicos tais como ATP marcado com ^{32}P , biotinilação ou marcação enzimática. As condições de hibridação, incluindo rigor moderado e rigor elevado, são proporcionadas em Sambrook *et al.*, *supra*, e são descritas acima na secção I.

As sequências identificadas em tais métodos de rastreio de bibliotecas podem ser comparadas e alinhadas com outras sequências conhecidas depositadas e disponíveis em bases de dados públicas tais como GenBank ou outras bases de dados de sequências privadas. A identidade de sequência (quer ao nível dos aminoácidos, quer dos nucleótidos) dentro de regiões definidas da molécula ou ao longo de todo o comprimento da sequência pode ser determinada através de alinhamento de sequências utilizando programas de software de computador disponíveis ao público (ajustados nos parâmetros padrão) tais como BLAST, BLAST2, ALIGN, DNASTar e INHERIT para medir identidade ou positivos para a comparação de sequências.

O ácido nucleico com a sequência de codificação da proteína pode ser obtido por rastreio de bibliotecas de ADNc ou genómicas seleccionadas utilizando a sequência de aminoácidos deduzida aqui revelada e, caso necessário, utilizando procedimentos de extensão de iniciadores convencionais tal como descrito em Sambrook *et al.*, *supra*, para detectar precursores e intermediários de processamento de

ARNm que possam não ter sido transcritos de forma inversa a ADNc.

2. Selecção e transformação de células hospedeiras

As células hospedeiras são transfectadas ou transformadas com vectores de expressão ou clonagem aqui descritos para produção de UCP4 e cultivadas em meio nutriente convencional modificado adequadamente para induzir promotores, seleccionar produtos de transformação ou amplificar os genes que codificam as sequências pretendidas. As condições de cultura, tais como meio, temperatura, pH e semelhantes, podem ser seleccionadas pelo perito na especialidade sem experiências desnecessárias. Em geral, podem encontrar-se princípios, protocolos e técnicas práticas para maximizar a produtividade de culturas celulares em *Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) e Sambrook *et al.*, *supra*.

São conhecidos pelo perito na especialidade métodos de transfecção, por exemplo, CaPO₄ e electroporação. Dependendo da célula hospedeira utilizada, a transformação é efectuada utilizando técnicas padrão adequadas para tais células. O tratamento de cálcio utilizando cloreto de cálcio, tal como descrito em Sambrook *et al.*, *supra*, ou electroporação são em geral utilizados para procariotas ou outras células que contêm barreiras de parede celular substanciais. A infecção com *Agrobacterium tumefaciens* é utilizada para transformação de determinadas células de plantas, tal como descrito por Shaw *et al.*, *Gene*, 23:315 (1983) e WO 89/05859 publicada a 29 de Junho de 1989. Para células de mamífero sem tais paredes celulares, pode ser utilizado o método de precipitação de fosfato de cálcio de Graham e van der Eb, *Virology*, 52:456-457 (1978). Foram descritos os aspectos gerais de transformações de sistemas de células hospedeiras de mamífero em patente U.S. 4 399 216. As transformações para leveduras são tipicamente efectuadas de acordo com o método de Van Solingen *et al.*, *J. Bact.*, 130:946 (1977) e Hsiao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76:3829 (1979). Contudo, podem também ser utilizados outros métodos para introduzir ADN em células, tais como por micro-injecção nuclear, electroporação, fusão de protoplastos bacterianos com células intactas, ou policatíones, por exemplo, polibreno, poliornitina. Para várias técnicas

para transformar células de mamíferos consultar Keown *et al.*, *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990) e Mansour *et al.*, *Nature*, 336:348-352 (1988).

No presente documento as células hospedeiras adequadas para clonagem ou expressão de ADN nos vectores, incluem células procariotas, de levedura ou de eucariotas superiores. Os procariotas adequados incluem, mas não se lhes limitam, eubactérias, tais como organismos Gram-negativos ou Gram-positivos, por exemplo, *Enterobacteriaceae* tais como *E. coli*. Encontram-se disponíveis ao público várias estirpes de *E. coli*, tais como *E. coli* K12 estirpe MM294 (ATCC 31446); *E. coli* X1776 (ATCC 31537); *E. coli* estirpe W3110 (ATCC 27325) e K5 772 (ATCC 53635).

Além de procariotas, são adequados micróbios eucariotas tais como fungos filamentosos ou leveduras, como hospedeiros de clonagem ou expressão para vectores que codificam UCP4. A *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo eucariota inferior habitualmente utilizado.

Células hospedeiras adequadas para a expressão de UCP4 glicosilado são derivadas de organismos multicelulares. Os exemplos de células de invertebrado incluem células de insecto tais como *Drosophila* S2 e *Spodoptera* Sf9, bem como células de plantas. Os exemplos de linhas celulares hospedeiras de mamífero úteis incluem células de ovário de hamster chinês (CHO) e células COS. Exemplos mais específicos incluem a linha CV1 de rim de macaco transformada com SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); a linha de rim embrionário humano (células 293 ou células 293 subclonadas para crescimento em cultura em suspensão, Graham *et al.*, *J. Gen Virol.*, 36:59 (1977)); células de ovário de hamster chinês/-DHFR (CHO, Urlaub e Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratinho (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)); células de pulmão humano (W138, ATCC CCL 75); células de fígado humano (Hep G2, HB 8065); e tumor de mama de ratinho (MMT 060562, ATCC CCL51). Considera-se que a selecção da célula hospedeira adequada pode ser feita por um perito na especialidade.

3. Selecção e utilização de um vector replicável

O ácido nucleico (por exemplo, ADNC ou ADN genómico) que codifica UCP4 pode ser inserido num vector replicável para clonagem (amplificação do ADN) ou para expressão. Encontram-se disponíveis ao público vários vectores. O vector pode, por exemplo, estar sob a forma de um plasmídeo, cosmídeo, partícula viral ou fago. A sequência de ácido nucleico adequada pode ser inserida no vector através de vários procedimentos. Em geral, insere-se ADN em local(is) de endonuclease de restrição adequado(s) utilizando técnicas conhecidas na especialidade. Os componentes do vector incluem em geral, mas não se lhes limitam, uma ou mais sequências de sinal, uma origem de replicação, um ou mais genes marcadores, um elemento facilitador, um promotor e uma sequência de terminação de transcrição. A construção de vectores adequados contendo uma ou mais destas componentes utiliza técnicas de ligação padrão que são conhecidas pelos peritos na especialidade.

O UCP4 pode ser produzido de modo recombinante não só directamente, mas também como um polipéptido de fusão com um polipéptido heterólogo, que pode ser uma sequência de sinal ou outro polipéptido com um local de clivagem específico no terminal N da proteína ou polipéptido maduros. Em geral, a sequência de sinal pode ser uma componente do vector ou pode ser uma porção do ADN que codifica UCP4 que é inserida no vector. A sequência de sinal pode ser uma sequência de sinal procariótica seleccionada, por exemplo, do grupo de comandos de fosfatase alcalina, penicilinase, lpp ou enterotoxina II estável ao calor. Para secreção em levedura, a sequência de sinal pode ser, por exemplo, o comando da invertase de levedura, comando do factor alfa (incluindo factores α de *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*, este último descrito na patente U.S. 5 010 182), ou comando da fosfatase ácida, o comando da glucoamilase de *C. albicans* (EP 362 179 publicada a 4 de Abril de 1990) ou a sequência de sinal descrita em WO 90/13646 publicado a 15 de Novembro de 1990. Em expressão em células de mamífero, podem ser utilizadas sequências de sinal de mamífero para secreção directa da proteína, tais como sequências de sinal de polipéptidos excretados da mesma espécie ou de espécies relacionadas, bem como comandos de secreção virais.

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

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

Constituem exemplos de marcadores seleccionáveis adequados para células de mamíferos os que permitem a identificação de células competentes para absorver o ácido nucleico que codifica UCP4, tais como DHFR ou timidina-quinase. Uma célula hospedeira adequada quando se utiliza DHFR de tipo selvagem é a linha celular CHO deficiente de actividade DHFR, preparada e propagada tal como descrito por Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980). Um gene de selecção adequado para utilização em levedura é o gene *trp1* presente no plasmídeo YRp7 de levedura [Stinchcomb *et al.*, Nature, 282:39 (1979); Kingsman *et al.*, Gene, 7:141 (1979); Tschemper *et al.*, Gene, 10:157 (1980)]. O gene *trp1* proporciona um marcador seleccionável para uma estirpe de levedura mutante isenta da capacidade de crescer em triptofano, por exemplo, ATCC N.º 44076 ou PEP4-1 [Jones, Genetics, 85:12 (1977)].

Os vectores de expressão e clonagem contêm usualmente um promotor ligado operativamente à sequência de ácido nucleico que codifica UCP4 para dirigir síntese de ARNm. São bem conhecidos promotores reconhecidos por uma variedade de

células hospedeiras potenciais. Os promotores adequados para utilização com hospedeiros eucarióticos, incluem os sistemas promotores da β -lactamase e da lactose [Chang *et al.*, *Nature*, 275:615 (1978); Goeddel *et al.*, *Nature*, 281:544 (1979)], da fosfatase alcalina, um sistema promotor do triptofano (trp) [Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980); EP 36 776] e promotores híbridos tais como o promotor tac [deBoer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25 (1983)]. Os promotores para utilização em sistemas bacterianos conterão também uma sequência de Shine-Dalgarno (S.D.) ligada operativamente ao ADN que codifica UCP4.

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

Constituem outros promotores de levedura, que são promotores indutíveis com a vantagem adicional de transcrição controlada pelas condições de crescimento, as regiões de promotor para álcool-desidrogenase 2, isocitocromo C, fosfatase ácida, enzimas de degradação associadas ao metabolismo do azoto, metalotioneína, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase e enzimas responsáveis pela utilização de maltose e galactose. Descrevem-se adicionalmente vectores e promotores adequados para utilização em expressão em levedura em EP 73 657.

A transcrição de UCP4 a partir de vectores em células hospedeiras de mamífero é controlada, por exemplo, por promotores obtidos de genomas de vírus tais como poliomavírus, poxvírus aviário (UK 2 211 504 publicado a 5 de Julho de 1989), adenovírus (tal como Adenovírus 2), papilomavírus bovino, vírus do sarcoma aviário, citomegalovírus, um retrovírus, vírus de hepatite B e vírus símio 40 (SV40), de

promotores de mamífero heterólogos, por exemplo, o promotor da actina ou um promotor de imunoglobulina e de promotores de choque térmico, desde que tais promotores sejam compatíveis com os sistemas de células hospedeiras.

A transcrição de um ADN que codifica o UCP4 por eucariotas superiores pode ser aumentada por inserção de uma sequência facilitadora no vector. Os facilitadores são elementos de ADN de acção em *cis*, usualmente de cerca de 10 a 300 pb, que actuam num promotor para aumentar a sua transcrição. São conhecidas muitas sequências facilitadoras de genes de mamífero (globina, elastase, albumina, α -fetoproteína e insulina). Tipicamente, contudo, utilizar-se-á um facilitador de um vírus de célula eucariótica. Os exemplos incluem o facilitador de SV40 no lado tardio da origem de replicação (pb 100-270), o facilitador do promotor precoce de citomegalovírus, o facilitador de polioma no lado tardio da origem de replicação e facilitadores de adenovírus. O facilitador pode ser introduzido por *splicing* no vector numa posição 5' ou 3' relativamente à sequência de codificação de UCP4, mas preferivelmente localiza-se num local a 5' do promotor.

Os vectores de expressão utilizados em células hospedeiras eucariotas (leveduras, fungos, insectos, plantas, animais, humanas ou células nucleadas de outros organismos multicelulares) conterão também sequências necessárias para a terminação da transcrição e para estabilizar o ARNm. Tais sequências estão normalmente disponíveis a partir das regiões não traduzidas a 5' e ocasionalmente a 3' de ADN ou ADNc eucariota ou viral. Estas regiões contêm segmentos nucleotídicos transcritos como fragmentos poliadenilados na porção não traduzida do ARNm que codifica UCP4.

Descrevem-se ainda outros métodos, vectores e células hospedeiras adequados para adaptação à síntese de UCP4 em cultura de células de vertebrados recombinantes em Gething *et al.*, *Nature*, 293:620-625 (1981); Mantei *et al.*, *Nature*, 281:40-46 (1979); EP 117 060; e EP 117 058.

4. Detecção de amplificação/expressão génica

A amplificação e/ou expressão génicas podem ser medidas numa amostra directamente, por exemplo, por transferência de "Southern" convencional, transferência de "Northern" para quantificar a transcrição de ARNm [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)], transferência "dot blotting" (análise de ADN) ou hibridação *in situ*, utilizando uma sonda marcada adequada, com base nas sequências aqui proporcionadas. Alternativamente, podem ser utilizados anticorpos que podem reconhecer cadeias duplas específicas, incluindo ADN em cadeia dupla, ARN em cadeia dupla e cadeias duplas híbridas de ADN-ARN ou cadeias duplas de ADN-proteína. Os anticorpos por seu lado podem ser marcados e o ensaio pode ser efectuado num formato em que a cadeia dupla se encontra ligada a uma superfície, de modo que quando se forma a cadeia dupla à superfície pode ser detectada a presença de antícorpo ligado à cadeia dupla.

Alternativamente, a expressão génica pode ser medida por métodos imunológicos, tais como coloração imuno-histoquímica de células ou secções de tecidos e ensaio da cultura celular ou fluidos corporais, para quantificar directamente a expressão do produto génico. Os anticorpos úteis para coloração imuno-histoquímica e/ou ensaio de fluidos de amostra podem ser monoclonais ou policlonais e podem ser preparados em qualquer mamífero. Convenientemente, os anticorpos podem ser preparados contra um polipeptídeo UCP4 de sequência nativa ou contra um péptido sintético baseado nas sequências de ADN aqui proporcionadas ou contra sequência exógena fundida a ADN de UCP4 e que codifica um epítopo específico de antícorpo.

5. Purificação do polipeptído

Podem recuperar-se formas de UCP4 de meio de cultura ou de lisados de células hospedeiras. Caso seja ligado à membrana, pode ser libertado da membrana utilizando uma solução de detergente adequada (por exemplo Triton-X 100) ou por clivagem enzimática. As células utilizadas na expressão de UCP4 podem ser rompidas por vários meios físicos ou químicos, tais como ciclos de congelação-descongelação, ultra-sons, ruptura mecânica ou agentes de lise celular.

Pode pretender-se purificar UCP4 de proteínas ou polipéptidos de células recombinantes. Os procedimentos seguintes são exemplos de procedimentos de purificação adequados: por fraccionamento numa coluna de permuta iônica; precipitação com etanol; HPLC de fase inversa; cromatografia em sílica ou numa resina permutadora catiónica tal como DEAE; cromatofocagem; SDS-PAGE; precipitação com sulfato de amónio; filtração em gel utilizando, por exemplo, Sephadex G-75; colunas de proteína A Sepharose para remover contaminantes tais como IgG; e colunas quelantes de metal para ligar formas de UCP4 marcadas com epítopo. Podem ser utilizados vários métodos de purificação de proteínas e tais métodos são conhecidos na especialidade e descritos por exemplo em Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982). A(s) etapa(s) de purificação seleccionadas dependerão, por exemplo, da natureza do processo de produção utilizado e do UCP4 específico produzido.

E. Utilizações para UCP4

As sequências nucleotídicas (ou seus complementos) que codificam UCP4 têm várias aplicações na especialidade da biologia molecular, incluindo utilizações como sondas de hibridação, em mapeamento de cromossomas e genes e na geração de ARN e ADN anti-sentido. O ácido nucleico de UCP4 será também útil para a preparação de polipéptidos UCP4 por técnicas recombinantes aqui descritas.

O gene de UCP4 de sequência nativa de comprimento completo (descrito no exemplo 1; SEQ NO:2) ou seus fragmentos podem ser utilizados, entre outras coisas, como sondas de hibridação para uma biblioteca de ADNc para isolar o gene de UCP4 de comprimento completo ou para isolar ainda outros genes (por exemplo, os que codificam variantes de ocorrência natural de UCP4 ou UCP4 de outra espécie) que apresentam uma identidade de sequência pretendida com a sequência de UCP4 revelada na figura 1 (SEQ ID NO:1). Opcionalmente, o comprimento das sondas será de cerca de 20 a cerca de 80 bases. As sondas de hibridação podem ser derivadas da sequência nucleotídica de SEQ ID NO:2 ou de sequências genómicas incluindo promotores, elementos facilitadores e

intrões de UCP4 de sequência nativa. A título de exemplo, um método de rastreio incluirá o isolamento da região de codificação do gene de UCP4 utilizando a sequência de ADN conhecida para sintetizar uma sonda seleccionada de cerca de 40 bases. As sondas de hibridação podem ser marcadas com uma variedade de marcadores, incluindo radionucleótidos tais como ^{32}P ou ^{35}S , ou marcadores enzimáticos tais como fosfatase alcalina acoplada à sonda através de sistemas de acoplamento avidina/biotina. As sondas marcadas com uma sequência complementar à do gene de UCP4 do presente invento podem ser utilizadas para rastrear bibliotecas de ADNc, ADN genómico ou ARNm humanos para determinar quais os membros de tais bibliotecas com que a sonda hibrida. As técnicas de hibridação são descritas em maior detalhe nos exemplos adiante.

Os fragmentos de ADN de UCP4 aqui revelados incluem sequências contendo pelo menos cerca de 20 a 30 nucleótidos consecutivos do ADN de SEQ ID NO:2. Preferivelmente, tais sequências incluem pelo menos cerca de 50 nucleótidos consecutivos do ADN de SEQ ID NO:2.

As sondas podem também ser utilizadas em técnicas de PCR para gerar um conjunto de sequências para identificação de sequências de codificação altamente relacionadas com UCP4.

As sequências nucleotídicas que codificam um UCP4 podem também ser utilizadas para construir sondas de hibridação para mapear o gene que codifica o UCP4 e para a análise genética de indivíduos com doenças genéticas. As sequências nucleotídicas aqui proporcionadas podem ser mapeadas num cromossoma e regiões específicas de um cromossoma utilizando técnicas conhecidas, tais como hibridação *in situ*, análise de ligação contra marcadores cromossómicos conhecidos e rastreio de hibridação com bibliotecas.

Quando as sequências de codificação para UCP4 codificam uma proteína que se liga a outra proteína, o UCP4 pode ser utilizado em ensaios para identificar as outras proteínas ou moléculas envolvidas na interacção de ligação. Através destes métodos podem ser identificados inibidores da interacção de ligação receptor/ligando. As proteínas envolvidas em tais interacções de ligação também podem ser utilizadas para

rastrear péptidos ou moléculas pequenas inibidores ou agonistas da interacção de ligação. Além disso, o receptor de UCP4 pode ser utilizado para isolar ligando(s) correlativo(s). Podem ser concebidos ensaios de rastreio para encontrar compostos líder que mimetizam a actividade biológica de um UCP4 nativo ou de um receptor para UCP4. Tais ensaios de rastreio incluirão ensaios susceptíveis de rastreio de alto rendimento de bibliotecas químicas, o que os torna particularmente adequados para identificar candidatos a fármacos do tipo de moléculas pequenas. As moléculas pequenas contempladas incluem compostos orgânicos ou inorgânicos sintéticos. Os ensaios podem ser efectuados numa variedade de formatos, incluindo ensaios de ligação proteína-proteína, ensaios de rastreio bioquímicos, imunoensaios e ensaios baseados em células, que estão bem caracterizados na especialidade.

Os ácidos nucleicos que codificam UCP4 ou as suas formas modificadas podem também ser utilizados para gerar animais transgénicos ou animais "knock out", que por seu lado são úteis no desenvolvimento e rastreio de reagentes úteis terapeuticamente. Um animal transgénico (por exemplo, um ratinho ou rato) é um animal com células que contêm um transgene, transgene esse que foi introduzido no animal ou num antepassado do animal num estágio pré-natal, por exemplo, um estágio embrionário. Um transgene é um ADN que é integrado no genoma de uma célula a partir da qual se desenvolve o animal transgénico. Numa concretização, pode utilizar-se ADNc que codifica UCP4 para clonar ADN genómico que codifica UCP4 de acordo com técnicas estabelecidas e as sequências genómicas são utilizadas para gerar animais transgénicos que contêm células que expressam ADN que codifica UCP4. Os métodos para gerar animais transgénicos, nomeadamente animais tais como ratinhos ou ratos, tornaram-se convencionais na especialidade e são descritos, por exemplo, em patentes U.S. 4 736 866 e 4 870 009. Tipicamente, tomam-se como alvo determinadas células para incorporação do transgene de UCP4 com facilitadores específicos de tecido. Os animais transgénicos que incluem uma cópia de um transgene que codifica UCP4 introduzido na linha germinal do animal num estágio embrionário podem ser utilizados para analisar o efeito de expressão aumentada de ADN que codifica UCP4. Tais animais

podem ser utilizados como animais de ensaio para reagentes que se pensa conferirem protecção contra, por exemplo, condições patológicas associadas à sua sobre-expressão ou sub-expressão. De acordo com esta faceta do invento, trata-se um animal com o reagente e uma incidência reduzida da condição patológica, comparativamente a animais não tratados contendo o transgene, indicaria uma intervenção terapêutica potencial para a condição patológica.

Alternativamente, podem ser utilizados homólogos de UCP4 não humanos para construir um animal "knock out" relativamente a UCP4 que tem um gene que codifica UCP4 deficiente ou alterado como resultado de recombinação homóloga entre o gene endógeno que codifica UCP4 e ADN genómico alterado que codifica UCP4 introduzido numa célula embrionária do animal. Por exemplo, pode utilizar-se ADNc que codifica UCP4 para clonar ADN genómico que codifica UCP4 de acordo com técnicas estabelecidas. Uma porção do ADN genómico que codifica UCP4 pode ser eliminada ou substituída por outro gene, tal como um gene que codifica um marcador seleccionável que pode ser utilizado para monitorizar a integração. Tipicamente, incluem-se várias quilobases de ADN flanqueador inalterado (de ambas as extremidades 5' e 3') no vector [consultar por exemplo, Thomas e Capecchi, Cell, 51:503 (1987) para uma descrição de vectores de recombinação homóloga]. O vector é introduzido numa linha celular estaminal embrionária (por exemplo, por electroporação) e seleccionam-se células nas quais o ADN introduzido se recombinou homologamente com o ADN endógeno [consultar por exemplo, Li *et al.*, Cell, 69:915 (1992)]. As células seleccionadas são então injectadas num blastocisto de um animal (por exemplo, um ratinho ou rato) para formar quimeras de agregação [consultar por exemplo, Bradley, em Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E.J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), p. 113-152]. Pode ser então implantado um embrião quimérico num animal fêmea hospedeira pseudo-grávida adequada e o embrião é levado a termo para criar um animal "knock out". A descendência contendo o ADN recombinado homologamente nas suas células germinais pode ser identificada por técnicas padrão e utilizada para criar animais nos quais todas as células do animal contêm o ADN recombinado homologamente. Os animais "knockout" podem ser caracterizados, por exemplo, pela sua

capacidade de defesa contra determinadas condições patológicas e pelo desenvolvimento de condições patológicas devido à ausência do polipéptido UCP4.

Os ácidos nucleicos que codificam os polipéptidos UCP4 podem também ser utilizados em terapia génica. Em aplicações de terapia génica, os genes são introduzidos em células de modo a conseguir síntese *in vivo* de um produto génico eficaz terapeuticamente, por exemplo para substituição de um gene deficiente. A "terapia génica" inclui tanto terapia génica convencional em que se consegue um efeito duradouro através de um tratamento único, como a administração de agentes génicos terapêuticos, que envolve a administração única ou repetida de um ADN ou ARNm eficaz terapeuticamente. Podem ser utilizados ARN e ADN anti-sentido como agentes terapêuticos para bloquear a expressão de determinados genes *in vivo*. Foi já demonstrado que oligonucleótidos anti-sentido curtos podem ser importados para células onde actuam como inibidores, apesar das suas baixas concentrações intracelulares causadas pela sua absorção restrita pela membrana celular. (Zamecnik *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4143-4146 [1986]). Os oligonucleótidos podem ser modificados para aumentar a sua absorção, por exemplo por substituição dos seus grupos fosfodiéster carregados negativamente por grupos neutros.

Existem uma variedade de técnicas para introduzir ácidos nucleicos em células viáveis. As técnicas variam dependendo se o ácido nucleico é transferido para células em cultura *in vitro*, ou *in vivo* nas células do hospedeiro pretendido. As técnicas adequadas para a transferência de ácido nucleico para células de mamífero *in vitro* incluem a utilização de lipossomas, electroporação, micro-injecção, fusão celular, DEAE-dextrano, o método de precipitação de fosfato de cálcio, etc. As técnicas de transferência génica *in vivo* actualmente preferidas incluem transfecção com vectores virais (tipicamente retrovirais) e transfecção mediada por proteínas de envelope de vírus-lipossoma (Dzau *et al.*, Trends in Biotechnology 11, 205-210 [1993]). Em algumas situações é desejável proporcionar a fonte de ácido nucleico com um agente que tem como alvo as células alvo, tal como um anticorpo específico para a proteína de membrana superficial da célula ou a célula alvo, um ligando para um receptor na célula alvo,

etc. Quando se utilizam lipossomas, podem ser utilizadas proteínas que se ligam a uma proteína membranar de superfície celular associada a endocitose para direcção ao alvo e/ou para facilitar a absorção, por exemplo proteínas de cápside ou seus fragmentos trópicos para um determinado tipo de célula, anticorpos para proteínas que sofrem internalização em ciclos, proteínas que têm como alvo uma localização intracelular e aumenta a semivida intracelular. A técnica de endocitose mediada por receptor é descrita, por exemplo, por Wu et al., J. Biol. Chem. 262, 4429-4432 (1987); e Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990). Para revisão de protocolos de marcação de gene e de terapia génica consultar Anderson et al., Science 256, 808-813 (1992).

Pensa-se que a terapia génica de UCP4 tem aplicações, por exemplo, no tratamento de condições metabólicas. Tal pode ser conseguido, por exemplo, utilizando as técnicas descritas acima e por introdução de um vector viral contendo um gene de UCP4 em determinados tecidos (tal como músculo ou gordura) para aumentar a taxa metabólica nestes tecidos alvo e assim elevar o consumo de energia.

Em geral, revelam-se aqui métodos de tratamento utilizando UCP4. A combustão de combustível, transporte de electrões, bomba de protão e consumo de O_2 (que podem ser denominadas colectivamente como taxa metabólica) estão acopladas a síntese de ATP. Pode existir uma "ineficácia" em mamíferos, de modo que uma parte da taxa metabólica (que em alguns casos pode ser superior a 20%) pode ser imputada a "fuga" de H^+ de volta ao espaço matricial sem qualquer síntese de ATP.

Pensa-se que UCP4 pode estar envolvido na catálise de fuga de H^+ , desempenhando assim um papel na ineficácia energética *in vivo*. Assim, a modulação da actividade de UCP4 ou quantidades (presença) de UCP4 em tecidos de mamífero (nomeadamente, tecidos metabolicamente importantes), pode modular concomitantemente fuga de H^+ , taxa metabólica e produção de calor. Os métodos de modulação (quer num modo de regulação positiva quer de regulação negativa) da taxa metabólica num mamífero têm uma variedade de aplicações terapêuticas, incluindo tratamento da obesidade e dos sintomas

associados com icto, traumatismo (tal como traumatismo de queimadura), sepsia e infecção.

No tratamento da obesidade, os peritos na especialidade considerarão que a modulação do potencial de membrana mitocondrial pode ser utilizada para aumentar a taxa metabólica corporal, aumentando assim a capacidade de um indivíduo perder peso. Podem efectuar-se ensaios de rastreio para identificar moléculas que podem regular positivamente a expressão ou a actividade (tal como o desacoplamento) de UCP4. As moléculas assim identificadas podem então ser utilizadas para aumentar a taxa metabólica e aumentar a perda de peso. Os polipéptidos UCP4 são úteis em ensaios para identificar compostos líder para agentes terapeuticamente activos que modulam a expressão ou a actividade de UCP4. As moléculas ou compostos candidatos podem ser ensaiados com as células ou tecidos de mamífero para determinar o(s) efeito(s) da molécula ou composto candidatos sobre a expressão ou a actividade de UCP4. Estes ensaios de rastreio podem ser susceptíveis de rastreio de alto rendimento de bibliotecas químicas, e são particularmente adequados para identificar candidatos a fármacos do tipo molécula pequena. As moléculas pequenas incluem, mas não se lhes limitam, compostos orgânicos ou inorgânicos sintéticos. Os ensaios podem ser realizados numa variedade de formatos, incluindo ensaios de ligação proteína-proteína, ensaios de rastreio bioquímicos, imunoensaios, ensaios baseados em células, etc. Tais formatos de ensaio são bem conhecidos na especialidade.

Assim, numa concretização, proporciona-se um método para realizar um ensaio de rastreio *in vitro* para identificar uma molécula que aumenta ou regula positivamente a expressão de UCP4, incluindo as etapas de expor uma célula ou amostra de tecido de mamífero que se pensa conter UCP4 a uma molécula candidata e subsequentemente analisar a expressão de UCP4 na referida amostra. Neste método, a amostra pode ser analisada adicionalmente relativamente ao potencial de membrana mitocondrial. Opcionalmente, o UCP4 é um polipéptido contendo resíduos de aminoácidos 1 a 323 da figura 1 (SEQ ID NO:1). A amostra a ser analisada pode incluir várias células ou tecidos de mamífero, incluindo, sem limitação, tecido cerebral humano. A molécula candidata utilizada no ensaio de rastreio pode ser

uma molécula pequena incluindo um composto orgânico ou inorgânico sintético. Numa concretização alternativa, o ensaio de rastreio é efectuado para identificar uma molécula que diminui ou regula negativamente a expressão de UCP4. O(s) efeito(s) que tal molécula candidata pode ter na expressão e/ou actividade de UCP4 pode(m) ser comparado(s) a um controlo ou amostra de referência, tal como por exemplo, a expressão ou actividade de UCP4 observada num mamífero idêntico.

O UCP4 pode também ser utilizado em métodos de diagnóstico. Por exemplo, a presença ou ausência de UCP4 ou alternativamente a sobre-expressão ou sub-expressão de UCP4 em células ou tecidos de um indivíduo, pode ser detectada utilizando ensaios conhecidos na especialidade, incluindo os descritos nos exemplos adiante. Assim, o invento também proporciona um método de detectar expressão de UCP4 numa célula ou amostra de tecido de mamífero, incluindo pôr em contacto uma célula ou amostra de tecido de mamífero com uma sonda de ADN e analisar a expressão do produto de transcrição de ARNm de UCP4 na referida amostra. A amostra pode incluir várias células ou tecidos de mamífero, incluindo, mas não se lhe limitando, tecido cerebral humano. O perito na especialidade pode utilizar a informação resultante de tais ensaios de detecção como auxiliar de previsão das condições metabólicas ou risco de início de obesidade. Caso se determine, por exemplo, que a actividade de UCP4 num doente é anormalmente alta ou baixa, pode administrar-se terapia, por exemplo terapia hormonal, para que a actividade de UCP4 retorne a um estado fisiologicamente aceitável.

A detecção de função de UCP4 reduzida num mamífero pode também ser utilizada como auxiliar de diagnóstico de actividade neural debilitada ou degeneração neural. Pensa-se actualmente que UCP4 pode estar envolvido na regulação da temperatura ou taxa metabólica cerebral que é necessária para função cerebral normal (e actividade neural associada). Também se pensa actualmente que UCP4 pode controlar a geração de espécies de oxigénio reactivas e assim contribuir para degeneração neural. As moléculas identificadas nos ensaios de rastreio para as quais se verificou que inibem a expressão ou função de UCP4 podem também ser utilizadas para tratar febre

dado que se pensa que UCP4 é regulado positivamente durante episódios de febre.

F. Anticorpos anti-UCP4

O presente invento proporciona adicionalmente anticorpos anti-UCP4. Os exemplos de anticorpos incluem anticorpos policlonais, monoclonais, humanizados, biespecíficos e heteroconjugados.

1. Anticorpos policlonais

Os anticorpos anti-UCP4 podem incluir anticorpos policlonais. São conhecidos pelos peritos na especialidade métodos de preparação de anticorpos policlonais. Os anticorpos policlonais podem ser desenvolvidos num mamífero, por exemplo, através de uma ou mais injecções de um agente de imunização e, caso se pretenda, um adjuvante. Tipicamente, o agente de imunização e/ou adjuvante serão injectados num mamífero através de múltiplas injecções subcutâneas ou intraperitoneais. O agente de imunização podem incluir o polipeptído UCP4 ou uma sua proteína de fusão. Pode ser útil conjugar o agente de imunização a uma proteína que se sabe ser imunogénica no mamífero a ser imunizado. Os exemplos de tais proteínas imunogénicas incluem, mas não se lhes limitam, hemocianina de lapa gigante, albumina de soro, tiroglobulina bovina e inibidor de tripsina de soja. Os exemplos de adjuvantes que podem ser utilizados incluem adjuvante completo de Freund e adjuvante MPL-TDM (monofosforil-lípido A, dicitrionomicolato de trealose sintético). O protocolo de imunização pode ser seleccionado por um perito na especialidade sem experiências desnecessárias.

2. Anticorpos monoclonais

Os anticorpos anti-UCP4 podem ser alternativamente anticorpos monoclonais. Os anticorpos monoclonais podem ser preparados utilizando métodos de hibridoma tal como os descritos por Kohler e Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). Num método de hibridoma imuniza-se tipicamente um hamster ou outro animal hospedeiro apropriado com um agente de imunização para induzir linfócitos que produzem ou são capazes de produzir

anticorpos que se ligarão especificamente ao agente de imunização. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*.

O agente de imunização incluirá tipicamente o polipéptido UCP4 ou uma sua proteína de fusão. De um modo geral, utilizam-se linfócitos de sangue periférico ("PBL") caso se pretendam células de origem humana ou células de baço ou células de gânglio linfático caso se pretendam fontes mamíferas não humanas. Os linfócitos são então fundidos com uma linha de células imortalizadas utilizando um agente de fusão adequado tal como polietilenoglicol, para formar uma célula de hibridoma [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) p. 59-103]. As linhas de células imortalizadas são habitualmente células de mamífero transformadas, nomeadamente células de mieloma de origem de roedor, bovino e humano. Habitualmente utilizam-se linhas de células de mieloma de rato ou ratinho. As células de hibridoma podem ser cultivadas num meio de cultura adequado que contém preferivelmente uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou sobrevivência das células imortalizadas não fundidas. Por exemplo, se as células parentais forem isentas da enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas conterá tipicamente hipoxantina, aminopterina e timidina ("meio HAT"), substâncias que evitam o crescimento de células deficitárias em HGPRT.

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

O meio de cultura no qual se cultivam as células de hibridoma pode ser então ensaiado quanto à presença de anticorpos monoclonais dirigidos contra UCP4. Preferivelmente, a especificidade de ligação de anticorpos monoclonais produzidos pelas células de hibridoma é determinada por imunoprecipitação ou por ensaio de ligação *in vitro*, tal como radioimunoensaio (RIA) ou ensaio de imunossorção com enzimas ligadas (ELISA). Tais técnicas e ensaios são conhecidos na especialidade. A afinidade de ligação do anticorpo monoclonal pode ser determinada, por exemplo, pela análise de Scatchard de Munson e Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Após identificação das células de hibridoma pretendidas, os clones podem ser subclonados por procedimentos de diluição limitante e cultivados por métodos padrão [Goding, *supra*]. Os meios de cultura adequados para este objectivo incluem, por exemplo, meio de Eagle modificado por Dulbecco e meio RPMI-1640. Alternativamente, as células de hibridoma podem ser cultivadas *in vivo* como ascites num mamífero.

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

Os anticorpos monoclonais podem também ser produzidos por métodos de ADN recombinante tais como os descritos na patente U.S. 4 816 567. O ADN que codifica os anticorpos monoclonais do invento pode ser facilmente isolado e sequenciado utilizando procedimentos convencionais (por exemplo, utilizando de sondas de oligonucleótido que são capazes de se ligar especificamente a genes que codificam as cadeias pesada e leve de anticorpos murinos). As células de hibridoma do invento servem como uma fonte preferível de tal ADN. Uma vez isolado, o ADN pode ser inserido em vectores de expressão que são então transfetados para células hospedeiras tais como células COS de símio, células de ovário de hamster chinês (CHO) ou células de mieloma que de outra forma não produzem qualquer outra proteína imunoglobulina, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras

recombinantes. O ADN pode também ser modificado, por exemplo, por substituição da sequência de codificação pelos domínios constantes das cadeias pesada e leve humanas em vez das sequências murinas homólogas [patente U.S. 4 816 567; Morrison et al., *supra*] ou por ligação covalente à sequência de codificação da imunoglobulina de toda ou de parte da sequência de codificação de um polipéptido não imunoglobulina. Tal polipéptido que não imunoglobulina pode ser substituído pelos domínios constantes de um anticorpo do invento ou pode ser substituído pelos domínios variáveis de um local de combinação de抗érgio de um anticorpo do invento para criar um anticorpo bivalente quimérico.

Os anticorpos podem ser anticorpos monovalentes. Os métodos de preparação de anticorpos monovalentes são bem conhecidos na especialidade. Por exemplo, um método envolve expressão recombinante da cadeia leve e cadeia pesada modificada de imunoglobulina. A cadeia pesada é truncada geralmente em qualquer local da região Fc de modo a evitar reticulação de cadeia pesada. Alternativamente, os resíduos de cisteína relevantes são substituídos por outro resíduo de aminoácido ou são eliminados de modo a evitar reticulação.

Os métodos *in vitro* são também adequados para preparar anticorpos monovalentes. A digestão de anticorpos para produzir os seus fragmentos, nomeadamente, fragmentos Fab, pode ser efectuada utilizando técnicas de rotina conhecidas na especialidade.

3. Anticorpos humanos e humanizados

Os anticorpos anti-UCP4 do invento podem incluir adicionalmente anticorpos humanizados ou anticorpos humanos. As formas humanizadas de anticorpos não humanos (por exemplo, murinos) são imunoglobulinas quiméricas, cadeias de imunoglobulina quimérica ou seus fragmentos (tais como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ ou outras subsequências de anticorpos de ligação de抗érgios) que contêm uma sequência mínima derivada de uma imunoglobulina não humana. Os anticorpos humanizados incluem imunoglobulinas humanas (anticorpo recebedor) nas quais se substituem resíduos de uma região determinante da complementaridade (CDR) do recebedor por

resíduos de uma CDR de uma espécie não humana (anticorpo dador) tal como ratinho, rato ou coelho apresentando a especificidade, afinidade e capacidade pretendidas. Nalguns casos, substituem-se resíduos do esqueleto Fv da imunoglobulina humana por resíduos não humanos correspondentes. Os anticorpos humanizados podem também incluir resíduos que não se encontram nem no anticorpo recebedor nem nas sequências de CDR ou de esqueleto importadas. De um modo geral, o anticorpo humanizado incluirá substancialmente todos de pelo menos um e tipicamente dois domínios variáveis, nos quais todas ou substancialmente todas as regiões CDR correspondem às de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as regiões FR são as de uma sequência de consenso de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado incluirá também optimamente pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de uma imunoglobulina humana [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)].

São bem conhecidos na especialidade métodos para humanizar anticorpos não humanos. De um modo geral, um anticorpo humanizado tem um ou mais resíduos de aminoácido nele introduzidos a partir de uma fonte que não é humana. Estes resíduos de aminoácido não humanos são muitas vezes referidos como resíduos de "importação", que são tipicamente retirados de um domínio variável de "importação". A humanização pode ser essencialmente efectuada seguindo o método de Winter e colaboradores [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)], substituindo por CDR ou sequências de CDR de roedor as sequências correspondentes de um anticorpo humano. Consequentemente, tais anticorpos "humanizados" são anticorpos quiméricos (patente U.S. 4 816 567), nos quais se substituiu substancialmente menos que um domínio variável humano intacto pela sequência correspondente de uma espécie não humana. Na prática, os anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos nos quais alguns resíduos CDR e possivelmente alguns resíduos FR são substituídos por resíduos de locais análogos em anticorpos de roedor.

Podem também produzir-se anticorpos humanos utilizando várias técnicas conhecidas na especialidade, incluindo bibliotecas de apresentação em fagos [Hoogenboom e Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)]. As técnicas de Cole et al. e Boerner et al. estão também disponíveis para a preparação de anticorpos monoclonais humanos (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) e Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)]. Podem igualmente produzir-se anticorpos humanos por introdução loci de imunoglobulina humana em animais transgénicos, e.g., ratinhos nos quais os genes de imunoglobulina endógenos foram parcial ou completamente inactivados. Após provação, observa-se produção de anticorpo humano, que se assemelha bastante à observada em seres humanos em todos os aspectos incluindo rearranjo e montagem de genes e repertório de anticorpos. Esta abordagem descreve-se, por exemplo, nas patentes U.S. 5 545 807; 5 545 806; 5 569 825; 5 625 126; 5 633 425; 5 661 016 e nas seguintes publicações científicas: Marks et al., Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368 856-859 (1994); Morrison, Nature 368, 812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg e Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995).

4. Anticorpos biespecíficos

Os anticorpos biespecíficos são anticorpos monoclonais, preferivelmente humanos ou humanizados, que têm especificidades de ligação para pelo menos dois抗ígenos diferentes. No presente caso, uma das especificidades de ligação é para UCP4, a outra é para qualquer outro抗ígeno e preferivelmente para uma proteína ou receptor ou subunidade de receptor da superfície celular.

São conhecidos na especialidade métodos para produzir anticorpos biespecíficos. Tradicionalmente, a produção recombinante de anticorpos biespecíficos baseia-se na co-expresão de dois pares de cadeia pesada/cadeia leve de imunoglobulina em que as duas cadeias pesadas têm especificidades diferentes [Milstein e Cuello, Nature, 305:537-539 (1983)]. Devido ao sortido aleatório de cadeias

leves e pesadas de imunoglobulina, estes hibridomas (quadromas) produzem uma mistura potencial de dez moléculas de anticorpo diferentes das quais apenas uma tem a estrutura biespecífica correcta. A purificação da molécula correcta é habitualmente conseguida por etapas de cromatografia de afinidade. Revelam-se procedimentos semelhantes em WO 93/08829, publicado a 13 de Maio de 1993 e em Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

Podem fundir-se domínios variáveis de anticorpos com as especificidades de ligação pretendidas (locais de combinação anticorpo-antígeno) com sequências de domínios constantes de imunoglobulina. A fusão é preferivelmente com um domínio constante de cadeia pesada de imunoglobulina incluindo pelo menos parte das regiões de charneira, CH2 e CH3. Prefere-se que a primeira região constante de cadeia pesada (CH1) contenha o local necessário para a ligação da cadeia leve presente em pelo menos uma das fusões. Os ADN que codificam as fusões de cadeia pesada de imunoglobulina e caso pretendido, cadeia leve de imunoglobulina, são inseridas em vectores de expressão separados e são co-transfetados para um organismo hospedeiro adequado. Para detalhes adicionais para gerar anticorpos biespecíficos consultar, por exemplo, Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986).

5. Anticorpos heteroconjugados

Os anticorpos heteroconjugados estão também abrangidos pelo âmbito do presente invento. Os anticorpos heteroconjugados são compostos por dois anticorpos ligados covalentemente. Tais anticorpos têm sido propostos, por exemplo, para dirigir células do sistema imunitário para células indesejadas [patente U.S. 4 676 980] e para tratamento de infecção por VIH [WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089]. Considera-se que os anticorpos podem ser preparados *in vitro* utilizando métodos conhecidos em química sintética de proteínas incluindo os que envolvem agentes de reticulação. Por exemplo, podem construir-se imunotoxinas utilizando uma reacção de permuta de dissulfureto ou por formação de uma ligação tioéter. Os exemplos de reagentes adequados para este objectivo incluem iminotiolato e metil-4-mercaptobutirimidato e os revelados, por exemplo, na patente U.S. 4 676 980.

G. Utilizações para anticorpos anti-UCP4

Os anticorpos anti-UCP4 do invento têm diferentes utilidades. Por exemplo, podem utilizar-se anticorpos anti-UCP4 em ensaios de diagnóstico para UCP4, por exemplo, detectar a sua expressão em células ou tecidos específicos. Podem utilizar-se diferentes técnicas de ensaio de diagnóstico conhecidas na especialidade, tal como ensaios de ligação competitiva, ensaios em sanduíche directos ou indirectos e ensaios de imunoprecipitação conduzidos quer em fase heterogénea quer em fase homogénea [Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987) p. 147-158]. Os anticorpos utilizados nos ensaios de diagnóstico podem ser marcados com uma porção detectável. A porção detectável deve ser capaz de produzir, directa ou indirectamente um sinal detectável. Por exemplo, a porção detectável pode ser um isótopo radioactivo tal como ^{3}H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S ou ^{125}I , um composto fluorescente ou quimioluminescente tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina ou luciferina ou uma enzima tal como fosfatase alcalina, beta-galactosidase ou peroxidase de rábano. Pode utilizar-se qualquer método conhecido na especialidade para conjugar o anticorpo com a porção detectável, incluindo os métodos descritos por Hunter et al., *Nature*, 144:945 (1962); David et al., *Biochemistry*, 13:1014 (1974); Pain et al., *J. Immunol. Meth.*, 40:219 (1981); e Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, 30;407 (1982).

Os anticorpos anti-UCP4 são também úteis para purificação por afinidade de UCP4 a partir de cultura de células recombinantes ou de fontes naturais. Neste processo, os anticorpos contra UCP4 são immobilizados num suporte adequado tal como uma resina Sephadex ou papel de filtro utilizando métodos bem conhecidos na especialidade. O anticorpo immobilizado é então posto em contacto com uma amostra contendo o UCP4 a ser purificado e seguidamente o suporte é lavado com um solvente adequado que removerá substancialmente todo o material na amostra excepto o UCP4 que está ligado ao anticorpo immobilizado. Finalmente, o suporte é lavado com outro solvente adequado que libertará o UCP4 do anticorpo.

EXEMPLOS

Os reagentes disponíveis comercialmente referidos nos exemplos foram utilizados de acordo com as instruções do fabricante salvo indicação em contrário. A fonte das células identificadas nos exemplos seguintes e ao longo de todo o fascículo pelos números de acesso ATCC é a American Type Culture Collection, Manassas, Virginia.

EXEMPLO 1

Isolamento de clones de ADNc que codificam UCP4 humana

Efectuaram-se buscas nas bases de dados EST que incluíram bases de dados EST públicas (por exemplo, GenBank) e uma base de dados EST registada (LIFESEQ™, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, California) de sequências apresentando homologias com UCP3 humana. A busca foi efectuada utilizando o programa de computador BLAST ou BLAST2 [Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)] como uma comparação de sequências da proteína UCP3 com uma tradução de 6 quadros de sequências EST. As comparações que resultaram numa pontuação BLAST de 70 (ou nalguns casos, 90) ou superior que não codificaram para proteínas conhecidas foram agregadas e juntas em sequências de ADN de consenso com o programa AssemblyLIGN e MacVector (Oxford Molecular Group, Inc.).

Montou-se uma sequência de ADN ("ADN de partida") relativamente a outras sequências EST utilizando o utilitário AssemblyLIGN (figura 7; SEQ ID NO:5). As EST da base de dados Incyte incluíram as sequências apresentando os seguintes números de acesso: 3468504; 3369262; 4220747; 1254733; 5016160; 3770189; 2265329; 928717; 3715961; 3528102; 961523; 1863723; 382533; 918252; 918404; 4313009; 3801604; c-swh06; 3464955; c-1sh09; 090424; 1316891; 1342069; 1435593; 16014011; 1668098; 1668103; 222248; 243244; 246984; 272663; 305678; 305871; 3369262; 3464955 e 3715961. Adicionalmente, a sequência de ADN de partida foi estendida utilizando ciclos repetidos de BLAST e AssemblyLIGN para estender a sequência tanto quanto possível utilizando as fontes de sequências EST discutidas acima.

Com base nesta sequência de ADN, sintetizaram-se oligonucleótidos para isolar um clone das sequências de codificação de comprimento completo para UCP4 por PCR. Os iniciadores de PCR directo e inverso apresentam geralmente uma gama entre 20 e 30 nucleótidos e são muitas vezes concebidos para fornecerem um produto de PCR com um comprimento de cerca de 100-1000 pb. As sequências sonda apresentam tipicamente um comprimento de cerca de 40-55 pb. Nalguns casos, sintetizam-se oligonucleótidos adicionais quando a sequência de consenso é maior do que cerca de 1-1,5 kpb.

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

Iniciador de PCR directo CGCGGATCCCGTTATCGTCTTGCCTACTGC
(U401) (SEQ ID NO:3)

Iniciador de PCR inverso GCGGAATTCTTAAAATGGACTGACTCCACTCATC
(U406) (SEQ ID NO:4)

Clonou-se também UCP4 com um marcador Flag no terminal NH₂ em pcDNA3 (pcDNA3Flag-UCP4; Invitrogen) entre os locais de restrição BamHI e EcoRI. Sintetizaram-se os seguintes iniciadores de PCR directo e inverso:

Iniciador de PCR directo
CGCGGATCCGAAATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGTCCGTCCGGAGGAGGAGG
(U410) (SEQ ID NO: 6)

Iniciador de PCR inverso GCGGAATTCTTAAAATGGACTGACTCCACTCATC
(U406) (SEQ ID NO:4)

Isolou-se ARN para construção das bibliotecas de ADNc a partir de tecido de cérebro. As bibliotecas de ADNc utilizadas para isolar os clones de ADNc foram construídas por métodos padrão utilizando reagentes disponíveis comercialmente tal como os de Invitrogen, San Diego, California. Como iniciador para o ADNc utilizou-se oligo dT contendo um local NotI ligado com extremidades lisas a adaptadores de SalI tratados com hemiquinase, clivado com NotI, o seu tamanho foi apropriadamente estabelecido por electroforese em gel e foi clonado numa orientação definida num vector de clonagem apropriado (tal como pRK5B ou pRKD; pRK5B é um precursor de

pRK5D que não contém o local SfiI; consultar, Holmes *et al.*, *Science*, 253:1278-1280 (1991) em locais únicos XhoI e NotI.

A sequenciação de ADN do clone isolado por PCR tal como descrito acima forneceu a sequência de ADN de comprimento completo para UCP4 (aqui designada como DNA77568-1626 [figura 2, SEQ ID NO: 2] e a sequência de proteína derivada para UCP4.

A sequência de codificação de comprimento completo de UCP4 é apresentada na figura 2 (SEQ ID NO:2). O clone DNA77568-1626 contém um único quadro de leitura aberto com um local de iniciação de tradução aparente nas posições de nucleótido 40-42 e um codão de terminação aparente nas posições de nucleótido 1009-1011 (consultar figura 2; SEQ ID NO:2). O precursor polipeptídico previsto tem um comprimento de 323 aminoácidos. Pensa-se actualmente que UCP4 é uma proteína ligada à membrana que contém pelo menos 6 regiões transmembranares. Estas possíveis regiões transmembranares da sequência de aminoácidos de UCP4 ilustram-se na figura 3. O clone DNA77568, designado como DNA77568-1626 contido no vector pcDNA3 (Invitrogen) foi depositado na ATCC e recebeu o n.º de depósito ATCC 203134. O polipeptído UCP4 é obtido ou pode obter-se por expressão da molécula codificada pela inserção de ADNc do vector ATCC 203134 depositado. A digestão do vector ATCC 203134 depositado com enzimas de restrição BamHI e EcoRI proporcionará uma inserção de aproximadamente 972 mais 34 pb. A proteína UCP4 de comprimento completo apresentada na figura 1 tem um peso molecular estimado de cerca de 36 061 daltons e um pI de cerca de 9,28.

Ilustra-se na figura 3 um alinhamento da sequência de aminoácidos de UCP4 com UCP 1, 2 e 3. Identificaram-se algumas diferenças notáveis entre UCP1 e UCP4. Quando UCP1 não contém o seu local de ligação de nucleótidos putativo, é resistente a inibição por nucleótidos e quando Phe-267 em UCP1 é substituído por um resíduo de Tyr, UCP1 tem actividade de desacoplamento aumentada [Gonzalez-Barroso *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 239: 445-450 (1996); Mayinger *et al.*, *Biochem.*, 31: 10536-10543 (1992)]. Contudo, tal como UCP2 e UCP3, UCP4 tem um resíduo de Tyr nesta posição (consultar figura 3). Adicionalmente, o terminal carboxilo de UCP1 tem sido

implicado na activação da sua actividade de desacoplamento por ácidos gordos livres (FFA). A substituição de Cys-305 por resíduos de Ala ou Ser resulta quer em diminuição quer em aumento de activação por FFA, respectivamente [Gonzalez-Barroso *et al.*, *supra*]. Devido a UCP2 ter uma Ala-307, UCP3 ter uma Ser-298 e UCP4 ter uma Ser-321, a actividade de desacoplamento de UCP4 e das outras UCP é provavelmente regulada diferentemente por nucleótidos e por FFA.

O gene de UCP4 humano foi mapeado na localização cromossómica 6 p11.2-q12 que é mais próxima do marcador genómico SHGC-34952.

EXEMPLO 2

Análise "Northern blot"

A expressão de ARNm de UCP4 em tecidos humanos foi analisada por "Northern blot". Hibridaram-se transferências de ARN humano com uma sonda de ADN de 1 quilobase marcada com ^{32}P baseada no ADNc de UCP4 de comprimento completo; gerou-se a sonda por digestão de pcDNA3UCP4 e purificação da inserção de ADNc de UCP4. Incubou-se a transferência de ARN de adulto humano MTN-II (Clontech) (figuras 4A, 4B, 4D, 4E e 4F), a transferência de tecido fetal humano (figuras 4D e 4H), PBL (figuras 4B e 4D) e células de cancro (figura 4C), com sondas de ADN. Tal como apresentado na figura 4C, as células de cancro sondadas incluíram HL-60 (leucemia promielocítica), células HeLa, K562 (leucemia mielógena crónica), MOLT-4 (leucemia linfoblástica), Raji (linfoma de Burkitt), SW480 (adenocarcinoma colorrectal), A549 (carcinoma de pulmão) e G361 (melanoma). A expressão de UCP2 foi também analisada por sondagem de uma hibridação de tecidos múltiplos de cérebro humano com ADNc de UCP2 humano (figura 4G). Todas as hibridações foram subsequentemente sondadas com um ADNc de β -actina.

A análise de "Northern" foi efectuada de acordo com as instruções do fabricante (Clontech). Revelaram-se as hibridações após exposição durante a noite a película de raios x.

Tal como apresentado nas figuras 4A-4H, detectaram-se os produtos de transcrição de ARNm de UCP4. Observou-se expressão em tecidos do cérebro, medula espinal, medula, corpo caloso e substância negra mas não nos outros tecidos humanos ou linhas celulares de cancro examinadas. Apesar do teor de produto de transcrição UCP4 ser maior em tecidos de cérebro do que em medula espinal, medula, corpo caloso e substância negra (figuras 4A, 4E e 4F), os teores de produto de transcrição UCP2 foram superiores na medula espinal e na medula (figura 4G). Na hibridação de tecido fetal humano, o produto de transcrição UCP4 foi apenas detectado no cérebro (figura 4H).

EXEMPLO 3

Utilização de UCP4 como sonda de hibridação

O método seguinte descreve a utilização de uma sequência nucleotídica que codifica UCP4 como uma sonda de hibridação.

Utiliza-se ADN incluindo a sequência de codificação de UCP4 de comprimento completo ou maduro (tal como apresentado na figura 2, SEQ ID NO:2) como uma sonda para rastrear ADN homólogos (tal como os que codificam variantes de UCP4 de ocorrência natural) em bibliotecas de ADNc de tecidos humanos ou bibliotecas genómicas de tecidos humanos.

A hibridação e lavagem dos filtros contendo qualquer uma das bibliotecas de ADN é efectuada sob as seguintes condições altamente rigorosas. A hibridação aos filtros da sonda derivada de UCP4 marcada radioquimicamente é efectuada numa solução de formamida a 50%, SSC 5x, SDS a 0,1%, pirofosfato de sódio a 0,1%, fosfato de sódio 50 mM, pH 6,8, solução de Denhardt 2x e sulfato de dextrano a 10% a 42°C durante 20 horas. A lavagem dos filtros é efectuada numa solução aquosa de SSC 0,1x e SDS a 0,1% a 42°C.

Podem então identificar-te ADN apresentando uma identidade de sequência pretendida com o ADN que codifica UCP4 de sequência nativa de comprimento completo utilizando técnicas padrão conhecidas na especialidade.

EXEMPLO 4

Expressão de UCP4 em *E. coli*

Este exemplo ilustra a preparação de UCP4 por expressão recombinante em *E. coli*.

A sequência de ADN que codifica UCP4 (SEQ ID NO:2) é inicialmente amplificada utilizando iniciadores de PCR seleccionados. Os iniciadores devem conter locais de enzimas de restrição que correspondem aos locais de enzimas de restrição no vector de expressão seleccionado. Podem utilizarse vários vectores de expressão. Constitui um exemplo de um vector adequado pBR322 (derivado de *E. coli*; consultar Bolivar *et al.*, *Gene*, 2:95 (1977)) que contém genes para resistência a ampicilina e tetraciclina. Digere-se o vector com enzima de restrição e desfosforila-se. As sequências amplificadas por PCR são então ligadas ao vector. O vector incluirá opcionalmente sequências que codificam para um gene de resistência a antibiótico, um promotor trp, uma sequência poli-his (incluindo os primeiros seis codões STII, sequência poli-his e local de clivagem de enteroquinase), a região de codificação de UCP4, o terminador de transcrição lambda e um gene argU.

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

Os clones seleccionados podem ser cultivados durante a noite em meio de cultura líquido tal como meio de LB suplementado com antibióticos. A cultura durante a noite pode ser subsequentemente utilizada para inocular uma cultura em maior escala. Crescem-se então as células até uma densidade óptica pretendida durante a qual se activa a expressão do promotor.

Após cultivar as células durante várias horas adicionais, podem recolher-se as células por centrifugação. Caso não esteja presente qualquer sequência de sinal e a UCP4 expressa seja intracelular, o sedimento celular obtido por centrifugação pode ser solubilizado utilizando vários agentes conhecidos na especialidade e a proteína UCP4 solubilizada pode então ser purificada utilizando uma coluna quelante de metal sob condições que permitem ligação forte da proteína. Caso esteja presente uma sequência de sinal, a UCP4 expressa pode ser obtida do meio de cultura ou do periplasma celular. A extracção e/ou solubilização dos polipéptidos UCP4 pode ser efectuada utilizando agentes e técnicas conhecidas na especialidade. Consultar por exemplo patentes U.S. 5 663 304; 5 407 810.

EXEMPLO 5

Expressão de UCP4 em células de mamífero

Este exemplo ilustra a preparação de UCP4 por expressão recombinante em células de mamífero.

O vector pRK5 (consultar EP 307 247, publicado a 15 de Março de 1989) utiliza-se como o vector de expressão. Opcionalmente, liga-se o ADN de UCP4 para pRK5 com enzimas de restrição seleccionadas para permitir inserção do ADN de UCP4 utilizando métodos de ligação tal como descritos em Sambrook *et al.*, *supra*. O vector resultante denomina-se pRK5-UCP4.

Numa concretização, as células hospedeiras seleccionadas podem ser células 293. Crescem-se células 293 humanas (ATCC CRL 1573) até confluência em placas de cultura de tecidos em meio tal como DMEM suplementado com soro fetal de vitelo e opcionalmente componentes nutriente e/ou antibióticos. Misturam-se cerca de 10 µg de ADN de pRK5-UCP4 com cerca de 1 µg de ADN que codifica o gene de ARN de VA [Thimmappaya *et al.*, *Cell*, 31:543 (1982)] e dissolveram-se em 500 µl de Tris-HCl 1 mM, EDTA 0,1 mM, CaCl₂ 0,227 M. Adiciona-se a esta mistura, gota a gota, 500 µl de HEPES 50 mM (pH 7,35), NaCl 280 mM, NaPO₄ 1,5 mM e deixa-se formar um precipitado durante 10 minutos a 25°C. Ressuspende-se o precipitado e adiciona-se às células 293 e deixa-se sedimentar durante cerca de quatro

horas a 37°C. Retira-se o meio de cultura por aspiração e adiciona-se 2 ml de glicerol a 20% em PBS durante 30 segundos. Lavam-se então as células 293 com meio isento de soro, adiciona-se meio fresco e incubam-se as células durante cerca de 5 dias.

Aproximadamente 24 horas após as transfecções, remove-se o meio de cultura e substitui-se por meio de cultura (sozinho) ou meio de cultura contendo ^{35}S -cisteína a 200 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ e ^{35}S -metionina a 200 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$. Após uma incubação de 12 horas, recolhe-se o meio condicionado, concentra-se num filtro de centrifugação e carrega-se num gel de SDS a 15%. O gel processado pode ser seco e exposto a película durante um período de tempo seleccionado para revelar a presença de polipéptido UCP4. Podem submeter-se as culturas contendo células transfectadas a incubação adicional (em meio isento de soro) e ensaia-se o meio em bioensaios seleccionados.

Numa técnica alternativa, pode introduzir-se UCP4 em células 293 de modo transitório utilizando o método de sulfato de dextrano descrito por Somparyrac *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 78:7575 (1981). Cultivam-se células 293 até densidade máxima num frasco de rotação e adicionam-se 700 μg de ADN de pRKS-UCP4. Primeiramente concentram-se as células do frasco de rotação por centrifugação e lavam-se com PBS. O precipitado de ADN-dextrano é incubado com o sedimento celular durante quatro horas. Tratam-se as células com glicerol a 20% durante 90 segundos, lavam-se com meio de cultura de tecidos e torna-se a introduzir no frasco de rotação contendo meio de cultura de tecidos, insulina bovina a 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e transferrina bovina a 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Após cerca de quatro dias, centrifuga-se o meio condicionado e filtra-se para remover células e restos. A amostra contendo UCP4 expresso pode ser concentrada e purificada por qualquer método seleccionado tal como diálise e/ou cromatografia em coluna.

Noutra concretização, pode expressar-se UCP4 em células CHO. pRK5-UCP4 pode ser transfectado para células CHO utilizando reagentes conhecidos tais como CaPO_4 ou DEAE-dextrano. Tal como descrito acima, as culturas celulares podem ser incubadas e o meio substituído com meio de cultura (sozinho) ou meio contendo uma marcação radioactiva tal como

³⁵S-metionina. Após determinar a presença de polipéptido UCP4, pode substituir-se o meio de cultura por meio isento de soro. Preferivelmente, incubam-se as culturas durante cerca de 6 dias e seguidamente recolhe-se o meio condicionado. O meio contendo o UCP4 expresso pode então ser concentrado e purificado por qualquer método seleccionado.

Pode também expressar-se UCP4 marcado com epítopo em células CHO hospedeiras. O UCP4 pode ser subclonado a partir do vector pRK5. A inserção de subclone pode ser submetida a PCR para fundir em quadro de leitura com um marcador epítópico seleccionado tal como um marcador poli-his num vector de expressão de baculovírus. A inserção de UCP4 marcada com poli-his pode então ser subclonada para um vector dirigido por SV40 contendo um marcador de selecção tal como DHFR para selecção de clones estáveis. Finalmente, as células CHO podem ser transfectadas (tal como descrito acima) com o vector dirigido por SV40. Pode efectuar-se marcação, como descrito acima, para verificar expressão. O meio de cultura contendo o UCP4 marcado com poli-His pode ser então concentrado e purificado por qualquer método seleccionado tal como por cromatografia de afinidade quelante de Ni²⁺.

Num método alternativo, pode expressar-se UCP4 intracelularmente (quando não se utiliza sequência de sinal). Esta expressão intracelular e subsequente extracção ou solubilização e purificação pode ser efectuada utilizando técnicas e reagentes conhecidos na especialidade.

EXEMPLO 6

Expressão de UCP4 em levedura

O método seguinte descreve expressão recombinante de UCP4 em levedura.

Primeiramente, constroem-se vectores de expressão de levedura para produção intracelular ou secreção de UCP4 a partir do promotor ADH2/GAPDH. Insere-se ADN codificando UCP4 e o promotor em locais de enzimas de restrição adequados no plasmídeo seleccionado para dirigir expressão intracelular de UCP4. Para secreção, pode clonar-se ADN que codifica UCP4 no

plasmídeo seleccionado conjuntamente com ADN que codifica o promotor ADH2/GAPDH, um péptido de sinalização de UCP4 nativo ou outro péptido de sinalização de mamífero, ou, por exemplo, uma sequência de factor alfa ou de sinalização/comando de secreção de invertase de levedura e sequências de ligação (se necessário) para expressão de UCP4. Alternativamente, utiliza-se a sequência de sinal nativa de UCP4.

As células de levedura, tal como levedura *S. cerevisiae* estirpe AB110, podem então ser transformadas com os plasmídeos de expressão descritos acima e cultivadas em meio de fermentação seleccionado tal como estabelecido, por exemplo, nas patentes U.S. 4 775 662 e 5 010 00. Os sobrenadantes de levedura transformados podem ser analisados por precipitação com ácido tricloroacético a 10% e separação por SDS-PAGE, seguido por coloração dos géis com corante de azul de Coomassie.

Pode subsequentemente isolar-se e purificar-se UCP4 recombinante por remoção das células de levedura do meio de fermentação por centrifugação e seguidamente concentração do meio utilizando filtros de cartucho seleccionados. O concentrado contendo UCP4 pode ser adicionalmente purificado utilizando resinas de cromatografia em coluna seleccionadas. Num método alternativo, o UCP4 pode ser expresso intracelularmente (nos casos em que não se utiliza a sequência de sinal). A expressão intracelular e subsequente extracção ou solubilização e purificação pode ser efectuada utilizando técnicas e reagentes conhecidos na especialidade.

EXEMPLO 7

Expressão de UCP4 em células de insecto infectadas com baculovírus

O método seguinte descreve expressão recombinante de UCP4 em células de insecto infectadas com baculovírus.

A sequência que codifica UCP4 é fundida a montante de um marcador epítópico contido no interior de um vector de expressão. Tais marcadores de epítopo incluem marcadores poli-his e marcadores de imunoglobulina (tal como regiões Fc de

IgG). Podem utilizar-se vários plasmídeos, incluindo plasmídeos derivados de plasmídeos disponíveis comercialmente tais como pVL1393 (Novagen). Sucintamente, a sequência que codifica UCP4 ou a porção pretendida da sequência de codificação de UCP4 é amplificada por PCR com iniciadores complementares às regiões 5' e 3'. O iniciador 5' pode incorporar locais de enzima de restrição (seleccionados) flankeadores. O produto é então digerido com tais enzimas de restrição seleccionadas e subclonado para o vector de expressão. O vector pode conter a sequência de sinal nativa para UCP4 caso se pretenda secreção.

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

Pode então purificar-se UCP4 marcada com poli-his expressa, por exemplo, por cromatográfica de afinidade quelante de Ni²⁺ como se segue. Preparam-se extractos a partir de células Sf9 infectadas com vírus recombinantes tal como descrito por Rupert *et al.*, *Nature*, 362:175-179 (1993). Sucintamente, lavam-se células Sf9, ressuspensem-se em tampão de ultra-sons (25 mL de Hepes, pH 7,9; MgCl₂ 12,5 mM; EDTA 0,1 mM; glicerol a 10%; NP-40 a 0,1%; KCl 0,4 M) e tratam-se com ultra-sons duas vezes durante 20 segundos em gelo. Clarificam-se os produtos do tratamento com ultra-sons por centrifugação e dilui-se o sobrenadante 50 vezes em tampão de carga (fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, glicerol a 10%, pH 7,8) e filtra-se através de um filtro de 0,45 micra. Prepara-se uma coluna de agarose Ni²⁺-NTA (disponível comercialmente de Qiagen) com um volume de leito de 5 mL, lava-se com 25 mL de água e equilibra-se com 25 mL de tampão de carga. Carrega-se o extracto celular filtrado na coluna a 0,5 mL por minuto. Lava-se a coluna até ocorrer uma linha de base a A₂₈₀ com tampão de carga, altura em que se inicia a recolha de fracções. Seguidamente, lava-se a coluna com um tampão de

lavagem secundário (fosfato a 50 mM; NaCl 300 mM, glicerol a 10%, pH 6,0), que elui proteína ligada não especificamente. Após se atingir novamente a linha de base a A₂₈₀, revela-se a coluna com um gradiente de 0 a 500 mM de imidazole em tampão de lavagem secundário. Recolhem-se fracções de 1 mL e analisam-se por SDS-PAGE e coloração com prata ou "Western blot" com Ni²⁺-NTA conjugado com fosfatase alcalina (Qiagen). Juntam-se as fracções contendo o UCP4 marcado com His₁₀ e dialisam-se contra tampão de carga.

Alternativamente, a purificação de UCP4 marcado com IgG (ou marcado com Fc) pode ser efectuada utilizando técnicas cromatográficas conhecidas, incluindo por exemplo, cromatografia em coluna de Proteína A ou Proteína G.

EXEMPLO 8

Medição de alterações do potencial de membrana mitocondrial induzidas por UCP4

Efectuaram-se ensaios para determinar os efeitos de expressão de UCP4 sobre o potencial da membrana mitocondrial.

Cresceram-se células 293 de rim embrionário humano (ATCC CRL 1573) em meio de cultura (DMEM, soro fetal de bovino a 10%, L-glutamina 2mM, penicilina a 100 unidades/ml, estreptomicina a 100 micrograma/ml) até confluência de 60%-80% em placas de 6 poços e transfecção-se temporariamente utilizando reagente de transfecção FuGene™ 6 (Boehringer Mannheim; de acordo com as instruções do fabricante) com construções que expressam UCP (pcDNA3UCP4 ou pcDNA3UCP3), construções que expressam UCP com um marcador Flag no terminal NH₂ (pcDNA3Flag-UCP4 ou pcDNA3Flag-UCP3) ou controlo de vector (pcDNA3; disponível de Invitrogen).

As construções de expressão de ADNc que codifica UCP4 com ou sem um marcador Flag no terminal NH₂ foram preparadas de acordo com o exemplo 1. Prepararam-se construções de expressão para ADNc que codifica UCP3 obtendo primeiro, por PCR, ADNc que codifica UCP3 humana de biblioteca de ADNc de melanoma. Sintetizaram-se iniciadores de PCR (directo e inverso):

iniciador de PCR directo

GCGAAGCTTGCATGGTGGACTGAAGCCTTCAGA (U301) (SEQ ID NO: 7)

iniciador de PCR inverso CGCGAATTCTCAAAACGGTGATTCCCGTAACAT
(U302) (SEQ ID NO: 8)

Preparou-se a construção de expressão para ADNc que codifica UCP3 com um marcador Flag no terminal NH₂ com os seguintes iniciadores de PCR:

iniciador de PCR directoGCGAAGCTTGCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAG GTTGGACTGAAGCCTTCAGACG
(U303) (SEQ ID NO: 9)iniciador de PCR inverso CGCGAATTCTCAAAACGGTGATTCCCGTAACAT
(U302) (SEQ ID NO: 8)

Clonou-se UCP3 com ou sem um marcador Flag no terminal NH₂ para pcDNA3 (pcDNA3UCP3 e pcDNA3Flag-UCP3) entre os locais HindIII e EcoRI e confirmou-se por sequenciação de ADN. Detectaram-se UCP3 e UCP4 com marcação Flag expressos em células 293 por análise "Western blot" utilizando anticorpo monoclonal M2 anti-Flag (Kodak) e kit de detecção ECL (Pierce).

Analisou-se o potencial de membrana mitocondrial de acordo com métodos conhecidos na especialidade [Salvioli et al., FEBS Lett., 411: 77-82 (1997); Smiley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 3671-3675 (1991)]. Cerca de 24-36 horas após a transfecção, tripsinizaram-se as células e sedimentaram-se $1,5 \times 10^6$ por centrifugação. Ressupenderam-se as células sedimentadas em 0,5ml de uma solução de corante JC-1 e incubaram-se na presença ou ausência de CCCP (carbonilcianeto de m-clorofenil-hidrazona; Sigma) 50µm no escuro durante 30 minutos a 37°C. JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianina; Molecular Probes, Eugene, Oregon) é um corante fluorescente e sensível ao potencial de membrana. Para preparar a solução de corante, preparou-se primeiramente JC-1 como uma solução-mãe em dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma) a uma concentração de 5 mg/ml. Diluiu-se a solução-mãe até 1 mg/ml com DMSO e seguidamente diluiu-se adicionalmente para 10 µg/ml com meio

de cultura pré-aquecido a 37°C e filtrado através de filtros de 0,45µm e 0,2µm para excluir JC-1 agregado.

Lavaram-se as células coradas e ressuspenderam-se em 1,0 ml de meio de cultura. As células ressuspensas em meio de cultura foram examinadas por espectrofluorimetria (espectrofluorofotómetro RF5000U; SHIMADZU, Japão). Analisou-se um subconjunto de células por citometria de fluxo (Coulter EPICS Elite ESP, Hialeah, Florida). Para análise espectrofluorimétrica a excitação foi a 488 nm e a emissão foi medida a 525 nm e 590 nm. A análise de citometria de fluxo foi efectuada com um laser de árgon de 488 nm como excitação, um filtro a transmitir 525 ± 20 nm no canal FL1 e um filtro a transmitir acima de 590 nm no canal FL2. Analisaram-se um mínimo de 10 000 células por amostra.

Efectuou-se igualmente uma análise estatística. Compararam-se as médias das razões das intensidades de fluorescência entre os picos vermelho (593 nm) e verde (532 nm) obtidos por espectrofluorimetria ao longo dos tratamentos. Fizeram-se nove transfeções independentes por tratamento. Analisaram-se as diferenças utilizando a diferença menos significativa protegida de Fisher.

Os resultados são ilustrados nas figuras 5A e 5B. A expressão de UCP3 nas células 293 reduziu a razão dos valores dos picos de fluorescência (593λ/532λ) em aproximadamente 15% (n=3) comparativamente com o de células transfectadas com controlo de vector, apresentando um declínio de potencial de membrana mitocondrial (figura 5A). Nas células transfectadas com UCP4, a intensidade de fluorescência indicativa de redução de potencial de membrana diminuiu em 19% (n=6) comparativamente com o de células transfectadas com controlo de vector (figuras 5A e 5B). O marcador Flag do terminal NH₂ não teve qualquer efeito na actividade de UCP3 ou UCP4.

Uma análise de FACS também mostrou um declínio semelhante do potencial de membrana mitocondrial. Na análise de FACS, as razões das intensidade integradas vermelho/verde diminuíram em 18% nas células transfectadas com UCP3 e 24% nas células transfectadas com UCP4. As células tratadas com o desacoplador

químico, CCCP, também apresentaram uma redução da razão de intensidades vermelho/verde (figuras 5A e 5B).

Estes dados sugerem que, tal como UCP3, a UCP4 apresenta actividade de desacoplamento.

EXEMPLO 9

Preparação de anticorpos que ligam UCP4

Este exemplo ilustra a preparação de anticorpos monoclonais que podem ligar especificamente UCP4.

As técnicas para a produção de anticorpos monoclonais são conhecidas na especialidade e descrevem-se, por exemplo, em Goding, *supra*. Os imunogénios que podem ser utilizados incluem UCP4 purificada, proteínas de fusão contendo UCP4 e células que expressam UCP4 recombinante à superfície celular. A selecção de imunogénios pode ser efectuada pelo perito na especialidade sem experimentação desnecessária.

Imunizam-se ratinhos, tal como Balb/c, com o imunogénio UCP4 emulsionado em adjuvante completo de Freund e injectam-se subcutânea ou intraperitonealmente numa quantidade desde 1-100 microgramas. Alternativamente, emulsiona-se o imunogénio em adjuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, Montana) e injecta-se nas patas traseiras do animal. Os ratinhos imunizados são então reforçados 10 a 12 dias depois com imunogénio adicional emulsionado no adjuvante seleccionado. Seguidamente, durante várias semanas, os ratinhos podem também ser reforçados com injecções adicionais de imunização. Podem obter-se periodicamente amostras de soro dos ratinhos por sangramento retro-orbital para ensaiar em ensaios de ELISA para detectar anticorpos anti-UCP4.

Após detecção de um título adequado de anticorpo, os animais "positivos" para anticorpos podem ser injectado com uma injecção intravenosa final de UCP4. Três a quatro dias depois sacrificam-se os ratinhos e recolhem-se as células de baço. Fundem-se então as células de baço (utilizando polietilenoglicol a 35%) com uma linha celular de mieloma murino seleccionada tal como P3X63AgU.1, disponível de ATCC,

CRL 1597. As fusões geram células de hibridoma que podem então ser plaqueadas em placas de culturas de tecidos de 96 poços contendo meio HAT (hipoxantina, aminopterina e timidina) para inibir proliferação de células não fundidas, híbridos de mieloma e híbridos de células de baço.

Rastreiam-se então as células de hibridoma numa ELISA para reactividade contra UCP4. A determinação de células de hibridoma "positivas" que excretam os anticorpos monoclonais contra UCP4 pretendidos encontra-se abrangida pela perícia na especialidade.

As células de hibridoma positivas podem ser injectadas intraperitonealmente nos ratinhos Balb/c singénicos para produzir ascites contendo os anticorpos monoclonais anti-UCP4. Alternativamente, as células de hibridoma podem ser cultivadas em frascos de cultura de tecidos ou frascos de rotação. A purificação dos anticorpos monoclonais produzidos nas ascites pode ser efectuada utilizando precipitação com sulfato de amónio seguido de cromatografia de exclusão em gel. Alternativamente, pode utilizar-se cromatografia de afinidade baseada na ligação de anticorpo a proteína A ou proteína G.

EXEMPLO 10

Localização subcelular

Para analisar a localização subcelular de UCP4, transfecaram-se células de carcinoma de mama humano MCF7 (ATCC HTB 22) quer com pcDNA3Flag-UCP3 (preparado de acordo com o exemplo 8) quer com pcDNA3Flag-UCP4 (preparado de acordo com o exemplo 1) utilizando reagente de transfecção FuGene (Boehringer Mannheim). Fixaram-se as células transfecadas em formaldeído a 3% à temperatura ambiente durante 15 minutos e permeabilizaram-se com TritonX-100 a 1% durante 15 minutos. Incubaram-se as células com anticorpo monoclonal anti-Flag (10 μ g/ml; Kodak) e anticorpo anti-citocromo C-oxidase (um marcador mitocondrial) (3ng/ml) durante 20 minutos. Lavaram-se então as células e incubaram-se com anticorpos secundários conjugados com Cy3 (de burro anti-ratinho; Jackson Laboratories) e conjugados com FITC (de burro anti-coelho,

Jackson Laboratories). Analisaram-se então as células por microscopia de fluorescência.

As figuras 6A-6F mostram que UCP3 e UCP4 foram co-localizados com o marcador mitocondrial.

EXEMPLO 11

Expressão do ARNm de UCP4 em ratinhos submetidos a stress de alimento e temperatura

A fim de avaliar se UCP4 tem actividade de desacoplamento *in situ* que é importante para o metabolismo, determinou-se a quantidade de ARNm de UCP4 produzida em tecidos de ratinhos que foram submetidos a *stress* de alimento e temperatura, ou seja, alterações metabólicas. Dependendo do papel que UCP4 pode desempenhar no metabolismo, a quantidade de ARNm de UCP4 produzida no tecido pode variar com *stress* sobre o metabolismo tal como jejum, consumo de gordura e exposição a temperaturas abaixo da temperatura ambiente.

Alimentaram-se os ratinhos deste estudo com mistura normal para roedores (Purina Rodent Chow 5010; Purina, St. Louis, Missouri) e água sem restrições salvo indicação em contrário. O tipo de rato estudo variou dependendo da condição utilizada para provocar o metabolismo do rato estudo e descrever-se-á adiante.

De um modo geral, expuseram-se os ratinhos estudados à luz durante 12 horas por dia das 6:00 h até às 18:00 h, altura em que eram expostos à escuridão durante as 12 horas seguintes.

Sacrificaram-se os ratinhos sob CO₂ imediatamente antes da recolha de tecidos que ocorreu de manhã entre as 8:00 h e as 12:00 h salvo indicação em contrário. Recolheram-se os tecidos e preparou-se ARN total de tecido utilizando reagentes e protocolos de Biotecx Lab, Houston, Texas. Apesar de terem sido recolhidos vários tecidos de cada rato, o estudo concentrou-se na medição da abundância de ARNm de UCP4 no cérebro (porque o cérebro tem expressão génica de UCP4

elevada). Utilizaram-se nos estudos pelo menos 5 ratinhos/tratamento.

Utilizou-se a reacção em cadeia com polimerase, com transcriptase inversa (RT-PCR), quantitativa, para determinar a quantidade de ARNm de UCP4 nos tecidos recolhidos. Efectuou-se a RT-PCR utilizando amostras de ARNm [Heid *et al.*, Genome Research, 6:986-994 (1996); Gibson *et al.*, Genome Research, 6:995-1001 (1996)]. De um modo geral, para efectuar a RT-PCR quantitativa utilizaram-se iniciadores e sondas específicos de UCP4 (TaqMan Instrument, PE Biosciences, Foster City, California). Corrigiram-se os valores para carga de ARNm utilizando a abundância de ARNm de β -actina como controlo de carga. Utilizaram-se os iniciadores e sondas seguintes:

Para UCP4:

iniciador directo: 5'AAT GCC TAT CGC CGA GGA G3' (SEQ ID NO:10);

iniciador inverso: 5'GTA GGA ACT TGC TCG TCC GG3' (SEQ ID NO:11);

sonda: 5' (FAM) TGC TCG CGC TCA CGC AGA GAT G (SEQ ID NO:12) (TAMARA) 3'.

Para beta-actina:

iniciador directo: 5' GAA ATC GTG CGT GAC ATC AAA GAG3' (SEQ ID NO:13);

iniciador inverso: 5'CTC CTT CTG CAT CCT GTC AGC AA3' (SEQ ID NO:14);

sonda: 5' (FAM) CGG TTC CGA TGC CCT GAG GCT C (SEQ ID NO:15) (TAMARA) 3'.

Efeito do consumo de alimentos sobre a expressão de ARNm de UCP4

Num primeiro estudo, estudaram-se ratinhos macho de sete semanas de idade (C57BL/6J; Bar Harbor, Maine) para avaliar o efeito do jejum e da ingestão de refeições sobre a produção de ARNm de UCP4 nos ratinhos estudados. Obtiveram-se os ratinhos às seis semanas de idade e às sete semanas atribuíram-se aleatoriamente a um de três grupos: ratinhos de controlo

alimentados sem restrições, ratinhos mantidos em jejum durante 24 horas e ratinhos mantidos em jejum durante 24 horas e seguidamente alimentados sem restrições durante 24 horas.

Sacrificaram-se os ratinhos tal como descrito acima após alimentação sem restrições para o primeiro grupo, após 24 horas de jejum para o segundo grupo e após 48 horas de primeiramente jejum e seguidamente alimentação sem restrições para o terceiro grupo. Recolheram-se os tecidos tal como descrito acima.

Efectuou-se RT-PCR quantitativo para o tecido de cérebro de acordo com os métodos descritos acima e quantificou-se a quantidade de ARNm de UCP4 produzida no cérebro. Determinaram-se diferenças estatísticas ao longo dos grupos utilizando análise de diferença menos significativa protegida de Fisher (L. Ott, *An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis*, 3^a Ed., Boston: PWS-Kent Publishing Co., 1988). Os dados apresentados nas figuras 8A a 8C representam médias +/- EPM.

A figura 8A ilustra a abundância de ARNm de UCP4 no tecido de cérebro de ratinhos que foram alimentados sem restrições durante 24 horas. A figura 8B ilustra a abundância de ARNm de UCP4 em tecido de cérebro de ratinhos que foram mantidos em jejum. A figura 8C ilustra a abundância de ARNm de UCP4 em tecido de cérebro de ratinhos que foram mantidos em jejum durante 24 horas e seguidamente alimentados sem restrições durante 24 horas.

Tipicamente, o jejum e a restrição do consumo de alimento diminuíram a taxa metabólica sugerindo que a expressão de ARNm de UCP4 diminuiria para ratinhos que estavam em jejum comparativamente com ratinhos que foram alimentados sem restrições. Contudo a figura 8B não apresenta uma diminuição da expressão de ARNm de UCP4 em tecido de cérebro para os ratinhos que foram mantidos em jejum comparativamente com os ratinhos que foram alimentados sem restrições tal como apresentado na figura 8A.

Efeito do consumo de gordura sobre a expressão do ARNm de UCP4

Num segundo estudo, estudaram-se ratinhos macho de quatro semanas de idade (A/J ou C57BL/6J; Jackson Labs, Bar Harbor, Maine) para avaliar o efeito de dietas ricas e pobres em gordura sobre a produção de ARNm de UCP4 nos ratinhos estudados. Demonstrou-se anteriormente que ratinhos A/J eram "resistentes à obesidade" quando submetidos a uma dieta rica em gorduras comparativamente com os ratinhos C57BL6/J "propensos à obesidade" (consultar Surwit *et al.*, *supra*). Tal pode dever-se a uma menor eficácia metabólica da estirpe A/J, ou seja, aparentemente os ratinhos absorvem menos calorias do que as calorias ingeridas.

Obtiveram-se os ratinhos às quatro semanas de idade e colocaram-se imediatamente quer com uma dieta pobre em gordura quer com uma dieta rica em gordura (Research Diets, Inc., New Brunswick, New Jersey) estabelecida de acordo com as formulações de Surwit *et al.*, *Metabolism*, 44(5): 645-651 (1995), contendo 11% ou 58% de gordura (% de calorias), respectivamente. Alimentaram-se os animais sem restrições durante aproximadamente três semanas (dias 22-23 da dieta). Seguidamente os animais foram sacrificados e recolheram-se os seus tecidos como descrito acima. Efectuou-se RT-PCR quantitativo para o tecido de cérebro de acordo com os métodos descritos acima e quantificou-se a quantidade de ARNm de UCP4 produzido no tecido de cérebro. Determinaram-se diferenças estatísticas ao longo dos grupos utilizando análise de diferença menos significativa protegida de Fisher (L. Ott, *An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis*, 3^a Ed., Boston: PWS-Kent Publishing Co., 1988). Os dados apresentados nas figuras 9A a 9D representam médias +/- EPM.

A figura 9A ilustra a abundância de ARNm de UCP4 em tecido de cérebro de ratinhos A/J alimentados com uma dieta pobre em gordura e a figura 9B ilustra a abundância de ARNm de UCP4 em tecido de cérebro de ratinhos A/J alimentados com uma dieta rica em gordura. A figura 9C ilustra a abundância de ARNm de UCP4 em tecido de cérebro de ratinhos C57BL6/J alimentados com uma dieta pobre em gordura e a figura 9D ilustra a abundância de ARNm de UCP4 em tecido de cérebro de ratinhos C57BL6/J alimentados com uma dieta rica em gordura.

Efeito do stress de temperatura sobre UCP4

Num terceiro estudo, estudaram-se ratinhos macho (FVB-N; Taconic, Germantown, New York) para avaliar o efeito da exposição dos ratinhos a *stress* de temperatura. Tipicamente, a exposição ao frio de roedores desencadeia um aumento da taxa metabólica. Este aumento metabólico pode ser desencadeado para manter uma temperatura corporal estável. No entanto, a aclimatação ao calor definida como a exposição crónica a temperaturas compreendidas na zona termo-neutra murina (aprox. 30-35°C) leva ao abaixamento da taxa metabólica [Klaus et al., Am. J. Physiol., 274:R287-R293 (1998)].

Os ratinhos deste estudo foram mantidos em gaiolas em conjuntos de dois e foram atribuídos aleatoriamente aos seguintes grupos: um grupo de controlo (mantido a 22°C durante 3 semanas), um grupo aclimatado ao calor (mantido a 33°C durante 3 semanas), um grupo com restrição de alimentos (mantido a 22°C durante 3 semanas mas ao qual foi dado acesso diariamente à quantidade média de alimento ingerido pelo grupo de ratinhos aclimatados ao calor no dia anterior), um grupo provocado com frio (mantido a 22°C durante 3 semanas antes do início da exposição a 4°C). Para os ratinhos provocados com frio, este eram inicialmente exposto, de manhã, a 4°C ao serem colocados numa sala a 4°C durante 1, 6, 24 ou 48 horas antes do sacrifício dos ratinhos e recolha de tecido.

Sacrificaram-se os ratinhos e recolheram-se os tecidos às seis semanas de idade como descrito acima. Efectuou-se RT-PCR quantitativo para o tecido de cérebro de acordo com os métodos descritos acima e quantificou-se a quantidade de ARNm de UCP4 produzida no cérebro. Determinaram-se diferenças estatísticas ao longo dos grupos utilizando análise de diferença menos significativa protegida de Fisher (L. Ott, An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis, 3^a Ed., Boston: PWS-Kent Publishing Co., 1988). Os dados apresentados nas figuras 10A a 10G representam +/- EPM. Um asterisco indica uma diferença estatística de pelo menos $p < 0,05$.

A figura 10A ilustra a abundância de ARNm de UCP4 no grupo de ratinhos de controlo. As figuras 10B a 10E ilustram a abundância de ARNm de UCP4 no grupo de ratinhos que foram

provocados com frio durante 1, 6, 24 e 48 horas, respectivamente. A figura 10F ilustra a abundância de ARNm de UCP4 no grupo de ratinhos com alimentação restrita e a figura 10G ilustra a abundância de ARNm de UCP4 no grupo de ratinhos aclimatado a calor.

As figuras de 10B a 10E indicam todas um aumento de expressão de ARNm de UCP4 nos ratinhos provocados com frio comparativamente com o grupo de controlo apresentado na figura 10A. As figuras 10F e 10G não apresentam um aumento semelhante de expressão de ARNm de UCP4 para ratinhos com alimentação restrita e ratinhos aclimatados ao calor, respectivamente, comparativamente com o grupo de controlo apresentado na figura 10A.

Depósito de material

Os seguintes materiais foram depositados em American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209, EUA (ATCC):

Material	N.º de depósito ATCC	Data do depósito
DNA77568-1626	203134	18 de Agosto de 1998

Este depósito foi efectuado ao abrigo do Tratado de Budapeste sobre o Reconhecimento Internacional do Depósito de Microorganismos para Efeitos do Procedimento em Matéria de Patente e seus Regulamentos (Tratado de Budapeste). Tal assegura manutenção de uma cultura viável do depósito durante 30 anos desde a data do depósito. O depósito será disponibilizado pela ATCC ao abrigo do Tratado de Budapeste e dependendo de acordo entre Genentech, Inc. e ATCC que assegura disponibilidade permanente e sem restrições da descendência da cultura do depósito ao público após emissão da patente U.S. pertinente ou após disponibilização ao público de qualquer pedido de patente U.S. ou estrangeira, a que avançar primeiro e assegura disponibilidade da descendência ao sujeito considerado competente pelo U.S. Commissioner of Patents and Trademarks de acordo com 35 USC'122 e com os regulamentos pertinentes do Commissioner (incluindo 37 CFR'1.14 com referência em particular a 886 OG 638).

O cessionário do presente pedido concordou que se uma cultura dos materiais em depósito morrer ou se perder ou for destruída quando cultivada sob condições adequadas, os materiais serão rapidamente substituídos por outra igual após notificação. A disponibilidade do material depositado não deve ser entendida como uma autorização para levar o invento à prática em contravenção dos direitos garantidos sob a autoridade de qualquer governo de acordo com as suas leis de patentes.

Listagem de Sequências

<110> Genentech, Inc.

<120> UCP4

<130> P1626R1PCT

<150> US 60/101,279

<151> 1998-09-22

<150> US 60/114,223

<151> 1998-12-30

<150> US 60/129,674

<151> 1999-04-16

<160> 18

<210> 1

<211> 323

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met	Ser	Val	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Arg	Leu	Leu	Pro	Leu	Thr	Gln
1				5				10					15	
Arg	Trp	Pro	Arg	Ala	Ser	Lys	Phe	Leu	Leu	Ser	Gly	Cys	Ala	Ala
				20				25					30	
Thr	Val	Ala	Glu	Leu	Ala	Thr	Phe	Pro	Leu	Asp	Leu	Thr	Lys	Thr
				35				40					45	
Arg	Leu	Gln	Met	Gln	Gly	Glu	Ala	Ala	Leu	Ala	Arg	Leu	Gly	Asp
				50				55					60	
Gly	Ala	Arg	Glu	Ser	Ala	Pro	Tyr	Arg	Gly	Met	Val	Arg	Thr	Ala
				65				70					75	
Leu	Gly	Ile	Ile	Glu	Glu	Glu	Gly	Phe	Leu	Lys	Leu	Trp	Gln	Gly
				80				85					90	
Val	Thr	Pro	Ala	Ile	Tyr	Arg	His	Val	Val	Tyr	Ser	Gly	Gly	Arg
				95				100					105	
Met	Val	Thr	Tyr	Glu	His	Leu	Arg	Glu	Val	Val	Phe	Gly	Lys	Ser
				110				115					120	
Glu	Asp	Glu	His	Tyr	Pro	Leu	Trp	Lys	Ser	Val	Ile	Gly	Gly	Met
				125				130					135	
Met	Ala	Gly	Val	Ile	Gly	Gln	Phe	Leu	Ala	Asn	Pro	Thr	Asp	Leu
				140				145					150	
Val	Lys	Val	Gln	Met	Gln	Met	Glu	Gly	Lys	Arg	Lys	Leu	Glu	Gly
				155				160					165	
Lys	Pro	Leu	Arg	Phe	Arg	Gly	Val	His	His	Ala	Phe	Ala	Lys	Ile
				170				175					180	
Leu	Ala	Glu	Gly	Ile	Arg	Gly	Leu	Trp	Ala	Gly	Trp	Val	Pro	
				185				190					195	
Asn	Ile	Gln	Arg	Ala	Ala	Leu	Val	Asn	Met	Gly	Asp	Leu	Thr	Thr
				200				205					210	
Tyr	Asp	Thr	Val	Lys	His	Tyr	Leu	Val	Leu	Asn	Thr	Pro	Leu	Glu
				215				220					225	
Asp	Asn	Ile	Met	Thr	His	Gly	Leu	Ser	Ser	Leu	Cys	Ser	Gly	Leu
				230				235					240	
Val	Ala	Ser	Ile	Leu	Gly	Thr	Pro	Ala	Asp	Val	Ile	Lys	Ser	Arg
				245				250					255	
Ile	Met	Asn	Gln	Pro	Arg	Asp	Lys	Gln	Gly	Arg	Gly	Leu	Leu	Tyr
				260				265					270	
Lys	Ser	Ser	Thr	Asp	Cys	Leu	Ile	Gln	Ala	Val	Gln	Gly	Gly	
				275				280					285	
Phe	Met	Ser	Leu	Tyr	Lys	Gly	Phe	Leu	Pro	Ser	Trp	Leu	Arg	Met
				290				295					300	
Thr	Pro	Trp	Ser	Met	Val	Phe	Trp	Leu	Thr	Tyr	Glu	Lys	Ile	Arg
				305				310					315	
Glu	Met	Ser	Gly	Val	Ser	Pro	Phe							
				320				323						

<210> 2
<211> 1039
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 2
ccgagctcg atccccttat cgtcttgcgc tactgctgaa tgcgggtccc 50
ggaggaggag gagaggcttt tgccgctgac ccagagatgg ccccgagcga 100
gcaaattcct actgtccggc tgcgcggcta ccgtggccga gctagcaacc 150
tttccccctgg atctcacaaa aactcgactc caaatgcaag gagaaggcgc 200
tcttgctcg ttgggagacg gtgcaagaga atctgcccc tataggggaa 250
tggtgcgcac agccctaggg atcattgaag aggaaggctt tctaaagctt 300
tggcaaggag tgacacccgc catttacaga cacgtgtt attctggagg 350
tcgaatggtc acatatgaac atctccgaga gttgtgttt ggcaaaagtg 400
aagatgagca ttatccccctt tggaaatcag tcattggagg gatgatggct 450
ggtgttattt gccagttttt agccaatcca actgacccatg tgaaggttca 500
gatgcaaatg gaaggaaaaaa ggaaactgga aggaaaacca ttgcgatttc 550
gtggtgtaca tcatgcattt gcaaaaatct tagctgaagg aggaatacga 600
gggctttggg caggctgggt acccaatata caaagagcag cactggtaa 650
tatggagat ttaaccactt atgatacgt gaaacactac ttggtattga 700
atacaccact tgaggacaat atcatgactc acggtttattc aagtttatgt 750
tctggactgg tagttctat tctgggaaca ccagccgatg tcatcaaaag 800
cagaataatg aatcaaccac gagataaaca aggaaggaaa cttttgtata 850
aatcatcgac tgactgcttg attcaggctg ttcaaggtga aggattcatg 900
agtctatata aaggctttt accatctgg ctgagaatga ccccttggtc 950
aatggtgttc tggcttactt atgaaaaat cagagagatg agtggagtca 1000
gtccatTTTA agaattctgc agatatccat cacactggc 1039

<210> 3
<211> 31
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência Artificial 1-31

<400> 3
cgcgatccc gttatcgatc tgcgatctg c 31

<210> 4
<211> 34
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência Artificial 1-34

<400> 4
gcggaattct taaaatggac tgactccact catc 34

<210> 5
<211> 1248
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência Artificial 1-1248

<220>
<221> desconhecida
<222> 1231
<223> base desconhecida

<400> 5
cgttatcgtc ttgcgtact gctgaatgtc cgtccggag gaggaggaga 50
ggctttgcc gctgaccagg agatggcccc gagcgagcaa attcctactg 100
tccggctgct cggctaccgt ggccgagcta gcaaccccttc ccctggatct 150
cacaaaaact cgactccaaa tgcaaggaga agcagcttt gctcggttgg 200
gagacgggtgc aagagaatct gccccctata ggggaatggg ggcacagcc 250
ctagggatca ttgaagagga aggctttcta aagcttggc aaggagtgac 300
acccggcatt tacagacacg tagtttatttc tggaggtcga atggtcacat 350

```

atgaacatct ccgagaggtt gtgtttggca aaagtgaaga tgagcattat 400
cccctttggaa aatcagtcat tggagggatg atggctggtg ttattggcca 450
gttttagcc aatccaaactg acctagtgaa ggttcagatg caaatggaag 500
gaaaaaggaa actggaagga aaaccattgc gatttcgtgg tgtacatcat 550
gcatttgcaa aaatcttagc tgaaggagga atacgaaggc tttgggcagg 600
ctgggtaccc aatatacaaa gagcagcact ggtgaatatg ggagatcaa 650
ccacttatga tacagtgaaa cactacttgg tattgaatac accacttgag 700
gacaatatca tgactcacgg tttatcaagt ttatgttctg gactggtagc 750
ttctattctg ggaacaccag ccgatgtcat caaaagcaga ataatgaatc 800
aaccacgaga taaacaagga aggggacttt tgtataaatac atcgactgac 850
tgcttgattc aggctgttca aggtgaagga ttcatgagtc tatataaagg 900
cttttacca tcttggctga gaatgacccc ttggtcaatg gtgttctggc 950
ttacttatga aaaaatcaga gagatgagtg gagtcaatgc attttaaacc 1000
cctaaagatg caacccttaa agatacagtg ttcaatgttta ttgaaatatg 1050
ggcatctgca acacataccccc cctattatcc ctacccctttt aggaagacac 1100
ctattccaca gagactgatt tataggggc agcactttat tttttctgg 1150
aaacccaagt tctctttgac tcctctttt gtccaaaagt gatctggtcg 1200
gatctcacaa gccatccaa tgagaccccg nacagcattt tctaaaga 1248

```

<210> 6
<211> 58
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência Artificial 1-58

<400> 6
cgcgatccg aaatggacta caaggacgac gatgacaagt ccgtcccgga 50
ggaggagg 58

<210> 7
<211> 35
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência Artificial 1-35

<400> 7
gcgaagcttg ccatggttgg actgaagcct tcaga 35

<210> 8
<211> 33
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência Artificial 1-33

<400> 8
cgcgaattct caaaaacggtg attcccgtaa cat 33

<210> 9
<211> 61
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência Artificial 1-61

<400> 9
gcgaagcttg ccatggacta caaggacgac gatgacaagg ttggactgaa 50
gccttcagac g 61

<210> 10
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência Artificial 1-19

<400> 10
aatgcctatc gccgaggag 19

<210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência Artificial 1-20

<400> 11
gttaggaacct gctcgtccgg 20

<210> 12
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> Sequência Artificial 1-22

<400> 12

tgctcgcgct cacgcagaga tg 22

<210> 13

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência Artificial 1-24

<400> 13

gaaatcgtgc gtgacatcaa agag 24

<210> 14

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência Artificial 1-23

<400> 14

ctccttctgc atcctgtcag caa 23

<210> 15

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência Artificial 1-22

<400> 15

cggttccgat gccctgaggc tc 22

<210> 16

<211> 307

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met	Gly	Gly	Leu	Thr	Ala	Ser	Asp	Val	His	Pro	Thr	Leu	Gly	Val
1														15
20														
Gln	Leu	Phe	Ser	Ala	Pro	Ile	Ala	Ala	Cys	Leu	Ala	Asp	Val	Ile
														30
Thr	Phe	Pro	Leu	Asp	Thr	Ala	Lys	Val	Arg	Leu	Gln	Val	Gln	Gly
														45
Glu	Cys	Pro	Thr	Ser	Ser	Val	Ile	Arg	Tyr	Lys	Gly	Val	Leu	Gly
														60
50														
Thr	Ile	Thr	Ala	Val	Val	Lys	Thr	Glu	Gly	Arg	Met	Lys	Leu	Tyr
														75
65														
Ser	Gly	Leu	Pro	Ala	Gly	Leu	Gln	Arg	Gln	Ile	Ser	Ser	Ala	Ser
														90
80														
Leu	Arg	Ile	Gly	Leu	Tyr	Asp	Thr	Val	Gln	Glu	Phe	Leu	Thr	Ala
														105
95														
Gly	Lys	Glu	Thr	Ala	Pro	Ser	Leu	Gly	Ser	Lys	Ile	Leu	Ala	Gly
														120
110														
Leu	Thr	Thr	Gly	Gly	Val	Ala	Val	Phe	Ile	Gly	Gln	Pro	Thr	Glu
														135
125														
Val	Val	Lys	Val	Arg	Leu	Gln	Ala	Gln	Ser	His	Leu	His	Gly	Ile
														150
140														
Lys	Pro	Arg	Tyr	Thr	Gly	Thr	Tyr	Asn	Ala	Tyr	Arg	Ile	Ile	Ala
														165
155														
Thr	Thr	Glu	Gly	Leu	Thr	Gly	Leu	Trp	Lys	Gly	Thr	Thr	Pro	Asn
														180
170														
Leu	Met	Arg	Ser	Val	Ile	Ile	Asn	Cys	Thr	Glu	Leu	Val	Thr	Tyr
														195
185														
Asp	Leu	Met	Lys	Glu	Ala	Phe	Val	Lys	Asn	Asn	Ile	Leu	Ala	Asp
														210
200														
Asp	Val	Pro	Cys	His	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Ile	Ala	Gly	Phe	Cys
														225
215														
Ala	Thr	Ala	Met	Ser	Ser	Pro	Val	Asp	Val	Val	Lys	Thr	Arg	Phe
														240
230														
Ile	Asn	Ser	Pro	Pro	Gly	Gln	Tyr	Lys	Ser	Val	Pro	Asn	Cys	Ala
														255
245														
Met	Lys	Val	Phe	Thr	Asn	Glu	Gly	Pro	Thr	Ala	Phe	Phe	Lys	Gly
														270
260														
Leu	Val	Pro	Ser	Phe	Leu	Arg	Leu	Gly	Ser	Trp	Asn	Val	Ile	Met
														285
275														
Phe	Val	Cys	Phe	Glu	Gln	Leu	Lys	Arg	Glu	Leu	Ser	Lys	Ser	Arg
														300
290														
Gln	Thr	Met	Asp	Cys	Ala	Thr								
305														
307														

<210> 17

<211> 309

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Val Gly Phe Lys Ala Thr Asp Val Pro Pro Thr Ala Thr Val																																																																																																																												
1	5		10	15	Lys Phe Leu Gly Ala Gly Thr Ala Ala Cys Ile Ala Asp Leu Ile			20	25	30	Thr Phe Pro Leu Asp Thr Ala Lys Val Arg Leu Gln Ile Gln Gly			35	40	45	Glu Ser Gln Gly Pro Val Arg Ala Thr Val Ser Ala Gln Tyr Arg			50	55	60	Gly Val Met Gly Thr Ile Leu Thr Met Val Arg Thr Glu Gly Pro			65	70	75	Arg Ser Leu Tyr Asn Gly Leu Val Ala Gly Leu Gln Arg Gln Met			80	85	90	Ser Phe Ala Ser Val Arg Ile Gly Leu Tyr Asp Ser Val Lys Gln			95	100	105	Phe Tyr Thr Lys Gly Ser Glu His Ala Ser Ile Gly Ser Arg Leu			110	115	120	Leu Ala Gly Ser Thr Thr Gly Ala Leu Ala Val Ala Val Ala Gln			125	130	135	Pro Thr Asp Val Val Lys Val Arg Phe Gln Ala Gln Ala Arg Ala			140	145	150	Gly Gly Gly Arg Arg Tyr Gln Ser Thr Val Asn Ala Tyr Lys Thr			155	160	165	Ile Ala Arg Glu Glu Gly Phe Arg Gly Leu Trp Lys Gly Thr Ser			170	175	180	Pro Asn Val Ala Arg Asn Ala Ile Val Asn Cys Ala Glu Leu Val			185	190	195	Thr Tyr Asp Leu Ile Lys Asp Ala Leu Leu Lys Ala Asn Leu Met			200	205	210	Thr Asp Asp Leu Pro Cys His Phe Thr Ser Ala Phe Gly Ala Gly			215	220	225	Phe Cys Thr Thr Val Ile Ala Ser Pro Val Asp Val Val Lys Thr			230	235	240	Arg Tyr Met Asn Ser Ala Leu Gly Gln Tyr Ser Ser Ala Gly His			245	250	255	Cys Ala Leu Thr Met Leu Gln Lys Glu Gly Pro Arg Ala Phe Tyr			260	265	270	Lys Gly Phe Met Pro Ser Phe Leu Arg Leu Gly Ser Trp Asn Val			275	280	285	Val Met Phe Val Thr Tyr Glu Gln Leu Lys Arg Ala Leu Met Ala			290	295	300	Ala Cys Thr Ser Arg Glu Ala Pro Phe			305	309	
	10	15																																																																																																																										
Lys Phe Leu Gly Ala Gly Thr Ala Ala Cys Ile Ala Asp Leu Ile																																																																																																																												
	20	25	30																																																																																																																									
Thr Phe Pro Leu Asp Thr Ala Lys Val Arg Leu Gln Ile Gln Gly																																																																																																																												
	35	40	45																																																																																																																									
Glu Ser Gln Gly Pro Val Arg Ala Thr Val Ser Ala Gln Tyr Arg																																																																																																																												
	50	55	60																																																																																																																									
Gly Val Met Gly Thr Ile Leu Thr Met Val Arg Thr Glu Gly Pro																																																																																																																												
	65	70	75																																																																																																																									
Arg Ser Leu Tyr Asn Gly Leu Val Ala Gly Leu Gln Arg Gln Met																																																																																																																												
	80	85	90																																																																																																																									
Ser Phe Ala Ser Val Arg Ile Gly Leu Tyr Asp Ser Val Lys Gln																																																																																																																												
	95	100	105																																																																																																																									
Phe Tyr Thr Lys Gly Ser Glu His Ala Ser Ile Gly Ser Arg Leu																																																																																																																												
	110	115	120																																																																																																																									
Leu Ala Gly Ser Thr Thr Gly Ala Leu Ala Val Ala Val Ala Gln																																																																																																																												
	125	130	135																																																																																																																									
Pro Thr Asp Val Val Lys Val Arg Phe Gln Ala Gln Ala Arg Ala																																																																																																																												
	140	145	150																																																																																																																									
Gly Gly Gly Arg Arg Tyr Gln Ser Thr Val Asn Ala Tyr Lys Thr																																																																																																																												
	155	160	165																																																																																																																									
Ile Ala Arg Glu Glu Gly Phe Arg Gly Leu Trp Lys Gly Thr Ser																																																																																																																												
	170	175	180																																																																																																																									
Pro Asn Val Ala Arg Asn Ala Ile Val Asn Cys Ala Glu Leu Val																																																																																																																												
	185	190	195																																																																																																																									
Thr Tyr Asp Leu Ile Lys Asp Ala Leu Leu Lys Ala Asn Leu Met																																																																																																																												
	200	205	210																																																																																																																									
Thr Asp Asp Leu Pro Cys His Phe Thr Ser Ala Phe Gly Ala Gly																																																																																																																												
	215	220	225																																																																																																																									
Phe Cys Thr Thr Val Ile Ala Ser Pro Val Asp Val Val Lys Thr																																																																																																																												
	230	235	240																																																																																																																									
Arg Tyr Met Asn Ser Ala Leu Gly Gln Tyr Ser Ser Ala Gly His																																																																																																																												
	245	250	255																																																																																																																									
Cys Ala Leu Thr Met Leu Gln Lys Glu Gly Pro Arg Ala Phe Tyr																																																																																																																												
	260	265	270																																																																																																																									
Lys Gly Phe Met Pro Ser Phe Leu Arg Leu Gly Ser Trp Asn Val																																																																																																																												
	275	280	285																																																																																																																									
Val Met Phe Val Thr Tyr Glu Gln Leu Lys Arg Ala Leu Met Ala																																																																																																																												
	290	295	300																																																																																																																									
Ala Cys Thr Ser Arg Glu Ala Pro Phe																																																																																																																												
	305	309																																																																																																																										

<210> 18

<211> 300

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Met Ala Val Lys Phe Leu Gly Ala Gly Thr Ala Ala Cys Phe Ala	1	5	10	15
Asp Leu Val Thr Phe Pro Leu Asp Thr Ala Lys Val Arg Leu Gln	20		25	30
Ile Gln Gly Glu Asn Gln Ala Val Gln Thr Ala Arg Leu Val Gln	35		40	45
Tyr Arg Gly Val Leu Gly Thr Ile Leu Thr Met Val Arg Thr Glu	50		55	60
Gly Pro Cys Ser Pro Tyr Asn Gly Leu Val Ala Gly Leu Gln Arg	65		70	75
Gln Met Ser Phe Ala Ser Ile Arg Ile Gly Leu Tyr Asp Ser Val	80		85	90
Lys Gln Val Tyr Thr Pro Lys Gly Ala Asp Asn Ser Ser Leu Thr	95		100	105
Thr Arg Ile Leu Ala Gly Cys Thr Thr Gly Ala Met Ala Val Thr	110		115	120
Cys Ala Gln Pro Thr Asp Val Val Lys Val Arg Phe Gln Ala Ser	125		130	135
Ile His Leu Gly Pro Ser Arg Ser Asp Arg Lys Tyr Ser Gly Thr	140		145	150
Met Asp Ala Tyr Arg Thr Ile Ala Arg Glu Glu Gly Val Arg Gly	155		160	165
Leu Trp Lys Gly Thr Leu Pro Asn Ile Met Arg Asn Ala Ile Val	170		175	180
Asn Cys Ala Glu Val Val Thr Tyr Asp Ile Leu Lys Glu Lys Leu	185		190	195
Leu Asp Tyr His Leu Leu Thr Asp Asn Phe Pro Cys His Phe Val	200		205	210
Ser Ala Phe Gly Ala Gly Phe Cys Ala Thr Val Val Ala Ser Pro	215		220	225
Val Asp Val Val Lys Thr Arg Tyr Met Asn Ser Pro Pro Gly Gln	230		235	240
Tyr Phe Ser Pro Leu Asp Cys Met Ile Lys Met Val Ala Gln Glu	245		250	255
Gly Pro Thr Ala Phe Tyr Lys Gly Phe Thr Pro Ser Phe Leu Arg	260		265	270
Leu Gly Ser Trp Asn Val Val Met Phe Val Thr Tyr Glu Gln Leu	275		280	285
Lys Arg Ala Leu Met Lys Val Gln Met Leu Arg Glu Ser Pro Phe	290		295	300

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de ácido nucleico isolada incluindo:

- (a) ADN que codifica um polipéptido UCP4 e que possui uma identidade de sequência de pelo menos 80% com uma molécula de ácido nucleico que codifica a sequência de resíduos de aminoácido de 1 a 323 da figura 1 (SEQ ID NO:1);
- (b) o complementar da molécula de ADN de (a);
- (c) ADN que codifica um polipéptido UCP4 com uma identidade de sequência de pelo menos 80% com a sequência de resíduos de aminoácidos de 1 a 323 da figura 1 (SEQ ID NO:1) ; ou
- (d) o complementar do ADN de (c).

2. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com a reivindicação 1 incluindo a sequência de nucleótidos de 40 a 1011 da figura 2 (SEQ ID NO:2).

3. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com a reivindicação 1 incluindo a sequência de nucleótidos da figura 2 (SEQ ID NO:2).

4. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com a reivindicação 1, em que a referida molécula de ácido nucleico inclui ADN que codifica um polipéptido UCP4 e hibrida com o complementar do ácido nucleico incluindo os nucleótidos de 40 a 1011 da figura 2 (SEQ ID NO:2) sob condições incluindo formamida a 50%, SSC 5x (NaCl 0,75 M, citrato de sódio 0,075 M), fosfato de sódio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sódio a 0,1%, solução de Denhardt 5x, ADN de esperma de salmão tratado com ultra-sons (50 g/ml), SDS a 0,1% e sulfato de dextrano a 10%, a 42°C, com lavagens a 42°C com SSC 0,2x (cloreto de sódio/citrato de sódio) e formamida a 50%, a 55°C, seguidas de uma lavagem de condições altamente rigorosas consistindo em SSC 0,1x contendo EDTA a 55°C.

5. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com a reivindicação 1 incluindo ADN apresentando uma identidade de sequência de pelo menos 80% com (a) uma molécula de ADN que codifica o mesmo polipéptido maduro codificado pelo ADNC do

depósito ATCC n.º 203134 (DNA77568-1626) ou (b) o complementar da molécula de ADN de (a).

6. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com a reivindicação 5 incluindo ADN que codifica o mesmo polipéptido maduro codificado pelo ADNc do depósito ATCC n.º 203134 (DNA77568-162G).

7. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com a reivindicação 1 incluindo (a) ADN que codifica um polipéptido incluindo a sequência de resíduos de aminoácido de 1 até 323 da figura 1 (SEQ ID NO:1) ou (b) o complementar do ADN de (a).

8. Vector incluindo o ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1.

9. Vector de acordo com a reivindicação 8 ligado operativamente a sequências de controlo reconhecidas por uma célula hospedeira transformada com o vector.

10. Célula hospedeira incluindo o vector de acordo com a reivindicação 9.

11. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 10, em que a referida célula é uma célula CHO.

12. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 10, em que a referida célula é uma *E. coli*.

13. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 10, em que a referida célula é uma célula de levedura.

14. Processo para produzir um polipéptido UCP4 incluindo a cultura da célula hospedeira de acordo com a reivindicação 10 sob condições adequadas para expressão do referido polipéptido UCP4 e a recuperação do referido polipéptido UCP4 da cultura de células.

15. Processo de acordo com a reivindicação 14, em que o processo inclui (i) hibridação de uma molécula de ADN de teste sob condições incluindo formamida a 50%, SSC 5x (NaCl 0,75 M, citrato de sódio 0,075 M), fosfato de sódio 50 mM (pH 6,8),

pirofosfato de sódio a 0,1%, solução de Denhardt 5x, ADN de esperma de salmão tratado com ultra-sons (50 g/ml), SDS a 0,1% e sulfato de dextrano a 10%, a 42°C, com lavagens a 42°C com SSC 0,2x (cloreto de sódio/citrato de sódio) e formamida a 50% a 55°C, seguidas de uma lavagem com condições altamente rigorosas consistindo em SSC 0,1x contendo EDTA a 55°C com (a) uma molécula de ADN que codifica um polipéptido UCP4 incluindo a sequência de resíduos de aminoácido de 1 a 323 da figura 1 (SEQ ID NO:1) ou (b) o complementar da molécula de ADN de (a) e, se a referida molécula de ADN de teste tiver pelo menos cerca de 80% de identidade de sequência com (a) ou (b), (ii) cultura de uma célula hospedeira incluindo a referida molécula de ADN de teste sob condições adequadas para a expressão do referido polipéptido e (iii) recuperação do referido polipéptido da cultura de células.

16. Polipéptido UCP4 isolado codificado pelo ADN de acordo com a reivindicação 1.

17. Polipéptido UCP4 isolado incluindo um polipéptido apresentando uma identidade de sequência de pelo menos 80% com a sequência de resíduos de aminoácido de 1 a 323 da figura 1 (SEQ ID NO:1).

18. Polipéptido isolado de acordo com a reivindicação 17 incluindo os resíduos de aminoácido de 1 a 323 da figura 1 (SEQ ID NO:1).

19. Polipéptido UCP4 isolado de acordo com a reivindicação 17, em que o polipéptido UCP4 é codificado pela inserção de ADNc do vector depositado como depósito ATCC n.º 203134 (DNA77568-1626).

20. Polipéptido UCP4 isolado de acordo com a reivindicação 17 consistindo essencialmente nos resíduos de aminoácido de 1 a 323 da figura 1 (SEQ ID NO:1).

21. Polipéptido UCP4 isolado de acordo com a reivindicação 17 consistindo nos resíduos de aminoácidos de 1 a 323 da figura 1 (SEQ ID NO:1).

22. Molécula quimérica incluindo um polipéptido UCP4 tal como reivindicado na reivindicação 16 e fundida com uma sequência de aminoácidos heteróloga.

23. Molécula quimérica de acordo com a reivindicação 22, em que a referida sequência de aminoácidos heteróloga é uma sequência marcadora epitópica.

24. Molécula quimérica de acordo com a reivindicação 22, em que a referida sequência de aminoácidos heteróloga é uma região Fc de uma imunoglobulina.

25. Anticorpo que se liga especificamente a um polipéptido UCP4 apresentando uma identidade de sequência de pelo menos 80% com a sequência de resíduos de aminoácido de 1 a 323 da figura 1 (SEQ ID NO:1).

26. Anticorpo de acordo com a reivindicação 25, em que o referido anticorpo é um anticorpo monoclonal.

27. Método para modular a taxa metabólica numa célula de mamífero *in vitro*, incluindo a etapa de regular positiva ou negativamente a actividade do polipéptido UCP4 na célula de mamífero, apresentando o polipéptido UCP4 uma identidade de sequência de pelo menos 80% com a sequência de resíduos de aminoácido de 1 a 323 da figura 1 (SEQ ID NO:1).

28. Método de acordo com a reivindicação 27, em que a referida regulação positiva da actividade do polipéptido UCP4 estimula um aumento da taxa metabólica num mamífero obeso.

29. Método para conduzir um ensaio de rastreio *in vitro* para identificar uma molécula que aumenta ou regula positivamente ou diminui ou regula negativamente a expressão de um polipéptido UCP4, apresentando uma identidade de sequência de pelo menos 80% com a sequência de resíduos de aminoácido de 1 a 323 da figura 1 (SEQ ID NO:1), incluindo as etapas de expor uma célula de mamífero ou amostra de tecido que se pensa conter UCP4 a uma molécula candidata e subsequentemente analisar a expressão de UCP4 na referida amostra.

30. Método de acordo com a reivindicação 29, incluindo adicionalmente a etapa de analisar o potencial de membrana mitocondrial na referida amostra.

31. Método de acordo com a reivindicação 29, em que o referido polipéptido UCP4 inclui os resíduos de aminoácido de 1 a 323 da figura 1 (SEQ ID NO:1).

32. Método de acordo com a reivindicação 29, em que a referida amostra inclui tecido de cérebro humano.

33. Método de acordo com a reivindicação 29, em que a referida molécula candidata é uma molécula pequena incluindo um composto sintético orgânico ou inorgânico.

34. Método de detecção da expressão *in vitro* de polipéptido UCP4 apresentando uma identidade de sequência de pelo menos 80% com a sequência de resíduos de aminoácido de 1 a 323 da figura 1 (SEQ ID NO:1) numa célula de mamífero ou amostra de tecido, incluindo pôr em contacto uma célula de mamífero ou amostra de tecido com uma sonda de ADN e analisar a expressão do transcrito de ARNm de UCP4 na referida amostra.

35. Método de acordo com a reivindicação 34, em que a referida amostra é tecido de cérebro humano.

Lisboa, 2008-02-26

MSVPEEEERILLPLTQRWPRAASKFLLSGCCAATVAELAATFPLDLTKTRLQMQGEAAALARLG
DGARESAPYRGMVRTALGIIIEEGFLKLWQGVTPAIYRHVVYSGGRMVVTYEHLEVVFG
KSEDEHYPLWKSVIGGMMAGVIGQFLANPTDLVKVQMQMEGKRKLEGKPLRFRGVHHAF
AKILAEGGIRGLWAGWVNPNIQRAALVNMGDLTTYDTVKHYLVLNTPLEDNIMTHGLSSL
CSGLVASILGTPADVIKSRMNQPRDKQGRGGLLYKSSTDCLIQAVQGEGHMSLYKGFLP
SWLRMTPWSMVFWLTYEKIREMSGVSPF

FIG. 1

CCGAGCTCGGATC
CCGTTATCGTCTGGCTACTGCTGA
ATGTCCGGTCCGGAGGAGGGCTTTCGGCTTGACCCAGAGATGGCCCGAGCG
AGCAAATTCTACTGTCCGGCTACCGTGGCGTAGCAACCTTCCCTG
GATCTCACAAAACCTCGACTCCAATGCAAGGAGAACGAGCTCTGCTCGGTGGAGAC
GGTGCAGAGAAATCTGCCCTATAGGGGAATGGGCTAGGGATCATGGTAA
GAGGAAGGGCTTCTAAAGCTTGGCAAGGGAGTGACACCCGCCATTACAGACACGTTAGTG
TATTCTGAGGTGAAATGGTCACATAATGAACATCTCGAGAGGGTGTGTTGGCAAAGT
GAAGATGAGCATTATCCCTTGGAAATCAGTCATTGGAGGGATGATGGCTGGTTATT
GCCAGTTAGCCAATCCAACCTGACCTAGTGAAGGTTCAAGTGCAAATGGAGGAAA
AGAAAACCTGGAAGGAAACCAATTGGCAATTGGCTGGGTACATCATGCCATTGGCAAATTC
TTAGCTGAAGGAGGAATACGAGGGCTTGGCAGGCTGGTACCCAAATAACAAGAGCA
GCACTGCTGAATATGGAGATTAAACCACTTATGATAACAGTGAACACTACTGGTATG
AATACACCACTGAGGACAATACTGACTCACGGTTATCAAGTTATGTTCTGGACTG
GTAGCTCTATTCTGGAACCCAGGGATGTCATCAAAAGCAGAATAATGAATCAACCA
CGAGATAAACAGGAAGGGGACTTTTGTATAAATCATCGACTGACTGCTTGAATTCAGGGT
GTTCAAGGTGAAGGATTCAATGAGTGTATAAAGGCTTACCATTCAGGTGAGAATG
ACCCCTGGTCAATGGTGTCTGGCTTACTTATGAAAAAATCAGAGATGAGTGGAGTC
AGTCCATTAAAGAATTCTGCAAGATATCCATCACACTGGC

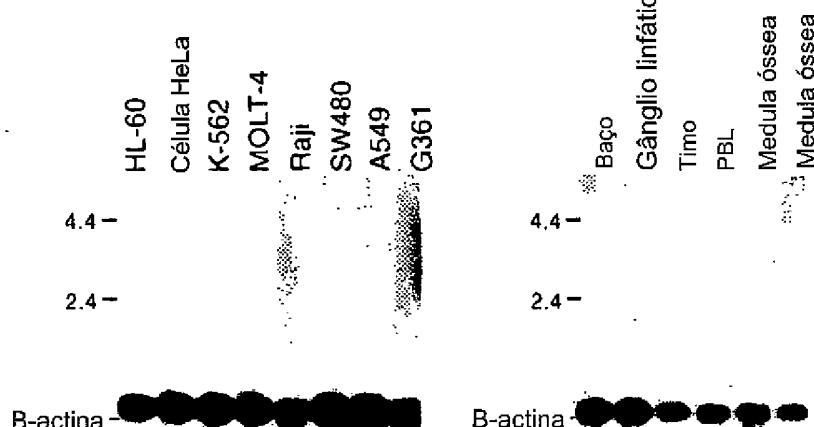
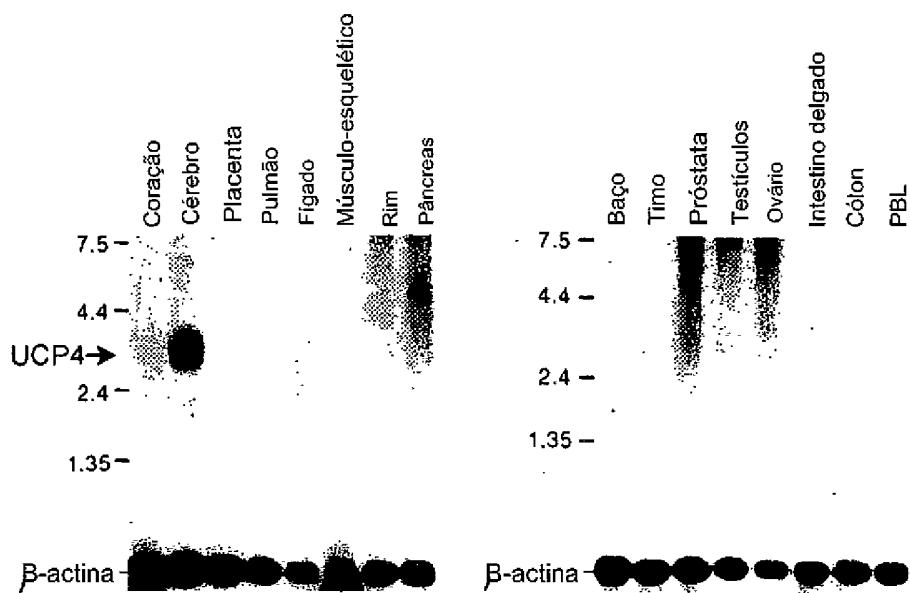
FIG. 2

UCP1	1	- - - - -	M[GGLTASD[VHPTLGVQLF[SAPIAACL	ADVITFPILD[TAKVRLQVQ
UCP2	1	- - - - -	MV[GFKATD[VPP[TATVKFLGAGTAACI	ADLITFPILD[TAKVRLQIQ
UCP3	1	- - - - -	- - - - -	- MAVKFLGAGTAACFADL[VTFPLDTAKVRLQIO
UCP4	1	MSVPEEEER	[LPLTQRWPRASKFLLSGCAATV	AELATFPILD[LTKTRLQM[Q
		I		*****
UCP1	45	GEC[P - - - - -	TSSVIRYKGVLGTTAVVKTEGRM[KLYSG[LPAGLQRQIS	
UCP2	45	GES[QGP[V R - - -	ATVSAQYRGVM[G[TILTMRVTEGPRSLYNGLVA	G[LQRQMS
UCP3	33	GENQ - AVQ - - -	TARLVQYRGVVLGTTILTMVRT[E[GPCSPYNGLVA	GLQRQMS
UCP4	51	GEAALARLGDGARESAPYRGMVRT[ALGIEEE[GFLK	EWQGVTPAIYRH[VV	
				II
UCP1	88	SASLIRIGLYDTVQ[EFLT	AGKET - A[PSLGSKILAGLTTGGVAVF	IGQOPTEV
UCP2	92	FASVIRIGLYDSVKQFYT	[KGS[E - HASIGSRLLAGSRTTGALAVAVAV	QPTDV
UCP3	79	FASIIRIGLYDSVKQOVXT	PKGAD - NSSLTTRILAGCTTGAMAVTCAQPTDV	
UCP4	101	YSGGRMVTYEHLR[E[VVF	GKSEDEHYP[PLWKSVIDGMMAGVIGQFLAN[P	PTDL
				III
UCP1	137	VKVRLLQAOQS[HLHG - -	IKPRYTNAYRILITATEGLTGLWKGTTPNL	MRS
UCP2	140	VKVRFQQAQARAG - - -	TIAREEGF[RGGLWKGTS[SPNVAR	
UCP3	128	VKVRFQQASIH[LGP[SRS	SDRKYS[GTMDAYRTIAREEGV[RGGLWKGTL	PNIMRN
UCP4	151	VKVQOMQMEGKRKLEGKPLR	FRGVHHAFAKILAE[GIRGLWAGWV	PNIQRA

FIG. 3A

UCP1 185	V I I N C T E L V T Y D L M K E A F V K N N I L A D D V P C H L V S A L I A G F C A T A M S S P V D	IV	V	VI
UCP2 187	A I V N C A E L V T Y D L I K D A L L K A N L M T D D L P C H F T S A F G A G F C T V I A S P V D			
UCP3 178	A I V N C A E V V T Y D I L K E K L L D Y H L E T D N F P C H F V S A F G A G F C A T V V A S P V D			
UCP4 201	A L V N M G D E T T Y D T V K H Y L V L N T P L E D N I M T H G L S S L C S G I V A S T I L G T P A D			
UCP1 235	V V K T R F I N S P P G Q	V	V	VII
UCP2 237	V V K T R Y M N S A L G Q			
UCP3 228	V V K T R Y M N S P P G Q			
UCP4 251	V I K S R I M N Q P R D K Q G R G L L Y K S S T D C L I Q A V Q G E G F M S L Y K G F L P S W L R M			
UCP1 279	G S W N V I M F V C F E Q L K R E L S R Q T M D C A T	V	V	VII
UCP2 281	G S W N V V M F V T Y E Q L K R A L M A A C T S R E A P F			
UCP3 272	G S W N V V M F V T Y E Q L K R A L M K V Q M L R E S P F			
UCP4 301	T P W S M V F W L T Y E K I R E M S G V S P F			

FIG. 3B



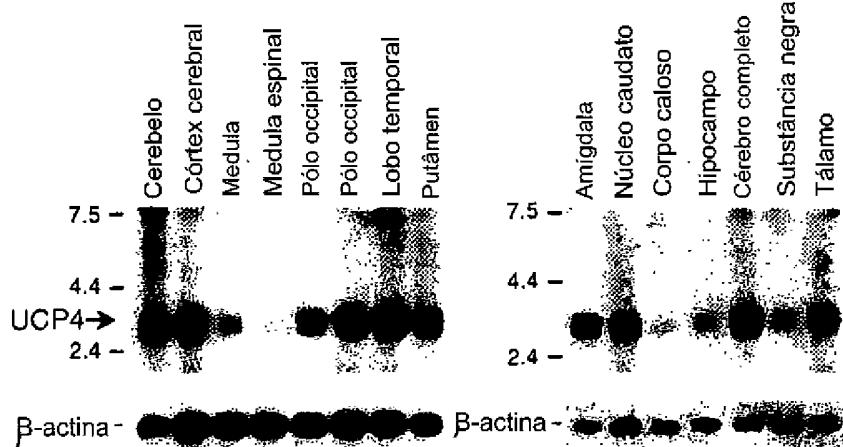


FIG. 4E

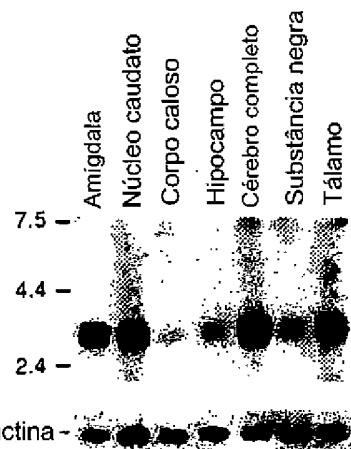


FIG. 4F

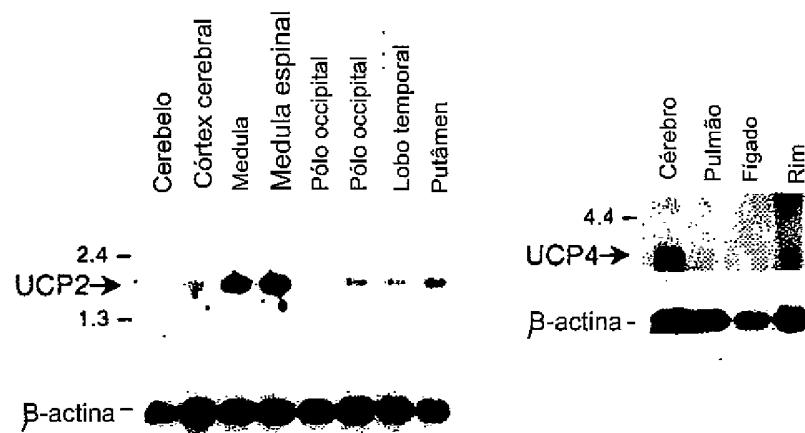


FIG. 4G

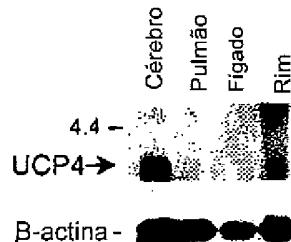


FIG. 4H

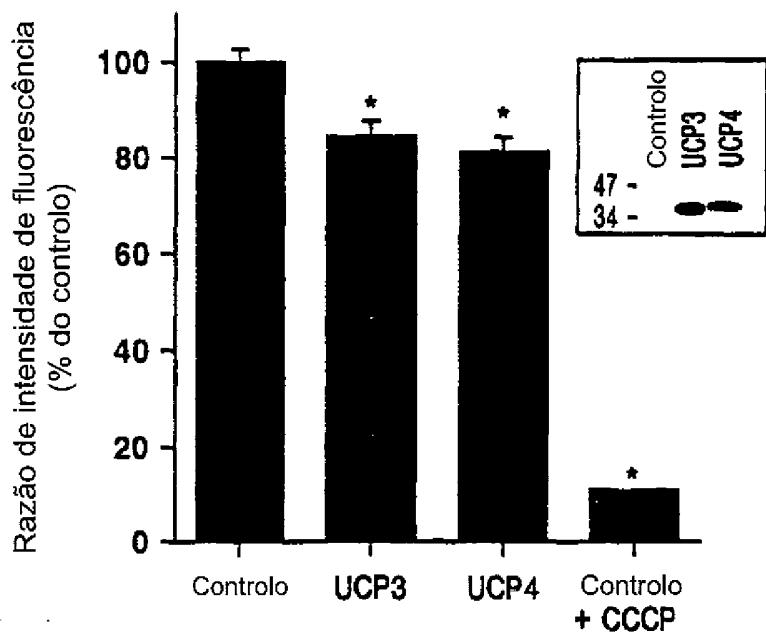


FIG. 5A

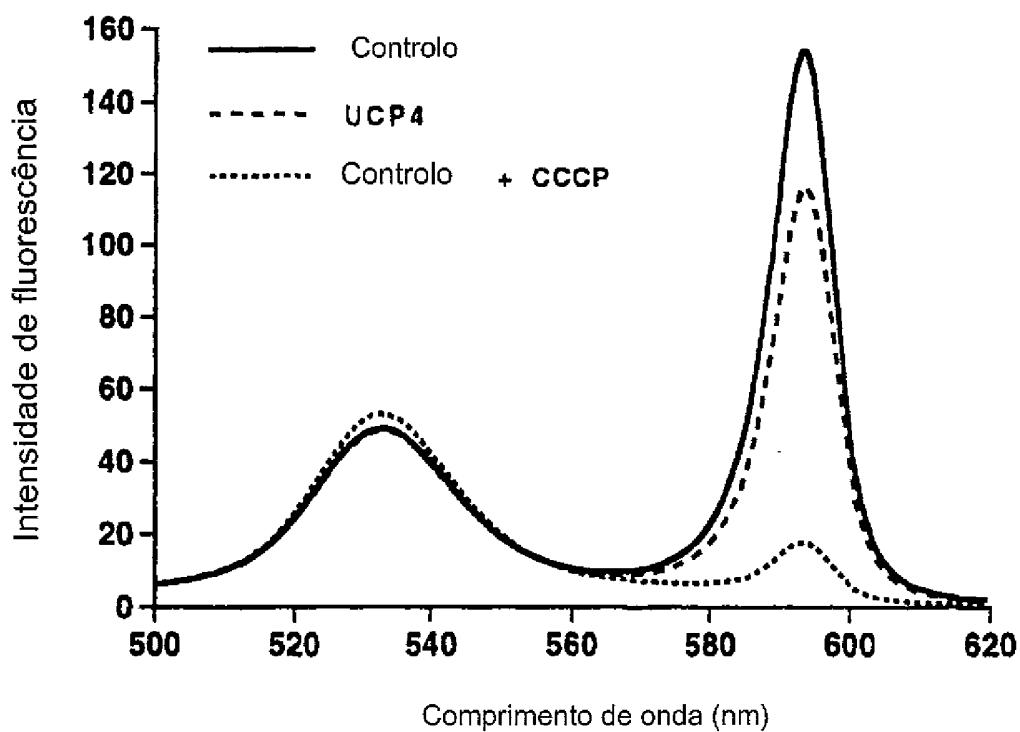
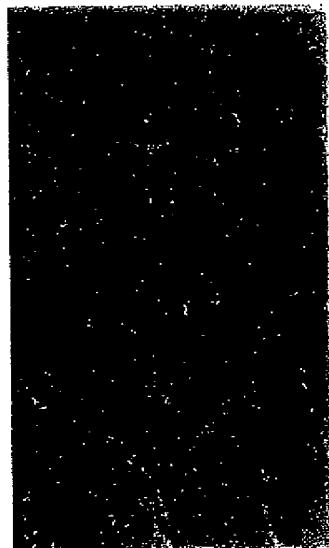


FIG. 5B

FIG. 6A



anti-cyto

FIG. 6B



anti-cyto anti-flag

FIG. 6C



anti-flag

FIG. 6D



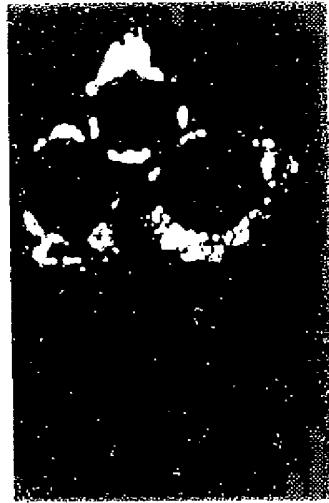
anti-cyto

FIG. 6E



anti-cyto anti-flag

FIG. 6F



anti-flag

CGTTATCGCTTGGCTACTGGTGAATGTCGCTGGAGGGAGGGAGGGCTTTCGGCTGACCCAGAG
ATGGCCCCGGAGCGAGCAATTCTACTGTCCGGCTACCGTGGCGCTACCGTGGCTGGCAACCTTCCCTG
GATCTCACAAAACTCGACTCCAATTGCAAGGAGAACGGCAGCTTGGCTGGGGAGACGGTGGCAAGGAGAT
CTGGCCCTATAGGGGAATTGGTGGCACAGCCCTAAGGATCATGGATCAAGGAAAGGGCTTCTAAAGCTTGGCA
AGGAGTGAACCCGCCATTACAGACACGTTAGTTTCTGGAGGTGGAATGGTCACATATGAAACATCTCCGA
GGGGTGTGTTGGCAAAGTGAAGATGAGCATTACCCCTTGGAAATCAGTCATTGGAGGGATGATGGCTG
GTGTTATGGCCAGTTTGTGCAACTGACCTAGTGAAGGTTGAGAATGGAAAGGAAAAGGAA
ACTGGAAAGGAAAACCATGGGATTCGGATTTCGGTGTGACATCATGCAATTGGCAAGGGAGGAATA
CGAAGGCTTGGCAGGGCTGGTACCCAAATACAAAGAGCAGCACTGGGACTGGAGATTAAACCACT
ATGATAACAGTGAACACTACTTGGTATTGAAATACACCACTGAGGACAATATCATGACTCACGGTTTATCAAG
TTATGTTCTGGACTGGTAGCTTCTATTCTGGAAACACCGCCGATGTCATCAAAAGCAGAAATAATGAATCAA
CCACGAGATAAAACAAGGAAGGGGACTTTGTATAAATCATCGACTGAATGCTGGCTGGTCAAGGGTG
AAGGATTCAATGAGTCTATAAAGGCTTACCATCTTGGCTGAGAAATGACCCCTGGTCAAGGGTCTG
GCTTACTTATGAAAAATCAGAGAATGAGTGGAGTCAGTCCATTAAACCCCTAAAGATGCAACCCCTAA
GATACAGTGTCACTATTGAAATATGGGCATCTGCAACACATAACCCCTATTATTCACCTCTTAGGA
AGACACACTTTCACAGAGACTGATTATGGGAGGGCAGCACTTATGGAAACCCCAAGTCTCTT
GACTCCCTTTGTCCAAGGGCATCTGGTGGATCTGTCACAAAGGGCATCCATGAGACCCGNACAGCATT
TCTAAAGA

FIG. 7

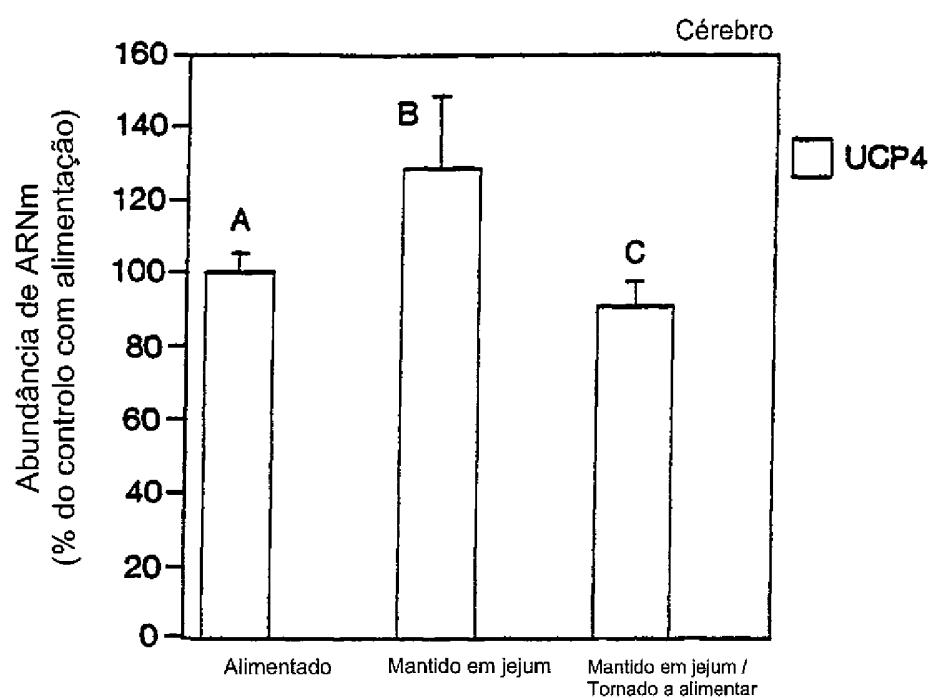


FIG. 8

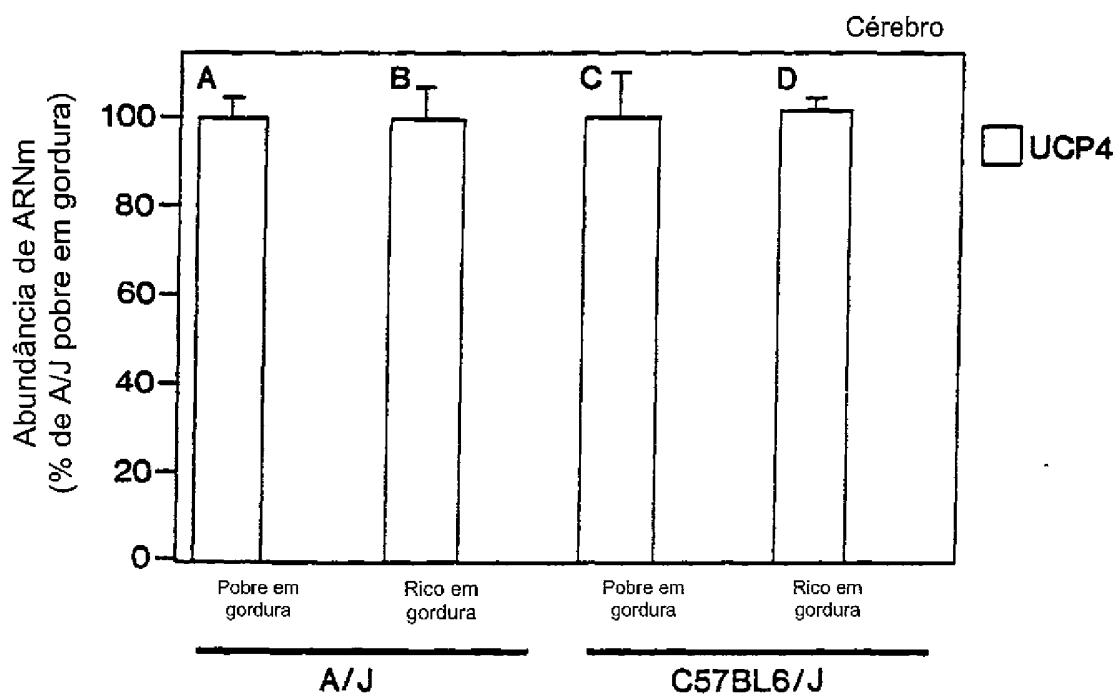


FIG. 9

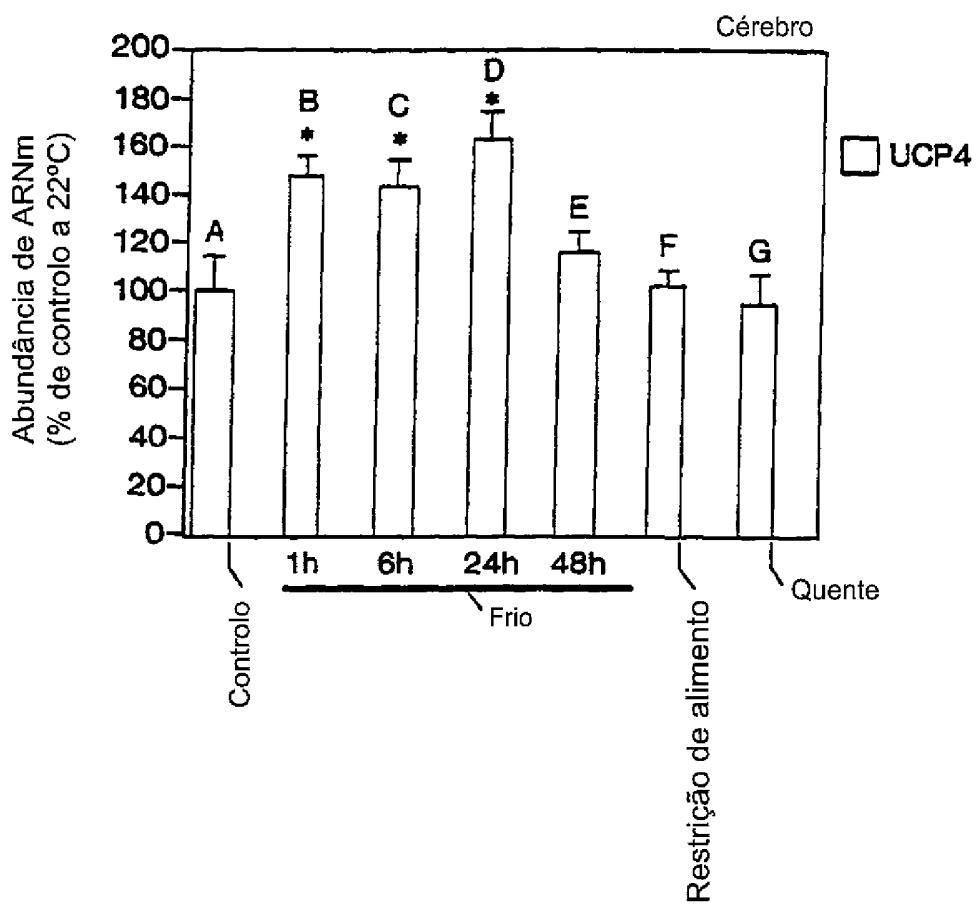


FIG. 10