

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

(22) Data de pedido: 2003.09.05	(73) Titular(es): AMGEN, INC.	
(30) Prioridade(s): 2002.09.06 US 408719 P	ONE AMGEN CENTER DRIVE THOUSAND	
(43) Data de publicação do pedido: 2005.09.14	OAKS, CA 91320-1799	US
(45) Data e BPI da concessão: 2012.03.14 118/2012	MEDAREX, INC.	US
	(72) Inventor(es):	
	VARNUM, BRIAN	US
	CHRIS VEZINA	US
	ALISON WITTE	US
	XUEMING QIAN	US
	FRANK MARTIN	US
	(74) Mandatário:	
	ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO	
	RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **ANTICORPO MONOCLONAL TERAPÊUTICO ANTI-IL-1R1 HUMANO**

(57) Resumo:

SÃO DESCRITOS ANTICORPOS QUE INTERAGEM COM O RECEPTOR DE INTERLEUCINA-1 DE TIPO 1 (IL-1R1). SÃO DESCRITOS MÉTODOS DE TRATAMENTO DE DOENÇAS MEDIADAS POR IL-1 POR ADMINISTRAÇÃO DE UMA QUANTIDADE FARMACEUTICAMENTE EFICAZ DE ANTICORPOS PARA IL-1R1. SÃO DESCRITOS MÉTODOS DE DETECÇÃO DA QUANTIDADE DE IL-1R1 NUMA AMOSTRA UTILIZANDO ANTICORPOS PARA IL-1R1.

RESUMO

"ANTICORPO MONOCLONAL TERAPÊUTICO ANTI-IL-1R1 HUMANO"

São descritos anticorpos que interagem com o receptor de interleucina-1 de tipo 1 (IL-1R1). São descritos métodos de tratamento de doenças mediadas por IL-1 por administração de uma quantidade farmacologicamente eficaz de anticorpos para IL-1R1. São descritos métodos de detecção da quantidade de IL-1R1 numa amostra utilizando anticorpos para IL-1R1.

DESCRIÇÃO

"ANTICORPO MONOCLONAL TERAPÊUTICO ANTI-IL-1R1 HUMANO"

Este pedido está relacionado e reivindica a prioridade do pedido provisório U.S. Nº de série 60/408719, apresentado em 6 de Setembro de 2002

CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção refere-se a anticorpos que se ligam à proteína de tipo 1 do receptor de interleucina-1 (IL-1R1). São também proporcionadas composições, particularmente composições farmacêuticas e métodos para tratar doenças mediadas por IL-1, tais como artrite reumatóide, osteodistrofia e outros estados inflamatórios.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Desenvolvimento de Anticorpos

A inflamação é a resposta do corpo a lesões que resultam de lesão mecânica, infecção ou estimulação antigénica. As reacções inflamatórias são frequentemente expressas patologicamente. Tais estados surgem quando a inflamação é expressa de um modo exagerado, é impropriamente estimulada ou persiste após o agente lesante ser removido.

A resposta inflamatória é mediada, *inter alia*, por citocinas. Uma das citocinas inflamatórias mais potentes já identificada é a interleucina-1 (IL-1). Um aumento na sinalização de IL-1 provoca inflamação persistente associada a diversas doenças, e pensa-se que a IL-1 seja um mediador chave em muitas doenças e estados patológicos. Esta citocina é sintetizada principalmente (apesar de não exclusivamente) por células da linhagem de macrófagos/monócitos e pode ser produzida em duas formas: IL-1 alfa (IL-1 α) e IL-1 beta (IL-1 β).

A IL-1 estimula respostas celulares por interacção com um complexo receptor heterodimérico compreendido por duas proteínas transmembranares, a proteína de tipo 1 do receptor de IL-1 (IL-1R1) e a proteína acessória do receptor de IL-1 (IL-1RAcP). A IL-1 liga-se primeiro a IL-1R1; a IL-1RAcP é depois recrutada para este complexo (Greenfeder *et al.*, 1995, J. Biol. Chem. 270:13757-13765; Yoon e Dinarello, 1998, J. Immunology 160:3170-3179; Cullinan *et al.*, 1998, J. Immunology 161:5614-5620), seguida por transdução do sinal resultando na indução de uma resposta celular.

Estudos de ligação com base em células sugerem que a IL-1RAcP estabiliza o complexo de sinalização de IL-1R por retardamento da taxa de dissociação do ligando (Wesche *et al.*, 1998, FEBS Letters 429:303-306). Enquanto a interacção da IL-1 com IL-1R foi exaustivamente caracterizada, a interacção de IL-1RAcP com receptor ligado a ligando permanece pouco definida. Uma vez que a IL-1RAcP não tem qualquer afinidade significativa para IL-1 ou IL-1R1 isoladamente, mas afinidade elevada para o complexo, depreende-se que novos locais de ligação para IL-1RAcP são criados pelo evento de ligação IL-1/IL-1R que pode mesmo incluir contribuições de resíduos de IL-1 (Ettorre *et al.*, 1997, Eur. Cytokine Netw. 8:161-171). Outra molécula, o antagonista do

receptor de IL-1 (IL-1ra) compete com IL-1 α e IL-1 β para ligação ao receptor, mas não recruta IL-1RACp, resultando num receptor ocupado mas não de sinalização. A actividade da IL-1 pode ser adicionalmente contrabalançada por IL-1R de tipo II, um receptor chamariz que se liga ao ligando, mas não participa na sinalização devido a um domínio intracelular truncado. A IL-1ra e a IL-1R de tipo II actuam para reduzir a gravidade e a duração dos eventos inflamatórios mediados por IL-1 (Wesche *et al.*, 1998, FEBS Letters 429:303-306; Dripps *et al.*, 1991, J. Biol. Chem. 266:10331-10336; Dripps *et al.*, 1991, J. Biol. Chem. 266:20331-20335).

Os inibidores de interleucina-1 podem ser produzidos a partir de qualquer proteína capaz de prevenir especificamente a activação de receptores celulares para IL-1, os quais podem resultar de uma variedade de mecanismos. Tais mecanismos incluem a regulação negativa da produção de IL-1, a ligação de IL-1 livre, interferir com a ligação de IL-1 a IL-1R, interferir com a formação do complexo IL-1R-IL-1RACp ou interferir com a modulação da sinalização de IL-1 após ligação ao seu receptor. As classes de inibidores de IL-1 incluem:

- antagonistas do receptor de interleucina-1, tal como IL-1ra, como descrito abaixo;
- anticorpos monoclonais anti-IL-1R (e. g., como divulgados na publicação do Pedido de Patente Europeia N° EP 623674, cuja divulgação é aqui incorporada por referência);
- Proteínas de ligação a IL-1, tal como receptores de IL-1 solúveis (e. g., como divulgados nas Pat. U.S. N° 5492888; 5488032; 5464937; 5319071; e 5180812
- anticorpos monoclonais anti-IL-1 (e. g., como divulgados nas Publicações do Pedido de Patente Internacional

Nº WO 9501997, WO 9402627, WO 9006371, Pat. U.S. Nº 4935343, documentos EP 364778, EP 267611 e EP 220063,

- Proteínas acessórias do receptor de IL-1 e anticorpos para as mesmas (e. g., como divulgados nas Publicações do Pedido de Patente Internacional Nº WO 96/23067 e WO 99/37773; e
- inibidores da enzima conversora de interleucina-1 β (ICE) ou da caspase I (e. g., como divulgados nas Publicações do Pedido de Patente Internacional Nº WO 99/46248, WO 99/47545 e WO 99/47154, os quais podem ser utilizados para inibir a produção e a secreção de IL-1 β ;
- inibidores da protease de interleucina-1 β ; e
- outros compostos e proteínas que bloqueiam a síntese *in vivo* ou a libertação extracelular de IL-1.

Inibidores de IL-1 exemplificativos são divulgados nas seguintes referências: Pat. U.S. Nº 5747444; 5359032; 5608035; 5843905; 5359032; 5866576; 5869660; 5869315; 5872095; 5955480; e 5965564; Publicações do Pedido de Patente Internacional Nº WO98/21957, WO96/09323, WO91/17184, WO96/40907, WO98/32733, WO98/42325, WO98/44940, WO98/47892, WO98/56377, WO99/03837, WO99/06426, WO99/06042, WO91/17249, WO98/32733, WO98/17661, WO97/08174, WO95/34326, WO99/36426 e WO99/36415; Publicações do Pedido de Patente Europeia Nº EP534978 e EP89479; e Pedido de Patente Francesa Nº FR 2762514. "Sims J. E. et al. divulga anticorpos conhecidos contra receptores de interleucina 1 (IL-1) de Tipo I e Tipo II e concluem que o receptor de Tipo I (IL-1R1) é responsável pela mediação da transdução de sinal após ligação a IL-1"

O antagonista do receptor de interleucina-1 (IL-1ra) é uma proteína humana que actua como um inibidor natural da interleucina-1 e é um membro da família IL-1 que inclui IL-1 α e IL-1 β . Os antagonistas do receptor (incluindo IL-1ra e as suas

variantes e derivados) preferidos, assim como métodos para a sua produção e utilização, são descritos na patente U.S. Nº 5075222; Publicações do Pedido de Patente Internacional Nº WO 91/08285; WO 91/17184; WO92/16221; WO93/21946; WO 94/06457; WO 94/21275; WO 94/21235; documentos DE 4219626, WO 94/20517; WO 96/22793; WO 97/28828; e WO 99/36541, Pedido de Patente Australiana Nº AU9173636; e Pedido de Patente Francesa Nº FR2706772; As proteínas incluem antagonistas do receptor de IL-1 não glicosiladas, assim como formas glicosiladas.

Especificamente, três formas úteis de IL-1ra e as suas variantes são divulgadas e descritas na patente U.S. Nº 5075222 ("Patente '222"). A IL-1ra α é caracterizada por SDS-PAGE como uma molécula de 22-23 kD que tem um ponto isoeléctrico aproximado de 4,8, que elui de uma coluna mono Q de FPLC por volta de 52 mM de NaCl em tampão Tris, pH 7,6. A IL-1ra β é caracterizada como uma proteína de 22-23 kD, que elui de uma coluna mono Q a 48 mM de NaCl. A IL-1ra α e a IL-1ra β são glicosiladas. A IL-1rax é caracterizada como uma proteína de 20 kD, que elui de uma coluna mono Q a 48 mM de NaCl e não é glicosilada. A Patente '222 também divulga métodos para isolar os genes responsáveis pela codificação dos inibidores, clonagem do gene em vectores e tipos de células adequados, e a expressão do gene para produzir os inibidores. Embora eficaz, a IL-1ra tem uma semi-vida relativamente curta. Na utilização actual, a IL-1ra é administrada uma vez por dia. A técnica beneficiaria assim de um antagonista do receptor de IL-1 com uma semi-vida apreciavelmente mais longa.

A prevenção da sinalização de IL-1 por inibição da ligação de IL-1 ao receptor de IL-1 é uma abordagem terapêutica atractiva para o tratamento de doenças mediadas por IL-1. Existe uma necessidade na técnica para inibidores clinicamente eficazes

da via de sinalização de IL-1 que podem melhorar os efeitos das doenças mediadas por IL-1 e são adequados para distribuição em doentes humanos. Um anticorpo humano que bloqueia a sinalização de IL-1 seria particularmente vantajoso no cumprimento desta necessidade e proporcionaria uma semi-vida mais longa do que a terapia actualmente disponível.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A invenção proporciona anticorpos monoclonais que se ligam ao receptor de interleucina-1 de tipo I (IL-1R1) como definido pelas reivindicações anexas. De um modo preferido, os anticorpos inibem a sinalização de IL-1 por competição com a ligação de IL-1 β e IL-1 α a IL-1R1. São também proporcionadas pela invenção linhas celulares de hibridoma que produzem e, de um modo muito preferido, segregam para o meio de cultura celular os anticorpos monoclonais da invenção. Os anticorpos da invenção bloqueiam com sucesso a sinalização de IL-1 em células humanas e são, assim, úteis no tratamento de doentes com doenças mediadas por IL-1. São também proporcionadas proteínas de fusão compreendendo a sequência de uma região Fc de anticorpo e uma ou mais sequências seleccionadas do grupo consistindo de SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 16, SEQ ID N°: 18, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 26, SEQ ID N°: 28, SEQ ID N°: 30, SEQ ID N°: 32, SEQ ID N°: 34, SEQ ID N°: 36, SEQ ID N°: 38 e SEQ ID N°: 40. Tais moléculas podem ser preparadas utilizando métodos como descritos, por exemplo, no documento WO 00/24782. Tais moléculas podem ser expressas, por exemplo, em células de mamífero (e. g., células de ovário de hamster chinês) ou células bacterianas (e. g., células de *E. coli*).

Em determinados aspectos, são também proporcionados anticorpos, de um modo preferido, anticorpos monoclonais, de um modo muito preferido, anticorpos humanos, compreendendo uma cadeia pesada e uma cadeia leve, em que a cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada em qualquer de SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 6 ou SEQ ID N°: 8 ou um seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional.

São também proporcionados anticorpos, de um modo preferido, anticorpos monoclonais, de um modo muito preferido, anticorpos humanos, compreendendo uma cadeia pesada e uma cadeia leve, em que a cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°: 4 ou um seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional.

Em determinados aspectos, os anticorpos compreendem uma cadeia pesada e uma cadeia leve, em que a região variável da cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada em qualquer de SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 14 ou SEQ ID N°: 16 ou um seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional. Noutros aspectos, a região variável da cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada em qualquer de SEQ ID N°: 12 ou SEQ ID N°: 18 ou um seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional. Em aspectos adicionais, a cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada em qualquer de SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 26, SEQ ID N°: 28, SEQ ID N°: 30, SEQ ID N°: 32, SEQ ID N°: 34 ou SEQ ID N°: 36 ou um seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional. Ainda em aspectos adicionais, a

cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada em qualquer de SEQ ID N°: 38 ou SEQ ID N°: 40 ou um seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional. Tais cadeias de anticorpo são úteis na preparação de anticorpos que se ligam especificamente a IL-1R1 e também na preparação de anticorpos biespecíficos em que a molécula resultante se liga a IL-1R1 e/ou a outra molécula alvo (e. g., TNF ou um receptor de TNF).

São também proporcionados anticorpos que se ligam especificamente a IL-1R1, em que a cadeia pesada compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°: 10 ou um seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional, e a cadeia leve compreende uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°: 12 ou um seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional.

Em determinados aspectos, são também proporcionados anticorpos compreendendo uma cadeia pesada e uma cadeia leve, em que a cadeia pesada compreende uma primeira região variável, e em que a primeira região variável compreende uma sequência que tem uma identidade de, pelo menos, 90%, de um modo mais preferido, pelo menos 95% e, de um modo muito preferido, de cerca de 99% com sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°: 10 e em que a cadeia leve compreende uma segunda região variável, e em que a segunda região variável compreende uma sequência que tem uma identidade de, pelo menos, 90%, de um modo mais preferido, pelo menos 95% e, de um modo muito preferido, cerca de 99% com a sequência de aminoácidos como

apresentada na SEQ ID N°: 12, em que o anticorpo interage com a IL-1R1.

São ainda proporcionados anticorpos que se ligam especificamente a IL-1R1, em que a cadeia pesada compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°: 14 ou um seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional, e a cadeia leve compreende uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°: 12 ou um seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional.

São também proporcionados anticorpos, compreendendo uma cadeia pesada e uma cadeia leve, em que a cadeia pesada compreende uma primeira região variável, e em que a primeira região variável compreende uma sequência que tem uma identidade de, pelo menos 90%, de um modo mais preferido, pelo menos 95% e, de um modo muito preferido, cerca de 99% com a sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°: 14 e em que a cadeia leve compreende uma segunda região variável, e em que a segunda região variável compreende uma sequência que tem uma identidade de, pelo menos 90%, de um modo mais preferido, pelo menos 95% e, de um modo muito preferido, cerca de 99% com a sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°: 12, em que o anticorpo interage com a IL-1R1.

A invenção também proporciona anticorpos que se ligam especificamente a IL-1R1, em que a cadeia pesada compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°: 16 ou um seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou

imunologicamente funcional, e a cadeia leve compreende uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°: 18 ou um seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antigénio ou imunologicamente funcional.

Em determinados aspectos, a invenção proporciona anticorpos, compreendendo uma cadeia pesada e uma cadeia leve, em que a cadeia pesada compreende uma primeira região variável, e em que a primeira região variável compreende uma sequência que tem uma identidade de, pelo menos 90%, de um modo mais preferido, pelo menos 95% e, de um modo muito preferido, cerca de 99% com a sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°: 16 e em que a cadeia leve compreende uma segunda região variável, e em que a segunda região variável compreende uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de, pelo menos, 90%, de um modo mais preferido, pelo menos 95% e, de um modo muito preferido, cerca de 99% com a sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°: 18, em que o anticorpo interage com a IL-1R1.

São também proporcionados anticorpos que se ligam especificamente a IL-1R1, em que a cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 26, SEQ ID N°: 28 ou SEQ ID N°: 30 ou um seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antigénio ou imunologicamente funcional, e a cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°: 38 ou um seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antigénio ou imunologicamente funcional.

A invenção proporciona ainda anticorpos que se ligam especificamente a IL-1R1, em que a cadeia pesada compreende uma

sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°: 32, SEQ ID N°: 34 ou SEQ ID N°: 36 ou um seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional, e a cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°: 40 ou um seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional.

A invenção também proporciona formas de realização de todos os anteriores que são anticorpos de cadeia simples, anticorpos Fv de cadeia simples, anticorpos Fab, anticorpos Fab' e anticorpos (Fab')₂.

Em aspectos particulares, é proporcionada uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos como apresentada em qualquer de SEQ ID N°: 38 ou SEQ ID N°: 40 ou um seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional.

Além disso, é proporcionada uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos como apresentada em qualquer de SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 26, SEQ ID N°: 28, SEQ ID N°: 30, SEQ ID N°: 32, SEQ ID N°: 34 ou SEQ ID N°: 36 ou um seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional.

A invenção também se refere a anticorpos humanos isolados que se ligam especificamente a IL-1R1, em que o anticorpo compreende: (a) regiões estruturais de cadeia pesada humana, uma região CDR1 de cadeia pesada humana, uma região CDR2 de cadeia pesada humana e uma região CDR3 de cadeia pesada humana; e (b) regiões estruturais de cadeia leve humana, uma região CDR1 de cadeia leve humana, uma região CDR2 de cadeia leve humana e uma

região CDR3 de cadeia leve humana. Em determinados aspectos, a região CDR1 de cadeia pesada humana pode ser a região CDR1 de cadeia pesada de 15C4 como mostrada na Figura 10 e a região CDR1 de cadeia leve humana pode ser a região CDR1 de cadeia leve pesada de 15C4 como mostrada na Figura 11. Noutros aspectos, a região CDR2 de cadeia pesada humana pode ser a região CDR2 de cadeia pesada de 15C4 como mostrada na Figura 10 e a região CDR2 de cadeia leve humana pode ser a região CDR2 de cadeia leve de 15C4 como mostrada na Figura 11. Ainda noutros aspectos, a região CDR3 de cadeia pesada humana é a região CDR3 de cadeia pesada de 15C4 como mostrada na Figura 10, e a região CDR3 de cadeia leve humana é a região CDR3 de cadeia leve de 15C4 como mostrada na Figura 11.

Além disso, a invenção proporciona um anticorpo humano isolado como definido nas reivindicações, o qual se liga especificamente ao receptor de interleucina-1 de tipo 1 (IL-1R1), compreendendo: uma região CDR1 de cadeia pesada humana, em que a cadeia pesada CDR1 tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 63; uma região CDR2 de cadeia pesada humana, em que a cadeia pesada CDR2 tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 66; e/ou uma região CDR3 de cadeia pesada humana, em que a cadeia pesada CDR3 tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 69.

A invenção também proporciona um anticorpo humano isolado como definido nas reivindicações, o qual se liga especificamente ao receptor de interleucina-1 de tipo 1 (IL-1R1), compreendendo: uma região CDR1 de cadeia leve humana, em que a cadeia leve CDR1 tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 71; uma região CDR2 de cadeia pesada humana, em que a cadeia pesada CDR2 tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 73; e/ou uma região CDR3

de cadeia pesada humana, em que a cadeia pesada CDR3 tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 75.

Em determinadas formas de realização, os anticorpos da invenção ligam-se ao terceiro domínio de IL-1R1, o qual é mostrado na Figura 17. De um modo preferido, o epítipo para um anticorpo da invenção consiste na sequência de aminoácidos YSV, a qual é aqui referida como Epítipo 4 e mostrada na Figura 24. São também proporcionadas proteínas de fusão e outras moléculas capazes de ligação ao Epítipo 4 (em conjunto com os anticorpos acima mencionados, colectivamente aqui referidos como “parceiros de ligação específica”), tal como podem ser preparadas utilizando métodos como descritos, por exemplo, no documento WO 00/24782. Tais moléculas podem ser expressas, por exemplo, em células de mamífero (e. g., células de ovário de hamster Chinês) ou em células bacterianas (e. g., células de *E. coli*).

Além disso, é proporcionado um método para o mapeamento de epítopos de um antígeno seleccionado. Num aspecto, o método compreende os passos de: (a) produzir um conjunto de proteínas de fusão, em que cada proteína de fusão compreende (i) avidina e (ii) um fragmento do antígeno; (b) rastrear o conjunto de proteínas de fusão para ligação a um ou mais parceiros de ligação específica para o antígeno; (c) isolar as proteínas de fusão num meio compreendendo biotina, pelo que a avidina se liga à biotina; e (d) analisar as proteínas de fusão ligadas pelo parceiro ou parceiros de ligação específica para determinar locais de ligação no antígeno para o parceiro ou parceiros de ligação específica. Num aspecto particular, os parceiros de ligação específica são anticorpos.

Em formas de realização adicionais, a invenção proporciona métodos para tratamento de uma doença, estado ou distúrbio

mediado por IL-1, como definido nas reivindicações, compreendendo o passo de administrar uma quantidade farmacologicamente eficaz de um ou mais anticorpos monoclonais da invenção ou um seu fragmento de imunoglobulina de ligação a antígeno ou imunologicamente funcional a um indivíduo com a sua necessidade.

São também proporcionados métodos para detectar o nível de IL-1R1 numa amostra biológica, compreendendo o passo de colocar em contacto a amostra com um anticorpo monoclonal da invenção ou seu fragmento de ligação a antígeno. Os anticorpos anti-IL-1R da invenção podem ser utilizados em qualquer método de ensaio conhecido, tais como ensaios de ligação competitiva, ensaios de sanduíche directos e indirectos, ensaios de imunoprecipitação e imunoenaios de adsorção ligados à enzima (ELISA) (ver, Sola, 1987, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158, CRC Press, Inc.) para a detecção e quantificação de IL-1R. Os anticorpos podem ligar-se a IL-1R com uma afinidade que é apropriada para o método de ensaio a ser utilizado.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

As Figuras 1A-1B descrevem uma sequência de ADNc (Fig. 1A) que codifica uma região constante de IgG1 de cadeia pesada de anticorpo anti-IL-1R1 humano (SEQ ID N°: 1) e a sequência de aminoácidos (Fig. 1B) de uma região constante de IgG1 de cadeia pesada de anticorpo anti-IL-1R1 humano (SEQ ID N°: 2).

As Figuras 2A-2B descrevem uma sequência de ADNc (Fig. 2A) que codifica uma região constante de cadeia kappa de anticorpo anti-IL-1R1 humano (SEQ ID N°: 3) e a sequência de

aminoácidos (Fig. 2B) de uma região constante de cadeia kapa de anticorpo anti-IL-1R1 humano (SEQ ID N°: 4).

As Figuras 3A-3B descrevem uma sequência de ADNc (Fig. 3A) que codifica uma região constante IgG2 de cadeia pesada de anticorpo anti-IL-1R1 humano (SEQ ID N°: 5) e a sequência de aminoácidos (Fig. 3B) de uma região constante IgG2 de cadeia pesada de anticorpo anti-IL-1R1 humano (SEQ ID N°: 6).

As Figuras 4A-4B descrevem uma sequência de ADNc (Fig. 4A) que codifica uma região constante IgG4 de cadeia pesada de anticorpo anti-IL-1R1 humano (SEQ ID N°: 7) e a sequência de aminoácidos (Fig. 4B) de uma região constante IgG4 de cadeia pesada de anticorpo anti-IL-1R1 humano (SEQ ID N°: 8).

As Figuras 5A-5B descrevem uma sequência de ADNc (Fig. 5A) que codifica a região variável de cadeia pesada do anticorpo anti-IL-1R1 26F5 (SEQ ID N°: 9) e a sequência de aminoácidos (Fig. 5B) da região variável de cadeia pesada do anticorpo anti-IL-1R1 26F5 (SEQ ID N°: 10).

As Figuras 6A-6B descrevem uma sequência de ADNc (Fig. 6A) que codifica a região variável de cadeia kapa do anticorpo anti-IL-1R1 26F5 (SEQ ID N°: 11) e a sequência de aminoácidos (Fig. 6B) da região variável de cadeia kapa do anticorpo anti-IL-1R1 26F5 (SEQ ID N°: 12).

As Figuras 7A-7B descrevem uma sequência de ADNc (Fig. 7A) que codifica a região variável de cadeia pesada do anticorpo anti-IL-1R1 27F2 (SEQ ID N°: 13) e a sequência de aminoácidos (Fig. 7B) da região variável de cadeia pesada do anticorpo anti-IL-1R1 27F2 (SEQ ID N°: 14).

As Figuras 8A-8B descrevem uma sequência de ADNc (Fig. 8A) que codifica a região variável de cadeia pesada do anticorpo anti-IL-1R1 15C4 (SEQ ID N°: 15) e a sequência de aminoácidos (Fig. 8B) da região variável de cadeia pesada do anticorpo anti-IL-1R1 15C4 (SEQ ID N°: 16).

As Figuras 9A-9B descrevem uma sequência de ADNc (Fig. 9A) que codifica a região variável de cadeia kappa do anticorpo anti-IL-1R1 15C4 (SEQ ID N°: 17) e a sequência de aminoácidos (Fig. 9B) da região variável de cadeia kappa do anticorpo anti-IL-1R1 15C4 (SEQ ID N°: 18).

A Figura 10 mostra um alinhamento de sequências de aminoácidos de regiões variáveis de cadeia pesada (sem sequência líder) de anticorpos anti-IL-1R1 designados 15C4 (SEQ ID N°: 80, 85), 27F2 (SEQ ID N°: 82, 87) e 26F5 (SEQ ID N°: 84, 89). As regiões determinantes de complementaridade (CDR) estão sublinhadas. A CDR1 para 26F5 é designada SEQ ID N°: 61; para 27F2 é designada SEQ ID N°: 62; para 15C4 é designada SEQ ID N°: 63. A CDR2 para 26F5 é designada SEQ ID N°: 64; para 27F2 é designada SEQ ID N°: 65; para 15C4 é designada SEQ ID N°: 66. A CDR3 para 26F5 é designada SEQ ID N°: 67; para 27F2 é designada SEQ ID N°: 68; para 15C4 é designada SEQ ID N°: 69.

A Figura 11 mostra um alinhamento de sequências de aminoácidos das regiões variáveis e cadeia leve (sem sequência líder) de anticorpos anti-IL-1R1-y designados 15C4 (SEQ ID N°: 81, 86), 27F2 (SEQ ID N°: 83, 88) e 26F5 (SEQ ID N°: 83, 88). A CDR1 para 26F5/27F2 é designada SEQ ID N°: 70; para 15C4 é designada SEQ ID N°: 71. A CDR2 para 26F5/27F2 é designada SEQ ID N°: 72; para 15C4 é

designada SEQ ID N°: 73. A CDR3 para 26F5/27F2 é designada SEQ ID N°: 74; para 15C4 é designada SEQ ID N°: 75.

A Figura 12 é um gráfico que ilustra o efeito inibidor de anticorpos anti-IL-1R1 na formação do complexo IL-1R/IL-1 β /IL-1RAcP.

A Figura 13 é um gráfico que mostra o efeito inibidor de um anticorpo monoclonal anti-IL-1R1 como aqui descrito e 15C4 designado na formação do complexo IL-1R/IL-1 α /IL-1racP.

A Figura 14 é um gráfico que representa a capacidade de anticorpos anti-IL-1R1 para bloquear a ligação de IL-1 β , embora não interferindo significativamente com a ligação de IL-1ra comparativamente com controlo de IgG.

A Figura 15A é um gráfico que mostra a inibição da produção de IL-6 em condrócitos humanos primários por anticorpos anti-IL-1R1, aqui identificados e designados 15C4, 26F5 e 27F2 comparativamente com IL-1ra.

A Figura 15B é um gráfico que mostra a inibição da produção IL-6 em condrócitos humanos primários por IL-1ra e anticorpos monoclonais 15C4 e 27F2, comparativamente com a classe de anticorpos monoclonais representados por 10H7 e 24E12.

A Figura 16 é um gráfico que mostra a inibição da produção de IL-6 em sangue total humano por anticorpos monoclonais anti-IL-1R1 designados 15C4, 26F5 e 27F2, comparativamente com IL-1ra.

A Figura 17 descreve sequências do 3° domínio de IL-1R1 de aminoácidos (SEQ ID N°: 76) e de nucleótidos (SEQ ID N°: 77) de humano e de nucleótidos (SEQ ID N°: 78) e de aminoácidos (SEQ ID N°: 79) de rato. As barras numeradas acima da sequência humana indicam os 15 locais diferentes mutados para construir as 15 proteínas mutadas diferentes. Os resíduos de rato introduzidos por mutação estão listados abaixo da sequência de ácidos nucleicos de rato.

A Figura 18 mostra a análise de transferência de Western que demonstra o reconhecimento de mutantes de IL-1R1 pelo anticorpo monoclonal anti-IL-1R1.

A Figura 19 é um desenho que representa a (I) activação da via de sinalização de IL-1 que começa com a ligação de IL-1 β a IL-1R1, e recrutamento de IL-1racP e de três classes de anticorpos anti-IL-1R1: (II) bloqueadores de IL-1 do epítipo do 3° domínio, (III) bloqueadores de RAcP do epítipo do 3° domínio e (IV) bloqueadores de IL-1 do epítipo do 1°/2° domínio.

A Figura 20 descreve a estrutura cristalina de 15C4 e 27F2 com a mutação 10 como aqui descrita. Os resíduos cinzentos indicam os epítopos de 15C4 e 27F2.

A Figura 21 descreve os epítopos de 15C4 no terceiro domínio de IL-1R1 extracelular.

A Figura 22 descreve os epítopos de 24E12 no terceiro domínio de IL-1R1 extracelular.

A Figura 23 descreve a sequência de aminoácidos (SEQ ID N°: 59) da proteína quimérica avidina-IL-1R1 humana-FLAG da invenção.

A Figura 24 descreve a sequência de aminoácidos (SEQ ID N°: 60) de uma proteína quimérica avidina-IL-1R1 de cinomolgos-FLAG. A avidina recombinante de galinha (em *itálico*) é ligada ao domínio extracelular maduro da IL-1R1 de cinomolgos (sublinhado, com um marcador FLAG C-terminal em **negrito**) através de um ligante de 6 aminoácidos. Quatro aminoácidos da IL-1R1 humana que foram introduzidos isoladamente e em combinação na sequência de cinomolgos estão em **negrito** sob a sequência de cinomolgos. O epítopo 4 está a **negrito**, em *itálico* e sublinhado.

A Figura 25A mostra uma análise de transferência de Western da ligação do anticorpo anti-IL1-R1 humana (anti-huIL1-R1) a IL-1R1. O * indica que os anticorpos foram utilizados a 5 µg/mL, enquanto nos restantes, os anticorpos foram utilizados a 1 µg/mL.

A Figura 25B mostra um sumário da análise densitométrica de um conjunto duplicado de experiências de transferência de Western.

A Figura 26 mostra gráficos que representam a ligação de anticorpos anti-huIL1R1 a proteínas de avidina-IL-1R1-FLAG num ensaio de ligação multiplexado com base em esferas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DE DETERMINADAS FORMAS DE REALIZAÇÃO PREFERIDAS

Os títulos de secção aqui utilizados são apenas para fins organizativos e não devem ser interpretados como limitativos dos elementos essenciais descritos.

Definições

Uma doença ou um estado patológico são considerados como sendo uma “doença mediada por interleucina-1 (IL-1)” se a doença ou o estado patológico de ocorrência natural ou induzido experimentalmente estiverem associados com níveis elevados de IL-1 em fluidos ou tecidos corporais ou se as células ou tecidos removidos do corpo produzem níveis elevados de IL-1 em cultura. Níveis elevados de IL-1 podem incluir, por exemplo, níveis que excedem aqueles normalmente encontrados numa célula ou tecido particular ou podem ser qualquer nível detectável de IL-1 numa célula ou tecido que normalmente não expressa IL-1. Em muitos casos, as doenças mediadas por IL-1 são também reconhecidas pelas seguintes duas condições adicionais: (1) as observações patológicas associadas com a doença ou estado patológico podem ser mimetizadas experimentalmente em animais por administração de IL-1 ou regulação positiva da expressão de IL-1; e (2) uma patologia induzida em modelos animais experimentais da doença ou do estado patológico pode ser inibida ou abolida por tratamento com agentes que inibem a acção da IL-1. Na maioria das doenças mediadas por IL-1, pelo menos, duas das três condições estão reunidas e, em muitas doenças mediadas por IL-1, todas as três condições estão reunidas.

Uma lista não exclusiva de doenças agudas e crônicas mediadas por IL-1, inclui, mas não está limitada ao seguinte: pancreatite aguda; esclerose lateral amiotrófica (ALS); Doença de Alzheimer; caquexia/anorexia, incluindo caquexia induzida por SIDA; asma e outras doenças pulmonares; aterosclerose; vasculite auto-imune; síndrome de fadiga crônica; doenças associadas a *Clostridium*, incluindo diarreia associada a *Clostridium*; estados e indicações coronárias, incluindo insuficiência cardíaca congestiva, restenose coronária, enfarte do miocárdio, disfunção do miocárdio (e. g., relacionada com sepsia) e enxerto de bypass de artéria coronária; cancro, tais como mieloma múltiplo e leucemias mielógenas (e. g., AML ou CML) e outras, assim como metástases tumorais; diabetes (e. g., diabetes dependente de insulina); endometriose; febre; fibromialgia; glomerulonefrite; doença de hospedeiro contra enxerto/rejeição de transplante; choque hemorrágico; hiperalgesia; doença inflamatória intestinal; estados inflamatórios de uma articulação, incluindo osteodistrofia, artrite psoriática e artrite reumatóide; doença inflamatória ocular que pode estar associada com, e. g., transplante da córnea; isquemia, incluindo isquemia cerebral (e. g., lesão cerebral como resultado de traumatismo, epilepsia, hemorragia ou acidente vascular cerebral, cada um dos quais pode conduzir a neurodegeneração); Doença de Kawasaki; dificuldade de aprendizagem; doenças pulmonares (e. g., ARDS); esclerose múltipla; miopatias (e. g., metabolismo da proteína muscular, especialmente em sepsia); neurotoxicidade (e. g., como induzida por HIV); osteoporose; dor, incluindo dor relacionada com cancro; Doença de Parkinson; doença periodontal; trabalho de parto prematuro; psoríase; lesão de reperfusão; choque séptico; efeitos secundários de radioterapia; doença da articulação temporo-mandibular; distúrbio de sono; uveíte; ou um estado inflamatório resultante de esforço, entorse, lesão de cartilagem, traumatismo, cirurgia ortopédica, infecção ou outros

processos de doença. Os métodos da invenção para tratar estas doenças agudas e crónicas mediadas por IL-1, assim como outros estados e doenças mediadas por IL-1, são descritos abaixo.

Podem ser utilizadas técnicas convencionais para preparar ADN recombinante, realizar síntese de oligonucleótidos e na prática de culturas de tecidos e transformação (e. g., electroporação, transfecção ou lipofecção). Podem ser realizadas reacções enzimáticas e técnicas de purificação de acordo com as especificações do fabricante ou como habitualmente realizadas na técnica ou como aqui descritas. As técnicas e processos anteriores podem ser genericamente realizados de acordo com métodos convencionais bem conhecidos na técnica e como descrito em várias referências gerais e mais específicas que são citadas e discutidas ao longo da presente descrição. Ver, e. g., Sambrook *et al.*, 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.I. Salvo definições específicas proporcionadas, a nomenclatura utilizada, assim como os processos e técnicas laboratoriais, relativamente a química analítica, química orgânica de síntese e química médica e farmacêutica aqui descritas, são aquelas bem conhecidas e utilizadas habitualmente na técnica. Podem ser utilizadas técnicas padrão para sínteses químicas, análises químicas, preparação, formulação e distribuição farmacêutica, e tratamento de doentes.

Como utilizadas de acordo com a presente divulgação, as seguintes expressões, salvo indicação em contrário, devem ser entendidas como tendo os seguintes significados:

A expressão “polinucleótido isolado” significa que o polinucleótido em causa, (1) não está associado (covalentemente ou não covalentemente) com a totalidade ou

uma porção de outros polinucleótidos com o qual o polinucleótido em causa está associado na natureza, (2) está associado com uma molécula com a qual não está associado na natureza ou (3) não ocorre na natureza associado com quaisquer outros polinucleótidos. Um tal polinucleótido isolado pode ser ADN genómico, ADNc, ARNm ou outro ARN, de origem sintética, ou qualquer sua combinação.

A expressão "proteína isolada" aqui referida significa que uma proteína em causa (1) está livre de, pelo menos, algumas outras proteínas com que seria normalmente encontrada, (2) está essencialmente livre de outras proteínas da mesma fonte, e. g., da mesma espécie, (3) é expressa por uma célula de uma espécie diferente, (4) foi separada de, pelo menos, cerca de 50 por cento de polinucleótidos, lípidos, hidratos de carbono ou outros materiais com que está associada na natureza, (5) não está associada (por interacção covalente ou não covalente) com porções de uma proteína com que a "proteína isolada" está associada na natureza, (6) está operativamente associada (por interacção covalente ou não covalente) com um polipéptido com que não está associada na natureza ou (7) não ocorre na natureza. ADN genómico, ADNc, ARNm ou outro ARN, de origem sintética, ou uma sua qualquer combinação, pode codificar uma tal proteína isolada. De um modo preferido, a proteína isolada está substancialmente livre de proteínas ou polipéptidos ou outros contaminantes que são encontrados no seu ambiente natural que interfeririam com a sua utilização terapêutica, de diagnóstico, profiláctica, em investigação ou outra.

Os termos "polipéptido" ou "proteína" significam uma ou mais cadeias de aminoácidos, em que cada cadeia compreende aminoácidos ligados covalentemente por ligações peptídicas e em que o referido polipéptido ou proteína compreende um pluralidade

de cadeias em conjunto ligadas não covalentemente e/ou covalentemente por ligações peptídicas, que tem a sequência de proteínas nativas, isto é, proteínas produzidas por células de ocorrência natural e especificamente não recombinantes, ou manipuladas geneticamente ou células recombinantes, e compreende moléculas que têm a sequência de aminoácidos da proteína nativa, ou moléculas que têm deleções, adições e/ou substituições de um ou mais aminoácidos da sequência nativa. Os termos “polipéptido” e “proteína” abrangem especificamente anticorpos anti-IL1-R1, ou sequências que têm deleções, adições e/ou substituições de um ou mais aminoácidos de um anticorpo anti-ILR-1R1. Assim, um “polipéptido” ou uma “proteína” pode compreender uma (denominado “um monómero”) ou uma pluralidade (denominado “um multímero”) de cadeias de aminoácidos.

A expressão “fragmento de polipéptido” refere-se a um polipéptido que pode ser monomérico ou multimérico, o qual tem uma deleção amino-terminal, uma deleção carboxi-terminal e/ou uma deleção ou substituição interna de um polipéptido de ocorrência natural ou produzido recombinantemente. Em determinadas formas de realização, um fragmento de polipéptido pode compreender uma cadeia de aminoácidos com, pelo menos, 5 a cerca de 500 aminoácidos de comprimento. Deve ser entendido que em determinadas formas de realização, os fragmentos têm, pelo menos, 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 ou 450 aminoácidos de comprimento. Os fragmentos particularmente úteis do polipéptido incluem domínios funcionais, incluindo domínios de ligação. No caso de um anticorpo anti-IL1-R1, os fragmentos úteis incluem, mas não estão limitados a: uma região CDR, especialmente uma região CDR3 da cadeia pesada ou leve; um domínio variável de uma cadeia pesada ou leve; uma porção de uma cadeia de anticorpo ou apenas a sua região variável incluindo duas CDR; e semelhantes.

A expressão “fragmento de imunoglobulina imunologicamente funcional”, como aqui utilizada, refere-se a um fragmento de polipéptido que contém, pelo menos, os domínios variáveis das cadeias pesadas e leves da imunoglobulina. Um fragmento de imunoglobulina imunologicamente funcional da invenção é capaz de ligação a um ligando, prevenir a ligação do ligando ao seu receptor, interromper a resposta biológica que resulta da ligação do ligando ao receptor, ou qualquer sua combinação. De um modo preferido, um fragmento de imunoglobulina imunologicamente funcional da invenção liga-se especificamente a IL-1R1.

As expressões “ocorrência natural” e “nativo” significa que que os materiais biológicos (moléculas, sequências, complexos proteicos, células e semelhantes), aos quais as expressões são aplicadas, podem ser encontrados na natureza e não são manipulados pelo homem. Por exemplo, um polipéptido ou sequência polinucleotídica que está presente num organismo (incluindo vírus) que pode ser isolado de uma fonte na natureza e que não foi intencionalmente modificado pelo homem é de ocorrência natural. Do mesmo modo, as expressões “ocorrência não natural” ou “não nativo” referem-se a um material que não é encontrado na natureza ou que foi estruturalmente modificado ou sintetizado pelo homem.

A expressão “ligado operativamente” significa que os componentes aos quais a expressão é aplicada estão numa relação que lhes permite realizar as suas funções inerentes sob condições adequadas. Por exemplo, uma sequência de controlo “ligada operativamente” a uma sequência codificante de proteína está aí ligada, de modo que a expressão da sequência codificante

de proteína seja realizada sob condições compatíveis com a actividade transcripcional das sequências de controlo.

A expressão "sequência de controlo" significa que a sequência polinucleotídica em causa pode realizar a expressão e o processamento de sequências codificantes às quais está ligada. A Nature de tais sequências de controlo pode depender do organismo hospedeiro. Em formas de realização particulares, as sequências de controlo para procariotas podem incluir um promotor, um local de ligação ribossomal e uma sequência de terminação de transcrição. Noutras formas de realização particulares, as sequências de controlo para eucariotas podem incluir promotores compreendendo um ou mais locais de reconhecimento para factores de transcrição, sequências intensificadoras de transcrição e sequências de terminação de transcrição. Em determinadas formas de realização, as "sequências de controlo" podem incluir sequências líder e/ou sequências de parceiros de fusão.

A expressão "polinucleótido" significa polímeros de ácidos nucleicos de cadeia simples ou cadeia dupla de, pelo menos, 10 bases de comprimento. Em determinadas formas de realização, os nucleótidos compreendendo o polinucleótido podem ser ribonucleótidos ou desoxirribonucleótidos ou uma forma modificada de qualquer tipo de nucleótido. As referidas modificações incluem modificações de base, tais como derivados de bromouridina e inosina, modificações de ribose, tais como 2', 3'-didesoxirribose, e modificações de ligação internucleotídica, tais como fosforotioato, fosforoditioato, fosforosselenoato, fosforodisselenoato, fosforoanilotioato, fosforoaniladato e fosforoamidato. A expressão inclui formas de ADN de cadeia simples e dupla.

O termo "oligonucleótido" significa um polinucleótido compreendendo um comprimento de 200 bases ou menos. Em formas de realização preferidas, os oligonucleótidos têm 10 a 60 bases de comprimento. Em formas de realização preferidas adicionais, os oligonucleótidos têm 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 a 40 bases de comprimento. Os oligonucleótidos podem ser de cadeia simples ou de cadeia dupla, e. g., para utilização na construção de um gene mutante. Os oligonucleótidos da invenção podem ser oligonucleótidos de sentido ou anti-sentido.

A expressão "nucleótidos de ocorrência natural" inclui desoxirribonucleótidos e ribonucleótidos. A expressão "nucleótidos modificados" inclui nucleótidos com grupos modificados ou substituídos de açúcar ou bases modificadas ou substituídas. A expressão "ligações oligonucleotídicas" inclui ligações, tais como fosforotioato, fosforoditioato, fosforosselenoato, fosforodisselenoato, fosforoanilotioato, fosforoaniladato, fosforoamidato, e semelhantes. Ver, e. g., LaPlanche et al. (1986), Nucl. Acid Res. 14:9081; Stec et al. (1984), J. Am. Chem. Soc. 106:6077; Stein et al. (1988), Nucl. Acid Res. 16:3209; Zon et al. (1991), Anti-Cancer Drug Design 6:539; Zon et al. (1991), Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, ed.), Oxford University Press, Oxford, Inglaterra ; Stec et al., Pat. U.S. N° 5151510; Uhlmann e Peyman (1990), Chemical Reviews 90:543. Um oligonucleótido da invenção pode incluir um marcador, incluindo um marcador radioactivo, um marcador fluorescente, um hapteno ou um marcador antigénico, para ensaios de detecção.

O termo "vector" significa qualquer molécula (e. g., ácido nucleico, plasmídeo ou vírus) utilizada para transferir informação de codificação para uma célula hospedeira.

A expressão “vector de expressão” ou “construção de expressão” refere-se a um vector que é adequado para transformação de uma célula hospedeira e contém sequências de ácidos nucleicos que direccionam e/ou controlam (em conjunto com a célula hospedeira) a expressão de uma ou mais regiões codificantes heterólogas aí ligadas operativamente. Uma construção de expressão pode incluir, mas não estar limitada a, sequências que afectam ou controlam a transcrição, tradução e *splicing* de ARN, se estiverem presentes intrões, de uma região codificante aí ligada operativamente.

A expressão “célula hospedeira” significa uma célula que foi transformada ou é capaz de ser transformada, com uma sequência de ácidos nucleicos e expressa, assim, um gene seleccionado de interesse. A expressão inclui a progenia da célula parental, sendo ou não a progenia idêntica em morfologia ou em composição genética à célula parental original, desde que o gene seleccionado esteja presente.

O termo “transdução” significa a transferência de genes de uma bactéria para outra, habitualmente por fagos. “Transdução” também se refere à incorporação e transferência de sequências celulares eucarióticas por retrovírus.

O termo “transfecção” significa a incorporação de ADN estranho ou exógeno por uma célula, e uma célula foi “transfectada” quando o ADN exógeno foi introduzido dentro da membrana celular. Muitas técnicas de transfecção são bem conhecidas no campo técnico e são aqui divulgadas. Ver, e. g., Graham *et al.*, 1973, *Virology* 52:456; Sambrook *et al.*, 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Id.; Davis *et al.*, 1986, *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier; e Chu *et al.*, 1981, *Gene* 13:197. Tais técnicas podem ser utilizadas para

introduzir uma ou mais unidades de ADN exógeno em células hospedeiras adequadas.

O termo “transformação” refere-se a uma alteração nas características genéticas de uma célula, e uma célula foi transformada quando foi modificada para conter ADN novo. Por exemplo, uma célula é transformada quando é modificada geneticamente do seu estado nativo por transfecção, transdução ou por outras técnicas. Após a transfecção ou transdução, o ADN de transformação pode recombinar com aquele da célula por integração física num cromossoma da célula, ou pode ser mantido transientemente como um elemento episomal sem ser replicado, ou pode replicar independentemente como um plasmídeo. Uma célula é considerada como tendo sido “transformada estavelmente” quando o ADN de transformação é replicado com a divisão da célula.

O termo “antigénio” refere-se a uma molécula ou a uma porção de uma molécula capaz de ser ligada por um agente selectivo de ligação, tal como um anticorpo e, adicionalmente, capaz de ser utilizada num animal para produzir anticorpos capazes de ligação a um epitopo desse antigénio. Um antigénio pode ter um ou mais epitopos.

O termo “epitopo” inclui qualquer determinante, de um modo preferido, um determinante polipeptídico, capaz de ligação específica a uma imunoglobulina ou receptor de célula T. Em determinadas formas de realização, os determinantes de epitopo incluem agrupamentos de superfície quimicamente activos de moléculas, tais como aminoácidos, cadeias laterais de açúcar, fosforilo ou sulfonilo e, em determinadas formas de realização, pode ter características estruturais tridimensionais específicas e/ou características específicas de carga. Um epitopo é uma região de um antigénio que está ligada por um anticorpo. Em

determinadas formas de realização, um anticorpo é referido como se ligar especificamente um antígeno quando reconhecer, de um modo preferido, o seu antígeno alvo numa mistura complexa de proteínas e/ou macromoléculas. Em formas de realização preferidas, um anticorpo é referido como se liga especificamente a um antígeno quando a constante de dissociação for menor ou igual a cerca de 10 nM, de um modo mais preferido, quando a constante de dissociação for menor ou igual a cerca de 100 pM e, de um modo muito preferido, quando a constante de dissociação for menor ou igual a cerca de 10 pM.

O termo "identidade" refere-se a uma relação entre as sequências de duas ou mais moléculas polipeptídicas ou duas ou mais moléculas de ácidos nucleicos, como determinado por comparação das suas sequências. Na técnica, "identidade" também significa o grau de parecença de sequência entre moléculas de ácidos nucleicos ou polipéptidos, qualquer que seja o caso, como determinado pelo emparelhamento entre sequências de dois ou mais nucleótidos ou de dois ou mais aminoácidos. A "identidade" mede a percentagem de emparelhamentos idênticos entre as menores de duas ou mais sequências com alinhamentos de lacuna (se algum) definidos por um modelo matemático particular ou um programa de computador (*i. e.*, "algoritmos").

O termo "semelhança" é utilizado na técnica, relativamente a um conceito relacionado; ao contrário da "identidade", contudo, a "semelhança" refere-se a uma medida de parecença que inclui emparelhamentos idênticos e emparelhamentos de substituição conservadora. Se duas sequências polipeptídicas tiverem, por exemplo, 10/20 aminoácidos idênticos e os restantes forem todos substituições não conservadoras, então a percentagem de identidade e de semelhança de ambas seriam 50%. Se no mesmo exemplo, existirem mais cinco posições onde existem

substituições conservadoras, então a percentagem de identidade permanece 50%, mas a percentagem de semelhança seria 75% (15/20). Deste modo, nos casos em que existem substituições conservadoras, a percentagem de semelhança entre dois polipéptidos será mais alta do que a percentagem de identidade entre aqueles dois polipéptidos.

A identidade e a semelhança de ácidos nucleicos e polipéptidos relacionados podem ser prontamente calculadas por métodos conhecidos. Tais métodos incluem, mas não estão limitados a, aqueles descritos em *Computational Molecular Biology*, (Lesk, A.M., ed.), 1988, Oxford University Press, Nova Iorque; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, (Smith, D.W., ed.), 1993, Academic Press, Nova Iorque; *Computer Analysis of Sequence Data, Part 1*, (Griffffin, A.M., e Griffin, H.G., eds.), 1994, Humana Press, New Jersey; von Heinje, G., *Sequence Analysis in Molecular Biology*, 1987, Academic Press; *Sequence Analysis Primer*, (Gribskov, M. e Devereux, J., eds.), 1991, M. Stockton Press, Nova Iorque; Carillo *et al.*, 1988, *SIAM J. Applied Math.* 48:1073; and Durbin *et al.*, 1998, *Biological Sequence Analysis*, Cambridge University Press.

Os métodos preferidos para determinar a identidade são concebidos para produzir o maior emparelhamento entre as sequências testadas. Os métodos para determinar a identidade são descritos em programas de computador publicamente disponíveis. Os métodos de programas de computador preferidos para determinar a identidade entre duas sequências incluem, mas não estão limitados ao, pacote de programa GCG, incluindo GAP (Devereux *et al.*, 1984, *Nucl. Acid. Res.* 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), BLASTP, BLASTN e FASTA (Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410). O programa

BLASTX está publicamente disponível pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI) e outras fontes (*BLAST Manual*, Altschul *et al.* NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul *et al.*, 1990, *supra*). O algoritmo bem conhecido de Smith Waterman pode também ser utilizado para determinar a identidade.

Determinados esquemas de alinhamento para alinhar duas sequências de aminoácidos podem resultar no emparelhamento de apenas uma curta região das duas sequências, e esta pequena região alinhada pode ter uma identidade de sequência muito elevada, embora não exista uma relação significativa entre as duas sequências de tamanho total. Desta forma, em determinadas formas de realização, o método de alinhamento seleccionado (programa GAP) irá resultar num alinhamento que cobre, pelo menos, 50 aminoácidos contíguos do polipéptido alvo.

Por exemplo, utilizando o algoritmo computadorizado GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), dois polipéptidos para os quais a percentagem de identidade de sequência é para ser determinada, são alinhados para emparelhamento óptimo dos seus aminoácidos respectivos ("*matched span*", como determinado pelo algoritmo). Em determinadas formas de realização, uma penalidade da abertura de lacuna (que é calculada como três-vezes a diagonal média; onde a "diagonal média" é a média da diagonal da matriz de comparação utilizada; a "diagonal" é a contagem ou o número atribuído a cada emparelhamento de aminoácido perfeito pela matriz de comparação particular) e uma penalidade de extensão de lacuna (que é habitualmente um décimo da penalidade de abertura de lacuna), assim como uma matriz de comparação, tais como PAM250 ou BLOSUM 62, são utilizados em conjunto com o algoritmo. Em determinadas formas de realização, uma matriz de comparação padrão (ver Dayhoff *et al.*, 1978, Atlas of Protein Sequence and

Structure 5:345-352 para a matriz de comparação PAM 250; Henikoff *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci USA 89:10915-10919 para a matriz de comparação BLOSUM 62) é também utilizada pelo algoritmo.

Em determinadas formas de realização, os parâmetros para uma comparação de sequências polipeptídicas incluem o seguinte:

Algoritmo: Needleman *et al.* (1970), J. Mol. Biol.
48:443-453;

Matriz de comparação: BLOSUM 62 de Henikoff *et al.* (1992),
supra;

Penalidade de Lacuna: 12

Penalidade de Comprimento de Lacuna: 4

Limite de Semelhança: 0

O programa GAP pode ser útil com os parâmetros acima. Em determinadas formas de realização, os parâmetros acima mencionados são os parâmetros por defeito para comparações de polipéptidos (juntamente com a ausência de penalidade para lacunas finais) que utilizam o algoritmo GAP.

A expressão "ocorrência natural" como utilizada com referência a aminoácidos, refere-se aos vinte aminoácidos convencionais. Ver Immunology-A Synthesis, 2^a Edição, (E. S. Golub e D. R. Gren, eds.), Sinauer Associates: Sunderland, MA (1991)

Os análogos peptídicos são utilizados habitualmente na indústria farmacêutica como fármacos não peptídicos com propriedades análogas àsquelas do péptido molde. Estes tipos de compostos não peptídicos são denominados "miméticos peptídicos" ou "peptidomiméticos". Ver Fauchere (1986), Adv. Drug Res.

15:29; Veber & Freidinger, 1985, TINS p.392; e Evans *et al.* (1987), J. Med. Chem. 30:1229, os quais são aqui incorporados por referência para qualquer fim. Tais compostos são frequentemente desenvolvidos com a ajuda de modelação molecular computadorizada. Os miméticos peptídicos que são estruturalmente semelhantes a péptidos terapeuticamente úteis podem ser utilizados para produzir um efeito terapêutico ou profilático semelhante. Geralmente, os peptidomiméticos são estruturalmente semelhantes a um péptido ou polipéptido paradigma (*i. e.*, um péptido ou polipéptido que tem uma propriedade bioquímica ou actividade farmacológica), tal como um anticorpo humano, mas têm uma ou mais ligações peptídicas opcionalmente substituídas por uma ligação seleccionada de: $-\text{CH}_2\text{-NH-}$, $-\text{CH}_2\text{-S-}$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $-\text{CH=CH-}$ (*cis* e *trans*), $-\text{COCH}_2\text{-}$, $-\text{CH(OH)CH}_2\text{-}$ e $-\text{CH}_2\text{SO-}$, por métodos bem conhecidos na técnica. A substituição sistemática de um ou mais aminoácidos de uma sequência de consenso com um D-aminoácido do mesmo tipo (*e. g.*, D-lisina em vez de L-lisina) pode ser utilizada em determinadas formas de realização para produzir péptidos mais estáveis. Além disso, péptidos constrangidos compreendendo uma sequência de consenso ou uma variação substancialmente idêntica da sequência de consenso, podem ser produzidos por métodos conhecidos na técnica (Rizo & Gierasch, 1992, Ann. Rev. Biochem. 61:387); por exemplo, por adição de resíduos de cisteína internos capazes de formar pontes bissulfureto intramoleculares que ciclizam o péptido.

“Anticorpo” ou “péptido(s) de anticorpo” referem-se a um anticorpo intacto ou um seu fragmento de ligação que compete com o anticorpo intacto para ligação específica e inclui anticorpos quiméricos, humanizados, totalmente humanos e biespecíficos. Em determinadas formas de realização, os fragmentos de ligação são produzidos por técnicas de ADN recombinante. Em formas de realização adicionais, os fragmentos de ligação são produzidos

por clivagem enzimática ou química de anticorpos intactos. Os fragmentos de ligação incluem, mas não estão limitados a, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv e anticorpos de cadeia simples.

A expressão "cadeia pesada" inclui uma cadeia pesada de tamanho total e os seus fragmentos que têm sequência de região variável suficiente para conferir especificidade para IL-1R1. Uma cadeia pesada de tamanho total inclui um domínio de região variável, V_H , e três domínios de região constante, C_{H1} , C_{H2} e C_{H3} . O domínio V_H está no amino-terminal do polipéptido e o domínio C_{H3} está no carboxil-terminal.

A expressão "cadeia leve" inclui uma cadeia leve de tamanho total e os seus fragmentos que têm sequência de região variável suficiente para conferir especificidade para IL-1R1. Uma cadeia leve de tamanho total inclui um domínio de região variável, V_L , e um domínio de região constante, C_L . Como a cadeia pesada, o domínio da região variável da cadeia leve está no amino-terminal do polipéptido.

Um "fragmento Fab" é compreendido por uma cadeia leve, e C_{H1} e regiões variáveis de uma cadeia pesada. A cadeia pesada de uma molécula Fab não pode formar uma ligação bissulfureto com outra molécula de cadeia pesada.

Um "fragmento Fab'" contém uma cadeia leve e uma cadeia pesada que contém mais da região constante, entre os domínios C_{H1} e C_{H2} , de modo que uma ligação bissulfureto intercadeia seja formada entre as duas cadeias pesadas para formar uma molécula $F(ab')_2$.

Um "fragmento $F(ab')_2$ " contém duas cadeias leves e duas cadeias pesadas contendo uma porção da região constante entre os

domínios C_H1 e C_H2, de modo que uma ligação bissulfureto intercadeia seja formada entre duas cadeias pesadas.

A “região Fv” compreende as regiões variáveis das cadeias pesadas e leves, mas carece das regiões constantes.

“Anticorpos de cadeia simples” são moléculas Fv em que as regiões variáveis da cadeia leve e pesada foram ligadas através de um ligante flexível para formar uma única cadeia polipeptídica, a qual forma uma região de ligação a antígeno. Os anticorpos de cadeia simples são discutidos em detalhe na Publicação do Pedido de Patente Internacional N° WO 88/01649 e nas Patentes U.S. N° 4946778 e 5260203.

Um “anticorpo bivalente”, à exceção de um “anticorpo multiespecífico” ou “multifuncional”, em determinadas formas de realização, é entendido como compreendendo locais de ligação que têm especificidade antigénica idêntica.

Um anticorpo “biespecífico” ou “bifuncional” é um anticorpo híbrido que tem dois pares diferentes de cadeia pesada/leve e dois locais diferentes de ligação. Os anticorpos biespecíficos podem ser produzidos através de uma variedade de métodos incluindo, mas não limitados a, fusão de hibridomas ou ligação de fragmentos Fab'. Ver, e. g., Songsivilai & Lachmann (1990), Clin. Exp. Immunol. 79:315-321; Kostelny et al. (1992), J. Immunol. 148:1547-1553.

Na avaliação da ligação e especificidade do anticorpo, de acordo com a invenção, um anticorpo “inibe substancialmente” a adesão de um ligando a um receptor quando um excesso de anticorpo reduz a quantidade de receptor ligado ao contra-

receptor por, pelo menos, cerca de 20%, 40%, 60%, 80%, 85% ou mais (como medido num ensaio de ligação competitiva *in vitro*).

O termo "agente" significa um composto químico, uma mistura de compostos químicos, uma macromolécula biológica ou um extracto feito de materiais biológicos.

Os termos "marcador" ou "marcado", referem-se à incorporação de um marcador detectável, e. g., por incorporação de um aminoácido marcado radioactivamente ou ligação a um polipéptido de unidades de biotina que podem ser detectadas por avidina marcada (e. g., estreptavidina, de um modo preferido, compreendendo um marcador detectável, tais como um marcador fluorescente, um marcador quimioluminescente ou uma actividade enzimática que pode ser detectada por métodos ópticos ou colorimétricos). Em determinadas formas de realização, o marcador pode também ser terapêutico. Vários métodos de marcação de polipéptidos e glicoproteínas são conhecidos na técnica e podem ser utilizados vantajosamente nos métodos aqui divulgados. Os exemplos de marcadores para polipéptidos incluem, mas não estão limitados, aos seguintes: radioisótopos ou radionuclídeos (e. g., ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), marcadores fluorescentes (e. g., isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina ou lantanídeo fosforoso), marcadores enzimáticos (e. g., peroxidase de rábano, β -galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina), marcadores quimioluminescentes, marcadores de hapteno, tal como grupos biotinilo, e epitopos polipeptídicos predeterminados reconhecidos por um repórter secundário (e. g., sequências de par de fecho de leucina, locais de ligação para anticorpos secundários, domínios de ligação a metal, marcadores de epitopo). Em determinadas formas de realização, os marcadores são ligados por braços espaçadores (tal como $(\text{CH}_2)_n$, em que

n < cerca de 20) de vários comprimentos para reduzir o potencial impedimento estérico.

A expressão “amostra biológica” inclui, mas não está limitada a, qualquer quantidade de uma substância de um organismo vivo ou anteriormente organismo vivo. Tais organismos vivos incluem, mas não estão limitados a, humanos, murganhos, macacos, ratos, coelhos e outros animais. Tais substâncias incluem, mas não estão limitadas a, sangue, soro, urina, células, órgãos, tecidos, osso, medula óssea, linfa, nódulos linfáticos, tecido sinovial, condrócitos, macrófagos sinoviais, células endoteliais, tecido vascular (particularmente tecido vascular inflamado) e pele. As expressões “agente farmacêutico” e “fármaco” referem-se a um composto químico ou a uma composição capaz de induzir um efeito terapêutico desejado quando administrado correctamente a um doente

O termo “doente” inclui indivíduos humanos e animais.

Salvo requerido em contrário pelo contexto, os termos no singular incluem o plural e os termos no plural incluem o singular.

Aminoácidos

Os vinte aminoácidos de ocorrência natural e as suas abreviaturas seguem a utilização convencional. Ver Immunology - A Synthesis, 2ª Edição, (E. S. Golub e D. R. Gren, eds.), Sinauer Associates: Sunderland, MA (1991). Os estereoisómeros (e. g., D-aminoácidos) dos vinte aminoácidos convencionais, aminoácidos não naturais, tais como aminoácidos α -, α -disubstituídos, N-alkil-aminoácidos e outros aminoácidos

não convencionais podem também ser componentes adequados para polipéptidos da invenção. Os exemplos de aminoácidos não convencionais incluem: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetil-lisina, ϵ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metil-histidina, 5-hidroxilisina, σ -N-metilarginina e outros aminoácidos e iminoácidos semelhantes (e. g., 4-hidroxiprolina). Na notação dos polipéptidos aqui utilizada, o sentido para a esquerda é o sentido amino-terminal e o sentido para a direita é o sentido carboxi-terminal, de acordo com a utilização e convenção padrão.

De modo semelhante, salvo indicação em contrário, a extremidade esquerda de sequências polinucleotídicas de cadeia simples é a extremidade 5'; o sentido para a esquerda de sequências polinucleotídicas de cadeia dupla é referido como sentido 5'. O sentido da adição 5' para 3' de transcritos nascentes de ARN é referido como o sentido de transcrição; as regiões de sequência na cadeia de ADN que tem a mesma sequência que o transcrito de ARN que são de 5' para a extremidade 5' do transcrito de ARN são referidas como "sequências a montante"; as regiões de sequência na cadeia de ADN que têm a mesma sequência que o transcrito de ARN que são de 3' para a extremidade 3' do transcrito de ARN são referidas como "sequências a jusante".

Os resíduos de aminoácidos de ocorrência natural podem ser divididos em classes com base nas propriedades comuns da cadeia lateral:

- 1) hidrofóbicos: norleucina (Nor ou Nle), Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- 2) hidrofílicos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- 3) acídicos: Asp, Glu;
- 4) básicos: His, Lys, Arg;

- 5) resíduos que influenciam a orientação da cadeia: Gly, Pro; e
- 6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

As substituições conservadoras de aminoácidos podem envolver a troca de um membro de uma destas classes com outro membro da mesma classe. As substituições conservadoras de aminoácidos podem abranger os resíduos de aminoácidos de ocorrência não natural, que são tipicamente incorporados por síntese peptídica química em vez de síntese em sistemas biológicos. Estas incluem peptidomiméticos e outras formas reversas ou invertidas de unidades de aminoácidos.

As substituições não conservadoras podem envolver a troca de um membro de uma destas classes para um membro de outra classe. Tais resíduos substituídos podem ser introduzidos, por exemplo, em regiões de um anticorpo humano que são homólogas com anticorpos não humanos ou nas regiões não homólogas da molécula.

Fazendo tais alterações, de acordo com determinadas formas de realização, o índice hidropático de aminoácidos pode ser considerado. A cada aminoácido foi atribuído um índice hidropático com base nas suas características de hidrofobicidade e carga. Estes são: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptofano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); e arginina (-4,5).

A importância do índice hidropático de aminoácidos em conferir função biológica interactiva numa proteína é compreendido na técnica (ver, por exemplo, Kyte et al., 1982, J.

Mol. Biol. 157:105-131). É conhecido que determinados aminoácidos podem ser substituídos por outros aminoácidos que têm uma pontuação ou índice hidropático semelhante e ainda retêm uma actividade biológica semelhante. Ao fazer alterações com base no índice hidropático, em determinadas formas de realização, está incluída a substituição de aminoácidos cujos índices hidropáticos estão dentro de ± 2 . Em determinadas formas de realização, estão incluídos aqueles que estão dentro de ± 1 e, em determinadas formas de realização, estão incluídos aqueles dentro de $\pm 0,5$.

É também compreendido na técnica que a substituição de aminoácidos semelhantes pode ser feita eficazmente com base na hidrofiliicidade, particularmente nos casos em que o péptido ou proteína biologicamente funcional assim criado, é pretendido para utilização em formas de realização imunológicas, como aqui divulgado. Em determinadas formas de realização, a maior hidrofiliicidade média local de uma proteína, como governado pela hidrofiliicidade dos seus aminoácidos adjacentes, correlaciona-se com a sua imunogenicidade e antigenicidade, *i. e.*, com uma propriedade biológica da proteína.

Os seguintes valores de hidrofiliicidade foram atribuídos a estes resíduos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 $\pm$ 1); glutamato (+3,0 $\pm$ 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 $\pm$ 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5) e triptofano (-3,4). Ao fazer as alterações com base em valores de hidrofiliicidade semelhantes, em determinadas formas de realização, está incluída a substituição de aminoácidos cujos valores de hidrofiliicidade estão dentro de ± 2 , em determinadas

formas de realização, estão incluídos aqueles que estão dentro de ± 1 e, em determinadas formas de realização, estão incluídos aqueles dentro de $\pm 0,5$. Pode-se também identificar epitopos de sequências primárias de aminoácidos com base na hidrofiliidade. Estas regiões são também referidas como “regiões de núcleo epitópico”.

Substituições de aminoácidos exemplificativas são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1

Substituições de Aminoácidos		
Resíduos Originais	Substituições Exemplificativas	Substituições Preferidas
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, Ácido 1,4-Diamino-butírico, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr

(continuação)

Substituições de Aminoácidos		
Resíduos Originais	Substituições Exemplificativas	Substituições Preferidas
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina	Leu

Um especialista será capaz de determinar variantes adequadas de polipéptidos, como aqui apresentados, utilizando técnicas bem conhecidas. Em determinadas formas de realização, um especialista na técnica pode identificar áreas adequadas da molécula que podem ser alteradas sem destruir a actividade, por direccionamento a regiões que não se acredita que sejam importantes para a actividade. Noutras formas de realização, o especialista na técnica pode identificar resíduos e porções das moléculas que são conservadas entre polipéptidos semelhantes. Em formas de realização adicionais, mesmo áreas que podem ser importantes para a actividade biológica ou para a estrutura podem ser submetidas a substituições conservadoras de aminoácidos sem destruir a actividade biológica ou sem afectar de forma adversa a estrutura do polipéptido.

Adicionalmente, um especialista pode rever estudos de estrutura-função que identificam resíduos em polipéptidos semelhantes que são importantes para a actividade ou estrutura. Face a uma tal comparação, o especialista na técnica pode prever a importância de resíduos de aminoácidos numa proteína que corresponde a resíduos de aminoácidos importantes para a actividade ou estrutura em proteínas semelhantes. Um

especialista na técnica pode optar por substituições de aminoácidos quimicamente semelhantes para tais resíduos de aminoácidos importantes previstos.

Um especialista na técnica pode também analisar a estrutura tridimensional e a sequência de aminoácidos em relação a essa estrutura em polipéptidos semelhantes. Face a uma tal informação, um especialista na técnica pode prever o alinhamento de resíduos de aminoácidos de um anticorpo relativamente à sua estrutura tridimensional. Em determinadas formas de realização, um especialista na técnica pode escolher não fazer alterações radicais a resíduos de aminoácidos previstos como estando à superfície da proteína, uma vez que tais resíduos podem estar envolvidos em interacções importantes com outras moléculas. Além disso, um especialista na técnica pode preparar variantes de teste contendo uma única substituição de aminoácido em cada resíduo de aminoácido desejado. As variantes podem ser depois rastreadas utilizando ensaios de actividade conhecidos dos especialistas na técnica. Tais variantes podem ser utilizadas para recolher informação acerca de variantes adequadas. Por exemplo, se se verificar que uma alteração a um resíduo de aminoácido particular resultou em actividade destruída, indesejavelmente reduzida ou inadequada, as variantes com tal alteração podem ser evitadas. Por outras palavras, com base na informação recolhida a partir de tais experiências de rotina, um especialista na técnica pode determinar prontamente os aminoácidos onde as substituições adicionais devem ser evitadas, isoladamente ou em combinação com outras mutações.

Muitas publicações científicas foram dedicadas à previsão da estrutura secundária. Ver Moulton, 1996, Curr. Op. In Biotech. 7:422-427; Chou et al., 1974, Biochemistry 13:222-245; Chou et al., 1974, Biochemistry 113:211-222; Chou et al., 1978, Adv.

Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 47:45-148; Chou et al., 1979, Ann. Rev. Biochem. 47:251-276; e Chou et al., 1979, Biophys. J. 26:367-384. Além disso, estão actualmente disponíveis programas de computador para ajudar na previsão de estrutura secundária. Um método de prever a estrutura secundária é baseado em modelação de homologia. Por exemplo, dois polipéptidos ou proteínas que têm uma identidade de sequência superior a 30%, ou semelhança superior a 40% têm, frequentemente, topologias estruturais semelhantes. O recente crescimento da base de dados estrutural de proteínas (PDB) tem proporcionado predictabilidade aumentada de estrutura secundária, incluindo o número potencial de enrolamentos dentro de uma estrutura de polipéptido ou proteína. Ver Holm et al., 1999, Nucl. Acid. Res. 27:244-247. Foi sugerido (Brenner et al., 1997, Curr. Op. Struct. Biol. 7:369-376) existir um número limitado de enrolamentos num dado polipéptido ou proteína e, assim que um número crítico de estruturas tenha sido resolvido, a previsão estrutural tornar-se-ão dramaticamente mais exacto.

Métodos adicionais para prever a estrutura secundária incluem "threading" (Jones, 1997, Curr. Opin. Struct. Biol. 7:377-87; Sippl et al., 1996, Structure 4:15-19), "profile analysis" (Bowie et al., 1991, Science 253:164-170; Gribskov et al., 1990, Meth. Enzym. 183:146-159; Gribskov et al., 1987, Proc. Nat. Acad. Sci. 84:4355-4358) e "evolutionary linkage" (ver Holm, 1999, *supra*; e Brenner, 1997, *supra*).

Em determinadas formas de realização, as variantes de anticorpos incluem variantes de glicosilação, em que o número e/ou tipo de local de glicosilação foi alterado comparativamente às sequências de aminoácidos do polipéptido parental. Em determinadas formas de realização, as variantes proteicas compreendem um número maior ou menor de locais de glicosilação

N-ligados do que a proteína nativa. Um local de glicosilação N-ligado é caracterizado pela sequência: Asn-X-Ser ou Asn-X-Thr, em que o resíduo de aminoácido designado como X pode ser qualquer resíduo de aminoácido, excepto prolina. A substituição de resíduos de aminoácidos para criar esta sequência proporciona um novo local potencial para a adição de uma cadeia de hidrato de carbono N-ligada. Alternativamente, as substituições que eliminam esta sequência irão remover uma cadeia de hidrato de carbono N-ligada existente. É também proporcionado um rearranjo de cadeias de hidrato de carbono N-ligadas em que um ou mais locais de glicosilação N-ligados (tipicamente aqueles que são de ocorrência natural) são eliminados e são criados um ou mais novos locais N-ligados. As variantes de anticorpo preferidas adicionais incluem variantes de cisteína em que um ou mais resíduos da cisteína são suprimidos ou substituídos por outro aminoácido (e. g., serina) comparativamente à sequência de aminoácidos parental. As variantes de cisteína podem ser úteis quando os anticorpos têm que ser re-enrolados numa conformação biologicamente activa, tal como após o isolamento de corpos de inclusão insolúveis. As variantes de cisteína têm habitualmente menos resíduos de cisteína do que a proteína nativa e têm, tipicamente, um número par para minimizar interacções resultantes de cisteínas desemparelhadas.

De acordo com determinadas formas de realização, as substituições de aminoácidos são aquelas que: (1) reduzem a susceptibilidade à proteólise, (2) reduzem a susceptibilidade à oxidação, (3) alteram a afinidade de ligação para formar complexos proteicos, (4) alteram afinidades de ligação e/ou (5) conferem ou modificam outras propriedades físico-químicas ou funcionais em tais polipéptidos. De acordo com determinadas formas de realização, podem ser feitas substituições de aminoácidos simples ou múltiplas (em determinadas formas de

realização, substituições de aminoácidos conservadoras) na sequência de ocorrência natural (em determinadas formas de realização, na porção do polipéptido fora do(s) domínio(s) que formam contactos intermoleculares). Em formas de realização preferidas, uma substituição de aminoácido conservadora, tipicamente, não muda substancialmente as características estruturais da sequência parental (e. g., uma substituição de aminoácido não deve tender a quebrar uma hélice que ocorra na sequência parental, ou interromper outros tipos de estrutura secundária que caracterizam a sequência parental). Os exemplos de estruturas secundárias e terciárias polipeptídicas, reconhecidas na técnica são descritos em *Proteins, Structures and Molecular Principles*, (Creighton, ed.), 1984, W. H. Freeman and Company, Nova Iorque; *Introduction to Protein Structure* (C. Branden e J. Tooze, eds.), 1991, Garland Publishing, Nova Iorque, N.I.; e Thornton *et al.* (1991), *Nature* 354:105.

Preparação de Anticorpos

As unidades estruturais de anticorpos de ocorrência natural compreendem tipicamente um tetrâmero. Cada desses tetrâmeros é tipicamente composto de dois pares idênticos de cadeias polipeptídicas, cada par contendo uma cadeia “leve” de tamanho total (tendo tipicamente um peso molecular de cerca de 25 kDa) e uma cadeia “pesada” de tamanho total (tendo tipicamente um peso molecular de cerca de 50-70 kDa). A porção amino-terminal de cada cadeia inclui tipicamente uma região variável de cerca de 100 a 110 ou mais aminoácidos que é tipicamente responsável pelo reconhecimento antigénico. A porção carboxi-terminal de cada cadeia define tipicamente uma região constante responsável pela função efectora. As cadeias leves humanas são classificadas tipicamente como cadeias leves kapa e lambda. As cadeias pesadas

são classificadas tipicamente como mu, delta, gama, alfa ou épsilon, e definem o isotipo do anticorpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. A IgG tem diversas subclasses, incluindo, mas não limitadas a, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. A IgM tem subclasses incluindo, mas não limitadas a, IgM1 e IgM2. A IgA está, de modo semelhante, subdividida em subclasses incluindo, mas não limitadas a, IgA1 e IgA2. Dentro das cadeias leves e pesadas de tamanho total, tipicamente, uma região "J" de cerca de 12 ou mais aminoácidos liga a região variável e as regiões constantes, com a cadeia pesada a incluir também uma região "D" de cerca de mais 10 aminoácidos. Ver, e. g., *Fundamental Immunology*, Cap. 7, 2ª ed., (Paul, W., ed.), 1989, Raven Press, N.I. A combinação das regiões variáveis de cada par de cadeia leve/pesada forma tipicamente o local de ligação a antígeno.

As regiões variáveis de cada uma das cadeias pesadas e das cadeias leves apresentam tipicamente a mesma estrutura geral compreendendo quatro regiões estruturais relativamente conservadas (FR) ligadas por três regiões híper-variáveis, também denominadas regiões determinantes de complementaridade ou CDR. As CDR das duas cadeias de cada par são tipicamente alinhadas pelas regiões estruturais, cujo alinhamento pode permitir a ligação a um epitopo específico. Do N-terminal ao C-terminal, ambas as regiões variáveis da cadeia leve e pesada compreendem tipicamente os domínios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4. A atribuição de aminoácidos a cada domínio está tipicamente de acordo com as definições de Kabat *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (1987 e 1991, National Institutes of Health, Bethesda, Md.), Chothia & Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917, ou Chothia *et al.*, 1989, *Nature* 342:878-883).

Os anticorpos tornaram-se úteis e de interesse como agentes farmacêuticos com o desenvolvimento dos anticorpos monoclonais. Os anticorpos monoclonais são produzidos utilizando qualquer método que produza moléculas de anticorpo através de linhas celulares contínuas em cultura. Os exemplos de métodos adequados para preparar anticorpos monoclonais incluem os métodos de hibridoma de Kohler *et al.* (1975, *Nature* 256:495-497) e o método do hibridoma humano de células B (Kozbor, 1984, *J. Immunol.* 133:3001; e Brodeur *et al.*, 1987, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, (Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque), pp. 51-63).

Os anticorpos monoclonais podem ser modificados para utilização como agentes terapêuticos. Um exemplo é um anticorpo "quimérico" em que uma porção da cadeia pesada e/ou da cadeia leve é idêntica ou homóloga a uma sequência correspondente em anticorpos derivados de uma espécie particular ou pertencente a uma classe ou subclasse particular de anticorpos, enquanto a restante cadeia ou cadeias são idênticas ou homólogas a uma sequência correspondente em anticorpos derivados de outra espécie ou pertencente a uma outra classe ou subclasse de anticorpos. Outros exemplos são fragmentos de tais anticorpos, desde que apresentem a actividade biológica desejada. Ver, Patente U.S. N° 4816567; e Morrison *et al.* (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855. Um desenvolvimento relacionado é o anticorpo "enxertado a CDR", em que o anticorpo compreende uma ou mais regiões determinantes de complementaridade (CDR) de uma espécie particular ou pertencente a uma classe ou subclasse particular de anticorpo, enquanto a restante cadeia ou cadeias são idênticas ou homólogas a uma sequência correspondente em anticorpos derivados de outra espécie ou pertencente a uma outra classe ou subclasse de anticorpos.

Outro desenvolvimento é o anticorpo "humanizado". Os métodos para humanizar anticorpos não humanos são bem conhecidos na técnica (ver Patentes U.S. Nº 5585089 e 5693762). Geralmente, um anticorpo humanizado é produzido por um animal não humano, e depois determinados resíduos de aminoácidos, tipicamente de porções não reconhecedoras de antígeno do anticorpo, são modificados para serem homólogos aos referidos resíduos num anticorpo humano de isotipo correspondente. A humanização pode ser realizada, por exemplo, utilizando métodos descritos na técnica (Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321:522-525; Riechmann *et al.*, 1988, *Nature* 332:323-327; Verhoeyen *et al.*, 1988, *Science* 239:1534-1536), por substituição de, pelo menos, uma porção de uma região variável de roedor para as regiões correspondentes de um anticorpo humano.

É mais recente e mais promissor o desenvolvimento de anticorpos humanos sem exposição do antígeno a seres humanos ("anticorpos totalmente humanos"). Utilizando animais transgênicos (e. g., murganhos) que são capazes de produzir um repertório de anticorpos humanos na ausência da produção de imunoglobulinas endógenas de murganho, tais anticorpos são produzidos por imunização com um antígeno (tendo tipicamente, pelo menos, 6 aminoácidos contíguos), opcionalmente conjugado a um veículo. Ver, por exemplo, Jakobovits *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551-2555; Jakobovits *et al.*, 1993, *Nature* 362:255-258; e Bruggermann *et al.*, 1993, *Year in Immunol.* 7:33. Num exemplo destes métodos, os animais transgênicos são produzidos por incapacitação dos loci de imunoglobulina endógena de murganho que codificam as cadeias pesadas e leves de imunoglobulina de murganho, e introdução dos loci que codificam as proteínas da cadeia pesada e leve humanas no seu genoma. Os animais parcialmente modificados que têm menos do que o complemento total de modificações, são depois cruzados para

obter um animal que tem todas as modificações desejadas do sistema imune. Quando administrado um imunogénio, estes animais transgénicos produzem anticorpos que são imuno-específicos para estes antigénios que têm sequências de aminoácidos humanas (em vez de murino), incluindo regiões variáveis. Ver as Publicações PCT N° WO96/33735 e WO94/02602. Métodos adicionais são descritos na Patente U.S. N° 5545807, Publicações PCT N° WO91/10741, WO90/04036 e nos documentos EP 546073B1 e EP 546073A1. Os anticorpos humanos podem também ser produzidos através da expressão de ADN recombinante em célula hospedeiras ou através de expressão em células de hibridoma, como aqui descrito.

Os anticorpos totalmente humanos podem também ser produzidos a partir de bibliotecas de apresentação de fagos (como divulgado em Hoogenboom *et al.*, 1991, J. Mol. Biol. 227:381; e Marks *et al.*, 1991, J. Mol. Biol. 222:581). Estes processos mimetizam a selecção imune através da apresentação de repertórios de anticorpos na superfície de bacteriófagos filamentosos e subsequente selecção do fago pela sua ligação a um antigénio de escolha. Uma tal técnica é descrita na Publicação PCT N° WO99/10494 que descreve o isolamento de anticorpos agonísticos funcionais e de elevada afinidade para receptores MPL e MSK utilizando uma tal abordagem.

Uma vez determinadas as sequências de nucleótidos que codificam tais anticorpos, também podem ser produzidos anticorpos quiméricos, enxertados a CDR, humanizados e totalmente humanos por métodos recombinantes. Os ácidos nucleicos que codificam os anticorpos são introduzidos em células hospedeiras e expressos utilizando materiais e processos habitualmente conhecidos na técnica.

A invenção proporciona um ou mais anticorpos monoclonais totalmente humanos contra a IL-1R1 humana. De um modo preferido, os anticorpos ligam-se ao terceiro domínio de IL-1R1. Em formas de realização preferidas, a invenção proporciona sequências de nucleótidos que codificam, e sequências de aminoácidos compreendendo, moléculas de imunoglobulina de cadeia pesada e leve, particularmente sequências que correspondem às suas regiões variáveis. Em formas de realização preferidas, são proporcionadas sequências que correspondem às regiões determinantes de complementaridade (CDR), especificamente de CDR1 a CDR3. Em formas de realização preferidas adicionais, a invenção proporciona linhas celulares de hibridoma que expressam tais moléculas de imunoglobulina e anticorpos monoclonais daí produzidos, de um modo muito preferido, anticorpos monoclonais humanos purificados contra a IL-1R1 humana.

A capacidade para clonar e reconstruir loci humanos, com tamanho na ordem das megabase, em cromossomas artificiais de levedura (YAC) e para introduzir estes na linha germinal de murganho, proporcionam uma abordagem vantajosa para elucidar os componentes funcionais dos loci muito grandes ou mapeados de forma grosseira, assim como produzir modelos úteis de doença humana. Além disso, a utilização de tal tecnologia para substituição de loci de murganho com os seus equivalentes humanos proporciona conhecimentos únicos na expressão e regulação de produtos génicos humanos durante o desenvolvimento, a sua comunicação com outros sistemas e a sua participação na indução e progressão da doença.

Uma aplicação prática importante de tal estratégia é a "humanização" do sistema imune humoral de murganho. A introdução de loci de imunoglobulina (Ig) humana em murganhos, nos quais os genes de Ig endógenos foram inactivados, oferece a oportunidade

para estudar os mecanismos subjacentes à expressão programada e montagem de anticorpos, assim como o seu papel no desenvolvimento de células B. Além disso, tal estratégia proporciona uma fonte para a produção de anticorpos monoclonais (MAb) totalmente humanos, particularmente para utilização como agentes terapêuticos. É esperado que os anticorpos totalmente humanos minimizem as respostas imunogénicas e alérgicas intrínsecas a MAb de murganho ou derivados de murganho, e assim aumentem a eficácia e a segurança de anticorpos administrados em aplicações terapêuticas. Os anticorpos totalmente humanos podem ser utilizados no tratamento de doenças humanas crónicas e recorrentes, tais como osteodistrofia, artrite reumatóide e outros estados inflamatórios, cujo tratamento requer a administração repetida de anticorpos.

Um especialista na técnica pode manipular estirpes de murganho deficientes na produção de anticorpos de murganho, com grandes fragmentos dos loci de Ig humanos, de modo que tais murganhos produzam anticorpos humanos na ausência de anticorpos de murganho. Os grandes fragmentos de Ig humanos podem preservar a grande diversidade génica variável, assim como a regulação apropriada da produção e expressão de anticorpos. Ao explorar o organismo do murganho para a diversificação e selecção de anticorpos e a carência de tolerância imunológica para proteínas humanas, o repertório de anticorpos humanos reproduzido nestas estirpes de murganho produzem anticorpos de elevada afinidade contra qualquer antigénio de interesse, incluindo antigénios humanos. Utilizando a tecnologia de hibridoma, podem ser produzidos e seleccionados MAb humanos específicos de antigénio com a especificidade desejada.

Em determinadas formas de realização, o especialista na técnica pode utilizar regiões constantes de espécies que não a

humana, em conjunto com uma ou mais regiões variáveis humanas em tais murganhos para produzir anticorpos quiméricos. Os anticorpos da invenção podem ser produzidos por imunização de tais animais com IL-1R1 de tamanho total, formas solúveis de IL-1R1 ou um seu fragmento. Ver, Por exemplo, a Publicação do Pedido de Patente Internacional WO 93/12227).

As CDR das regiões variáveis da cadeia leve e pesada de anticorpos anti-IL-1R1 da invenção, podem ser enxertadas em regiões estruturais (FR) da mesma, ou de outras espécies. Em determinadas formas de realização, as CDR das regiões variáveis da cadeia leve e pesada de anticorpo anti-IL-1R1 podem ser enxertadas com FR de consenso. Para criar FR humanas de consenso, as FR de diversas sequências de aminoácidos da cadeia pesada ou da cadeia leve humanas são alinhadas para identificar uma sequência de aminoácidos de consenso. As FR da cadeia pesada ou da cadeia leve do anticorpo anti-IL-1R1 são substituídas com as FR de uma cadeia pesada ou cadeia leve diferente. Os aminoácidos raros nas FR das cadeias pesadas e leves do anticorpo anti-IL-1R1 são tipicamente não substituídos, enquanto o resto dos aminoácidos da FR podem ser substituídos. Os aminoácidos raros são aminoácidos específicos que estão em posições em que não são habitualmente encontrados em FR. As regiões variáveis enxertadas de anticorpos anti-IL-1R1 da invenção, podem ser utilizadas com uma região constante que seja diferente da região constante do anticorpo anti-IL-1R1. Alternativamente, as regiões variáveis enxertadas são parte de um anticorpo Fv de cadeia simples. O enxero de CDR é descrito, e. g., nas Patentes U.S. N° 6180370, 5693762, 5693761, 5585089 e 5530101.

Em determinadas formas de realização, a invenção proporciona anticorpos anti-IL1-R1 que compreendem uma região CDR1 de cadeia

pesada humana que tem uma sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 63; uma região CDR2 de cadeia pesada humana que tem uma sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 66; e/ou uma região CDR3 de cadeia pesada humana que tem uma sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 69.

Noutras formas de realização, a invenção proporciona anticorpos anti-IL1-R1 que compreendem uma região CDR1 de cadeia leve humana que tem uma sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 71; uma região CDR2 de cadeia pesada humana que tem uma sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 73; e/ou uma região CDR3 de cadeia pesada humana que tem uma sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 75.

Os anticorpos da invenção são preparados, de um modo preferido, utilizando murganhos transgênicos que têm uma porção substancial do locus humano produtor de anticorpos, introduzido em células produtoras de anticorpos de murganho e que são adicionalmente manipulados para serem deficientes na produção de anticorpos endógenos de murino. Tais murganhos são capazes de produzir anticorpos e moléculas de imunoglobulina humana e não produzir ou produzir quantidades substancialmente reduzidas de anticorpos e moléculas de imunoglobulina de murino. As tecnologias utilizadas para conseguir este resultado são divulgadas em patentes, pedidos e nas referências divulgadas nesta descrição. Em formas de realização preferidas, o especialista pode utilizar os métodos como divulgados na Publicação do Pedido de Patente Internacional N° WO 98/24893. Ver também Mendez *et al.*, 1997, Nature Genetics 15:146-156.

Os anticorpos monoclonais (MAb) da invenção podem ser produzidos através de uma variedade de técnicas, incluindo metodologia convencional de anticorpos monoclonais, *e. g.*, a

técnica de hibridação celular somática padrão de Kohler e Milstein, 1975, *Nature* 256:495. Embora os processos de hibridação celular somática sejam preferidos, em princípio, podem ser utilizadas outras técnicas para produzir anticorpos monoclonais, e.g., transformação viral ou oncogénica de linfócitos B.

Numa forma de realização preferida, os anticorpos monoclonais humanos dirigidos contra IL-1R1 podem ser produzidos utilizando murganhos referidos como murganhos "HuMab", os quais contêm um minilocus do gene da imunoglobulina humana que codifica sequências de imunoglobulina humana não rearranjadas da cadeia pesada (μ e γ) e da cadeia leve κ , em conjunto com mutações dirigidas que inactivam os loci endógenos da cadeia μ e κ . Lonberg et al., 1994, *Nature* 368:856-859. Desta forma, os murganhos apresentam uma expressão reduzida de IgM ou κ de murganho e, em resposta à imunização, os transgenes da cadeia pesada e leve humanas introduzidos sofrem permuta de classe e mutação somática para produzir anticorpos monoclonais de IgG κ humano de elevada afinidade. Lonberg et al., *supra*; Lonberg e Huszar, 1995, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93; Harding e Lonberg, 1995, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546. A preparação de murganhos HuMab é descrita em detalhe em Taylor et al., 1992, *Nucleic Acids Res.* 20:6287-6295; Chen et al., 1993, *International Immunology* 5:647-656; Tuailon et al., 1994, *J. Immunol.* 152:2912-2920; Lonberg et al., 1994, *Nature* 368:856-859; Lonberg, 1994, *Handbook of Exp. Pharmacology* 113:49-101; Taylor et al., 1994, *International Immunology* 6:579-591; Lonberg & Huszar, 1995, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93; Harding & Lonberg, 1995, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546; Fishwild et al., 1996, *Nature Biotechnology* 14:845-851. Ver ainda Patentes U.S. N° 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5789650; 5877397; 5661016; 5814318; 5874299; e

5770429; todas de Lonberg e Kay, assim como a Patente U.S. N° 5545807 de Surani *et al.*; Publicação do Pedido de Patente Internacional N° WO 93/1227, publicado em 24 de Junho de 1993; WO 92/22646, publicado em 23 de Dezembro de 1992; e WO 92/03918, publicado em 19 de Março de 1992. Alternativamente, as estirpes de murganhos transgênicos HCo7 e HCo12 descritas nos Exemplos abaixo podem ser utilizadas para produzir anticorpos anti-IL-1R1 humana.

Vantajosamente, os anticorpos monoclonais totalmente humanos específicos para IL-1R1 são produzidos como se segue. Murganhos transgênicos contendo genes da imunoglobulina humana são imunizados com o antígeno relacionado com a IL-1R1 de interesse. São obtidas células linfáticas (tal como células B) do murganho que expressam anticorpos. Tais células recuperadas são fundidas com uma linha celular de tipo mielóide para preparar linhas celulares de hibridoma imortalizadas e tais linhas celulares de hibridoma são rastreadas e seleccionadas para identificar as linhas celulares de hibridoma que produzem anticorpos específicos para o antígeno de interesse. Em determinadas formas de realização, é proporcionada a produção de uma linha celular de hibridoma que produz os anticorpos específicos para IL-1R1.

Em formas de realização preferidas, os anticorpos da invenção são produzidos por linhas de hibridoma. Nestas formas de realização, os anticorpos da invenção ligam-se a IL-1R1 com uma constante de dissociação (K_d) entre, aproximadamente, 4 pM e 100 pM. Em determinadas formas de realização da invenção, os anticorpos ligam-se a IL-1R1 com uma K_d menor do que cerca de 20 pM. Noutras formas de realização, os anticorpos da invenção ligam-se ao terceiro domínio de IL-1R1. As sequências de

aminoácidos e de nucleótidos do terceiro domínio da IL1-R1 de humano e rato são mostradas na Figura 17.

Em formas de realização preferidas, os anticorpos da invenção são do isotipo IgG1, IgG2 ou IgG4, sendo o isotipo IgG2 o mais preferido. Em formas de realização preferidas da invenção, os anticorpos compreendem uma cadeia leve kapa humana e uma cadeia pesada humana de IgG1, IgG2 ou IgG4. Em formas de realização particulares, as regiões variáveis dos anticorpos são ligadas a uma região constante, diferente da região constante para o isotipo IgG1, IgG2 ou IgG4. Em determinadas formas de realização, os anticorpos da invenção foram clonados para expressão em células de mamífero.

Em determinadas formas de realização, as substituições conservadoras de aminoácidos para as cadeias pesadas e leves do anticorpo anti-IL-1R1 (e as modificações correspondentes nos nucleótidos codificantes) produzirão anticorpos anti-IL-1R1 que têm características funcionais e químicas semelhantes àsquelas do anticorpo anti-IL-1R1. Pelo contrário, as modificações substanciais nas características funcionais e/ou químicas do anticorpo anti-IL-1R1 podem ser realizadas através da selecção de substituições na sequência de aminoácidos das cadeias pesadas e leves que diferem significativamente no seu efeito em manter (a) a estrutura do esqueleto molecular na área da substituição, por exemplo, como uma conformação em folha ou helicoidal, (b) a carga ou hidrofobicidade da molécula no local alvo, ou (c) o volume da cadeia lateral.

Por exemplo, uma “substituição conservadora de aminoácidos” pode envolver uma substituição de um resíduo de aminoácido nativo com um resíduo não nativo, de modo que exista pouco ou nenhum efeito na polaridade ou carga do resíduo de aminoácido

nessa posição. Além disso, qualquer resíduo nativo no polipéptido pode também ser substituído com alanina, como foi previamente descrito para a “mutagênese de varrimento de alanina” (Wells, 1991, *Methods Enzymol.* 202:390 (ed. J.J. Langone), Academic Press, Londres).

As substituições de aminoácidos desejadas (sejam conservadoras ou não conservadoras) podem ser determinadas pelos especialistas na técnica no momento em que tais substituições são desejadas. Em determinadas formas de realização, as substituições de aminoácidos podem ser utilizadas para identificar resíduos importantes do anticorpo anti-IL-1R1 ou para aumentar ou diminuir a afinidade dos anticorpos anti-IL-1R1 aqui descritos.

Em formas de realização alternativas, os anticorpos da invenção podem ser expressos em linhas celulares com exceção de linhas celulares de hibridoma. Nestas formas de realização, as sequências que codificam anticorpos particulares podem ser utilizadas para transformação de uma célula hospedeira de mamífero adequada. De acordo com estas formas de realização, a transformação pode ser realizada utilizando qualquer método conhecido para introduzir polinucleótidos numa célula hospedeira, incluindo, por exemplo, o empacotamento do polinucleótido num vírus (ou num vector viral) e a transdução de uma célula hospedeira com o vírus (ou vector) ou por processos de transfecção conhecidos na técnica. Tais processos são exemplificados nas Pat. U.S. N° 4399216, 4912040, 4740461 e 4959455. Geralmente, o processo de transformação utilizado pode depender do hospedeiro a ser transformado. Os métodos para introduzir polinucleótidos heterólogos em células de mamífero são bem conhecidos na técnica e incluem, mas não estão limitados a, transfecção mediada por dextrano, precipitação com fosfato de

cálcio, transfecção mediada por polibreno, fusão de protoplastos, electroporação, encapsulação do(s) polinucleótido(s) em lipossomas e microinjecção directa do ADN em núcleos.

De acordo com determinadas formas de realização dos métodos da invenção, uma molécula de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos de uma região constante de cadeia pesada, de uma região variável de cadeia pesada, de uma região constante de cadeia leve ou de uma região variável de cadeia leve de um anticorpo IL-1R1 da invenção, é introduzida num vector de expressão apropriado utilizando técnicas padrão de ligação. Numa forma de realização preferida, a região constante de cadeia pesada ou leve de IL-1R1 é adicionada ao C-terminal da região variável apropriada e é ligada num vector de expressão. O vector é tipicamente seleccionado para ser funcional numa célula hospedeira particular a utilizar (*i. e.*, o vector é compatível com o sistema da célula hospedeira, de modo que possa ocorrer a amplificação do gene e/ou a expressão do gene). Para uma revisão de vectores da expressão, ver, Goeddel (ed.), 1990, Meth. Enzymol. Vol. 185, Academic Press, N.I.

Tipicamente, os vectores da expressão utilizados em qualquer das células hospedeiras conterão sequências para a manutenção do plasmídeo e para a clonagem e expressão de sequência de nucleótidos exógena. Tais sequências, colectivamente referidas como “sequências flanqueadoras” em determinadas formas de realização, incluirão, tipicamente, uma ou mais das seguintes sequências de nucleótidos: um promotor, uma ou mais sequências intensificadoras, uma origem de replicação, uma sequência de terminação transcripcional, uma sequência completa de intrão contendo um local dador e aceitador de *splice*, uma sequência que codifica uma sequência líder para a secreção de polipéptido, um

local de ligação a ribossoma, uma sequência de poliadenilação, uma região poliligante para introduzir o ácido nucleico que codifica o polipéptido a ser expresso e um elemento marcador de selecção. Cada destas sequências é discutida abaixo.

Opcionalmente, o vector pode conter uma sequência que codifica um “marcador”, *i. e.*, uma molécula oligonucleotídica localizada na extremidade 5' ou 3' da sequência codificante do polipéptido de IL-1R1; a sequência oligonucleotídica codifica poli-His (tal como hexa-His) ou um outro “marcador”, tais como FLAG, HA (hemaglutinina do vírus da gripe) ou *myc* para o qual existem anticorpos comercialmente disponíveis. Este marcador é tipicamente fundido ao polipéptido após expressão do polipéptido e pode servir como meio para purificação de afinidade ou detecção do anticorpo IL-1R1 a partir da célula hospedeira. A purificação de afinidade pode ser realizada, por exemplo, por cromatografia em coluna utilizando anticorpos contra o marcador como uma matriz de afinidade. Opcionalmente, o marcador pode ser subsequentemente, removido do polipéptido IL-1R1 purificado por vários meios, tal como utilizando determinadas peptidases para clivagem.

As sequências flanqueadoras podem ser homólogas (*i. e.*, da mesma espécie e/ou estirpe que a célula hospedeira), heterólogas (*i. e.*, de uma espécie diferente da espécie ou estirpe da célula hospedeira), híbridas (*i. e.*, uma combinação de sequências flanqueadoras de mais do que uma fonte), sintéticas ou nativas. Como tal, a fonte de uma sequência flanqueadora pode ser qualquer organismo procariótico ou eucariótico, qualquer organismo vertebrado ou invertebrado, ou qualquer planta, desde que a sequência flanqueadora seja funcional no sistema da célula hospedeira e possa ser activada pela mesma.

As sequências flanqueadoras úteis nos vectores desta invenção podem ser obtidas por quaisquer de vários métodos bem conhecidos na técnica. Tipicamente, as sequências flanqueadoras úteis aqui, terão sido previamente identificadas por mapeamento e/ou digestão de restrição com endonucleases e podem ser assim isoladas da fonte de tecido apropriada, utilizando as endonucleases de restrição apropriadas. Em alguns casos, a sequência de nucleótidos total de uma sequência flanqueadora pode ser conhecida. Aqui, a sequência flanqueadora pode ser sintetizada utilizando os métodos aqui descritos para a síntese ou clonagem de ácidos nucleicos.

Nos casos em que toda ou apenas uma porção da sequência flanqueadora é conhecida, esta pode ser obtida utilizando a reacção em cadeia da polimerase (PCR) e/ou por rastreamento de uma biblioteca genómica com uma sonda adequada, tais como um oligonucleótido e/ou um fragmento de sequência flanqueadora da mesma ou de outra espécie. Nos casos em que a sequência flanqueadora não é conhecida, um fragmento de ADN contendo uma sequência flanqueadora pode ser isolado de um pedaço de ADN maior que possa conter, por exemplo, uma sequência codificante ou mesmo outro gene ou genes. O isolamento pode ser realizado por digestão com endonucleases de restrição para produzir o fragmento de ADN apropriado, seguida por isolamento utilizando purificação em gel de agarose, cromatografia em coluna Qiagen® (Chatsworth, CA) ou outros métodos conhecidos do especialista na técnica. A selecção de enzimas adequadas para realizar este objectivo será prontamente evidente a um técnico com conhecimento geral na matéria.

Uma origem de replicação é tipicamente uma parte daqueles vectores de expressão procarióticos adquiridos comercialmente, e a origem ajuda na amplificação do vector numa célula hospedeira.

Se o vector de escolha não contiver um local de origem de replicação, esta pode ser quimicamente sintetizada com base numa sequência conhecida e ligada no vector. Por exemplo, a origem de replicação do plasmídeo pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) é adequada para a maioria das bactérias Gram-negativas e várias origens virais (e. g., SV40, políoma, adenovírus, vírus da estomatite vesicular (VSV) ou papilomavírus, tais como HPV ou BPV) são úteis para vectores de clonagem em células de mamífero. Geralmente, o componente de origem de replicação não é necessário para vectores de expressão em mamíferos (por exemplo, a origem SV40 é frequentemente utilizada apenas porque também contém o promotor precoce do vírus).

Uma sequência de terminação de transcrição está tipicamente localizada a 3' da extremidade de uma região codificante de polipéptido e serve para terminar a transcrição. Geralmente, uma sequência de terminação de transcrição em células procarióticas é um fragmento rico em G-C, seguido por uma sequência poli-T. Embora a sequência seja facilmente clonada a partir de uma biblioteca ou mesmo adquirida comercialmente como parte de um vector, esta pode também ser prontamente sintetizada utilizando métodos para a síntese de ácidos nucleicos, tal como aqueles aqui descritos.

Um gene marcador de selecção codifica uma proteína necessária para a sobrevivência e crescimento de uma célula hospedeira, cultivada num meio de cultura selectivo. Os genes marcadores de selecção típicos codificam proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou outras toxinas, e. g., ampicilina, tetraciclina ou canamicina para células hospedeiras procarióticas; (b) complementem deficiências auxotróficas da célula; ou (c) fornecem nutrientes críticos não disponíveis a partir de meios complexos ou definidos. Os marcadores de

selecção preferidos, são o gene de resistência à canamicina, o gene de resistência à ampicilina e o gene de resistência à tetraciclina. Um gene de resistência à neomicina pode também ser utilizado para a selecção em células hospedeiras procarióticas e eucarióticas.

Outros genes de selecção podem ser utilizados para amplificar o gene que será expresso. A amplificação é o processo em que os genes que têm grande procura para a produção de uma proteína crítica para crescimento ou sobrevivência celular, são reiterados habitualmente em tandem dentro dos cromossomas de gerações sucessivas de células recombinantes. Os exemplos de marcadores de selecção adequados para células de mamífero incluem, a di-hidrofolato redutase (DHFR) e a timidina cinase sem promotor. Os transformantes de células de mamífero são colocados sob pressão de selecção em que apenas os transformantes estão excepcionalmente adaptados para sobreviver devido ao gene de selecção presente no vector. A pressão de selecção é imposta através do cultivo das células transformadas sob condições em que a concentração do agente de selecção no meio está sucessivamente aumentada, conduzindo assim à amplificação do gene de selecção e ao ADN que codifica outro gene, tal como o polipéptido IL-1R1 compreendendo o vector. Como resultado, as quantidades aumentadas de um polipéptido, tal como o polipéptido IL-1R1, são sintetizadas a partir do ADN amplificado.

Um local de ligação a ribossoma é habitualmente necessário para a iniciação da tradução do ARNm e é caracterizado por uma sequência de Shine-Dalgarno (procariotas) ou uma sequência de Kozak (eucariotas). O elemento é tipicamente localizado a 3' do promotor e a 5' da sequência codificante do polipéptido a ser expresso.

Em alguns casos, tais como quando a glicosilação é desejada num sistema de expressão de célula hospedeira eucariótica, pode-se manipular as várias pré- ou pro-sequências para melhorar a glicosilação ou o rendimento. Por exemplo, pode-se alterar o local de clivagem da peptidase de um péptido sinal particular, ou adicionar pro-sequências que podem também afectar a glicosilação. O produto proteico final pode ter, na posição -1 (relativamente ao primeiro aminoácido da proteína madura) um ou mais incidentes de aminoácidos adicionais para a expressão, que podem não ter sido totalmente removidos. Por exemplo, o produto proteico final pode ter um ou dois resíduos de aminoácidos encontrados no local de clivagem da peptidase, ligados ao amino-terminal. Alternativamente, a utilização de alguns locais de clivagem enzimática pode resultar numa forma ligeiramente truncada do polipéptido desejado, se a enzima cortar em tal área no polipéptido maduro.

Os vectores de expressão e clonagem da invenção conterão tipicamente um promotor que é reconhecido pelo organismo hospedeiro e operativamente ligado à molécula que codifica o anticorpo anti-IL-1R1. Os promotores são sequências não transcritas localizadas a montante (*i. e.*, 5') do codão de iniciação de um gene estrutural (habitualmente dentro de cerca de 100 a 1000 pb) que controlam a transcrição do gene estrutural. Os promotores são convencionalmente agrupados em uma de duas classes: promotores indutíveis e promotores constitutivos. Os promotores indutíveis iniciam níveis aumentados de transcrição a partir de ADN sob o seu controlo, em resposta a alguma alteração nas condições de cultura, tais como a presença ou ausência de um nutriente ou uma alteração na temperatura. Os promotores constitutivos, por outro lado, iniciam produção contínua de produto génico; isto é, existe pouco ou nenhum controlo sobre a expressão génica. É bem

conhecido um grande número de promotores, reconhecidos por uma variedade de potenciais células hospedeiras. Um promotor adequado está operativamente ligado ao ADN que codifica a cadeia pesada ou a cadeia leve, compreendendo um anticorpo anti-IL-1R1 da invenção por remoção do promotor da fonte de ADN por digestão com enzimas de restrição e introdução da sequência promotora desejada no vector.

Os promotores adequados para a utilização com hospedeiros de levedura são também bem conhecidos na técnica. Os intensificadores de levedura são vantajosamente utilizados com promotores de levedura. Os promotores adequados para utilização com células hospedeiras de mamífero são bem conhecidos e incluem, mas não estão limitados àqueles obtidos a partir dos genomas de vírus, tais como vírus polioma, vírus da difteria aviária, adenovírus (tal como adenovírus 2), vírus do papiloma bovino, vírus do sarcoma aviário, citomegalovírus, retrovírus, vírus da hepatite-B e, de um modo muito preferido, Vírus Símio 40 (SV40). Outros promotores adequados de mamífero incluem promotores heterólogos de mamífero, por exemplo, promotores de choque térmico e o promotor de actina.

Promotores adicionais que podem ter interesse incluem, mas não estão limitados a: a região promotora precoce de SV40 (Bernoist e Chambon, 1981, *Nature* 290:304-10); o promotor CMV; o promotor contido na longa repetição do terminal 3' do vírus do sarcoma de Rous (Yamamoto *et al.*, 1980, *Cell* 22:787-97); o promotor da timidina cinase de herpes (Wagner *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1444-45); as sequências reguladoras do gene da metalotionina (Brinster *et al.*, 1982, *Nature* 296:39-42); vectores de expressão procarióticos, tal como o promotor da beta-lactamase (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3727-31); ou o promotor tac (DeBoer

et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:21-25). Também de interesse são as seguintes regiões de controlo transcripcional de animal, as quais apresentam especificidade de tecido e foram utilizadas em animais transgénicos: a região de controlo do gene I da elastase que está activo em células acinares pancreáticas (Swift *et al.*, 1984, *Cell* 38:639-46; Ornitz *et al.*, 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409 (1986); MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); a região de controlo do gene da insulina que está activo em células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-22); a região de controlo do gene da imunoglobulina que está activo em célula linfóides (Grosschedl *et al.*, 1984, *Cell* 38:647-58; Adames *et al.*, 1985, *Nature* 318:533-38; Alexander *et al.*, 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-44); a região de controlo do vírus do tumor mamário de murganho que está activo em células testiculares, mamárias, linfóides e mastócitos (Leder *et al.*, 1986, *Cell* 45:485-95); a região de controlo do gene da albumina que está activo no fígado (Pinkert *et al.*, 1987, *Genes e Devel.* 1:268-76); a região de controlo do gene da alfa-feto-proteína que está activo no fígado (Krumlauf *et al.*, 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-48; Hammer *et al.*, 1987, *Science* 235:53-58); a região de controlo do gene da alfa 1-antitripsina que está activo no fígado (Kelsey *et al.*, 1987, *Genes e Devel.* 1:161-71); a região de controlo do gene da beta-globina que está activo em célula mielóides (Mogram *et al.*, 1985, *Nature* 315:338-40; Kollias *et al.*, 1986, *Cell* 46:89-94); a região de controlo do gene da proteína básica de mielina que está activo em células oligodendrócitas no cérebro (Readhead *et al.*, 1987, *Cell* 48:703-12); a região de controlo do gene da cadeia-2 leve da miosina que está activo no músculo-esquelético (Sani, 1985, *Nature* 314:283-86); e a região de controlo do gene da hormona libertadora de gonadotrofina que está activo no hipotálamo (Mason *et al.*, 1986, *Science* 234:1372-78).

Uma sequência intensificadora pode ser introduzida no vector para aumentar a transcrição do ADN que codifica a cadeia leve ou a cadeia pesada, compreendendo um anticorpo anti-IL-1R1 da invenção, por eucariotas superiores. Os intensificadores são elementos de actuação cis de ADN, habitualmente com cerca de 10-300 pb de comprimento que actuam no promotor para aumentar a transcrição. Os intensificadores são relativamente independentes quanto à orientação e posição. Têm sido encontrados a 5' e 3' da unidade de transcrição. São conhecidas diversas sequências intensificadoras disponíveis a partir de genes de mamífero (e. g., globina, elastase, albumina, alfa-feto-proteína e insulina). Tipicamente, contudo, é utilizado um intensificador de um vírus. O intensificador SV40, o intensificador do promotor precoce de citomegalovírus, o intensificador de políoma e intensificadores de adenovírus conhecidos na técnica, são elementos intensificadores exemplificativos para a activação de promotores eucarióticos. Embora um intensificador possa sofrer *splice* no vector a uma posição 5' ou 3' de uma molécula de ácido nucleico, está tipicamente localizado num local a 5' do promotor.

Os vectores de expressão da invenção podem ser construídos a partir de um vector inicial, tal como um vector comercialmente disponível. Tais vectores podem ou não conter todas as sequências flanqueadoras desejadas. Nos casos em que uma ou mais das sequências flanqueadoras aqui descritas não estão ainda presentes no vector, estas podem ser obtidas individualmente e ligadas no vector. Os métodos utilizados para obter cada das sequências flanqueadoras são bem conhecidos de um especialista na técnica.

Depois o vector ter sido construído e uma molécula de ácido nucleico que codifica a cadeia leve ou a cadeia pesada compreendendo um anticorpo anti-IL-1R1 ter sido introduzida no local apropriado do vector, o vector completo pode ser introduzido numa célula hospedeira adequada para amplificação e/ou expressão do polipéptido. A transformação de um vector de expressão para um anticorpo anti-IL-1R1 numa célula hospedeira seleccionada pode ser realizada por métodos bem conhecidos incluindo transfecção, infecção, co-precipitação com fosfato de cálcio, electroporação, microinjecção, lipofecção, transfecção mediada por DEAE-dextrano ou outras técnicas conhecidas. O método seleccionado será em parte uma função do tipo de célula hospedeira a ser utilizada. Estes métodos e outros métodos adequados são bem conhecidos do especialista na técnica, e são apresentados, por exemplo, em Sambrook *et al.*, *supra*.

A célula hospedeira, quando cultivada sob condições apropriadas, sintetiza um anticorpo anti-IL-1R1 que pode ser subsequentemente recolhido do meio de cultura (se a célula hospedeira segregar para o meio) ou directamente a partir da célula hospedeira que o produz (se não for segregado). A selecção de uma célula hospedeira apropriada dependerá de vários factores, tais como níveis desejados de expressão, modificações do polipéptido que são desejáveis ou necessárias para a actividade (tais como glicosilação ou fosforilação) e a facilidade de se enrolar numa molécula biologicamente activa.

As linhas celulares de mamífero disponíveis como hospedeiras para a expressão são bem conhecidas na técnica e incluem, mas não estão limitadas a, muitas linhas celulares imortalizadas disponíveis a partir da American Type Culture Collection (A.T.C.C.), incluindo mas não limitadas, às células de ovário de hamster Chinês (CHO), células HeLa, células de rim de cria de

hamster (BHK), células de rim de macaco (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (e. g., Hep G2) e uma variedade de outras linhas celulares. Em determinadas formas de realização, pode-se seleccionar linhas celulares por determinação de quais linhas celulares têm níveis elevados de expressão e produzem anticorpos com propriedades de ligação a IL-1R1 constitutivas. Noutra forma de realização, pode-se seleccionar uma linha celular a partir da linhagem de células B que não produz os seus próprios anticorpos, mas tem a capacidade para produzir e segregar um anticorpo heterólogo (e. g., linhas celulares NS0 e SP2/0 de mieloma de murganho).

Os anticorpos da invenção são úteis para detectar IL-1R1 em amostras biológicas e na identificação de células ou tecidos que produzem a proteína IL-1R1. Os referidos anticorpos que se ligam a IL-1R1 e bloqueiam a interacção com outros compostos de ligação, têm utilização terapêutica na modulação de doenças mediadas por IL-1. Em formas de realização preferidas, os anticorpos para IL-1R1 podem bloquear a ligação de IL-1R1 a IL-1 β ou IL-1 α , o que pode resultar na interrupção da cascata de transdução de sinal de IL-1.

Os anticorpos da invenção que se ligam especificamente a IL-1R1 podem ser úteis no tratamento de doenças mediadas por IL-1, como discutidas abaixo. Os referidos anticorpos podem ser utilizados em ensaios de ligação para detectar a ligação de IL-1R1 e a sua capacidade para inibir IL-1R1 de formar um complexo com IL-1 β e com a proteína acessória IL-1R (IL-1RAcP) ou com IL-1 α e IL-1RAcP.

Em determinadas formas de realização, a invenção proporciona métodos para tratar distúrbios médicos associados com reacções inflamatórias mediadas por IL-1 ou reacções imunorreguladoras

mediadas por IL-1. Os métodos da invenção incluem a administração de um anticorpo anti-IL1R1 da invenção a um indivíduo que sofra de uma doença inflamatória ou imunorreguladora que seja mediada por IL-1. Como aqui utilizadas, os termos “efermidade”, “doença”, “estado patológico” ou “estado anómalo” são utilizadas indiscriminadamente com a expressão “distúrbio médico”.

Numa forma de realização particular, os métodos da invenção envolvem a administração a um doente de um anticorpo anti-IL-1R1 da invenção, para prevenir assim a ligação de IL-1 a seu receptor de superfície celular (IL-1R1).

Para tratar um distúrbio médico caracterizado por expressão anómala ou excessiva de IL-1 ou sinalização anómala ou excessiva de IL-1, uma molécula compreendendo um anticorpo para IL-1R de tipo I desta invenção é administrada ao doente numa quantidade e duração suficiente para induzir uma melhoria sustida em, pelo menos, um indicador que reflecte a gravidade do distúrbio. Uma melhoria é considerada “sustida” se o doente apresentar a melhoria em, pelo menos, duas ocasiões separadas por uma a quatro semanas. O grau de melhoria é determinado com base em sinais ou sintomas, e pode também utilizar questionários que são colocados ao doente, tal como questionários de qualidade-de-vida.

Os vários indicadores que reflectem a extensão da doença do doente podem ser avaliados para determinar se a quantidade e duração do tratamento são suficientes. O valor de linha de base para o indicador ou indicadores escolhidos é estabelecido por examinação do doente antes da administração da primeira dose do anticorpo. De um modo preferido, a examinação da linha de base é feita no período de cerca de 60 dias da administração da

primeira dose. Se o anticorpo de IL-1R for administrado para tratar sintomas agudos, tal como, por exemplo, para tratar lesões traumáticas (lesão traumática do joelho, acidente vascular cerebral, lesão da cabeça, etc.), a primeira dose é administrada assim que praticavelmente possível, após a lesão ou o evento ter ocorrido.

A melhoria é induzida por administração repetitiva de uma dose de anticorpo até o doente manifestar uma melhoria face à linha de base, para o indicador ou indicadores escolhidos. No tratamento de estados crónicos, este grau de melhoria é obtido por administração repetitiva deste medicamento durante um período de, pelo menos, um mês ou mais, e. g., durante um, dois, ou três meses ou mais, ou indefinidamente. Um período de uma a seis semanas, ou mesmo uma única dose, são frequentemente suficientes para tratar estados agudos.

Embora o grau de enfermidade do doente após tratamento possa parecer melhorado de acordo com um ou mais indicadores, o tratamento pode ser continuado indefinidamente ao mesmo nível ou numa dose ou frequência reduzida. Uma vez reduzido ou interrompido o tratamento, este pode mais tarde ser recommençado ao nível original, se os sintomas reaparecerem.

Qualquer via de administração eficaz pode ser utilizada para administrar terapeuticamente o anticorpo. O anticorpo pode ser injectado por via intra-articular, intravenosa, intramuscular, intralesão, intraperitoneal, intracraniana, inalação ou injeção subcutânea de bolus ou por infusão contínua. Por exemplo, as doenças pulmonares podem envolver métodos intranasais e de inalação. Outros meios adequados de administração incluem libertação sustida a partir de implantes, inalação de aerossóis, colírios, preparações orais, incluindo pilulas, xaropes,

pastilhas ou pastilha elástica, e preparações tópicas, tais como loções, géis, pulverizadores, unguentos ou outras técnicas adequadas. A administração por inalação é particularmente benéfica no tratamento de doenças associadas com distúrbios pulmonares.

Numa forma de realização da invenção, um anticorpo anti-IL-1R1 da invenção pode ser administrado uma vez por mês. Noutra forma de realização, o anticorpo é administrado uma vez de duas em duas semanas ou uma vez por semana para tratar os vários distúrbios médicos aqui divulgados. Ainda noutra forma de realização, o anticorpo é administrado, pelo menos, duas vezes por semana e numa outra forma de realização é administrado, pelo menos, uma vez por dia. Um doente adulto é uma pessoa que tem 18 anos de idade ou mais. Se injectada, a quantidade eficaz, por dose de adulto, varia desde 1-200 mg/m² ou desde 1-40 mg/m² ou cerca de 5-25 mg/m². Alternativamente, uma dose fixa pode ser administrada, cuja quantidade possa variar desde 2-400 mg/dose, 2-100 mg/dose ou desde cerca de 10-80 mg/dose. Se a dose for para ser administrada mais do que uma vez por semana, uma gama de dosagem exemplificativa é a mesma como as gamas de dosagem descritas anteriormente ou inferior. Numa forma de realização da invenção, as várias indicações descritas abaixo são tratadas por administração de uma preparação aceitável para injeção contendo anticorpo para o receptor de IL-1 a 80-100 mg/dose ou, alternativamente, contendo 80 mg por dose. A dose é administrada repetidamente. Se for utilizada uma via de administração diferente de injeção, a dose é ajustada, apropriadamente, de acordo com práticas médicas convencionais. Por exemplo, se a via de administração for por inalação, a dosagem pode ser uma a sete vezes por semana a gamas de dose desde 10 mg/dose a 50 mg por dose.

Em formas de realização preferidas, a invenção também proporciona composições farmacêuticas compreendendo uma quantidade terapêuticamente eficaz de um ou mais anticorpos da invenção em conjunto com um diluente, veículo, solubilizante, emulsionante, conservante e/ou adjuvante farmacêuticamente aceitáveis. De um modo preferido, os materiais de formulação aceitáveis são não tóxicos para os receptores nas dosagens e concentrações utilizadas. Em formas de realização preferidas, são proporcionadas composições farmacêuticas compreendendo uma quantidade terapêuticamente eficaz de anticorpos anti-IL-1R1.

Em determinadas formas de realização, a composição farmacêutica pode conter materiais de formulação para modificar, manter ou preservar, por exemplo, o pH, osmolaridade, viscosidade, limpidez, cor, isotonicidade, odor, esterilidade, estabilidade, taxa de dissolução ou libertação, adsorção ou penetração da composição. Em tais formas de realização, os materiais de formulação adequados incluem, mas não estão limitados a, aminoácidos (tais como glicina, glutamina, asparagina, arginina ou lisina); antimicrobianos; antioxidantes (tais como ácido ascórbico, sulfito de sódio ou hidrogenossulfito de sódio); tampões (tais como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos ou outros ácidos orgânicos); agentes de volume (tais como manitol ou glicina); agentes quelantes (tal como ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA)); agentes de complexação (tais como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina ou hidroxipropil-beta-ciclodextrina); enchimentos; monossacáridos; dissacáridos; e outros hidratos de carbono (tais como glucose, manose ou dextrinas); proteínas (tais como albumina, gelatina ou imunoglobulinas séricas); corantes, aromatizantes e agentes de diluição; agentes emulsionantes; polímeros hidrofílicos (tal como polivinilpirrolidona); polipéptidos de baixo peso

molecular; contra-íões formadores de sal (tal como sódio); conservantes (tais como cloreto de benzalcónio, ácido benzóico, ácido salicílico, timerosal, álcool feniletílico, metilparabeno, propilparabeno, cloro-hexidina, ácido sórbico ou peróxido de hidrogénio); solventes (tais como glicerina, propilenoglicol ou polietilenoglicol); álcoois de açúcar (tais como manitol ou sorbitol); agentes de suspensão; agentes tensioactivos ou agentes molhantes (tais como pluronics, PEG, ésteres de sorbitano, polissorbatos, tais como polissorbato 20, polissorbato 80, triton, trimetamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes estabilizantes (tais como sacarose ou sorbitol); agentes aumentadores de tonicidade (tais como halogenetos de metal alcalino, de um modo preferido, cloreto de sódio ou potássio, manitol, sorbitol); veículos de distribuição; diluentes; excipientes e/ou adjuvantes farmacêuticos. Ver, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edição, (A.R Gennaro, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

Em determinadas formas de realização, a composição farmacêutica óptima será determinada por um especialista na técnica dependendo, por exemplo, da via de administração pretendida, formato de distribuição e dosagem desejada. Ver, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*. Em determinadas formas de realização, tais composições podem influenciar o estado físico, estabilidade, taxa de libertação *in vivo* e taxa de eliminação *in vivo* dos anticorpos da invenção.

Em determinadas formas de realização, o veículo ou transportador primário numa composição farmacêutica pode ser de natureza aquosa ou não aquosa. Por exemplo, um veículo ou transportador adequado podem ser água para injeção, solução salina fisiológica ou fluido cefalorraquidiano artificial, possivelmente suplementados com outros materiais comuns em

composições para administração parentérica. Soro fisiológico tamponado a pH neutro ou soro fisiológico misturado com albumina sérica são veículos exemplificativos adicionais. Em formas de realização preferidas, as composições farmacêuticas compreendem tampão Tris de cerca de pH 7,0-8,5, ou tampão acetato de cerca de pH 4,0-5,5, e podem ainda incluir sorbitol ou um seu substituto adequado. Em determinadas formas de realização da invenção, as composições de anticorpo anti-IL-1R1 podem ser preparadas para armazenamento por mistura da composição seleccionada que tem o grau de pureza desejado com agentes de formulação opcionais (Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*) na forma de um bolo liofilizado ou de uma solução aquosa. Além disso, em determinadas formas de realização, o produto de anticorpo anti-IL-1R1 pode ser formulado como um liofilizado utilizando excipientes apropriados, tal como sacarose.

As composições farmacêuticas da invenção podem ser seleccionadas para distribuição parentérica. As composições podem ser seleccionadas para inalação ou para distribuição através do tracto digestivo, tal como oralmente. A preparação de tais composições farmacêuticamente aceitáveis está dentro da especialidade da técnica.

Os componentes de formulação estão presentes, de um modo preferido, em concentrações que são aceitáveis ao local de administração. Em determinadas formas de realização, são utilizados tampões para manter a composição a pH fisiológico ou a um pH ligeiramente mais baixo, tipicamente dentro de uma gama de pH desde cerca de 5 a cerca de 8.

Quando a administração parentérica está contemplada, as composições terapêuticas para utilização nesta invenção podem ser proporcionadas na forma de uma solução aquosa apirógena,

parentericamente aceitável, compreendendo o anticorpo anti-IL-1R1 desejado num veículo farmacêuticamente aceitável. Um veículo particularmente adequado para injeção parentérica é água destilada estéril em que o anticorpo anti-IL-1R1 é formulado como uma solução isotónica estéril, correctamente conservada. Em determinadas formas de realização, a formulação pode envolver a preparação da molécula desejada com um agente, tais como microesferas injectáveis, partículas bioerodíveis, compostos poliméricos (tais como ácido poliláctico ou ácido poliglicólico), esferas ou lipossomas, as quais podem proporcionar libertação controlada ou sustida do produto que pode ser distribuído através de injeção de depot. Em determinadas formas de realização, o ácido hialurónico pode também ser utilizado, o qual tem o efeito de promover a duração sustida na circulação. Em determinadas formas de realização, podem ser utilizados dispositivos implantáveis de distribuição de fármaco para introduzir a molécula de anticorpo desejada.

As composições farmacêuticas da invenção podem ser formuladas para inalação. Nestas formas de realização, os anticorpos anti-IL-1R1 são formulados como um pó seco para inalação. Em formas de realização preferidas, podem também ser formuladas soluções de inalação de anticorpo anti-IL-1R1 com um propulsor para distribuição do aerossol. Em determinadas formas de realização, as soluções podem ser nebulizadas. A administração pulmonar e os seus métodos de formulação são ainda descritos na Publicação da Patente Internacional N° WO94/20069, que descreve a distribuição pulmonar de proteínas quimicamente modificadas.

Está também contemplado que as formulações podem ser administradas oralmente. Os anticorpos Anti-IL-1R1 que são administrados desta forma, podem ser formulados com ou sem

veículos habitualmente utilizados na preparação de formas de dosagem sólida, tais como comprimidos e cápsulas. Em determinadas formas de realização, uma cápsula pode ser concebida para libertar a parte activa da formulação no tracto gastrointestinal quando a biodisponibilidade é maximizada e a degradação pré-sistémica é minimizada. Podem ser incluídos agentes adicionais para facilitar a absorção do anticorpo anti-IL-1R1. Podem também ser utilizados diluentes, aromatizantes, ceras de baixo ponto de fusão, óleos vegetais, lubrificantes, agentes de suspensão, agentes de desintegração de comprimido e aglutinantes.

Uma composição farmacêutica da invenção é, de um modo preferido, proporcionada de modo a compreender uma quantidade eficaz de uma ou mais anticorpos anti-IL-1R1 numa mistura com excipientes não tóxicos que são adequados para o fabrico de comprimidos. Ao dissolver os comprimidos em água estéril, ou noutro veículo apropriado, as soluções podem ser preparadas na forma de dose unitária. Os excipientes adequados incluem, mas não estão limitados a, diluentes inertes, tais como carbonato de cálcio, carbonato ou bicarbonato de sódio, lactose ou fosfato de cálcio; ou agentes de ligação, tais como amido, gelatina ou acácia; ou agentes lubrificantes, tais como estearato de magnésio, ácido esteárico ou talco.

Composições farmacêuticas adicionais serão evidentes aos especialistas na técnica, incluindo formulações que envolvem anticorpos anti-IL-1R1 em formulações de distribuição sustida ou controlada. As técnicas para formular uma variedade de outros meios de distribuição sustida ou controlada, tais como transportadores lipossomais, micropartículas bioerodíveis ou esferas porosas e injeções de depot, são também conhecidas dos especialistas na técnica. Ver, por exemplo, Publicação da

Patente Internacional N° WO93/15722 que descreve a libertação controlada de micropartículas poliméricas porosas para a distribuição de composições farmacêuticas. As preparações de libertação sustida podem incluir matrizes poliméricas semi-permeáveis na forma de artigos com forma, e. g., películas ou microcápsulas. As matrizes de libertação sustida podem incluir poliésteres, hidrogéis, polilactidas (como divulgadas na Patente U.S. N° 3773919 e na Publicação do Pedido de Patente Europeia N° EP 058481), copolímeros de ácido L-glutâmico e gama-etil-L-glutamato (Sidman *et al.*, 1983, *Biopolymers* 22:547-556), poli(2-hidroxietil-metacrilato) (Langer *et al.*, 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277 e Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12:98-105), acetato de viniletileno (Langer *et al.*, *supra*) ou ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (Publicação do Pedido de Patente Europeia N° EP 133988). As composições de libertação sustida podem também incluir lipossomas que podem ser preparados por qualquer um de vários métodos conhecidos na técnica. Ver, e. g., Eppstein *et al.*, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688-3692; Publicações do Pedido de Patente Europeia N° EP 036676; EP 088046 e EP 143949.

As composições farmacêuticas utilizadas para administração *in vivo* são tipicamente proporcionadas como preparações estéreis. A esterilização pode ser realizada por filtração através de membranas de filtração estéreis. Quando a composição é liofilizada, a esterilização utilizando este método pode ser realizada antes ou depois da liofilização e reconstituição. As composições para administração parentérica podem ser armazenadas em forma liofilizada ou numa solução. As composições parentéricas são habitualmente colocadas num recipiente que tem um ponto de acesso estéril, por exemplo, um saco ou frasquinho de solução intravenosa que tem uma tampa perfurável por uma agulha hipodérmica de injeção.

Uma vez formulada a composição farmacêutica, esta pode ser armazenada em frascinhos estéreis como uma solução, suspensão, gel, emulsão, sólido ou como um pó desidratado ou liofilizado. Tais formulações podem ser armazenadas numa forma pronta a utilizar ou numa forma (e. g., liofilizada) que é reconstituída antes da administração.

A invenção também proporciona kits para produzir uma unidade de administração de dose única. Os kits da invenção podem, cada, um conter um primeiro recipiente que tem uma proteína desidratada e um segundo recipiente que tem uma formulação aquosa. Em determinadas formas de realização desta invenção, são proporcionados kits contendo seringas pré-cheias de câmara única a multicâmara (e. g., seringas com líquidos e seringas com liofilizados).

A quantidade eficaz de uma composição farmacêutica contendo anticorpo anti-IL-1R1 a ser utilizada terapeuticamente depende, por exemplo, do contexto terapêutico e dos objectivos. Um especialista na técnica entenderá que os níveis apropriados de dosagem para o tratamento irão variar dependendo, em parte, da molécula distribuída, da indicação para o qual o anticorpo anti-IL-1R1 está a ser utilizado, da via de administração e do tamanho (peso corporal, superfície corporal ou tamanho do órgão) e/ou estado do doente (idade e saúde geral). Em determinadas formas de realização, o clínico assistente pode titular a dosagem e modificar a via de administração para obter o efeito terapêutico óptimo. Uma dosagem típica pode variar desde cerca de 0,1 µg/kg até cerca de 100 mg/kg ou mais, dependendo dos factores acima mencionados. Em formas de realização preferidas, a dosagem pode variar desde 0,1 µg/kg até cerca de 100 mg/kg; de um modo mais preferido, desde 1 µg/kg até cerca de 100 mg/kg; ou

de um modo ainda mais preferido, desde 5 µg/kg até cerca de 100 mg/kg.

A frequência de dosagem irá depender dos parâmetros farmacocinéticos do anticorpo anti-IL-1R1 particular na formulação utilizada. Tipicamente, um clínico assistente administra a composição até ser alcançada uma dosagem que consiga o efeito desejado. A composição pode assim ser administrada como uma dose única, ou como duas ou mais doses (que pode ou não conter a mesma quantidade da molécula desejada) ao longo do tempo, ou como uma infusão contínua através de um dispositivo implantado ou um cateter. Refinamentos adicionais da dosagem apropriada são feitos rotineiramente pelos técnicos com conhecimento geral na matéria e está dentro do âmbito das tarefas realizadas rotineiramente pelos mesmos. As dosagens apropriadas podem ser verificadas através da utilização de dados de resposta à dose apropriados.

A via de administração da composição farmacêutica é de acordo com métodos conhecidos, e. g., oralmente, através de injeção por via intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intra-parenquimal), intracerebroventricular, intramuscular, intra-ocular, intra-arterial, intraportal ou intralesão; sistemas de libertação sustida ou através de dispositivos de implantação. Em determinadas formas de realização, as composições podem ser administradas por injeção de bolus ou continuamente por infusão, ou por implantação de dispositivo.

A composição pode também ser administrada localmente através de implantação de uma membrana, esponja ou outro material apropriado sobre o qual a molécula desejada foi absorvida ou encapsulada. Em determinadas formas de realização, quando é utilizado um dispositivo de implantação, o dispositivo pode ser

implantado em qualquer tecido ou órgão adequado e a distribuição da molécula desejada pode ser através de difusão, bolus de libertação temporizada ou administração contínua.

Também pode ser desejável utilizar composições farmacêuticas do anticorpo anti-IL-1R1 de acordo com a invenção *ex vivo*. Em tais casos, as células, tecidos ou órgãos que foram removidos do doente são expostos às composições farmacêuticas de anticorpo anti-IL-1R1 após o que as células, tecidos e/ou órgãos são, subsequentemente, implantados de volta ao doente.

Em particular, os anticorpos anti-IL-1R1 podem ser distribuídos por implantação de determinadas células que foram manipuladas geneticamente, utilizando métodos como aqueles aqui descritos, para expressar e segregar o polipéptido. Em determinadas formas de realização, tais células podem ser células animais ou humanas, e podem ser autólogas, heterólogas ou xenogénicas. Em determinadas formas de realização, as células podem ser imortalizadas. Noutras formas de realização, de modo a diminuir a possibilidade de uma resposta imunológica, as células podem ser encapsuladas para evitar a infiltração de tecidos circundantes. Em formas de realização adicionais, os materiais de encapsulação são tipicamente membranas ou invólucros poliméricos semi-permeáveis biocompatíveis que permitem a libertação de um ou mais produtos proteicos, mas previnem a destruição das células pelo sistema imune do doente ou por outros factores prejudiciais dos tecidos circundantes.

Em determinadas formas de realização, a invenção abrange ainda a administração de um anticorpo anti-IL-1R1 ou de uma composição farmacêutica da invenção simultaneamente com um ou mais outros fármacos que são administrados ao mesmo doente, sendo cada fármaco administrado de acordo com um regime adequado

para esse medicamento. Isto abrange pré-tratamento, tratamento simultâneo, tratamento sequencial e regimes alternantes. Os exemplos de tais fármacos incluem, mas não estão limitados a, antivirais, antibióticos, analgésicos, corticosteróides, antagonistas de citocinas inflamatórias, fármacos anti-reumáticos modificadores da doença (DMARD) e anti-inflamatórios não esteróides.

Noutras formas de realização, um anticorpo anti-IL-1R1 ou uma composição farmacêutica da invenção pode ser administrado em combinação com outros inibidores de citocinas, incluindo aqueles que antagonizam, por exemplo, RANKL, $TGF\beta$, $IFN\gamma$, IL-6 ou IL-8 e TNF, particularmente $TNF\alpha$. Em combinação com IL-6, um anticorpo deste invenção pode ser utilizado para tratar e prevenir a recorrência de convulsões, incluindo convulsões induzidas por antagonismo do receptor $GABA_A$, convulsões associadas com episódios ictais de EEG e convulsões límbicas motoras que ocorrem durante o estado epiléptico. Em combinação com um inibidor de $IFN\gamma$, um anticorpo desta invenção é útil no tratamento de fibrose pulmonar idiopática e fibrose cística. A combinação de um anticorpo do receptor de IL-1 e de inibidores RANKL, *e. g.*, um anticorpo RANKL é útil para prevenir a destruição óssea em vários cenários incluindo, mas não limitado a, vários distúrbios reumáticos, osteoporose, mieloma múltiplo ou outras malignidades que causam degeneração óssea, ou terapia antitumoral com vista a prevenir metástases ósseas, ou destruição óssea associada com detritos do desgaste de próteses ou com periodontite. Além disso, os anticorpos da invenção podem ser administrados em combinação com inibidores de IL-17, tal como formas solúveis de um receptor de IL-17 (tal como IL-17R:Fc) ou um anticorpo de IL-17 ou um anticorpo de IL-17R, proteína de ligação a IL-18, formas solúveis de receptores de

IL-18 e anticorpos de IL-18, anticorpos contra receptores de IL-18 ou anticorpos contra o ligando de CD30 ou contra CD4.

A invenção abrange ainda métodos para utilizar um anticorpo anti-IL1R1 ou uma composição farmacêutica da invenção no tratamento dos distúrbios médicos aqui divulgados em combinação com um inibidor de TNF, de um modo preferido, TNFR:Fc (ENBREL®) e qualquer combinação de citocinas ou inibidores de citocinas descritos acima que são agentes activos em terapias de combinação. Por exemplo, de acordo com a presente invenção, podem ser utilizados métodos de terapia de combinação para tratar a artrite reumatóide, acidente vascular cerebral, asma, psoríase, etc.

Os estados tratados eficazmente por um anticorpo anti-IL-1R1 ou composição farmacêutica aqui descrita, incluem doenças pulmonares, tais como asma, doença pulmonar obstrutiva crónica, proteinose alveolar pulmonar, fibrose e pneumopatia induzida por bleomicina, fibrose pulmonar induzida por radiação, fibrose cística, acumulação de colagénio nos pulmões e ARDS, todas as quais podem ser tratadas com combinações de um anticorpo de IL-1R e um inibidor de IL-4 e/ou um inibidor de IL-13, e. g., anticorpo do IL-4R que inibe a actividade de IL-13 e IL-4. Os anticorpos e as composições farmacêuticas divulgadas da invenção são também úteis para tratar displasia bronco-pulmonar (BPD); doenças pulmonares obstrutivas crónicas (e. g., enfisema e bronquite crónica) e doença pulmonar fibrótica crónica de bebés prematuros. Além disso, os compostos, composições e terapias de combinação da invenção são utilizados para tratar doenças pulmonares ocupacionais, incluindo asbestose, pneumoconiose do mineiro de carvão, silicose ou estados semelhantes associados com a exposição a longo prazo a partículas finas. Noutros aspectos da invenção, os compostos, composições e terapias de

combinação divulgados são utilizados para tratar bronquiolite obliterante com pneumonia organizada, fibrose pulmonar incluindo fibrose pulmonar idiopática e fibrose pulmonar induzida por radiação; sarcoidose pulmonar; e alergias, incluindo rinite alérgica, dermatite de contacto, dermatite atópica e asma.

Tais combinações são úteis também para tratar doentes que sofrem de vários distúrbios da pele, incluindo mas não limitados a, dermatite herpetiforme (doença de Duhring), dermatite atópica, dermatite de contacto, urticária (incluindo urticária idiopática crónica) e doenças bolhosas auto-imunes, incluindo pênfigo vulgar e penfigóide bolhoso. Outras doenças tratáveis com a combinação de um anticorpo de IL-1R e IL-4 e/ou um inibidor de IL-13 incluem miastenia grave, sarcoidose, incluindo sarcoidose pulmonar, escleroderma, artrite reactiva, síndrome de IgE hyper, esclerose múltipla e síndrome hipereosinofílica idiopática. A combinação é utilizada também para tratar reacções alérgicas a medicação e como um adjuvante para imunoterapia de alergia.

Os anticorpos do receptor de IL-1 e as composições farmacêuticas aqui descritas são úteis para tratar doenças protozoárias, incluindo malária e esquistossomose e para tratar eritema nodoso leproso; meningite bacteriana ou viral; tuberculose, incluindo tuberculose pulmonar; e pneumonite secundária a uma infecção bacteriana ou viral, incluindo infecção com influenza e mononucleose infecciosa.

Os distúrbios e lesões cardiovasculares são tratáveis e/ou preveníveis com as composições farmacêuticas ou os anticorpos anti-IL1-R1 divulgadas, isoladamente ou em combinação com outros inibidores de citocinas. Os distúrbios cardiovasculares tratáveis incluem aneurismas aórticos; incluindo aneurismas

aórticos abdominais, síndrome coronária aguda, arterite; oclusão vascular, incluindo oclusão da artéria cerebral; complicações de cirurgia de bypass coronário; lesão de isquemia/reperfusão; doença cardíaca, incluindo doença cardíaca aterosclerótica, miocardite, incluindo miocardite auto-imune crônica e miocardite viral; insuficiência cardíaca, incluindo insuficiência cardíaca crônica, insuficiência cardíaca congestiva, caquexia de insuficiência cardíaca; enfarte do miocárdio; restenose e/ou aterosclerose após cirurgia cardíaca ou após processos de angioplastia de balão da artéria carótida; isquemia do miocárdio silenciosa; disfunção ventricular esquerda, complicações pós-implantação de dispositivos de assistência ventricular esquerda; Fenómenos de Raynaud; tromboflebite; vasculite, incluindo vasculite de Kawasaki; doença veno-oclusiva, arterite de células gigante, granulomatose de Wegener; confusão mental após cirurgia de bypass cardiopulmonar e púrpura de Schoenlein-Henoch.

Em determinadas formas de realização, os anticorpos anti-IL-1R1 e as composições farmacêuticas da invenção podem ser também utilizados para tratar estados crônicos de dor, tal como dor pélvica crônica, incluindo síndrome de dor prostatite/pélvica crônica e dor pós-herpética.

Os distúrbios do sistema endócrino incluindo diabetes com início na juventude (inclui diabetes mellitus auto-imune e tipos de diabetes dependentes de insulina) e diabetes de maturidade (inclui diabetes não dependente de insulina e mediada por obesidade) podem também ser tratados com anticorpos anti-IL-1R1 ou composições farmacêuticas da invenção. Tal tratamento a estados secundários associados com diabetes, tais como retinopatia diabética, rejeição de transplante renal em doentes diabéticos, resistência à insulina mediada por obesidade e

insuficiência renal, a qual pode estar associada com proteinúria e hipertensão. Outros distúrbios endócrinos são também tratáveis com estes compostos e incluem a doença do ovário policístico, adrenoleucodistrofia ligada ao cromossoma X, hipotireoidismo e tireoidite, incluindo tireoidite de Hashimoto (*i. e.*, tireoidite auto-imune), disfunção da célula tiroideia, incluindo síndrome do doente eutireóideo.

Os estados do sistema gastrointestinal são tratáveis ou preveníveis com anticorpos anti-IL-1R1 ou composições farmacêuticas da invenção, isoladamente ou em combinação com outros agentes terapêuticos. Estes estados incluem doença celíaca, doença de Crohn; colite ulcerosa; gastroparesia idiopática; pancreatite, incluindo pancreatite crônica; pancreatite aguda, doença inflamatória intestinal e úlceras, incluindo úlceras gástricas e do duodeno.

Os distúrbios do sistema genito-urinário são também tratáveis ou preveníveis com anticorpos anti-IL-1R1 ou composições farmacêuticas aqui descritas. Tais distúrbios incluem glomerulonefrite, incluindo glomerulonefrite auto-imune, glomerulonefrite devido a exposição a toxinas ou glomerulonefrite secundária a infecções com estreptococos hemolíticos ou outros agentes infecciosos. Também tratáveis com os compostos, composições e terapias de combinação da invenção ser a síndrome urêmica e as suas complicações clínicas (por exemplo, insuficiência renal, anemia e cardiomiopatia hipertrófica), incluindo síndrome urêmica associada com exposição a toxinas, fármacos ou outras causas ambientais. As complicações de inflamação que surgem da parede da bexiga que conduzem à alteração na função de absorção, são tratáveis ou preveníveis com os anticorpos desta invenção. Estão incluídas em tais complicações a colelitíase (cálculo biliar) e a

coledocolitíase (pedras do ducto biliar) e a recorrência de colelitíase e coledocolitíase. Estados adicionais tratáveis com os compostos, composições e terapias de combinação da invenção são complicações de hemodiálise; estados da próstata, incluindo hipertrofia benigna da próstata, prostatite não bacteriana e prostatite crónica; e complicações de hemodiálise.

São também aqui proporcionados métodos para utilizar anticorpos anti-IL-1R1 da invenção, composições e terapias de combinação para tratar vários distúrbios hematológicos e oncológicos. Por exemplo, os anticorpos anti-IL-1R1, isoladamente ou em combinação com outros inibidores de citocinas ou outros agentes activos como acima descritos, podem ser utilizado para tratar várias formas de cancro, incluindo leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, carcinoma nasofaríngeo positivo ao vírus de Epstein-Barr, glioma, cancros do cólon, estômago, próstata, célula renal, do colo do útero e do ovário, cancro do pulmão (SCLC e NSCLC), incluindo caquexia, fadiga, astenia associados ao cancro, síndrome paraneoplásica da caquexia e hipercalcemia. Tumores sólidos, incluindo sarcoma, osteossarcoma e carcinoma, tal como adenocarcinoma (por exemplo, cancro da mama) e carcinoma de células escamosas são também tratáveis. Os cancros tratáveis adicionais incluem cancro do esófago, cancro gástrico, carcinoma da bexiga, leucemia, incluindo leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia mielóide, leucemia linfoblástica crónica ou aguda e leucemia de células pilosas. Outras malignidades com potencial metastático invasivo, incluindo mieloma múltiplo, podem ser tratadas com os compostos, composições e terapias de combinação em causa.

Além disso, os anticorpos anti-IL-1R1 divulgados podem ser utilizados para tratar anemias e distúrbios hematológicos,

incluindo neutropenia idiopática crónica, anemia de doença crónica, anemia aplásica, incluindo anemia aplásica de Fanconi; púrpura trombocitopénica idiopática (ITP); púrpura trombocitopénica trombótica, síndromes mielodisplásicas (incluindo anemia refractária, anemia refractária com sideroblastos em anel, anemia refractária com excesso de blastos, anemia refractária com excesso de blastos em transformação); metaplasia de mielofibrose/mielóide; e crise vaso oclusiva de células falciformes.

Vários distúrbios linfoproliferativos são também tratáveis com anticorpos anti-IL-1R1 da invenção, incluindo síndrome linfoproliferativa auto-imune (ALPS), leucemia linfoblástica crónica, leucemia das células pilosas, leucemia linfática crónica, linfoma de células T periféricas, linfoma linfocítico pequeno, linfoma da célula do manto, linfoma folicular, linfoma de Burkitt, linfoma de células T positivo ao vírus Epstein-Barr, linfoma histiocítico, doença de Hodgkin, linfoma agressivo difuso, leucemias linfáticas agudas, doença linfoproliferativa T gama, linfoma cutâneo de células B, linfoma cutâneo de células T (*i. e.*, micose fungóide) e síndrome de Sézary.

Os estados hereditários, tais como doença de Gaucher, doença de Huntington, doença de IgA linear e distrofia muscular são tratáveis com os anticorpos desta invenção.

Outros estados tratáveis ou preveníveis pelos anticorpos do receptor de IL-1 ou composições farmacêuticas divulgadas, incluem aqueles que resultam de lesões da cabeça ou espinal medula incluindo hematoma subdural devido a traumatismo na cabeça. Em relação a esta terapia, as composições e combinações descritas são adequadas para prevenir lesão neurológica craniana e tratar cefaleia cervicogénica. As composições e combinações

descritas são ainda adequadas para tratar efeitos secundários neurológicos associados com irradiação do cérebro.

Os anticorpos anti-IL-1R1 e a composição farmacêutica da invenção são também úteis para tratar estados do fígado, tais como hepatite, incluindo hepatite alcoólica aguda, hepatite aguda viral ou induzida por fármaco, hepatite A, B e C, colangite esclerosante, epitélio sinusoidal hepático e inflamação do fígado devido a causas desconhecidas.

Os distúrbios que envolvem a perda de audição e que estão associados com expressão anômala de IL-1 são tratáveis com os anticorpos anti-IL-1R1 ou as composições farmacêuticas da invenção. Tais distúrbios incluem perda de audição associada com o nervo coclear que se pensa resultar de um processo auto-imune, *i. e.*, perda de audição auto-imune. Também tratáveis ou preveníveis com os anticorpos anti-IL-1R1 ou as composições farmacêuticas da invenção são a síndrome de Ménière e o colesteatoma, um distúrbio do ouvido médio associado frequentemente com a perda de audição.

Os distúrbios não artríticos dos ossos e articulações são também tratáveis com os anticorpos aqui descritos. Isto abrange distúrbios osteoclásticos que conduzem a perda óssea, tal como mas não limitados a, osteoporose, incluindo osteoporose pós-menopáusia, osteodistrofia, periodontite que resulta em dentes a abanar ou a sua perda, e descolamento de próteses após substituição de articulação (habitualmente associada com uma resposta inflamatória aos detritos de desgaste). Este último estado é também denominado "osteólise de implante ortopédico". Outro estado tratável com os compostos, composições e terapias de combinação da invenção é a disfunção da articulação temporomandibular (TMJ).

Os anticorpos anti-IL-1R1 ou as composições farmacêuticas da invenção podem também ser utilizados para tratar distúrbios reumáticos incluindo artrite reumatóide juvenil e do adulto; escleroderma; lúpus eritematoso sistémico; gota; osteodistrofia; polimialgia reumática; espondiloartropatias soronegativas, incluindo espondilite anquilosante e doença de Reiter, artrite psoriática e artrite de Lyme crónica. Os anticorpos desta invenção são também úteis para tratar inflamação do músculo voluntário e de outros músculos, incluindo dermatomiosite, miosite de corpos de inclusão, polimiosite e linfangioleiomiomatose.

Outra utilização para os anticorpos e as composições farmacêuticas da invenção é o tratamento e/ou a prevenção de amiloidose primária e de amiloidose secundária que é característica de vários estados incluindo doença de Alzheimer, amiloidose reactiva secundária; Síndrome de Down; e amiloidose associado a diálise. São também tratáveis com os anticorpos ou as composições farmacêuticas da invenção as síndromes herdadas de febre periódica, incluindo febre Mediterrânea familiar, hiperimmunoglobulina D e síndrome de febre periódica e síndromes periódicas associadas ao receptor de TNF (TRAPS).

Noutras formas de realização, os anticorpos ou as composições farmacêuticas da invenção podem ser utilizadas para tratar distúrbios que envolvem a pele ou membranas mucosas. Tais distúrbios incluem doenças acantolíticas, incluindo doença de Darier, queratose folicular e pênfigo vulgar. Os distúrbios da pele adicionais que podem ser tratados utilizando anticorpos da invenção incluem acne, acne rosácea, alopecia areata, estomatite aftosa, penfigóide bolhoso, queimaduras, eczema, eritema, incluindo eritema multiforme e eritema multiforme bolhoso (síndrome de Stevens-Johnson), a doença inflamatória da pele,

líquen plano, doença bolhosa de IgA linear (dermatose bolhosa crônica da infância), perda de elasticidade da pele, úlceras de superfície mucósica, incluindo úlceras gástricas, dermatite neutrofílica (síndrome de Sweet), dermatomiosite, pitiríase rubra pilaris, psoríase, pioderma gangrenoso, reticulo-histiocitose multicêntrica e necrólise epidérmica tóxica. Outros estados relacionados com a pele tratáveis pelas terapias e terapias de combinação da presente invenção, incluem dermatite herpetiforme.

Os distúrbios adicionais que podem ser tratados com os anticorpos ou as composições farmacêuticas da invenção incluem a doença do enxerto contra o hospedeiro, e complicações que resultam de transplantação de órgãos sólidos, tal como coração, fígado, pele, rim, pulmão (obliteração das vias aéreas do transplante de pulmão) ou outros transplantes, incluindo transplantes de medula óssea.

Os distúrbios oculares são também tratáveis ou preveníveis com os anticorpos anti-IL-1R1 ou as composições farmacêuticas divulgadas, incluindo descolamento regmatogénico de retina, e doença inflamatória ocular, incluindo doença inflamatória ocular associada com o fumar e degeneração macular.

Os anticorpos ou as composições farmacêuticas da invenção, como aqui descritas, são úteis para tratar distúrbios que afectam o sistema reprodutivo feminino. Os exemplos incluem, mas não estão limitados a, falha de implantes múltiplos/infertilidade; síndrome de perda fetal ou perda de embrião IV (aborto espontâneo); gravidezes pré-eclâmpticas ou eclâmpsia; endometriose, cervicite crónica e trabalho de parto prematuro.

Além disso, os anticorpos ou as composições farmacêuticas da invenção são úteis para tratar e/ou prevenir ciática, sintomas de envelhecimento, reacções graves a fármacos (por exemplo, toxicidade de IL-2 ou fibrose e pneumopatia induzida por bleomicina), ou para suprimir a resposta inflamatória antes, durante ou após a transfusão de glóbulos vermelhos alogénicos em cirurgia cardíaca ou outra, ou para tratar uma lesão traumática de um membro ou articulação, tal como lesão traumática do joelho. Vários outros distúrbios médicos tratáveis com os anticorpos anti-IL-1R1 ou as composições farmacêuticas divulgadas incluem; esclerose múltipla; Síndrome de Behcet; Síndrome de Sjogren; anemia hemolítica auto-imune; beta talassemia; esclerose lateral amiotrófica (doença de Lou Gehrig); Doença de Parkinson; e tenossinovite de causa desconhecida, assim como vários distúrbios ou doenças auto-imunes associadas com deficiências hereditárias, incluindo atraso mental ligado ao cromossoma X.

Além disso, os anticorpos anti-IL-1R1 ou as composições farmacêuticas da invenção são úteis para tratar lesões do sistema nervoso central (SNC), incluindo os efeitos de neurotransmissores neurotóxicos descarregados durante a excitação de inflamação no sistema nervoso central e para inibir ou prevenir o desenvolvimento de cicatrizes gliais em locais de lesão do sistema nervoso central. Em relação à epilepsia e ao tratamento de convulsões, a redução da gravidade e do número de convulsões recorrentes, e redução da gravidade dos efeitos prejudiciais das convulsões, redução da perda neuronal, degeneração neuronal e gliose associada com as convulsões.

As utilizações adicionais para os anticorpos ou as composições farmacêuticas da invenção incluem, mas são limitadas a, tratamento de polineuropatia e miopatia do doente crítico

(CIPNM), polineuropatia aguda; anorexia nervosa; paralisia de Bell; síndrome de fadiga crónica; demência transmissível, incluindo doença de Creutzfeld-Jacob; neuropatia desmielinizante; Síndrome de Guillain-Barre; doença dos discos vertebrais; Síndrome da guerra do Golfo; polineuropatia desmielinizante inflamatória crónica, miastenia grave; isquemia cerebral silenciosa; distúrbios do sono, incluindo narcolepsia e apnéia do sono; degeneração neuronal crónica; e acidente vascular cerebral, incluindo doenças isquémicas cerebrais. Ainda utilizações adicionais para os anticorpos da invenção são a anorexia e/ou estados anoréxicos, peritonite, endotoxemia e choque séptico, formação de granulomas, choque térmico, síndrome de Churg-Strauss, inflamação crónica após infecções agudas, tais como tuberculose e lepra, esclerose sistémica e cicatrização hipertrófica.

Noutras formas de realização, proteínas de fusão de avidina compreendendo uma sequência de aminoácidos de um dos anticorpos de IL-1R1 da invenção podem ser construídas para vários fins. As proteínas de fusão de avidina podem ser produzidas, por exemplo, utilizando um vector de expressão de mamífero contendo uma sequência de ADNc que codifica a avidina recombinante de galinha, adjacente a um local de clonagem múltipla para inserção de um parceiro de fusão específico do gene alvo. O vector pode incluir uma sequência de avidina com a sua sequência endógena de sinal para permitir a secreção de parceiros de fusão génica discretos que não contêm naturalmente sequências de sinal. A proteína de fusão expressa pelo vector tem um marcador da proteína avidina na porção N-terminal do parceiro de fusão. A estratégia de fusão como aqui descrita tem a capacidade de segregar proteínas que são normalmente expressas intracelularmente, tais como genes de transdução de sinal ou receptores hormonais nucleares.

Alternativamente, pode ser utilizado um vector que codifica a avidina sem a sua sequência endógena de sinal, o que irá resultar em marcação do C-terminal de parceiros da proteína de fusão. Uma fusão de avidina no C-terminal permite também a secreção da proteína com base na sequência endógena de sinal do parceiro de fusão. Tal estratégia pode ser aplicada para permitir um processamento e enrolamento correcto da proteína ou para determinar a validade de uma sequência de sinal proposta. Adicionalmente, o vector pode compreender uma curta sequência de nucleótidos que codifica uma sequência de aminoácidos, que pode actuar como um substrato específico clivável por enzima, entre a avidina e as sequências do parceiro de fusão. Tais sequências cliváveis por enzima permitem a separação do parceiro de fusão a partir da avidina, para fins de purificação ou libertação da proteína.

As proteínas de fusão de avidina da invenção podem ser utilizadas, por exemplo, no rastreio de anticorpos, caracterização funcional (determinação de uma utilidade do anticorpo como um agonista ou antagonista, agente neutralizante, etc.), mapeamento de epitopos ou estratégias de imunização. As fusões de avidina de uma proteína alvo podem ser também utilizadas em farmacocinética, eficácia ou outros formatos de ensaio convencionais, concebidos para testar amostras pré-clínicas ou amostras de doentes clínicos para a presença do anticorpo terapêutico no sangue, urina ou outras amostras de tecido. Os parceiros da proteína de fusão de avidina podem ser preparados como sequências de tamanho total ou truncadas, domínios estruturais especificamente isolados ou como sequências quiméricas com outros homólogos do parceiro de fusão de outras espécies.

As proteínas de fusão de avidina podem ser expressas utilizando quaisquer meios convencionais para introduzir genes em células, como aqui descritos e conhecidos na técnica. As proteínas podem ser expressas, por exemplo, em células 293 ou CHO por transfecção das células com uma construção de fusão de avidina numa solução de lípidos, tal como Lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Os meios condicionados e/ou os lisados celulares de células que expressam as proteínas de fusão podem ser recolhidos e aplicados num substrato de ensaio, tais como esferas de poliestireno revestidas de biotina ou placas de ELISA revestidas com biotina. A recolha dos meios condicionados e/ou do lisado celular pode ser conduzida num ponto de tempo que permita a expressão óptima da proteína de fusão. O ponto de tempo pode ser determinado experimentalmente pelos especialistas na técnica, mas é habitualmente cerca de 48 horas após a transfecção. As proteínas de fusão podem também ser analisadas na membrana celular ou intracelularmente para a expressão e funcionalidade na ligação de ligandos, receptores ou anticorpos conhecidos.

As proteínas de fusão de avidina da invenção podem ser analisadas por qualquer método conhecido ou previamente caracterizado que utiliza interacções de biotina-avidina. Tais métodos incluem, mas não estão limitados a, citometria de fluxo e microscopia/imagiologia fluorescente. Por exemplo, as fusões de avidina expressas em meios ou lisados celulares podem ser aplicadas a esferas revestidas de biotina e coradas com um anticorpo anti-avidina marcado com fluorescência para indicar o nível de expressão. Além disso, os anticorpos fluorescentes podem ser aplicados para reconhecer o parceiro específico da proteína de fusão num formato de ensaio multicolorimétrico. Adicionalmente, anticorpos não marcados específicos para o

parceiro da proteína de fusão podem ser aplicados simultaneamente com anticorpos marcados com fluorescência num ensaio competitivo.

Em determinadas formas de realização, a invenção proporciona métodos para o mapeamento de epitopos utilizando proteínas de fusão de avidina. Um exemplo de um método de mapeamento de epitopos da invenção é proporcionado abaixo, relativamente ao mapeamento de epitopos para anticorpos anti-IL-1R1. Contudo, um especialista na técnica reconhecerá que tais métodos podem ser prontamente aplicados ao mapeamento de epitopos para qualquer anticorpo e não estão limitados a anticorpos anti-IL-1R1. Por exemplo, o ADNc codificando avidina de galinha (com sequência endógena de sinal) pode ser ligado com a extremidade 5' a ADNc que codificam uma proteína de interesse (*i. e.*, uma proteína que seja reconhecida por anticorpos para os quais é desejado determinar um epitopo) fundida a uma sequência marcadora FLAG na extremidade 3'. Os genes da fusão marcada com FLAG podem ser montados num vector de expressão utilizando técnicas moleculares convencionais. Um painel de proteínas marcadas com avidina-FLAG mutantes em que determinados aminoácidos foram substituídos (*e. g.*, com resíduos de aminoácidos correspondentes de outra espécie animal) pode ser produzido utilizando técnicas convencionais. As proteínas mutantes e de tipo selvagem podem ser expressas em células hospedeiras e a ligação das proteínas mutantes e de tipo selvagem com um anticorpo de interesse pode ser detectada utilizando, por exemplo, análise de transferência de Western ou ensaios de ligação baseados em esferas, como aqui descritos. Assim, um epitopo pode ser definido por determinação de que substituições nas proteínas mutantes destroem a ligação ao anticorpo de interesse.

EXEMPLOS

Os seguintes exemplos, incluindo as experiências conduzidas e os resultados obtidos, são proporcionados para fins apenas ilustrativos e não devem ser interpretados como limitativos da invenção.

Exemplo 1

Produção de anticorpos monoclonais humanos contra o receptor de interleucina-1 de tipo I (IL-1R1)

Murganhos transgênicos HuMab

Os anticorpos monoclonais totalmente humanos para o receptor de IL-1 de tipo I (IL-1R1) foram preparados utilizando a estirpe HCo7 de murganhos transgênicos, a qual expressa genes de anticorpos humanos. Em cada uma destas estirpes de murganho, o gene endógeno da cadeia leve kapa de murganho foi interrompido homozigoticamente como descrito em Chen *et al.* (1993, EMBO J. 12:811-820), e o gene endógeno da cadeia pesada de murganho foi interrompido homozigoticamente como descrito no Exemplo 1 da Publicação do Pedido de Patente Internacional N° WO 01/09187. Cada destas estirpes de murganho contém um transgene da cadeia leve kapa humana, KCo5, como descrito em Fishwild *et al.* (1996, Nature Biotechnology 14:845-851). A estirpe HCo7 contém o transgene da cadeia pesada humana HCo7 como descrito nas Patentes U.S. N° 5545806; 5625825; e 5545807. A estirpe HCo7 é aqui referida como murganhos HuMab.

Imunizações de HuMab

Para produzir anticorpos monoclonais totalmente humanos para IL-1R1, os murganhos HuMab foram imunizados com IL-1R1 recombinante purificada derivada de células de insecto ou de mamífero (por Exemplo, células CHO) como antigénio. Os esquemas gerais de imunização para murganhos HuMab são descritos em Lonberg et al. (1994, Nature 368:856-859; Fishwild et al., *supra*; e Publicação do Pedido de Patente Internacional N° WO 98/24884, cujos ensinamentos de cada são incorporados por referência). Os murganhos tinham 6-16 semanas de idade após a primeira infusão de antigénio. Uma preparação recombinante purificada (25-50 µg) de antigénio IL-1R1 (e. g., purificado a partir de células transfectadas de insecto ou de mamífero que expressam IL-1R1) foi utilizada para imunizar intraperitonealmente (IP) ou subcutaneamente (Sc) os murganhos HuMab.

As imunizações de murganhos transgénicos HuMab foram realizadas utilizando antigénio em adjuvante completo de Freund e duas injeções, seguidas por imunização IP de 2-4 semanas (até um total de 11 imunizações) com o antigénio em adjuvante incompleto de Freund. Várias dúzias de murganhos foram imunizadas para cada antigénio. Um total de 149 murganhos da estirpe HCo7 foi imunizado com IL-1R1. A resposta imune foi monitorizada através de amostras de sangue retro-orbital.

Para seleccionar os murganhos HuMab que produzem anticorpos que se ligam a IL-1R1, os soros de murganhos imunizados foram testados por ELISA como descrito por Fishwild et al., *supra*. Resumidamente, as placas de microtitulação foram revestidas com IL-1R1 recombinante purificada de células de insecto ou de mamífero a 1-2 µg/mL em PBS e foram incubados 50 µL/poço a 4 °C,

de um dia para o outro, depois bloqueadas com 200 µL/poço de 5% de soro de galinha em PBS/Tween (0,05%). Diluições de plasma de murganhos imunizados com IL-1R1 foram adicionadas a cada poço e incubadas durante 1-2 horas à temperatura ambiente. As placas foram lavadas com PBS/Tween e depois incubadas com um reagente policlonal específico de Fc de cabra anti-IgG humana conjugado com peroxidase de rábano (HRP) durante 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem, as placas foram reveladas com substrato ABTS (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, catálogo N° A-1888, 0,22 mg/mL) e analisadas espectrofotometricamente a uma OD de 415-495. Os murganhos com títulos suficientes de imunoglobulina humana anti-IL-1R1 foram utilizados para produzir anticorpos monoclonais como descrito abaixo.

Preparação de hibridomas que produzem anticorpos monoclonais humanos para IL-1R1

Os murganhos foram preparados para a produção de anticorpos monoclonais através de injeção intravenosa de reforço com antigénio, 2 dias antes do sacrifício, e os baços foram posteriormente removidos. Os esplenócitos de murganho foram isolados de murganhos HuMab e fundidos com PEG numa linha celular de mieloma de murganho utilizando protocolos convencionais. Tipicamente, foram realizadas 20-30 fusões para cada antigénio.

Resumidamente, suspensões de célula única de linfócitos esplénicos de murganhos imunizados foram fundidas a um quarto do número de células de mieloma de murganho não segregantes P3X63-Ag8.653 (A.T.C.C., N° de Acesso CRL 1580) ou células de mieloma de murganho não segregantes SP2/0 (A.T.C.C., CRL 1581) com PEG a 50% (Sigma). As células foram plaqueadas a

aproximadamente 1×10^5 /poço em placas de microtitulação de fundo plano, seguidas por uma incubação de cerca de duas semanas em meio selectivo contendo 10% de soro bovino fetal, 10% de meio de condicionamento P388D1 (A.T.C.C., N° de Acesso CRL TIB-63), 3-5% de origen (IGEN) em DMEM (Mediatech, N° de Catálogo CRL 10013, com glucose elevada, L-glutamina e piruvato de sódio) mais 5 mM de HEPES, 0,055 mM de 2-mercaptoetanol, 50 mg/mL de gentamicina e 1x HAT (Sigma, N° de Catálogo CRL P-7185). Após 1-2 semanas, as células foram cultivadas em meio em que HAT foi substituído por HT.

Os hibridomas resultantes foram seleccionados para a produção de anticorpos específicos de antigénio. Os poços individuais foram rastreados por ELISA (acima descrito) para anticorpos IgG monoclonais humanos anti-IL-1R1. Uma vez ocorrido crescimento extenso dos hibridomas, o meio foi monitorizado habitualmente após 10-14 dias. Os hibridomas segregantes de anticorpos foram plaqueados novamente, rastreados outra vez e, se ainda positivos para IgG humano, os anticorpos monoclonais anti-IL-1R1 foram subclonados, pelo menos, duas vezes por diluição limitante. Os subclones estáveis foram depois cultivados *in vitro* para produzir quantidades pequenas de anticorpo em meio de cultura de tecidos para caracterização.

Seleção de anticorpos monoclonais humanos que se ligam a IL-1R1

Um ensaio de ELISA como acima descrito foi utilizado para rastrear para hibridomas que mostraram reactividade positiva com o imunogénio IL-1R1. Os hibridomas que segregam um anticorpo monoclonal que se ligou com elevada avidéz a IL-1R1 foram subclonados e adicionalmente caracterizados. Um clone de cada

hibridoma, que reteve a reactividade das células parentais (como determinado por ELISA), foi escolhido para fazer um banco de células em 5-10 frasquinhos, armazenados em azoto líquido.

Um ELISA específico de isotipo foi realizado para determinar o isotipo dos anticorpos monoclonais produzidos como aqui divulgado. Nestas experiências, os poços de placas de microtitulação foram revestidos com 50 µL/poço de uma solução de 1 µg/mL da cadeia leve kapa de murganho anti-humano em PBS e incubados a 4 °C, de um dia para o outro. Após bloqueamento com 5% de soro de galinha, as placas foram feitas reagir com sobrenadante de cada anticorpo monoclonal testado e um controlo de isotipo purificado. As placas foram incubadas à temperatura ambiente durante 1-2 horas. Os poços foram depois feitos reagir com anti-soros policlonais anti-humano específicos de IgG1, IgG2 ou IgG4 humana, de cabra e conjugados com peroxidase de rábano, e as placas foram reveladas e analisadas como descrito abaixo.

Os anticorpos monoclonais purificados de sobrenadantes de hibridoma que mostraram ligação significativa a IL-1R1, como detectado por ELISA, foram adicionalmente testados para actividade biológica utilizando ensaios de ligação *in vitro* e ensaios baseados em células de sangue total e condrócitos humanos. Os anticorpos que apresentaram a melhor actividade foram designados 15C4, 26F5, 27F2, 24E12 e 10H7. Os anticorpos foram submetidos a uma experiência preliminar de triagem de epitopo. Placas de ELISA foram revestidas com sIL-1R1 humana (domínio 1+2+3), sIL-1R1 humana truncada (domínio 1+2), sIL-1R1 de rato, sIL-1R humana de tipo II e ovalbumina (controlo negativo). A ligação do anticorpo foi detectada com um anticorpo anti-Fc Humano conjugado com peroxidase de rábano (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Os resultados são resumidos na Tabela 2. Um símbolo de verificação (✓) na Tabela 2 representa

um resultado positivo para a ligação; “X” representa um resultado negativo. Os anticorpos 15C4, 26F5, 27F2 e 24E12 apenas ligaram a proteína IL-1R1 que tem todos os três domínios extracelulares, indicando que os epitopos para cada estão dentro do terceiro domínio. O anticorpo 10H7 liga-se ao domínio extracelular de tamanho total IL-1R1 e também a uma proteína truncada que tem apenas os domínios 1 e 2, demonstrando que o epítipo para este anticorpo se encontra no domínio 1 ou 2. Nenhum dos anticorpos testados tem reactividade cruzada com o receptor de tipo II humano ou IL-1R1 de rato.

Tabela 2

Anticorpo	Oa (Controlo Negativo)	sIL-1R1 Hu (Domínio 1+2+3)	sIL-1R1 Hu (Domínio 1+2)	sIL-1RII Hu (Domínio 1+2+3)	sIL-1R1 Rato (Domínio 1+2+3)
15C4	X	✓	X	X	X
26F5	X	✓	X	X	X
27F2	X	✓	X	X	X
24E12	X	✓	X	X	X
10H7	X	✓	✓	X	X

Exemplo 2

Inibição *in vitro* da formação do complexo IL-1 Receptor de Tipo I por anticorpos anti-IL-1R1

A capacidade dos anticorpos para inibir os eventos de ligação extracelular requeridos para a sinalização de IL-1 foi avaliada com proteínas recombinantes *in vitro* num ensaio em que a ligação de IL-1 a IL-1R resulta na formação de um local de ligação de elevada afinidade para IL-1RACp. A ligação de IL-1RACp a IL-1 ligado a IL-1R (referido como “complexo de formação”) é medida como se segue. As proteínas recombinantes foram incubadas em ensaios de ligação em placas de microtitulação na ausência (controlo) ou presença de anticorpos. Os valores de IC₅₀ foram derivados de comparações de valores de controlo com valores obtidos na presença de anticorpo a concentrações entre 10 fM e 1 µM. Resumidamente, o ensaio foi conduzido como se segue. IL-1R1 biotinilado e esferas revestidas com estreptavidina (Dynal, Dynabeads M-28) foram dispensadas em placas de microtitulação. O anticorpo foi depois adicionado aos poços apropriados numa diluição em série abrangendo uma vasta gama de concentrações. Foi adicionado IL-1β ou IL-1α a uma concentração de 1 nM, e IL1RACp marcado com ruténio (preparado com NHS-marcador (IGEN) de acordo com os protocolos da IGEN) foi adicionado numa concentração final de 5 nM. Após incubação durante 1 h à temperatura ambiente, a reacção de ligação foi analisada com um instrumento ORIGEN™ 1,5 ou M8 (IGEN Internacional Inc.). A ligação de IL-1RACp a IL-1 ligado a IL-1R1 foi determinada por detecção do sinal de electroquimioluminescência associada com as esferas de IL-1R1 ligado. A redução do sinal que resulta da competição de anticorpos de ligação a IL-1 ou IL-1RACp foi calculada como

percentagem do sinal de ECL que resulta para ligação máxima (sem competição).

A curva de resposta de inibição para cada anticorpo nestes ensaios de ligação foi estabelecida e as IC_{50} foram derivadas utilizando o software PRISMA[™]. Os resultados para a inibição de eventos de ligação induzidos por IL-1 β são representados pelo gráfico na Figura 12. Os valores de IC_{50} para inibição da formação do complexo são mostrados na Tabela 3 abaixo. Os anticorpos 15C4, 26F5, 27F2 e 24E12 inibem fortemente a formação do complexo. Estes anticorpos são todos ligantes do terceiro domínio de IL-1R1, como acima descrito. O anticorpo 10H7 pertence a uma classe de anticorpos que se liga a uma construção do IL-1R que carece do terceiro domínio. O 10H7 é um inibidor menos potente da ligação dirigida por IL-1 de IL-1RAcP do que os ligantes do terceiro domínio. A inibição da formação do complexo pelos anticorpos da invenção foi comparada com a inibição por IL-1ra. Os ligantes do terceiro domínio demonstraram uma capacidade semelhante ou ligeiramente superior para inibir a formação de complexo por comparação com IL-1ra.

A Figura 13 representa a capacidade do anticorpo 15C4 para inibir a formação do complexo IL-1R1/IL-1 α /RAcP. A IC_{50} para a formação do complexo IL-1R1/IL-1 α /RAcP foi 43 pM.

Tabela 3

	Anti-IL-1R1 humano					rIL-1ra
	15C4	26F5	27F2	24E12	10H7	
IC50	96 pM	160 pM	333 pM	348 pM	5,3 nM	555 pM
Limites de Confiança de 95%	71 pM a 129 pM	118 pM a 219 pM	214 pM a 517 pM	223 pM a 542 pM	3,6 nM a 7,5 nM	414 pM a 743 pM

Exemplo 3

Anticorpos anti-IL-1R1 inibem a ligação de IL-1 β e IL-1ra ao receptor

A capacidade dos anticorpos anti-IL-1R1 para inibir a ligação de IL-1 β ou IL-1ra a IL-1R1 foi avaliada num ensaio com proteínas recombinantes. A mistura de reacção continha 0,1 mg/mL de Dynabeads M-280 Streptavidin (Dynal) e 1 nM de IL-1R1 biotinilado. Os anticorpos foram adicionados a concentrações desde 320 nM a 0,3 nM. A adição de IL-1 β marcado com ruténio (5 nM) ou IL-1ra (1 nM) iniciou a ligação que continuou durante 1 hora à temperatura ambiente. As misturas da reacção foram medidas como acima utilizando um instrumento ORIGEN™ 1,5 ou M8 (IGEN Internacional Inc.). A competição foi calculada como a percentagem do sinal de ECL para ligação máxima (sem competição). Os anticorpos 15C4, 26F5 e 27F2, os anticorpos mais potentes, bloqueiam a ligação do ligando (IL-1 β) ao receptor, mas não interferem significativamente com a ligação de IL-1ra comparativamente com o controlo de IgG. Pelo contrário, o

anticorpo 24E12 liga-se ao receptor mas não bloqueia a ligação de IL-1 β ou IL-1ra ao receptor. Assim, o anticorpo 24E12 representa uma classe única de ligantes do terceiro domínio distinta da classe representada por 15C4, 26F5 e 27F2. O anticorpo 10H7 inibe a ligação de IL-1 β e IL-1ra ao receptor. Os resultados são resumidos na Figura 14.

Exemplo 4

Ensaio de sangue total humano e condrócitos

Condrócitos humanos primários (Cell Applications Inc., San Diego, CA) foram inoculados em placas de 96 poços a uma densidade de 10000 células/poço em meio DMEM contendo 1% de FBS e 1% de Pen Strep (GIBCO). As células foram deixadas a recuperar de um dia para o outro, antes da adição de anticorpos anti-IL1-RI a concentrações que variam desde 10 nM a 0,1 pM durante 20 minutos. A IL-1 β foi adicionada a uma concentração de 1 pM ($\sim$ EC₅₀) e os sobrenadantes de cultura foram recolhidos após 16 horas de incubação a 37 °C. Os níveis de IL-6 no sobrenadante foram medidos utilizando um ELISA (Pierce-Endogen, Rockford, IL, N° de Cat. EH2IL-65) de acordo com as instruções do fabricante. A curva de resposta de inibição para cada anticorpo da invenção nos ensaios baseados em células foi estabelecida e os valores de IC₅₀ foram derivados utilizando software PRISMA™. Os anticorpos 15C4, 26F5 e 27F2 são inibidores potentes da sinalização de IL-1 comparativamente a IL-1ra (Figura 15A). Os anticorpos 24E12 e 10H7 são acentuadamente menos potentes do que 15C4 e 27F2 (Figura 15B). Os valores de IC₅₀ para a inibição da produção de IL-6 por condrócitos humanos, induzida por IL-1 β , são mostrados

nas Tabelas 4A e 4B (correspondendo à Figura 15A e 15B, respectivamente).

Os anticorpos monoclonais anti-IL-1R1 15C4, 26F5 e 27F2 foram pré-incubados 40-60 minutos com sangue total humano recolhido de voluntários normais, em tubos de recolha de sangue com heparina de sódio. Os ensaios foram realizados como se segue: 100 µL de sangue recém-isolado foi fraccionado em poços de uma placa de 96 poços. Foram adicionados 50 µL de anticorpo em meio RPMI contendo 10% de soro AB humano. A IL-1β foi depois adicionada a uma concentração de 30 pM (EC₅₀). Os sobrenadantes de cultura foram recolhidos após 18 horas e os níveis de IL-6 no sobrenadante foram medidos utilizando ELISA. Como um controlo, IL-1ra foi pré-incubado 40-60 minutos com sangue total e a produção de IL-6 foi medida como acima. Os três anticorpos anti-IL-1R1 bloquearam a actividade de IL-1 com potência comparável àquela de IL-1ra (Figura 16). Os valores de IC₅₀ para a inibição da produção de IL-6 induzida por IL-1 em sangue total humano são mostrados na Tabela 5.

Tabela 4A

	Anticorpos anti-IL-1R1 Humanos			rIL-1ra
	15C4	27F2	26F5	
IC50	16 pM	32 pM	26 pM	32 pM
Limites de Confiança de 95%	15 pM a 18 pM	21 pM a 49 pM	19 pM a 36 pM	22 pM a 46 pM

Tabela 4B

	Anticorpos anti-IL-1R1 Humanos				
	15C4	27F2	10H7	24E12	rIL-ra
IC50	7 pM	28 pM	7,5 pM	NA	20 pM
Limites de Confiança de 95%	5,8 pM a 7,9 pM	22 pM a 35 pM	5,6 nM a 10 nM	NA	17 pM a 23 pM

Tabela 5

Dador	Parâmetros de Análise	15C4	26F5	27F2	IL-1ra
1047	IC50	126 pM	410 pM	249 pM	241 pM
	Limites de Confiança de 95%	47 pM a 339 pM	213 pM a 790 pM	88 pM a 703 pM	124 pM a 471 pM
1319	IC50	111 pM	174 pM	579 pM	381 pM
	Limites de Confiança de 95%	59 pM a 208 pM	60 pM a 501 pM	249 pM a 1,3 nM	167 pM a 875 pM
Compósito	IC50	126 pM	372 pM	387 pM	264 pM
(Dados Reunidos)	Limites de Confiança de 95%	62 pM a 255 pM	187 pM a 739 pM	202 pM a 748 pM	134 pM a 517 pM

Exemplo 5

Mutagénese e mapeamento de epitopos

Foi utilizada mutagénese dirigida (Altered Sites® In Vitro Mutagenesis System, Promega, Madison WI) de IL-1R1 para preparar um painel de proteínas mutantes (“muteínas”) em que resíduos de aminoácidos de rato foram substituídos com a sequência humana correspondente. Foram construídos quinze plasmídeos mutados diferentes (ver barras numeradas na Figura 17). Os plasmídeos que codificam estas proteínas substituídas e o IL-1R1 parental foram transientemente transfectados em células CHO. Foram gerados transfectantes simulados como controlos negativos. O meio condicionado (CM) destas células foi concentrado ~20 vezes utilizando colunas de concentração Centriprep 10 (Amicon). A expressão das muteínas foi avaliada por SDS-PAGE e transferência de Western. Treze proteínas mutantes foram expressas a níveis que permitiram a avaliação da ligação do anticorpo. As proteínas foram aplicadas num gel, submetidas a electroforese e transferidas para membranas. As membranas foram bloqueadas com 1% de leite em PBS, 0,1% de Tween-20 e depois incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente com os anticorpos anti-IL-1R 15C4, 27F2 ou 24E12 a 0,5 ug/mL em PBS, 0,1% de Tween-20. Após lavagem, as membranas foram incubadas com anti-IgG-Fc-HRP de humano produzido em cabra. O sinal foi detectado utilizando substrato quimioluminescente (ECL) (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). As sequências específicas humanas críticas para a ligação do anticorpo foram identificadas como aquelas que, quando substituídas com sequências de rato, reduziram ou eliminaram o sinal de ECL. O reconhecimento de 15C4 dos mutantes 1, 2, 4 e 10 foi diminuído quando comparado a 24E12 (Figura 18, painel superior). De modo semelhante, a ligação de 27F2 aos mutantes 1, 2 e 4 foi diminuída (Figura 18, painel meio). 24E12

não apresentou ligação significativa aos mutantes 12, 13, 14 e 15 (Figura 18, painel inferior).

O isolamento e caracterização de anticorpos anti-IL-1R1 humanos identificaram três classes distintas de anticorpos competitivos (Figura 19). Os inibidores mais fortes da actividade biológica de IL-1, como demonstrado por bioensaios com base em células, são aqueles anticorpos que se ligam ao terceiro domínio de IL-1R1 e previnem a associação de IL-1- β . As experiências de mapeamento de epitopos que utilizam um painel de proteínas mutantes no terceiro domínio, demonstraram que esta classe de anticorpos, que inclui 15C4, 27F2 e 26F5, partilha um epitopo conformacional sobreposto mas não idêntico. As Figuras 20 e 21 ilustram a posição dos epitopos de 15C4 no terceiro domínio do receptor de IL-1, num diagrama de fita de IL-1 ligado ao receptor de IL-1ra (Schreuder *et al.*, 1997, *Nature* 386:194-200). Os resíduos do receptor de IL-1 que definem a ligação da classe mais potente de anticorpos estão ilustrados a cinzento. Estes anticorpos demonstraram potência superior e, desta forma, estes epitopos definem locais de ligação para anticorpos de uma classe superior. Os locais de ligação de 15C4 e 27F2 são sobrepostos mas não idênticos, como determinado pela análise mutacional dos 15 locais diferentes em IL-1R1, descrita acima. Os locais são descritos na Figura 17 como barras numeradas acima da sequência de proteína. Os locais críticos de interacção parecem estar nas mutações nos locais 1 (LSDIA; SEQ ID N°: 41), 2 (VIDE; SEQ ID N°: 42), 4 (YSV) e 10 (TCFA; SEQ ID N°: 43). Os locais de ligação de 15C4 e 27F2 estão compreendidos nos locais 1 e 2, uma vez que a substituição dos resíduos de rato para os resíduos humanos em ambos os locais extingue a ligação. 27F2 difere de 15C4 na medida em que alterações no local 4 extinguem completamente a sua ligação, enquanto a ligação de 15C4 é reduzida mas não completamente

eliminada. A mutação 10 reduz também a ligação de 15C4, mas 27F2 não tem interacção óbvia com este local. O exame da estrutura cristalina revela que estes resíduos definem uma face do terceiro domínio que está orientado no sentido do espaço ocupado por ligando ligado (Figuras 20 e 21) (Vigers et al., 1997, Nature 386:190-194).

A segunda classe de anticorpos identificados, representada por 10H7, não requer o terceiro domínio para ligação e, ao contrário da classe preferida, inibe a ligação de IL-1ra. Esta classe é activa em bioensaios, mas é menos potente do que a classe preferida.

Em contraste com a forte inibição de bioensaios de IL-1 com a classe preferida de anticorpos, 24E12 é um inibidor ineficaz em bioensaios. O anticorpo 24E12 inibe a ligação de IL-1RAcP com IL-1 ligado a IL-1R. O epitopo para esta classe de anticorpos, definida pelos mutantes 12, 13, 14 e 15, está próximo do domínio transmembranar de IL-1R1 e está numa região não envolvida directamente na ligação de IL-1 ou IL-1ra (Figura 22).

Exemplo 6

Clonagem das cadeias pesada e leve do anticorpo anti-IL-1R1

Clonagem da cadeia leve do MAb 15C4 anti-IL-1R1

As cadeias leves para três hibridomas que expressam anticorpos monoclonais de ligação a α IL-1R1, 15C4, 27F2 e 26F5 foram clonadas no vector de expressão de células de mamífero pDSR α 19 (ver Publicação do Pedido Internacional N° WO 90/14363.

A construção do plasmídeo que codifica a cadeia leve kapa de 15C4 é explicitamente aqui descrita; a clonagem das outras espécies de cadeia leve foi realizada utilizando processos semelhantes. A região variável da cadeia leve kapa de α IL-1R1 foi obtida utilizando métodos de amplificação por reacção em cadeia da polimerase (PCR) a partir da primeira cadeia de ADNc preparada a partir de ARN total do híbrido α IL-1R1 15C4, o qual foi preparado utilizando o reagente TRIzol[®] (Invitrogen). A primeira cadeia de ADNc foi sintetizada utilizando um iniciador aleatório com um adaptador de extensão (5'- GGC CGG ATA GGC CTC CAN NNN NNT -3'; SEQ ID N°: 44) e 5' RACE (amplificação rápida de extremidades de ADNc) foi realizada utilizando o GeneRace[™] Kit (Invitrogen). Para a cadeia leve completa, o iniciador para a frente foi o iniciador interno GeneRacer[™] (5'- GAG CAC TGA CAT GGA CTG AAG GGA TA -3'; SEQ ID N°: 45) e o iniciador reverso foi 5'- GGG GTC AGG CTG GAA CTG AGG -3' (SEQ ID N°: 46). Os produtos de RACE foram clonados em pCR4-TOPO (Invitrogen) e as sequências de ADN foram determinadas. A sequência de ADN de consenso da cadeia kapa 15C4 foi utilizada para conceber iniciadores para amplificação por PCR da cadeia de anticorpo de tamanho total. O iniciador de PCR kapa 5' codificado pelo amino-terminal da sequência de sinal, um local da enzima de restrição *Xba*I, e uma sequência de Kozak otimizada (5'- CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC CAT GTC GCC ATC ACA ACT CAT TGG G -3'; SEQ ID N°: 47). O iniciador 3' codificou o carboxi-terminal e o codão de terminação, assim como um local de restrição *sal*I (5'- CTT GTC GAC TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCT C -3'; SEQ ID N°: 48).

Iniciador kapa 5' 15C4 α IL-1R1 (SEQ ID N°: 47):

5'- CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC CAT GTC GCC ATC ACA ACT
XbaI Kozak M S P S Q L
CAT TGG G -3'
I G (SEQ ID N°: 49)

Iniciador kapa 3' 15C4 α IL-1R1 (SEQ ID N°: 48):

5'- CTT GTC GAC TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCT C -3'
SalI * C E G R N F S (SEQ ID N°: 50)

O clone da cadeia kapa de α IL-1R1 15C4 de tamanho total foi obtido utilizando um pCR4: clone kapa 15C4 através de amplificação por PCR com os iniciadores kapa 5' 15C4 α IL-1R1 e 3'. A reacção de PCR produziu um produto com 733 pares de bases que codifica os 233 resíduos de aminoácidos (incluindo a sequência de sinal da cadeia kapa de 19 aminoácidos) da cadeia kapa de α IL-1R1 15C4. O produto de PCR foi purificado utilizando um kit de purificação de PCR QIAquick (Qiagen Cat. N° 28104), corte com XbaI e salI, gel isolado e purificado utilizando um kit de extracção de gel QIAquick (Qiagen Cat. N° 28704). Este fragmento de PCR contendo a cadeia kapa de α E-1R1 15C4 completa foi depois ligado no vector de expressão de mamífero pDSR α 19. O ADN do clone de expressão da cadeia kapa 15C4 foi sequenciado para confirmar que codificava o mesmo péptido que foi identificado no hibridoma 15C4. O vector de expressão final, pDSR α 19:15C4 kapa tem 5468 pares de bases e contém sete regiões funcionais descritas na Tabela 6.

Tabela 6

<u>Número dos</u> <u>Pares de Base</u> <u>do Plasmídeo</u>	
2 a 881	Um sinal de terminação de transcrição/ poliadenilação da α -subunidade da hormona glicoproteica pituitária bovina (α -FSH) (Goodwin <i>et al.</i> , 1983, Nucleic Acids Res. 11:6873-82; Número de Acesso Genbank X00004)
882 a 2027	Um minigene da di-hidrofolato redutase (DHFR) de murganho contendo o promotor DHFR endógeno de murganho, as sequências codificantes de ADNc e os sinais de terminação de transcrição/poliadenilação de DHFR (Gasser <i>et al.</i> , 1982, Proc. Natl. Acad Sci. USA. 79:6522- 6; Nunberg <i>et al.</i> , 1980, Cell 19:355-64; Setzer <i>et al.</i> , 1982, J. Biol. Chem. 257:5143-7; McGrogan <i>et al.</i> , 1985, J. Biol. Chem. 260:2307-14)
2031 a 3947	Sequências de pBR322 contendo o gene do marcador de resistência à ampicilina e a origem de replicação do plasmídeo em <i>E. coli</i> (Número de Acesso Genbank J01749)
3949 a 4292	Um promotor precoce, intensificador e origem de replicação de SV40 (Takebe <i>et al.</i> , 1988, Mol. Cell Biol. 8:466-72, Número de Acesso Genbank J02400)
4299 a 4565	Um elemento intensificador de tradução do domínio LTR de HTLV-1 (Seiki <i>et al.</i> , 1983, Proc. Natl. Acad Sci. USA. 80:3618-22, Número de Acesso Genbank J02029)

(continuação)

<u>Número dos</u> <u>Pares de Base</u> <u>do Plasmídeo</u>	
4574 a 4730	Um intrão dos sinais dadores/aceitadores de <i>splice</i> de 16S, 19S de SV40 (Okayama e Berg, 1983, Mol. Cell Biol. 3:280-9, Número de Acesso Genbank J02400)
4755 a 5468	O ADNc da cadeia leve kapa 15C4 entre os locais <i>XbaI</i> e <i>sal I</i>

Construção de pDSR α 19:hIgG1C_H

Um plasmídeo de expressão de MAb pDSR α 19:região variável de rato/região constante humana de IgG1 (rVh/hCh1) foi construído como o resultado de uma ligação de três partes, produto de PCR da região variável de anticorpo de rato terminado com *XbaI* e *BsmBI*, a região constante de IgG1 humana (C_{H1}, charneira, domínios C_{H2} e C_{H3}) derivada por clivagem de *salI* e isolamento do gel do fragmento *BsmBI* e *salI* do plasmídeo linear pDSR α 19:hIgG1C_H (extremidades *hindIII* e *BsmBI*) e um pDSR α 19 linearizado com extremidades *XbaI* e *salI* (ver Pedido Provisório de Patente U.S. N° 60/370407, do mesmo titular e co-pendente, apresentado em 5 de Abril de 2002, "Human Anti-OPGL Neutralizing Antibodies As Selective OPGL Pathway Inhibitors". O vector de expressão final, pDSR α 19:região variável de rato/região constante humana de IgG1 (rVh/hCh1), tem 6158 pares de bases e contém 7 regiões funcionais descritas na Tabela 7.

Tabela 7

<u>Número dos</u> <u>Pares de Base</u> <u>do Plasmídeo</u>	
2 a 881	Um sinal de terminação de transcrição/ poliadenilação da α -subunidade da hormona glicoproteica pituitária bovina (α -FSH) (Goodwin <i>et al.</i> , 1983, Nucleic Acids Res. 11:6873-82; Número de Acesso Genbank X00004)
882 a 2027	Um minigene da di-hidrofolato redutase (DHFR) de murganho contendo o promotor DHFR endógeno de murganho, as sequências codificantes de ADNc e os sinais de terminação de transcrição/poliadenilação de DHFR (Gasser <i>et al.</i> , 1982, Proc. Natl. Acad Sci. USA. 79:6522- 6; Nunberg <i>et al.</i> , 1980, Cell 19:355-64; Setzer <i>et al.</i> , 1982, J. Biol. Chem. 257:5143-7; McGrogan <i>et al.</i> , 1985, J. Biol. Chem. 260:2307-14)
2031 a 3947	Sequências de pBR322 contendo o gene do marcador de resistência à ampicilina e a origem de replicação do plasmídeo em <i>E. coli</i> (Número de Acesso Genbank J01749)
3949 a 4292	Um promotor precoce, intensificador e origem de replicação de SV40 (Takebe <i>et al.</i> , 1988, Mol. Cell Biol. 8:466-72, Número de Acesso Genbank J02400)
4299 a 4565	Um elemento intensificador de tradução do domínio LTR de HTLV-1 (Seiki <i>et al.</i> , 1983, Proc. Natl. Acad Sci. USA. 80:3618-22, Número de Acesso Genbank J02029)

(continuação)

Número dos Pares de Base do Plasmideo	
4574 a 4730	Um intrão dos sinais dadores/aceitadores de <i>splice</i> de 16S, 19S de SV40 (Okayama e Berg, 1983, Mol. Cell Biol. 3:280-9, Número de Acesso Genbank J02400)
4755 a 6158	O ADNc da cadeia pesada rVh/hCh1 entre os locais <i>XbaI</i> e <i>salI</i>. Esta sequência do fragmento da cadeia pesada é mostrada abaixo (SEQ ID N°:51) com as sequências dos locais de restrição sublinhadas: <i>XbaI</i> <u>TCTAG</u> ACCACCATGG ACATCAGGCT CAGCTTAGTT TTCCTTGTCCTTTTCATAAA AGGTGTCCAG TGTGAGGTAG AACTGGTGGA GTCTGGGGGC GGCTTAGTAC AACCTGGAAG GTCCATGACA CTCTCCTGTG CAGCCTCGGG ATTCATTTC AGAACCTATG GCATGGCCTG GGTCCGCCAG GCCCAACGA AGGGTCTGGA GTGGGTCTCA TCAATTACTG CTAGTGGTGG TACCACCTAC TATCGAGACT CCGTGAAGGG CCGCTTCACT ATTTTAGGG ATAATGCAAA AAGTACCCTA TACCTGCAGA TGGACAGTCC GAGGTCTGAG GACACGGCCA CTTATTTCTG TACATCAATT <i>BsmBI</i> TCGGAATACT GGGGCCACGG AGTCATGGTC ACCGTCTCTA GTGCCTCCACCAAGGGCCCA TCGGTCTTCC CCCTGGCACC CTCCTCCAAG AGCACCTCTGGGGGCACAGC GGCCCTGGGC TGCTTGCTCA AGGACTACTT CCCGAACCG GTGACGGTGT CGTGGAATC AGGCGCCCTG ACCAGCGCG TGCACACCTT CCCGGCTGTC CTACAGTCCT CAGGACTCTA CTCCTCAGC AGCGTGGTGACCGTGCCCTC CAGCAGCTTG GGCACCCAGA CCTACATCTG CAACGTGAATCACAAGCCCA GCAACACCAA GGTGGACAAG AAAGTTGAGC CCAAATCTTG TGACAAAACCT CACACATGCC CACCGTGCCC AGCACCTGAA CTCCTGGGGG GACCGTCAGT CTTCTCTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC TCCCGGACCC CTGAGGTAC ATGCGTGGTG GTGGACGTGA GCCACGAAGACCCTGAGGTC AAGTTCAACT GTACGTGGA CGGCGTGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG GAGCAGTACA ACAGCACGTA CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTCTGCA CCAGGACTGG CTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAAG CCCTCCCAGC CCCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC CTGCCCCCA TCCGGGATG AGCTGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAT CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGAGAACAA CTACAAGACC ACGCCTCCCG TGCTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCTCT ATAGCAAGCT CACCGTGGAC AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC AACCACTACA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCCGGGTA <i>SalI</i> AATGATAAGT <u>CGAC</u>

O plasmídeo linear pDSR α 19:hIgG1C_H foi preparado por digestão do plasmídeo pDSR19:região variável de rato/região constante humana de IgG1 com as enzimas de restrição XbaI e BsmBI, para remover a região variável de rato, e purificado utilizando uma kit de extracção de gel QIAquick. O plasmídeo linear pDSR α 19:hIgG1C_H contendo o domínio da região constante humana de IgG1 de 1 kpb foi utilizado para aceitar regiões variáveis do anticorpo α IL-1R derivadas de hibridoma.

Clonagem da Cadeia Pesada de Anti-IL1-RI 15C4 MAb

As cadeias pesadas para dez hibridomas que expressam anticorpos monoclonais de ligações a α IL1-RI, 15C4, 27F2 e 26F5, foram clonados no vector de expressão de célula de mamífero pDSR α 19. A construção do plasmídeo que codifica a cadeia pesada de 15C4 é explicitamente descrita; a clonagem das outras espécies de cadeia pesada foi realizada utilizando processos semelhantes. A região variável da cadeia pesada de α IL-1R1 15C4 foi obtida utilizando métodos de amplificação por PCR a partir de ADNc da primeira cadeia paraparado a partir de ARN total do hibridoma α IL1-RI 15C4, o qual foi preparado utilizando reagente de TRIzol[®]. A primeira cadeia de ADNc foi sintetizada utilizando um iniciador aleatório com um adaptador de extensão (5'- GGC CGG ATA GGC CTC CAN NNN NNT -3'; SEQ ID N°: 44) e 5' RACE (amplificação rápida de extremidades de ADNc) foi realizada utilizando o GeneRacer[™] Kit. Para a cadeia pesada de comprimento parcial, o iniciador para a frente foi o iniciador interno GeneRacer[™] (5'- GGA CAC TGA CAT GGA CTG AAG GAG TA -3'; SEQ ID N°: 45) e o iniciador reverso foi 5'- TGA GGA CGC TGA CCA CAC G -3' (SEQ ID N°: 52). Os produtos de RACE foram clonados em pCR4-TOPO e as sequências de ADN foram determinadas. A sequência de ADN de consenso da região variável da cadeia pesada 15C4 foi

variável da cadeia pesada de α IL-1R1 15C4. O produto de PCR foi purificado utilizando um Kit de Purificação de PCR QIAquick e depois digerido com *Xba*I e *Bsm*BI, isolado de gel e purificado com um Kit de Extração de Gel QIAquick.. Este fragmento contendo a região variável da cadeia pesada de α IL-1R1 15C4 completa foi depois ligado no vector de expressão de mamífero pDSR α 19:hIgG1C_H. O ADN do clone de expressão da cadeia pesada de IgG1 15C4 foi sequenciado para confirmar que codificava o mesmo péptido da região variável da cadeia pesada que foi identificado no hibridoma 15C4. O vector de expressão final, pDSR α 19:15C4 da cadeia pesada IgG1 tem 6173 pares de bases e contém sete regiões funcionais descritas na Tabela 8.

Tabela 8

<u>Número dos</u> <u>Pares de Base</u> <u>do Plasmideo</u>	
2 a 881	Um sinal de terminação de transcrição/ poliadenilação da α -subunidade da hormona glicoproteica pituitária bovina (α -FSH) (Goodwin <i>et al.</i> , 1983, Nucleic Acids Res. 11:6873-82; Número de Acesso Genbank X00004)

(continuação)

<u>Número dos</u> <u>Pares de Base</u> <u>do Plasmideo</u>	
882 a 2027	Um minigene da di-hidrofolato redutase (DHFR) de murganho contendo o promotor DHFR endógeno de murganho, as sequências codificantes de ADNc e os sinais de terminação de transcrição/ poliadenilação de DHFR (Gasser <i>et al.</i> , 1982, Proc. Natl. Acad Sci. USA. 79:6522-6; Nunberg <i>et al.</i> , 1980, Cell 19:355-64; Setzer <i>et al.</i> , 1982, J. Biol. Chem. 257:5143-7; McGrogan <i>et al.</i> , 1985, J. Biol. Chem. 260:2307-14)
2031 a 3947	Sequências de pBR322 contendo o gene do marcador de resistência à ampicilina e a origem de replicação do plasmídeo em <i>E. coli</i> (Número de Acesso Genbank J01749)
3949 a 4292	Um promotor precoce, intensificador e origem de replicação de SV40 (Takebe <i>et al.</i> , 1988, Mol. Cell Biol. 8:466-72, Número de Acesso Genbank J02400)
4299 a 4565	Um elemento intensificador de tradução do domínio LTR de HTLV-1 (Seiki <i>et al.</i> , 1983, Proc. Natl. Acad Sci. USA. 80:3618-22, Número de Acesso Genbank J02029)
4574 a 4730	Um intrão dos sinais dadores/aceitadores de <i>splice</i> de 16S, 19S de SV40 (Okayama e Berg, 1983, Mol. Cell Biol. 3:280-9, Número de Acesso Genbank J02400)
4755 a 6173	O ADNc da cadeia pesada IgG1 15C4 entre os locais <i>XbaI</i> e <i>SalI</i>

Construção de pDSR19:hIgG2C_H

Um plasmídeo de expressão de MAb pDSR1 α 9:região variável humana/região constante humana de IgG2 (hVh/hCh2) foi construído como o resultado de uma ligação de três partes, produto de PCR da região variável de anticorpo humano terminado com *Xba*I e *Bsm*BI, o produto de PCR da região constante de IgG2 humana (C_{H1}, charneira, domínios C_{H2} e C_{H3}) com extremidades *Bsm*BI e *sal*I e um pDSRa19 linearizado com extremidades *Xba*I e *Sal*I. O vector de expressão final, pDSR α 19:região variável humana/região constante humana de IgG2 (hVh/hCh2) (ver Pedido Provisório de Patente U.S. N° 60/370407, do mesmo titular e co-pendente, apresentado em 5 de Abril de 2002, "Human Anti-OPGL Neutralizing Antibodies As Selective OPGL Pathway Inhibitors"), tem 6164 pares de bases e contém 7 regiões funcionais descritas na Tabela 9.

Tabela 9

<u>Número dos</u> <u>Pares de Base</u> <u>do Plasmídeo</u>	
2 a 881	Um sinal de terminação de transcrição/ poliadenilação da α -subunidade da hormona glicoproteica pituitária bovina (α -FSH) (Goodwin et al., 1983, Nucleic Acids Res. 11:6873-82; Número de Acesso Genbank X00004)

(continuação)

<u>Número dos</u> <u>Pares de Base</u> <u>do Plasmídeo</u>	
882 a 2027	Um minigene da di-hidrofolato redutase (DHFR) de murganho contendo o promotor DHFR endógeno de murganho, as sequências codificantes de ADNc e os sinais de terminação de transcrição/poliadenilação de DHFR (Gasser <i>et al.</i> , 1982, Proc. Natl. Acad Sci. USA. 79:6522-6; Nunberg <i>et al.</i> , 1980, Cell 19:355-64; Setzer <i>et al.</i> , 1982, J. Biol. Chem. 257:5143-7; McGrogan <i>et al.</i> , 1985, J. Biol. Chem. 260:2307-14)
2031 a 3947	Sequências de pBR322 contendo o gene do marcador de resistência à ampicilina e a origem de replicação do plasmídeo em <i>E. coli</i> (Número de Acesso Genbank J01749)
3949 a 4292	Um promotor precoce, intensificador e origem de replicação de SV40 (Takebe <i>et al.</i> , 1988, Mol. Cell Biol. 8:466-72, Número de Acesso Genbank J02400)
4299 a 4565	Um elemento intensificador de tradução do domínio LTR de HTLV-1 (Seiki <i>et al.</i> , 1983, Proc. Natl. Acad Sci. USA. 80:3618-22, Número de Acesso Genbank J02029)
4574 a 4730	Um intrão dos sinais dadores/aceitadores de <i>splice</i> de 16S, 19S de SV40 (Okayama e Berg, 1983, Mol. Cell Biol. 3:280-9, Número de Acesso Genbank J02400)

(continuação)

Número dos Pares de Base do Plasmídeo	
4755 a 6158	O ADNc da cadeia pesada hVh/hCh2 entre os locais <i>Xba</i>I e <i>sal</i>I. Esta sequência deste fragmento da cadeia pesada é mostrada abaixo (SEQ ID N°:57) com os locais de restrição sublinhados: <i>Xba</i>I <u>TCTAGA</u> CCACCATGGA CATGAGGGTC CCCGCTCAGC TCCTGGGGCT CCTGCTATTG TGGTTGAGAG GTGCCAGATG TGAGGTCCAG CTGGTGCACTCTGGGGGAGG CTGGGTACAT CCTGGGGGGT CCCTGAGACT CTCCTGTGCAGGCTCTGGAT TCACCTTCAG TGGCCATGCT TTGCACTGGG TTCGCCAGGCTCCAGGAAAA GGTCTGGAGT GGGTATCAGG TATTGGTACT CATGGTGGGACATACTATGC AGACTCCGTG AAGGGCCGAT TCACCATCTC CAGAGACAATGCCAAGAACT CCTTGTTTCT TCAAATGAAC AGCCTGAGCG CCGAGGACATGGCTGTGTAT TACTGTACAA GAAGAAACTG <i>Bsm</i>BI GGGACAATTT GACTACTGGGGCCAGGGAAC CCTGGTCACC <u>GTCTCTAGTG</u> CCTCCACCAA GGGCCCATCGGTCTTCCCC TGGCGCCCTG CTCCAGGAGC ACCTCCGAGA GCACAGCGGCCCTGGGCTGC CTGGTCAAGG ACTACTTCCC CGAACCCTGTG ACGGTGTCGTGGAACCTCAGG CGCTCTGACC AGCGGCGTGC ACACCTTCCC AGCTGTCTACAGTCCTCAG GACTCTACTC CCTCAGCAGC GTGGTGACCG TGCCCTCCAGCAACTTCGGC ACCCAGACCT ACACCTGCAA CGTAGATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGT GGACAAGACA GTTGAGCGCA AATGTTGTGT CGAGTGCCCAACCGTGCCAG CACCACCTGT GGCAGGACCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCCAAAACCCAAG GACACCCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCACGTGCGTGGTGGTGA CGTGAGCCAC GAAGACCCCG AGGTCCAGTT CAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG ACAAAGCCAC GGGAGGAGCAGTTCAACAGC ACGTTCCGTG TGGTCAGCGT CCTACCGTT GTGCAACAGGACTGGCTGAA CGGCAAGGAG TACAAGTGCA AGGTCTCCAA CAAAGGCCTCCCAGCCCCCA TCGAGAAAAC CATCTCCAAA ACCAAAGGGC AGCCCCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGC CCCCATCCCG GGAGGAGATG ACCAAGAACCAGGTCAGCCT GACCTGCCTG GTCAAAGGCT TCTACCCAG CGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG AACAACTACA AGACCACACCTCCCATGCTG GACTCCGACG GCTCCTTCTT CCTCTACAGC AAGCTCACCCTGGACAAGAG CAGGTGGCAG CAGGGGAACG TCTTCTCATG CTCCGTGATGCATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACGCAG <i>sal</i>I AAGAGCCTCT CCCTGTCTCCGGGTAAATGA TAAGT<u>CGAC</u>

O plasmídeo linear pDSR α 19:hIgG2_H foi preparado por digestão do plasmídeo pDSR19:região variável humana/região constante humana de IgG2 com as enzimas de restrição *Xba*I e

*Bsm*BI, para remover a região variável humana, e purificado utilizando uma Kit de Extração de Gel QIAquick. O plasmídeo linear pDSR α 19:hIgG2C_H contendo o domínio da região constante humana de IgG2 de 1 kpb foi utilizado para aceitar regiões variáveis do anticorpo α IL-1R derivadas de hibridoma.

Construção do Clone de Expressão da Cadeia Pesada IgG2 anti-IL1-RI

O fragmento da região variável da cadeia pesada de α IL-1R1 15C4, acima descrito, foi ligado no vector de expressão de mamífero pDSR α 19:hIgG2C_H. O ADN do clone de expressão da cadeia pesada de IgG2 15C4 foi sequenciado para confirmar que codificava o mesmo péptido da região variável da cadeia pesada que foi identificado no hibridoma 15C4. O vector de expressão final, pDSR α 19:15C4 da cadeia pesada IgG2 tinha 6161 pares de bases e contém sete regiões funcionais descritas na Tabela 10.

Tabela 10

<u>Número dos</u> <u>Pares de Base</u> <u>do Plasmídeo</u>	
2 a 881	Um sinal de terminação de transcrição/ poliadenilação da α -subunidade da hormona glicoproteica pituitária bovina (α -FSH) (Goodwin <i>et al.</i> , 1983, Nucleic Acids Res. 11:6873-82; Número de Acesso Genbank X00004)

(continuação)

<u>Número dos</u> <u>Pares de Base</u> <u>do Plasmideo</u>	
882 a 2027	Um minigene da di-hidrofolato redutase (DHFR) de murganho contendo o promotor DHFR endógeno de murganho, as sequências codificantes de ADNc e os sinais de terminação de transcrição/ poliadenilação de DHFR (Gasser <i>et al.</i> , 1982, Proc. Natl. Acad Sci. USA. 79:6522-6; Nunberg <i>et al.</i> , 1980, Cell 19:355-64; Setzer <i>et al.</i> , 1982, J. Biol. Chem. 257:5143-7; McGrogan <i>et al.</i> , 1985, J. Biol. Chem. 260:2307-14)
2031 a 3947	Sequências de pBR322 contendo o gene do marcador de resistência à ampicilina e a origem de replicação do plasmídeo em <i>E. coli</i> (Número de Acesso Genbank J01749)
3949 a 4292	Um promotor precoce, intensificador e origem de replicação de SV40 (Takebe <i>et al.</i> , 1988, Mol. Cell Biol. 8:466-72, Número de Acesso Genbank J02400)
4299 a 4565	Um elemento intensificador de tradução do domínio LTR de HTLV-1 (Seiki <i>et al.</i> , 1983, Proc. Natl. Acad Sci. USA. 80:3618-22, Número de Acesso Genbank J02029)
4574 a 4730	Um intrão dos sinais dadores/aceitadores de <i>splice</i> de 16S, 19S de SV40 (Okayama e Berg, 1983, Mol. Cell Biol. 3:280-9, Número de Acesso Genbank J02400)
4755 a 6161	O ADNc da cadeia pesada IgG2 15C4 entre os locais <i>XbaI</i> e <i>SalI</i>

Construção de pDSR19:hIgG4C_H

Um plasmídeo de expressão de MAb pDSR α 19:região variável humana/região constante humana de IgG4 (hVh/hCh4) foi construído como o resultado de uma ligação de três partes do produto de PCR da região variável de anticorpo humano terminado com *Xba*I e *Bsm*BI, a região constante de IgG4 humana (C_{H1}, charneira, domínios C_{H2} e C_{H3}) digerida com *Bsm*BI e *Sal*I e isolada do gel, e um pDSRa19 linearizado com extremidades *Xba*I e *Sal*I. O vector de expressão final, pDSR α 19:região variável humana/região constante humana de IgG4 (hVh/hCh4) (ver Pedido Provisório de Patente U.S. N° 60/370407, do mesmo titular e co-pendente, apresentado em 5 de Abril de 2002, "Human Anti-OPGL Neutralizing Antibodies As Selective OPGL Pathway Inhibitors"), tem 6167 pares de bases e contém 7 regiões funcionais descritas na Tabela 11.

Tabela 11

<u>Número dos</u> <u>Pares de Base</u> <u>do Plasmídeo</u>	
2 a 881	Um sinal de terminação de transcrição/ poliadenilação da α -subunidade da hormona glicoproteica pituitária bovina (α -FSH) (Goodwin <i>et al.</i> , 1983, Nucleic Acids Res. 11:6873-82; Número de Acesso Genbank X00004)

(continuação)

<u>Número dos</u> <u>Pares de Base</u> <u>do Plasmídeo</u>	
882 a 2027	Um minigene da di-hidrofolato redutase (DHFR) de murganho contendo o promotor DHFR endógeno de murganho, as sequências codificantes de ADNc e os sinais de terminação de transcrição/poliadenilação de DHFR (Gasser <i>et al.</i> , 1982, Proc. Natl. Acad Sci. USA. 79:6522-6; Nunberg <i>et al.</i> , 1980, Cell 19:355-64; Setzer <i>et al.</i> , 1982, J. Biol. Chem. 257:5143-7; McGrogan <i>et al.</i> , 1985, J. Biol. Chem. 260:2307-14)
2031 a 3947	Sequências de pBR322 contendo o gene do marcador de resistência à ampicilina e a origem de replicação do plasmídeo em <i>E. coli</i> (Número de Acesso Genbank J01749)
3949 a 4292	Um promotor precoce, intensificador e origem de replicação de SV40 (Takebe <i>et al.</i> , 1988, Mol. Cell Biol. 8:466-72, Número de Acesso Genbank J02400)
4299 a 4565	Um elemento intensificador de tradução do domínio LTR de HTLV-1 (Seiki <i>et al.</i> , 1983, Proc. Natl. Acad Sci. USA. 80:3618-22, Número de Acesso Genbank J02029)
4574 a 4730	Um intrão dos sinais dadores/aceitadores de <i>splice</i> de 16S, 19S de SV40 (Okayama e Berg, 1983, Mol. Cell Biol. 3:280-9, Número de Acesso Genbank J02400)

(continuação)

Número dos Pares de Base do Plasmideo	
4755 a 6167	O ADNc da cadeia pesada hVh/hCh4 entre os locais <i>Xba</i>I e <i>sal</i>I. Esta sequência deste fragmento da cadeia pesada é mostrada abaixo (SEQ ID N°:58) com os locais de restrição sublinhados: <i>Xba</i>I <u>TCT AG</u>ACCACCAT GGACATGAGG GTCCCCGCTC AGCTCCTGGG GCTCCTGCTA TTGTGGTTGA GAGGTGCCAG ATGTGAGGTC CAGCTGGTGCACTCTGGGGG AGGCTTGGTA CATCCTGGGG GGTCCCTGAG ACTCTCCTGTGCAGGCTCTG GATTACCTT CAGTGGCCAT GCTTTGCACT GGGTTCGCCAGGCTCCAGGA AAAGGTCTGG AGTGGGTATC AGGTATTGGT ACTCATGGTGGGACATACTA TGCAGACTCC GTGAAGGGCC GATTACCAT CTCCAGAGACAATGCCAAGA ACTCCTTGGT TCTTCAAATG AACAGCCTGA GCGCCGAGGACATGGCTGTG TATTACTGTA CAAGAAGAAA CTGGGGACAA TTTGACTACTGGGGCCAGGG <i>Bsm</i>BI AACCTGGTC <u>ACCGTCTCTA</u> GTGCCAGCAC CAAGGGGCCATCCGTCTTCC CCCTGGCGCC CTGCTCCAGG AGCACCTCCG AGAGCACAGCCGCCCTGGGC TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCCGAACCG GTGACGGTGTCTGTGGAATC AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT CCCGGCTGTCTACAGTCCT CAGGACTCTA TCCCTCAGC AGCGTGGTGA CCGTGCCCTCCAGCAGCTG GGCACGAAGA CCTACACCTG CAACGTAGAT CACAAGCCCAGCAACACCAA GGTGGACAAG AGAGTTGAGT CCAAATATGG TCCCCATGCCCATCATGCC CAGCACCTGA GTTCTGGGG GGACCATCAG TCTTCTGTTCCCCCAAAA CCCAAGGACA CTCTCATGAT CTCCCGGACC CTTGAGGTCACGTGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCAGGAAG ACCCGAGGT CCAGTTCAACTGGTACGTGG ATGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGAGGAGCAGTTC AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCTGCACCAAGGACTG GCTGAACGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAAGGCCTCCCGT CCTCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGGCAGCCCCGAGAGCCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCAGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA CCCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TACAGCAGGCTAACCGTGA CAAGAGCAGG TGGCAGGAGG GGAATGTCTT CTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC <i>Sal</i>I ACACAGAAGA GCCTCTCCCTGTCTCTGGGT AAATGATAAG <u>TCGAC</u>

O plasmídeo linear pDSRα19:hIgG4C_H foi preparado por digestão do plasmídeo pDSR19:região variável humana/região constante humana de IgG4 com as enzimas de restrição *Xba*I e

*Bsm*BI, para remover a região variável humana, e purificado utilizando um Kit de Extração de Gel QIAquick. O plasmídeo linear pDSR α 19:hIgG4C_H contendo o domínio da região constante humana de IgG4 de 1 kpb foi utilizado para aceitar regiões variáveis do anticorpo α IL-1R derivadas de hibridoma.

Construção do Clone de Expressão da Cadeia Pesada IgG4 Anti-IL1-RI

O fragmento da região variável da cadeia pesada de α IL-1R1 15C4, acima descrito, foi ligado no vector de expressão de mamífero pDSR α 19:hIgG4C_H. O ADN do clone de expressão da cadeia pesada de IgG4 15C4 foi sequenciado para confirmar que codificava o mesmo péptido da região variável da cadeia pesada que foi identificado no hibridoma 15C4. O vector de expressão final, pDSR α 19:15C4 da cadeia pesada IgG4 tinha 6164 pares de bases e contém sete regiões funcionais descritas na Tabela 12.

Tabela 12

<u>Número dos</u> <u>Pares de Base</u> <u>do Plasmídeo</u>	
2 a 881	Um sinal de terminação de transcrição/ poliadenilação da α -subunidade da hormona glicoproteica pituitária bovina (α -FSH) (Goodwin <i>et al.</i> , 1983, Nucleic Acids Res. 11:6873-82; Número de Acesso Genbank X00004)

(continuação)

<u>Número dos</u> <u>Pares de Base</u> <u>do Plasmideo</u>	
882 a 2027	Um minigene da di-hidrofolato redutase (DHFR) de murganho contendo o promotor DHFR endógeno de murganho, as sequências codificantes de ADNc e os sinais de terminação de transcrição/ poliadenilação de DHFR (Gasser <i>et al.</i> , 1982, Proc. Natl. Acad Sci. USA. 79:6522-6; Nunberg <i>et al.</i> , 1980, Cell 19:355-64; Setzer <i>et al.</i> , 1982, J. Biol. Chem. 257:5143-7; McGrogan <i>et al.</i> , 1985, J. Biol. Chem. 260:2307-14)
2031 a 3947	Sequências de pBR322 contendo o gene do marcador de resistência à ampicilina e a origem de replicação do plasmídeo em <i>E. coli</i> (Número de Acesso Genbank J01749)
3949 a 4292	Um promotor precoce, intensificador e origem de replicação de SV40 (Takebe <i>et al.</i> , 1988, Mol. Cell Biol. 8:466-72, Número de Acesso Genbank J02400)
4299 a 4565	Um elemento intensificador de tradução do domínio LTR de HTLV-1 (Seiki <i>et al.</i> , 1983, Proc. Natl. Acad Sci. USA. 80:3618-22, Número de Acesso Genbank J02029)
4574 a 4730	Um intrão dos sinais dadores/aceitadores de <i>splice</i> de 16S, 19S de SV40 (Okayama e Berg, 1983, Mol. Cell Biol. 3:280-9, Número de Acesso Genbank J02400)
4755 a 6164	O ADNc da cadeia pesada IgG4 15C4 entre os locais <i>XbaI</i> e <i>salI</i>

Exemplo 7

Expressão de anticorpos anti-IL-1R1 em células de ovário de hamster Chinês (CHO)

Os anticorpos anti-IL-1R1 recombinantes são produzidos em células de ovário de hamster Chinês, especificamente CHO AM-1/D, como divulgado na Patente U.S. N° 6210924. Resumidamente, as sequências de ADN que codificam as cadeias pesadas ou leves completas de cada anticorpo anti-IL-1R1 da invenção, são clonadas em vectores de expressão. As células CHO AM-1/D são co-transfectadas com um vector de expressão capaz de expressar uma cadeia pesada completa e um vector de expressão que expressa a cadeia leve completa do anticorpo anti-IL-1R1 apropriado. Por exemplo, para produzir o anticorpo 26F5, as células são co-transfectadas com um vector capaz de expressar uma cadeia leve completa compreendendo a sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°:38 e um vector capaz de expressar uma cadeia pesada completa compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 22 ou SEQ ID N°: 24. Para produzir o anticorpo 27F2, as células são co-transfectadas com um vector capaz de expressar uma cadeia leve completa compreendendo a sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°: 38 e um vector capaz de expressar uma cadeia pesada completa compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID N°: 26, SEQ ID N°: 28 ou SEQ ID N°: 30. Para produzir o anticorpo 15C4, as células são co-transfectadas com um vector capaz de expressar uma cadeia leve completa compreendendo a sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°: 40 e um vector capaz de expressar uma cadeia pesada completa compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID N°: 32, SEQ ID N°: 34 ou SEQ ID N°: 36. A Tabela 13 resume as cadeias leves completas e pesadas completas para os vários

anticorpos IL-1R1. A designação “.../IgG=” descreve a sequência da região constante para o anticorpo particular.

Tabela 13

Anticorpo	Região Variável da Cadeia Pesada + Região Constante da Cadeia Pesada	Cadeia Pesada Completa
26F5/IgG1 (nucleótido)	SEQ ID N°: 9 + SEQ ID N°: 1	SEQ ID N°: 19
26F5/IgG1 (aminoácido)	SEQ ID N°: 10 + SEQ ID N°: 2	SEQ ID N°: 20
26F5/IgG2 (nucleótido)	SEQ ID N°: 9 + SEQ ID N°: 5	SEQ ID N°: 21
26F5/IgG2 (aminoácido)	SEQ ID N°: 10 + SEQ ID N°: 6	SEQ ID N°: 22
26F5/IgG4 (nucleótido)	SEQ ID N°: 9 + SEQ ID N°: 7	SEQ ID N°: 23
26F5/IgG4 (aminoácido)	SEQ ID N°: 10 + SEQ ID N°: 8	SEQ ID N°: 24
27F2/IgG1 (nucleótido)	SEQ ID N°: 13 + SEQ ID N°: 1	SEQ ID N°: 25
27F2/IgG1 (aminoácido)	SEQ ID N°: 14 + SEQ ID N°: 2	SEQ ID N°: 26
27F2/IgG2 (nucleótido)	SEQ ID N°: 13 + SEQ ID N°: 5	SEQ ID N°: 27
27F2/IgG2 (aminoácido)	SEQ ID N°: 14 + SEQ ID N°: 6	SEQ ID N°: 28
27F2/IgG4 (nucleótido)	SEQ ID N°: 13 + SEQ ID N°: 7	SEQ ID N°: 29

(continuação)

Anticorpo	Região Variável da Cadeia Pesada + Região Constante da Cadeia Pesada	Cadeia Pesada Completa
27F2/IgG4 (aminoácido)	SEQ ID N°: 14 + SEQ ID N°: 8	SEQ ID N°: 30
15C4/IgG1 (nucleótido)	SEQ ID N°: 15 + SEQ ID N°: 1	SEQ ID N°: 31
15C4/IgG1 (aminoácido)	SEQ ID N°: 16 + SEQ ID N°: 2	SEQ ID N°: 32
15C4/IgG2 (nucleótido)	SEQ ID N°: 15 + SEQ ID N°: 5	SEQ ID N°: 33
15C4/IgG2 (aminoácido)	SEQ ID N°: 16 + SEQ ID N°: 6	SEQ ID N°: 34
15C4/IgG4 (nucleótido)	SEQ ID N°: 15 + SEQ ID N°: 7	SEQ ID N°: 35
15C4/IgG4 (aminoácido)	SEQ ID N°: 16 + SEQ ID N°: 8	SEQ ID N°: 36
Anticorpo	Região Variável da Cadeia Leve + Região Constante da Cadeia Leve	Cadeia Leve Completa
26F5/27F2 (nucleótido)	SEQ ID N°: 11 + SEQ ID N°: 3	SEQ ID N°: 37
26F5/27F2 (aminoácido)	SEQ ID N°: 12 + SEQ ID N°: 4	SEQ ID N°: 38
15C4 (nucleótido)	SEQ ID N°: 17 + SEQ ID N°: 3	SEQ ID N°: 39
15C4 (aminoácido)	SEQ ID N°: 18 + SEQ ID N°: 4	SEQ ID N°: 40

A expressão estável de anticorpos anti-IL-1R1 é realizada por co-transfecção de células CHO AM-1/D deficientes em di-hidrofolato redutase (DHFR), com os vectores de expressão. As transfecções são realizadas utilizando técnicas convencionais (co-precipitação com fosfato de cálcio) e selecção por DHFR. As colónias transfectadas são isoladas e cultivadas até à confluência em placas de 24 poços. Os anticorpos produzidos pelas células transfectadas são examinados quanto ao enrolamento apropriado e actividade neutralizante. Os clones que sobreproduzem anticorpos anti-IL-1R1 apropriadamente enrolados dos isotipos IgG1, IgG2 e IgG4 são seleccionados e os anticorpos são purificados como descrito abaixo.

Exemplo 8

Produção de Anticorpo anti-IL-1R1

Os anticorpos anti-IL-1R1 são produzidos por expressão numa linha clonal de células CHO. Para cada série produtiva, as células de um único frasquinho são descongeladas em meio de cultura de células sem soro. As células são inicialmente cultivadas num balão em T e são expandidas em série através de uma série de balões com agitação magnética, até ser produzido inóculo suficiente para inocular num biorreactor de 20 L. Após crescimento durante 5-10 dias, a cultura é depois utilizada para inocular um biorreactor de 300 L. Após crescimento durante mais 5-10 dias, a cultura é utilizada para inocular um biorreactor de 2000 L. A produção é realizada num biorreactor de 2000 L utilizando uma cultura em modo descontínuo, em que são alimentados nutrientes contendo componentes concentrados para manter o crescimento celular e a viabilidade da cultura. A

produção dura aproximadamente duas semanas, durante as quais o anticorpo anti-IL1-R1 é produzido constitutivamente pelas células e segregado no meio de cultura celular.

O reactor de produção é controlado por um pH, temperatura e nível de oxigénio dissolvido estabelecidos: o pH é controlado por adição de dióxido de carbono gasoso e carbonato de sódio; o oxigénio dissolvido é controlado pelo fluxo dos gases ar, azoto e oxigénio.

No final da produção, o caldo celular é alimentado numa centrífugadora de discos e o sobrenadante da cultura é separado das células. O concentrado é adicionalmente clarificado através de um filtro de profundidade, seguido por um filtro de 0,2 µm. O meio condicionado clarificado é depois concentrado por ultrafiltração de fluxo tangencial. O meio condicionado é concentrado 15 a 30 vezes. O meio condicionado concentrado é depois processado por purificação ou congelado para purificação numa data posterior.

Exemplo 9

Mapeamento de Epitopos Utilizando Proteínas de Fusão com Avidina

Para produzir proteínas de fusão com avidina, o ADNc que codifica a avidina de galinha (com a sequência de sinal endógena) foi ligado com a extremidade 5' de ADNc que codificam os domínios extracelulares maduros de IL-1R1 humano ou de cinomolgos, fundidos com uma sequência marcadora-FLAG na extremidade 3'. Os genes de fusão marcados com FLAG foram

montados num vector pALTERMAX utilizando técnicas moleculares convencionais. A sequência de aminoácidos da proteína de fusão IL-1R1 humano-avidina é mostrada na Figura 23 (SEQ ID N°:59). A sequência de aminoácidos da proteína de fusão IL-1R1 cinomolgo-avidina é mostrada na Figura 24 (SEQ ID N°: 60). Foi gerado um painel de proteínas mutantes avidina-cinoIL-1RI-FLAG, em que aminoácidos humanos foram substituídos por resíduos correspondentes de cinomolgos, utilizando o Altered Sites II Mammalian *In Vitro* Mutagenesis System (Promega Corp.). As mutações são ilustradas na Figura 24.

Os plasmídeos que codificam o mutante de avidina-cinoIL-1R e as proteínas de tipo selvagem, assim como que a proteína de avidina-huIL-1RI-FLAG, foram transfectados transientemente em células 293T, utilizando o reagente de transfecção Cytofectine (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Transfectantes simulados foram utilizados como controlos negativos. Os anticorpos monoclonais anti-huIL-1RI (MAb) que se ligam a estas proteínas foram avaliados por transferência de Western e ensaios de ligação baseados em esferas que utilizam meio condicionado (CM) recolhido a partir das células transfectadas.

Para a análise de transferência de Western, o CM foi diluído 1:3 em tampão de amostra SDS não redutor, fervido durante 5-10 minutos e aplicado em géis de Tris-glicina a 10%. Após SDS-PAGE e transferência de Western, as membranas foram bloqueadas com 3%de BSA/1% de ovalbumina em PBS/0,1% de Tween-20 (PBST) e coradas com MAb anti-huIL-1RI. Um anticorpo anti-IgG humana-Fc-HRP de cabra (Pierce Chemical Co.) diluído 1:15000 em PBST foi utilizado para a detecção secundária. A detecção anti-FLAG foi utilizada para normalizar o conteúdo proteico. A captura de imagem e densitometria foram realizadas utilizando um sistema digital de imagiologia FluorChem 8000

(Alpha Innotech Corp.). As intensidades do sinal para os MAb anti-huIL-1RI foram normalizadas contra os valores para o anticorpo anti-FLAG, para ter em consideração a variação do conteúdo proteico. A ligação do anticorpo foi expressa como uma percentagem de ligação a avidina-IL-1RI humano-FLAG.

Os resultados da transferência de Western são mostrados na Figura 25A. A Figura 25B mostra a análise densitométrica de um conjunto duplicado de experiências de transferência de Western. Os resíduos humanos críticos para ligação do anticorpo são aqueles que restauram o sinal quando substituídos em cinoIL-1RI. Em geral, as mutações 1 e 2 (ilustradas na Figura 24), isoladamente ou em combinação, restauram a ligação a muitos anticorpos (15C4/IgG2, 5B8, 1C2, 24H2, 16E9, 26E4 e 20G1) enquanto as mutações 10,1 e 10,2 não. Nenhum destes anticorpos se ligou a cinoIL-1RI de tipo selvagem. Dois anticorpos (27F2 e 19C8) ligaram-se consistentemente a todas as proteínas mutantes, assim como a cinoIL-1RI de tipo selvagem. Isto sugeriu que o epítipo 4 (resíduos Y279-v281 de cinoIL-1RI), identificado nas proteínas paralog humanas/rato e inalteradas em IL-1RI de cinomolgos, foi o epítipo dominante para estes anticorpos. O epítipo 4 está a negrito, em itálico e sublinhado na sequência de aminoácidos mostrada na Figura 24.

Nos ensaios de ligação multiplexados baseados em esferas, as proteínas de fusão com avidina foram capturadas por incubação do CM com esferas fluorescentes revestidas de biotina, um conjunto de esferas por proteína de fusão (Beadlyte Multi-Biotin 10plex Bead Kit; Upstate Biotechnologies). As esferas foram lavadas e reunidas em PBST e fraccionadas nos poços de uma placa de fundo de filtro de 96 poços (Millipore Corp.). Os anticorpos (MAb anti-huIL-1RI ou MAb anti-FLAG) foram adicionados a 25 µg/mL e incubados durante 1 hora. As esferas foram lavadas novamente e

uma mistura de anticorpo anti-IgG de murganho conjugado com ficoeritrina e (Fab')₂ anti-IgG humana, foi utilizada para detectar a ligação do anticorpo. Após uma incubação de 1 hora, as esferas foram lavadas e ressuspensas em PBST. As intensidades médias de fluorescência (MFI) foram medidas utilizando um Luminex 100 (Luminex Corp). Os dados foram normalizados utilizando os valores de MFI para a ligação de MAb anti-FLAG, para ter em consideração a variação do conteúdo proteico. A ligação do anticorpo foi expressa como uma percentagem de ligação a avidina-huIL-1R1-FLAG (Figura 26). O perfil de ligação dos anticorpos anti-IL-1R1 às proteínas avidina-cinoIL1R1-FLAG mutadas com resíduos humanos, assim como às proteínas de cinomolgos de tipo selvagem e IL-1R1 humanas, foi consistente com a análise de imunotransferência mostrada na Figura 25.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Varnum, Brian
 Witte, Alison
 Vezina, Chris
 Wong, Lu Min
 Qian, Xueming

<120> Anticorpo Monoclonal Terapêutico Anti-IL-1R1 Humano

<130> 01, 1554

<160> 79

<170> PatentIn versão 3.0

<210> 1

<211> 990

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 1

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg	60
ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg	120
tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctctca	180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc	300
aaatcttgtg acaaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga	360
ccgtcagtct tctcttcccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct	420
gaggtcacat gcgtgggtgg ggacgtgagc cacgaagacc ctgagggtcaa gttcaactgg	480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac	540

```

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag      600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc      660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag      720
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc      780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg      840
ctggactccg acggctcctt cttcctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg      900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg      960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa      990

```

<210> 2

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 2

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1          5          10          15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20          25          30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35          40          45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50          55          60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65          70          75          80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85          90          95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100         105         110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115         120         125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130         135         140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145         150         155         160

```

Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	165	170	175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	180	185	190	
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	195	200	205	
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	210	215	220	
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	225	230	235	240
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	245	250	255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	260	265	270	
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	275	280	285	
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	290	295	300	
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	305	310	315	320
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							325	330		

<210> 3

<211> 321

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 3

cgaactgtgg	ctgcaccatc	tgtcttcac	ttcccgccat	ctgatgagca	gttgaaatct	60
ggaactgcct	ctgttggtg	cctgctgaat	aacttctatc	ccagagagge	caaagtacag	120
tggaaggtgg	ataacgccct	ccaatcgggt	aactcccagg	agagtgtcac	agagcaggac	180
agcaaggaca	gcacctacag	cctcagcagc	accctgacgc	tgagcaaagc	agactacgag	240
aaacacaaag	tctacgcctg	cgaagtcacc	catcaggggc	tgagctcgcc	cgtcacaaag	300
agcttcaaca	ggggagagtg	t				321

<210> 4
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 4

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

<210> 5
 <211> 978
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 5

gcctccacca	agggcccatc	ggtcttcccc	ctggcgccct	gtccaggag	cacctccgag	60
agcacagcgg	ccctgggctg	cctgggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggt	gacgggtgtcg	120
tggaaactcag	gcgctctgac	cagcggcgtg	cacaccttcc	cagctgtcct	acagtcctca	180
ggactctact	ccctcagcag	cgtggtgacc	gtgccctcca	gcaacttcgg	caccagacc	240
tacacctgca	acgtagatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggacaagac	agttgagcgc	300
aaatgttgtg	tcgagtgcc	accgtgcca	gcaccacctg	tggcaggacc	gtcagtcttc	360
ctcttcccc	caaaacccaa	ggacaccctc	atgatctccc	ggacccctga	ggtcacgtgc	420
gtgggtggtg	acgtgagcca	cgaagacccc	gaggtccagt	tcaactggta	cgtggacggc	480

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt	540
gtggtcagcg tcctcaccgt tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc	600
aaggtctcca acaaaggcct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa aaccaaggga	660
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac	720
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatgc cgtggagtgg	780
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac	840
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac	900
gtcttctcat gtcctgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc	960
tcctgtctc cgggtaaa	978

<210> 6

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 6

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

Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
			100					105						110	
Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
		115					120					125			
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
	130					135					140				
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
145					150				155						160

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

<210> 7

<211> 981

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 7

gccagcacca agggggccatc cgtctttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag	60
agcacagccg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg	120
tggaaactcag gcgccctgac cagcggcggtg cacaccttcc cggtctgtcct acagtcttca	180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc	240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc	300

aaatatggtc	ccccatgccc	atcatgccc	gcacctgagt	tcttgggggg	accatcagtc	360
ttctgttcc	ccccaaaacc	caaggacact	ctcatgatct	cccggacccc	tgaggtcacg	420
tgcgtggtgg	tgacgtgag	ccaggaagac	cccaggtcc	agttcaactg	gtacgtggat	480
ggcgtggagg	tgcataatgc	caagacaaag	ccgcgggagg	agcagttcaa	cagcacgtac	540
cgtgtggtca	gcgtcctcac	cgtcctgcac	caggactggc	tgaacggcaa	ggagtacaag	600
tgcaaggtct	ccaacaaagg	cctcccgtcc	tccatcgaga	aaaccatctc	caaagccaaa	660
gggcagcccc	gagagccaca	ggtgtacacc	ctgcccccat	cccaggagga	gatgaccaag	720
aaccaggtca	gcctgacctg	cctgggtcaa	ggcttctacc	ccagcgacat	cgccgtggag	780
tgggagagca	atgggcagcc	ggagaacaac	tacaagacca	cgctcccgt	gctggactcc	840
gacggctcct	tcttctctta	cagcaggeta	accgtgraca	agagcaggtg	gcaggagggg	900
aatgtcttct	catgctccgt	gakgcatgag	gctctgcaca	accactacac	acagaagagc	960
ctctccctgt	ctctgggtaa	a				981

<210> 8

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 8

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

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp	
145	150 155 160
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe	
	165 170 175
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp	
	180 185 190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu	
	195 200 205
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg	
	210 215 220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys	
	225 230 235 240
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp	
	245 250 255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys	
	260 265 270
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser	
	275 280 285
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser	
	290 295 300
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser	
	305 310 315 320
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys	
	325

<210> 9

<211> 417

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 9

atggagtttg ggctgagctg ggtcttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag	60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccet gagactctcc	120
tgtgcagcgt ctggattcac cttcagcaac tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca	180
ggcaaggggc tggagtgggt ggcaggcatt tggaatgatg gaattaataa ataccatgca	240
cactccgtga ggggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg	300
caaatgaaca gcccgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agcacggtct	360
ttcgactggc tattatttga gttctggggc cagggaaacc tggtcacctg ctctagt	417

<210> 10

<211> 139

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 10

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

<210> 11

<211> 384

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 11

atggaagccc	cagctcagct	tctcttcctc	ctgctactct	ggctcccaga	taccaccgga	60
gaaattgtgt	tgacacagtc	tccagccacc	ctgtctttgt	ctccagggga	aagagccacc	120
ctctcctgca	gggccagtc	gagtgttagc	agctacttag	cctggtacca	acagaaacct	180
ggccaggctc	ccaggctcct	catctatgat	gcaccaaca	gggccactcg	catcccagcc	240
aggttcagtg	gcagtgggtc	tgggacagac	ttcaactctc	ccatcagcag	cctagagcct	300
gaagattttg	cagtttatta	ctgtcagcag	cgtagcaact	ggcctccgct	cactttcggc	360
ggagggacca	aggtggagat	caaa				384

<210> 12
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 12

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

<210> 13
 <211> 417
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 13

atggagtttg	ggctgagctg	ggttttcctc	gttgctcttt	taagaggtgt	ccagtgtcag	60
gtgcagctgg	tggagtctgg	gggaggcgtg	gtccagcctg	ggaggtccct	gagactctcc	120
tgtgcagtgt	ctggattcac	cttcagtaac	tatggcatgc	actgggtccg	ccaggctcca	180
ggcaaggggc	tggagtgggt	ggcagctata	tggaatgatg	gagaaaataa	acaccatgca	240
ggctccgtga	ggggccgatt	caccatctcc	agagacaatt	ccaagaacac	gctgtatctg	300
caaatgaaca	gcctgagagc	cgaggacacg	gctgtgtatt	actgtgcgag	aggacgatat	360
tttgactggt	tattatttga	gtattggggc	cagggaaacc	tggtcacctg	ctctagt	417

<210> 14

<211> 139

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 14

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

<210> 15

<211> 411

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 15

atgggggtcaa	ccgccatcct	cgccctcctc	ctggctgttc	tccaaggagt	ctgtgccgag	60
gtgcagctga	tgcagtctgg	agcagaggtg	aaaaagcccg	gggagtctct	gaagatctcc	120
tgtaagggtt	ctggatacag	cttttccttc	cactggatcg	cctgggtgcg	ccagatgccc	180
gggaaaggcc	tggagtggat	ggggatcatc	catcctgggtg	cctctgatac	cagatacagc	240
ccgtccttcc	aaggccaggt	caccatctca	gccgacaact	ccaacagcgc	cacctacctg	300
cagtggagca	gcctgaaggc	ctcggacacc	gccatgtatt	tctgtgcgag	acaaagggaa	360
ctcgactact	ttgactactg	gggccaggga	accctgggtca	ccgtctctag	t	411

<210> 16
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 16

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

Pro	Ser	Phe	Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Asn	Ser	Asn	Ser
			85						90					95	
Ala	Thr	Tyr	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met
			100					105					110		
Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Gln	Arg	Glu	Leu	Asp	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly
		115					120					125			
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
	130					135									

<210> 17
 <211> 378
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 17

```
atgtcgccat cacaactcat tgggtttctg ctgctctggg ttccagcctc caggggtgaa      60
attgtgctga ctcaagtctcc agactttcag tctgtgactc caaaggagaa agtcaccatc      120
acctgccggg ccagtcagag cattggtagt agcttacact ggtaccagca gaaaccagat      180
cagtcctcaa agctcctcat caagtatgct tcccagtcct tctcaggggt cccctcgagg      240
ttcagtggca gtggatctgg gacagatttc accctcacca tcaatagcct ggaagctgaa      300
gatgctgcag cgtattactg tcatcagagt agtagtttac ctctcacttt cggcggaggg      360
accaaggtgg agatcaaa                                     378
```

<210> 18
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 18

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

<210> 19
 <211> 1407
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 19

atggagtttg	ggctgagctg	ggtcttcctc	gttgctcttt	taagaggtgt	ccagtgtcag	60
gtgcagctgg	tggagtctgg	gggaggcgtg	gtccagcctg	ggaggtccct	gagactctcc	120
tgtgcagcgt	ctggattcac	cttcagcaac	tatggcatgc	actgggtccg	ccaggctcca	180
ggcaaggggc	tggagtgggt	ggcaggcatt	tggaatgatg	gaattaataa	ataccatgca	240
cactccgtga	ggggccgatt	caccatctcc	agagacaatt	ccaagaacac	gctgtatctg	300
caaatgaaca	gcccagagac	cgaggacacg	gctgtgtatt	actgtgcgag	agcacggtct	360
ttcgactggc	tattatttga	gttctggggc	cagggaaacc	tggtcaccgt	ctctagtgcc	420

```

tccaccaagg gcccatcggg cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 480
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtctcagga 600
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca gcttggggcac ccagacctac 660
atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaagggtg acaagaaagt tgagccaaa 720
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 780
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag 840
gtcatatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactgggtac 900
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 960
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1020
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 1080
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 1140
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1200
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag acaaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1260
gactccgacg gctccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1320
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1380
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 1407

```

<210> 20

<211> 469

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 20

```

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

```

Glu	Trp	Val	Ala	Gly	Ile	Trp	Asn	Asp	Gly	Ile	Asn	Lys	Tyr	His	Ala	
65					70					75					80	
His	Ser	Val	Arg	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	
				85					90					95		
Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Pro	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	
			100					105					110			
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ala	Arg	Ser	Phe	Asp	Trp	Leu	Leu	Phe	Glu	Phe	
		115					120					125				
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	
	130					135					140					
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	
145					150					155					160	
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	
				165					170					175		
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	
			180					185					190			
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	
		195					200					205				
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	
	210					215					220					
Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	
225					230					235					240	
Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	
				245					250					255		
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	
			260					265					270			
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	
		275					280					285				
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	
	290					295					300					
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	
305					310					315					320	
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	
				325					330					335		
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	
			340					345					350			
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	
		355					360					365				
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	
	370					375					380					

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
405 410 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys
465

<210> 21

<211> 1395

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 21

atggagtttg ggctgagctg ggtcttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag	60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtcct gagactctcc	120
tgtgcagcgt ctggattcac cttcagcaac tatggcatgc actgggtccg ccaggtcca	180
ggcaaggggc tggagtgggt ggcaggcatt tggaatgatg gaattaataa ataccatgca	240
cactccgtga ggggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg	300
caaatgaaca gcccgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagag agcacggctc	360
ttcgactggc tattatttga gttctggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctagtgcc	420
tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc	480
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg	540
aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccag ctgtcctaca gtcctcagga	600
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca acttcggcac ccagacctac	660
acctgcaacg tagatcaciaa gcccgacaac accaagggtg acaagacagt tgagcgcaaa	720
tggtgtgtcg agtgcccacc gtgcccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttcctc	780
ttccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtg	840
gtgggtggacg tgagccacga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggacggcgtg	900

```

gagggtgcata atgccaagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg      960
gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag      1020
gtctccaaca aaggcctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaagggcag      1080
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccgga aggagatgac caagaaccag      1140
gtcagcctga cctgcctggg caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag      1200
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacacctc ccatgctgga ctccgacggc      1260
tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc      1320
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc      1380
ctgtctccgg gtaaa                                     1395

```

<210> 22

<211> 465

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 22

```

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

```

Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	165	170	175
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	180	185	190
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	195	200	205
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	210	215	220
Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	225	230	235
Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	245	250	255
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	260	265	270
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	275	280	285
Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	290	295	300
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	305	310	315
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	325	330	335
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	340	345	350
Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	355	360	365
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	370	375	380
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	385	390	395
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	405	410	415
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	420	425	430
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	435	440	445
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	450	455	460
Lys																465		

<210> 23

<211> 1398

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 23

atggagtttg ggctgagctg ggtcttctctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag	60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggagggtccct gagactctcc	120
tgtgcagcgt ctggattcac cttcagcaac tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca	180
ggcaaggggc tggagtgggt ggcaggcatt tggaatgatg gaattaataa ataccatgca	240
cactccgtga ggggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg	300
caaatgaaca gcccagagac cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagag agcacggtct	360
ttcgactggc tattatttga gttctggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctagtgc	420
agcaccaagg ggccatccgt cttccccctg gcgcctgct ccaggagcac ctccgagagc	480
acagccgccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg	540
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga	600
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac gaagacctac	660
acctgcaacg tagatcaciaa gcccagcaac accaaggtgg acaagagagt tgagtccaaa	720
tatgggtccc catgcccac atgcccagca cctgagttcc tggggggacc atcagtcttc	780
ctgttcccc caaaaccaa ggacactctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc	840
gtggtggtgg acgtgagcca ggaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggatggc	900
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agttcaacag cacgtaccgt	960
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc	1020
aaggtctcca acaaaggcct cccgtcctcc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg	1080
cagccccgag agccacaggt gtacaccctg ccccatccc aggaggagat gaccaagaac	1140
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg	1200
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac	1260
ggctccttct tcctctacag caggctaacc gtgracaaga gcagggtggca ggaggggaat	1320
gtcttctcat gctccgtgac gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc	1380
tcctgtctc tgggtaaa	1398

<210> 24

<211> 466

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 24

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
 275 280 285
 Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 290 295 300
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
 305 310 315 320
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 325 330 335
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
 340 345 350
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 355 360 365
 Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 370 375 380
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 385 390 395 400
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 405 410 415
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
 420 425 430
 Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 435 440 445
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
 450 455 460
 Gly Lys
 465

<210> 25

<211> 1407

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 25

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag	60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtcctt gagactctcc	120
tgtgcagtgt ctggattcac cttcagtaac tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca	180

```

ggcaaggggc tggagtgggt ggcagctata tggaatgatg gagaaaataa acaccatgca 240
ggctccgtga ggggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag aggacgatat 360
tttgactggg tattatttga gtattggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctagtgcc 420
tccaccaagg gcccatcggg cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 480
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540
aactcaggcg cctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga 600
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 660
atctgcaacg tgaatcaciaa gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 720
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 780
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag 840
gtcacatgcg tgggtgggga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 900
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 960
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1020
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 1080
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 1140
accaagaacc aggtcagcct gacctgctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1200
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgctgctg 1260
gactccgacg gctccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1320
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1380
aagagcctct cctgtctcc gggtaaa 1407

```

<210> 26

<211> 469

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 26

```

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
1           5           10          15
Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
20          25          30

```


Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	
			340					345					350			
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	
		355					360					365				
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	
	370					375					380					
Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	
385					390					395					400	
Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	
				405					410					415		
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	
			420					425					430			
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	
	435						440					445				
Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	
450						455					460					
Leu	Ser	Pro	Gly	Lys												
465																

<210> 27

<211> 1395

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 27

```

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag      60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggagggtccct gagactctcc      120
tgtgcagtgt ctggattcac cttcagtaac tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca      180
ggcaaggggc tggagtgggt ggcagctata tggaatgatg gagaaaataa acaccatgca      240
ggctccgtga ggggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg      300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag aggacgatat      360
tttgactggg tattatttga gtattggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctagtgcc      420
tccaccaagg gccatcggt cttccccctg gcgccttget ccaggagcac ctccgagagc      480
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg      540
aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccag ctgtcctaca gtccctcagga      600
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca acttcggcac ccagacctac      660

```

acctgcaacg tagatcacaa gccagcaac accaaggtgg acaagacagt tgagcgcaaa 720
 tgttgtgtcg agtgcccacc gtgcccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttcctc 780
 tccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtg 840
 gtggtggacg tgagccacga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggacggcgtg 900
 gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg 960
 gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgcag 1020
 gtctccaaca aaggcctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaagggcag 1080
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac caagaaccag 1140
 gtcagcctga cctgcctggg caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag 1200
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacacctc ccatgctgga ctccgacggc 1260
 tcctttcttc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1320
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1380
 ctgtctccgg gtaaa 1395

<210> 28

<211> 465

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 28

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

Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Arg	Tyr	Phe	Asp	Trp	Leu	Leu	Phe	Glu	Tyr	115	120	125	
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	130	135	140	
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	145	150	155	160
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	165	170	175	
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	180	185	190	
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	195	200	205	
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	210	215	220	
Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	225	230	235	240
Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	245	250	255	
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	260	265	270	
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	275	280	285	
Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	290	295	300	
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	305	310	315	320
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	325	330	335	
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	340	345	350	
Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	355	360	365	
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	370	375	380	
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	385	390	395	400

Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu
				405					410					415	
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys
			420					425					430		
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
		435					440					445			
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
	450					455					460				
Lys															
465															

<210> 29

<211> 1398

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 29

atggagtttg	ggctgagctg	ggttttctctc	gttgctcttt	taagaggtgt	ccagtgtcag	60
gtgcagctgg	tggagtctgg	gggaggcgtg	gtccagcctg	ggaggtcctt	gagactctcc	120
tgtgcagtgt	ctggattcac	cttcagtaac	tatggcatgc	actgggtccg	ccaggetcca	180
ggcaaggggc	tggagtgggt	ggcagctata	tggaatgatg	gagaaaataa	acaccatgca	240
ggctccgtga	ggggccgatt	caccatctcc	agagacaatt	ccaagaacac	gctgtatctg	300
caaatgaaca	gcctgagagc	cgaggacacg	gctgtgtatt	actgtgcgag	aggacgatat	360
tttgactggg	tattatttga	gtattggggc	cagggaaacc	tggtcaccgt	ctctagtgcc	420
agcaccaagg	ggccatccgt	cttccccctg	gcgcctgtct	ccaggagcac	ctccgagagc	480
acagccgccc	tgggctgcct	ggtcaaggac	tacttccccg	aaccgggtgac	ggtgtcgtgg	540
aactcaggcg	ccctgaccag	cggcgtgcac	accttccccg	ctgtcctaca	gtcctcagga	600
ctctactccc	tcagcagcgt	ggtgaccgtg	ccctccagca	gcttgggcac	gaagacctac	660
acctgcaacg	tagatcacia	gcccagcaac	accaaggtgg	acaagagagt	tgagtccaaa	720
tatgggtccc	catgcccata	atgcccagca	cctgagttcc	tggggggacc	atcagtcttc	780
ctgttcccc	caaaacccaa	ggacactctc	atgatctccc	ggaccctga	ggtcacgtgc	840
gtgggtgggtg	acgtgagcca	ggaagacccc	gaggtccagt	tcaactggta	cgtggatggc	900
gtggaggtgc	ataatgccaa	gacaaagccg	cgggaggagc	agttcaacag	cacgtaccgt	960
gtggtcagcg	tcctcaccgt	cctgcaccag	gactggctga	acggcaagga	gtacaagtgc	1020

```

aaggtctcca acaaaggcct cccgtcctcc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1080
cagccccgag agccacaggt gtacaccctg ccccatccc aggaggagat gaccaagaac 1140
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1200
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1260
ggctccttct tcctctacag caggctaacc gtgracaaga gcaggtggca ggaggggaat 1320
gtcttctcat gctccgtgak gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc 1380
tcctgtctc tgggtaaa 1398

```

<210> 30

<211> 466

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 30

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

Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	
			180					185					190			
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	
		195					200					205				
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	
	210					215					220					
Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	
225					230					235					240	
Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	
				245					250					255		
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
			260					265					270			
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	
		275					280					285				
Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
	290					295					300					
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
305					310					315					320	
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
				325					330					335		
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	
			340					345					350			
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	
		355					360					365				
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
	370					375					380					
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
385						390					395				400	
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	
				405					410					415		
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	
			420					425					430			
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
		435					440					445				
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	
	450					455					460					
Gly	Lys															
465																

<210> 31

<211> 1401

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 31

atgggggtcaa	ccgccatcct	cgccctcctc	ctggctgttc	tccaaggagt	ctgtgccgag	60
gtgcagctga	tgcagtctgg	agcagaggtg	aaaaagcccg	gggagtctct	gaagatctcc	120
tgtaaggggt	ctggatacag	cttttccttc	cactggatcg	cctgggtgcg	ccagatgccc	180
gggaaaggcc	tggagtggat	ggggatcatc	catcctgggtg	cctctgatac	cagatacagc	240
ccgtccttcc	aaggccaggt	caccatctca	gccgacaact	ccaacagcgc	cacctacctg	300
cagtggagca	gcctgaaggc	ctcggacacc	gccatgtatt	tctgtgcgag	acaaagggaa	360
ctcgactact	ttgactactg	gggccagggg	accctgggtca	ccgtctctag	tgcctccacc	420
aagggcccat	cggtcttccc	cctggcaccc	tctccaaga	gcacctctgg	gggcacagcg	480
gccctgggct	gcctgggtcaa	ggactacttc	cccgaaccgg	tgacggtgtc	gtggaactca	540
ggcgccctga	ccagcggcgt	gcacaccttc	ccggctgtcc	tacagtcctc	aggactctac	600
tccctcagca	gcgtgggtgac	cgtgccctcc	agcagcttgg	gcaccagac	ctacatctgc	660
aacgtgaatc	acaagcccg	caacaccaag	gtggacaaga	aagttgagcc	caaactctgt	720
gacaaaactc	acacatgccc	accgtgcccc	gcacctgaac	tcctgggggg	accgtcagtc	780
ttcctcttcc	ccccaaaacc	caaggacacc	ctcatgatct	cccggacccc	tgaggtcaca	840
tgcgtgggtg	tggacgtgag	ccacgaagac	cctgagggtca	agttcaactg	gtacgtggac	900
ggcgtggagg	tgcataatgc	caagacaaag	ccgcgggagg	agcagtacaa	cagcacgtac	960
cgtgtgggtca	gcgtcctcac	cgtcctgcac	caggactggc	tgaatggcaa	ggagtacaag	1020
tgcaaggtct	ccaacaaagc	cctcccagcc	cccatcgaga	aaaccatctc	caaagccaaa	1080
gggcagcccc	gagaaccaca	ggtgtacacc	ctgcccccat	cccgggatga	gctgaccaag	1140
aaccagggtca	gcctgacctg	cctgggtcaaa	ggcttctatc	ccagcgacat	cgccgtggag	1200
tgggagagca	atgggcagcc	ggagaacaac	tacaagacca	cgctcccgt	gctggactcc	1260
gacggctcct	tcttcctcta	tagcaagctc	accgtggaca	agagcaggtg	gcagcagggg	1320
aacgtcttct	catgctccgt	gatgcatgag	gctctgcaca	accactacac	gcagaagagc	1380
ctctccctgt	ctccgggtaa	a				1401

<210> 32
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 32

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

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

<210> 33

<211> 1389

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 33

atgggggtcaa cgcgccatcct cgccttcctc ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgag 60
gtgcagctga tgcagtctgg agcagaggtg aaaaagcccc gggagtctct gaagatctcc 120
tgtaaggggt ctggatacag cttttccttc cactggatcg cctgggtgcg ccagatgccc 180

gggaaaggcc tggagtggat ggggatcatc catcctgggtg cctctgatac cagatacagc 240
ccgtccttcc aaggccaggt caccatctca gccgacaact ccaacagcgc cacctacctg 300
cagtggagca gcctgaaggc ctgggacacc gccatgtatt tctgtgcgag acaaagggaa 360
ctcgactact ttgactactg gggccaggga accctgggtc ccgtctctag tgcctccacc 420
aagggcccat cggctctccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcg 480
gccctgggct gcctgggtaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 540
ggcgctctga ccagcggcgt gcacaccttc ccagctgtcc tacagtcctc aggactctac 600
tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcaacttcg gcaccagac ctacacctgc 660
aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga cagttgagcg caaatgttgt 720
gtcgagtgcc caccgtgccc agcaccacct gtggcaggac cgtcagctct cctcttcccc 780
ccaaaaccca aggacacct catgatctcc cggaccctg aggtcacgtg cgtgggtggtg 840
gacgtgagcc acgaagacct cgaggtccag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg 900
cataatgcca agacaaagcc acgggaggag cagttcaaca gcacgttccg tgtgggtcagc 960
gtcctcaccg ttgtgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagt caagggtctcc 1020
aaciaaggcc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aaaccaaagg gcagccccga 1080
gaaccacagg tgtacacct gcccccaccc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 1140
ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1200
gggcagccgg agaacaacta caagaccaca cctcccatgc tggactccga cggtccttc 1260
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1320
tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1380
ccgggtaaa 1389

<210> 34

<211> 463

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 34

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

Ser	Phe	His	Trp	Ile	Ala	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	50	55	60	
Glu	Trp	Met	Gly	Ile	Ile	His	Pro	Gly	Ala	Ser	Asp	Thr	Arg	Tyr	Ser	65	70	75	80
Pro	Ser	Phe	Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Asn	Ser	Asn	Ser	85	90	95	
Ala	Thr	Tyr	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	100	105	110	
Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Gln	Arg	Glu	Leu	Asp	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	115	120	125	
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	130	135	140	
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	145	150	155	160
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	165	170	175	
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	180	185	190	
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	195	200	205	
Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	210	215	220	
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	225	230	235	240
Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	245	250	255	
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	260	265	270	
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	275	280	285	
Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	290	295	300	
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	305	310	315	320
Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	325	330	335	
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	340	345	350	
Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	355	360	365	

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 370 375 380
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 385 390 395 400
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
 405 410 415
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 420 425 430
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 435 440 445
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 35

<211> 1392

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 35

atgggggtcaa	ccgccatcct	cgccctcctc	ctggctgttc	tccaaggagt	ctgtgccgag	60
gtgcagctga	tgcagtctgg	agcagaggtg	aaaaagcccg	gggagtctct	gaagatctcc	120
tgtaagggtt	ctggatacag	cttttccttc	cactggatcg	cctgggtgcg	ccagatgccc	180
gggaaaggcc	tggagtggat	ggggatcatc	catcctggtg	cctctgatac	cagatacagc	240
ccgtccttcc	aaggccaggt	caccatctca	gccgacaact	ccaacagcgc	cacctacctg	300
cagtggagca	gcctgaaggc	ctcggacacc	gccatgtatt	tctgtgcgag	acaaagggaa	360
ctcgactact	ttgactactg	gggccaggga	accctggtca	ccgtctctag	tgccagcacc	420
aaggggccat	ccgtcttccc	cctggcgccc	tgtctccagga	gcacctccga	gagcacagcc	480
gccctgggct	gcctgggtcaa	ggactacttc	cccgaaccgg	tgacgggtgc	gtggaactca	540
ggcgccctga	ccagcggcgt	gcacaccttc	ccggctgtcc	tacagtcctc	aggactctac	600
tccctcagca	gcgtggtgac	cgtgccctcc	agcagcttgg	gcacgaagac	ctacacctgc	660
aacgtagatc	acaagcccag	caacaccaag	gtggacaaga	gagttgagtc	caaatatggt	720
cccccatgcc	catcatgccc	agcacctgag	ttcctggggg	gaccatcagt	cttcctgttc	780
cccccaaac	ccaaggacac	tctcatgata	tcccggaccc	ctgaggtcac	gtgcgtggtg	840
gtggacgtga	gccaggaaga	ccccgaggtc	cagttcaact	ggtacgtgga	tggcgtggag	900

```

gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagttca acagcacgta ccgtgtggtc      960
agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc      1020
tccaacaaag gcctcccgtc ctccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc      1080
cgagagccac aggtgtacac cctgccccca tcccaggagg agatgaccaa gaaccaggtc      1140
agcctgacct gcctgggtcaa aggcttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc      1200
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc      1260
tttttctctt acagcaggct aaccgtgrac aagagcaggt ggcaggaggg gaatgtcttc      1320
tcatgtctccg tgakgcatga ggctctgcac aaccactaca cacagaagag cctctccctg      1380
tctctgggta aa                                                                1392

```

<210> 36

<211> 464

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 36

```

Met Gly Ser Thr Ala Ile Leu Ala Leu Leu Leu Ala Val Leu Gln Gly
1          5          10          15

Val Cys Ala Glu Val Gln Leu Met Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
          20          25          30

Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe
          35          40          45

Ser Phe His Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu
          50          55          60

Glu Trp Met Gly Ile Ile His Pro Gly Ala Ser Asp Thr Arg Tyr Ser
65          70          75          80

Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Asn Ser Asn Ser
          85          90          95

Ala Thr Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met
          100          105          110

Tyr Phe Cys Ala Arg Gln Arg Glu Leu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
          115          120          125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
          130          135          140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
145          150          155          160

```

Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val			
				165					170					175				
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala			
			180					185					190					
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val			
		195					200					205						
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His			
	210						215					220						
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly			
225					230					235					240			
Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser			
				245					250					255				
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg			
			260					265					270					
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro			
		275					280					285						
Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala			
	290					295					300							
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val			
305					310					315					320			
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr			
				325					330					335				
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr			
			340					345					350					
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu			
	355						360					365						
Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys			
	370					375					380							
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser			
385					390					395					400			
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp			
				405					410					415				
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser			
			420					425					430					
Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala			
	435						440					445						
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys			
	450					455					460							

<210> 37

<211> 705

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 37

```
atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga      60
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      120
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctgggtacca acagaaacct      180
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc      240
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct      300
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctccgct cactttcggc      360
ggagggacca aggtggagat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg      420
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc      480
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtaactcc      540
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg      600
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag      660
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt                          705
```

<210> 38

<211> 235

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 38

```
Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1              5              10              15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
      20              25              30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
      35              40              45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
      50              55              60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
      65              70              75              80
```

Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	
			85						90					95		
Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser	
			100					105					110			
Asn	Trp	Pro	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	
		115					120					125				
Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	
	130					135					140					
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	
145					150					155					160	
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	
				165					170					175		
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	
		180						185					190			
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	
	195						200					205				
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	
210					215						220					
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys						
225					230					235						

<210> 39

<211> 699

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 39

atgtcgccat	cacaactcat	tgggtttctg	ctgctctggg	ttccagcctc	caggggtgaa	60
attgtgctga	ctcagtctcc	agactttcag	tctgtgactc	caaaggagaa	agtcaccatc	120
acctgccggg	ccagtcagag	cattggtagt	agcttacact	ggtaccagca	gaaaccagat	180
cagtctccaa	agctcctcat	caagtatgct	tcccagtcct	tctcaggggt	cccctcgagg	240
ttcagtggca	gtggatctgg	gacagatttc	accctcacca	tcaatagcct	ggaagctgaa	300
gatgctgcag	cgtattactg	tcatcagagt	agtagtttac	ctctcacttt	cggcggaggg	360
accaaggtgg	agatcaaacg	aactgtggct	gcaccatctg	tcttcatctt	cccgccatct	420
gatgagcagt	tgaaatctgg	aactgcctct	gttggtgtgcc	tgctgaataa	cttctatccc	480
agagaggcca	aagtacagtg	gaaggtggat	aacgccctcc	aatcgggtaa	ctcccaggag	540

```

agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg      600
agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg      660
agctcgcccc tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgt                                699

```

 $\langle 210 \rangle$ 40

<211> 233

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

 $\langle 400 \rangle \quad 40$

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

<210> 41
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 41

Leu Ser Asp Ile Ala
1 5

<210> 42
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 42

Val Ile Asp Glu
1

<210> 43
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 43

Thr Cys Phe Ala
1

<210> 44
<211> 24
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> iniciador oligonucleotídico para PCR

<220>

<221> característica_misc

<222> (18). (23)

<223> n são a, c, t ou g

<400> 44

ggccggatag gcctccannn nnnt 24

<210> 45

<211> 26

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> iniciador oligonucleotídico para PCR

<400> 45

ggacactgac atggactgaa ggagta 26

<210> 46

<211> 26

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> iniciador oligonucleotídico para PCR

<400> 46

ggacactgac atggactgaa ggagta 26

<210> 47

<211> 46

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> iniciador oligonucleotídico para PCR

<400> 47

cagcagaagc ttctagacca ccatgtcgcc atcacaactc attggg 46

<210> 48

<211> 34

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> iniciador oligonucleotídico para PCR

<400> 48

cttgtcgact caacactctc ccctgttgaa gctc 34

<210> 49

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> sequência de aminoácidos codificada pelo iniciador
5' anti-IL-1R1 15C4 kapa

Met Ser Pro Ser Gln Leu Ile Gly
1 5

tctagaccac	catggacatc	aggtcagct	tagttttcct	tgtccttttc	ataaaagggtg	60
tccagtgtga	ggtagaactg	gtggagtctg	ggggcggcct	agtacaacct	ggaagggtcca	120
tgacactctc	ctgtgcagcc	tcggtattca	ctttcagaac	ctatggcatg	gcctgggtcc	180
gccaggcccc	aacgaagggt	ctggagtggg	tctcatcaat	tactgctagt	ggtggtacca	240
cctactatcg	agactccgtg	aagggccgct	tcaactatttt	tagggataat	gcaaaaagta	300
ccctatacct	gcagatggac	agtccgaggt	ctgaggacac	ggccaattat	ttctgtacat	360
caatttcgga	atactggggc	cacggagtca	tggtcaccgt	ctctagtgcc	tccaccaagg	420
gcccacgggt	cttccccctg	gcaccctcct	ccaagagcac	ctctgggggc	acagcggccc	480
tgggctgcct	ggtcaaggac	tacttccccg	aaccggtgac	ggtgtcgtgg	aactcaggcg	540
ccctgaaccag	cggcgtgcac	accttccccg	ctgtcctaca	gtcctcagga	ctctactccc	600

tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca gcttgggcac ccagacctac atctgcaacg	660
tgaatcacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaa tcttgtagaca	720
aaactcacac atgccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg tcagtcttcc	780
tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctcccg gaccttgag gtcacatgcg	840
tggtggtgga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg	900
tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg	960
tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca	1020
aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaa gccaaagggc	1080
agccccgaga accacaggtg tacacctgc ccccatcccg ggatgagctg accaagaacc	1140
aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggt tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg	1200
agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tccgtgctg gactccgacg	1260
gctccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg	1320
tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct	1380
ccctgtctcc gggtaaata ga taagtcgac	1409

<210> 52

<211> 19

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> iniciador oligonucleotídico para PCR

<400> 52

tgaggacgct gaccacacg 19

<210> 53

<211> 44

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> iniciador oligonucleotídico para PCR

<400> 53

cagcagaagc ttctagacca ccatgggggtc aaccgccatc ctcg 44

<210> 54

<211> 32

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> iniciador oligonucleotídico para PCR

<400> 54

gtggaggcac tagagacggt gaccagggtt cc 32

<210> 55

<211> 7

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> sequência de aminoácidos codificada pelo iniciador da
cadeia pesada 5' anti-IL-1R1 15C4

<400> 55

Met Gly Ser Thr Ala Ile Leu
1 5

<210> 56

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> sequência de aminoácidos codificada pelo iniciador da cadeia pesada 3' anti-IL-1R1 15C4

<400> 56

Thr	Ser	Ala	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Leu	Thr	Gly
1			5					10		

<210> 57

<211> 1415

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 57

tctagaccac	catggacatg	aggggtccccg	ctcagctcct	ggggctcctg	ctattgtggt	60
tgagaggtgc	cagatgtgag	gtccagctgg	tgcagctctg	gggaggttg	gtacatcctg	120
gggggtccct	gagactctcc	tgtgcaggct	ctggattcac	cttcagtggc	catgctttgc	180
actgggttcg	ccaggctcca	ggaaaaggtc	tggagtgggt	atcaggtatt	ggtactcatg	240
gtgggacata	ctatgcagac	tccgtgaagg	gccgattcac	catctccaga	gacaatgcca	300
agaactcctt	gtttcttcaa	atgaacagcc	tgagcgccga	ggacatggct	gtgtattact	360
gtacaagaag	aaactgggga	caatttgact	actggggcca	gggaaccctg	gtcaccgtct	420
ctagtgcctc	caccaagggc	ccatcgggtct	tccccctggc	gccctgctcc	aggagcacct	480
ccgagagcac	agcggccctg	ggctgcctgg	tcaaggacta	cttccccgaa	ccggtgacgg	540
tgtcgtggaa	ctcaggcgct	ctgaccagcg	gcgtgcacac	cttcccagct	gtcctacagt	600
cctcaggact	ctactccctc	agcagcgtgg	tgaccgtgcc	ctccagcaac	ttcggcaccc	660
agacctacac	ctgcaacgta	gatacacaagc	ccagcaacac	caaggtggac	aagacagttg	720
agcgcaaattg	ttgtgtcgag	tgcccaccgt	gcccagcacc	acctgtggca	ggaccgtcag	780
tcttctctct	cccccaaaa	cccaaggaca	ccctcatgat	ctcccgacc	cctgaggtca	840
cgtgcgtggg	ggtggacgtg	agccacgaag	accccgaggt	ccagttcaac	tggtacgtgg	900
acggcgtgga	ggtgcataat	gccaagacaa	agccacggga	ggagcagttc	aacagcacgt	960

tccgtgtggt cagcgctctc accgttgtgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca	1020
agtgcaaggt ctccaacaaa ggctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca	1080
aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag gagatgacca	1140
agaaccaggt cagcctgacc tgcctgggtca aaggcttcta cccagcgac atcgccgtgg	1200
agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacacctccc atgctggact	1260
ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg	1320
ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga	1380
gcctctccct gtctccgggt aaatgataag tcgac	1415

<210> 58

<211> 1418

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 58

tctagaccac catggacatg agggccccg ctcagctcct ggggctcctg ctattgtggt	60
tgagaggtgc cagatgtgag gtccagctgg tgcagtctgg gggaggcttg gtacatcctg	120
gggggtccct gagactctcc tgtgcagget ctggattcac cttcagtggc catgctttgc	180
actgggttcg ccaggctcca ggaaaaggtc tggagtgggt atcaggtatt ggtactcatg	240
gtgggacata ctatgcagac tccgtgaagg gccgattcac catctccaga gacaatgcca	300
agaactcctt gtttcttcaa atgaacagcc tgagcgccga ggacatggct gtgtattact	360
gtacaagaag aaactgggga caatttgact actggggcca gggaaacctg gtcaccgtct	420
ctagtgccag caccaagggg ccacccgtct tccccctggc gccctgctcc aggagcacct	480
ccgagagcac agccgcccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg	540
tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggt gtcctacagt	600
cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcacga	660
agacctacac ctgcaacgta gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagagagttg	720
agtccaaata tggccccca tgcccatcat gccagcacc tgagttcctg gggggacct	780
cagtcttctt gttccccca aaacccaagg acactctcat gatctccgg acccctgagg	840
tcacgtgcgt ggtggtggac gtgagccagg aagacccga ggtccagttc aactggtacg	900
tggatggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag ttcaacagca	960
cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt	1020

acaagtgcaa ggtctccaac aaaggcctcc cgtcctccat cgagaaaacc atctccaaag	1080
ccaaagggca gccccgagag ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccag gaggagatga	1140
ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg	1200
tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg	1260
actccgacgg ctcttcttc ctctacagca ggctaaccgt ggacaagagc aggtggcagg	1320
aggggaatgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacacaga	1380
agagcctctc cctgtctctg ggtaaatgat aagtcgac	1418

<210> 59

<211> 485

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 59

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

Ala	Asp	Lys	Cys	Lys	Glu	Arg	Glu	Glu	Lys	Ile	Ile	Leu	Val	Ser	Ser	
				165					170					175		
Ala	Asn	Glu	Ile	Asp	Val	Arg	Pro	Cys	Pro	Leu	Asn	Pro	Asn	Glu	His	
			180					185					190			
Lys	Gly	Thr	Ile	Thr	Trp	Tyr	Lys	Asp	Asp	Ser	Lys	Thr	Pro	Val	Ser	
		195					200					205				
Thr	Glu	Gln	Ala	Ser	Arg	Ile	His	Gln	His	Lys	Glu	Lys	Leu	Trp	Phe	
	210					215					220					
Val	Pro	Ala	Met	Val	Glu	Asp	Ser	Gly	His	Tyr	Tyr	Cys	Val	Val	Arg	
225					230					235					240	
Asn	Ser	Ser	Tyr	Cys	Leu	Arg	Ile	Lys	Ile	Ser	Ala	Lys	Phe	Val	Glu	
				245					250					255		
Asn	Glu	Pro	Asn	Leu	Cys	Tyr	Asn	Ala	Gln	Ala	Ile	Phe	Lys	Gln	Lys	
			260					265					270			
Leu	Pro	Val	Ala	Gly	Asp	Gly	Gly	Leu	Val	Cys	Pro	Tyr	Met	Glu	Phe	
		275					280					285				
Phe	Lys	Asn	Glu	Asn	Asn	Glu	Leu	Pro	Lys	Leu	Gln	Trp	Tyr	Lys	Asp	
	290					295					300					
Cys	Lys	Pro	Leu	Leu	Leu	Asp	Asn	Ile	His	Phe	Ser	Gly	Val	Lys	Asp	
305					310					315					320	
Arg	Leu	Ile	Val	Met	Asn	Val	Ala	Glu	Lys	His	Arg	Gly	Asn	Tyr	Thr	
				325					330					335		
Cys	His	Ala	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Leu	Gly	Lys	Gln	Tyr	Pro	Ile	Thr	Arg	
			340					345					350			
Val	Ile	Glu	Phe	Ile	Thr	Leu	Glu	Glu	Asn	Lys	Pro	Thr	Arg	Pro	Val	
		355					360					365				
Ile	Val	Ser	Pro	Ala	Asn	Glu	Thr	Met	Glu	Val	Asp	Leu	Gly	Ser	Gln	
	370					375					380					
Ile	Gln	Leu	Ile	Cys	Asn	Val	Thr	Gly	Gln	Leu	Ser	Asp	Ile	Ala	Tyr	
385					390					395					400	
Trp	Lys	Trp	Asn	Gly	Ser	Val	Ile	Asp	Glu	Asp	Asp	Pro	Val	Leu	Gly	
			405						410					415		
Glu	Asp	Tyr	Tyr	Ser	Val	Glu	Asn	Pro	Ala	Asn	Lys	Arg	Arg	Ser	Thr	
			420					425					430			
Leu	Ile	Thr	Val	Leu	Asn	Ile	Ser	Glu	Ile	Glu	Ser	Arg	Phe	Tyr	Lys	
		435					440					445				
His	Pro	Phe	Thr	Cys	Phe	Ala	Lys	Asn	Thr	His	Gly	Ile	Asp	Ala	Ala	
	450					455					460					
Tyr	Ile	Gln	Leu	Ile	Tyr	Pro	Val	Thr	Asn	Phe	Gln	Lys	Asp	Tyr	Lys	
465					470					475					480	
Asp	Asp	Asp	Asp	Lys												
				485												

<210> 60

<211> 485

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> proteína quimérica de avidina-cinómolgos IL-1R1-FLAG

<400> 60

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

Asn Ser Ser Tyr Cys Leu Arg Ile Lys Ile Thr Ala Lys Phe Val Glu

245

250

255

Asn Glu Pro Asn Leu Cys Tyr Asn Ala Glu Ala Ile Phe Lys Gln Arg
260 265 270

Leu Pro Val Ala Gly Asp Gly Gly Leu Val Cys Pro Tyr Met Glu Phe
275 280 285

Phe Lys Asp Glu Asn Asn Glu Leu Pro Lys Leu Leu Trp Tyr Lys Asp
290 295 300

Cys Lys Pro Leu Leu Leu Asp Asn Ile His Phe Ser Gly Val Lys Asp
305 310 315 320

Arg Leu Ile Val Met Asn Val Ala Glu Lys His Arg Gly Asn Tyr Thr
325 330 335

Cys His Ala Ser Tyr Thr Tyr Leu Gly Lys Gln Tyr Pro Ile Thr Arg
340 345 350

Val Ile Glu Phe Ile Thr Leu Glu Glu Asn Lys Pro Thr Arg Pro Val
355 360 365

Ile Val Ser Pro Ala Asn Glu Thr Ile Glu Val Asp Leu Gly Ser Gln
370 375 380

Ile Gln Leu Ile Cys Asn Val Thr Gly Gln Leu Ser Asp Thr Ala Tyr
385 390 395 400

Trp Lys Trp Asn Gly Ser Phe Ile Asp Glu Asp Asp Pro Val Leu Gly
405 410 415

Glu Asp Tyr Tyr Ser Val Glu Asn Pro Ala Asn Lys Arg Arg Ser Thr
420 425 430

Leu Ile Thr Val Leu Asn Ile Ser Glu Thr Glu Ser Arg Phe Tyr Lys
435 440 445

His Pro Phe Thr Cys Leu Ala Arg Asn Thr His Gly Met Asp Ala Ala
450 455 460

Tyr Val Gln Leu Ile Tyr Pro Val Thr Lys Phe Gln Lys Asp Tyr Lys
465 470 475 480

Asp Asp Asp Asp Lys
485

<210> 61

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 61

Asn	Tyr	Gly	Met	His
1				5

<210> 62

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 62

Thr	Phe	Ser	Asn	Tyr	Gly	Met	His
1				5			

<210> 63

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 63

Phe	His	Trp	Ile	Ala
1				5

<210> 64

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 64

Gly	Ile	Trp	Asn	Asp	Gly	Ile	Asn	Lys	Tyr	His	Ala	His	Ser	Val	Arg
1				5					10					15	

Gly

<210> 65

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 65

Ala	Ile	Trp	Asn	Asp	Gly	Glu	Asn	Lys	His	His	Ala	Gly	Ser	Val	Arg
1				5					10					15	

Gly

<210> 66

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 66

Ile	Ile	His	Pro	Gly	Ala	Ser	Asp	Thr	Arg	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

<210> 67

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 67

Ala	Arg	Ser	Phe	Asp	Trp	Leu	Leu	Phe	Glu	Phe
1				5					10	

<210> 68

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 68

Gly	Arg	Tyr	Phe	Asp	Trp	Leu	Leu	Phe	Glu	Tyr
1				5					10	

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 69

Gln Arg Glu Leu Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 70

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 70

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 71

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 71

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser Leu His
1 5 10

<210> 72

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 72

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 73

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 73

Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser
1 5

<210> 74

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 74

Gln	Gln	Arg	Ser	Asn	Trp	Pro	Pro	Leu	Thr
1			5						10

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 75

His	Gln	Ser	Ser	Ser	Leu	Pro	Leu	Thr
1			5					

<210> 76

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 76

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

<210> 77
 <211> 350
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 77

cctgtgattg tgagcccagc taatgagaca atggaagtag acttgggatc ccagatacaa	60
ttgatctgta atgtcaccgg ccagttgagt gacattgctt actggaagtg gaatgggtca	120
gtaattgatg aagatgacct agtgctaggg gaagactatt acagtgtgga aaatcctgca	180
aacaaaagaa ggagtaccct catcacagtg cttaatatat cggaaattga aagtagattt	240
tataaacatc catttacctg ttttgccaag aatacacatg gtatagatgc agcatatatc	300
cagttaatat atccagtcac taatttcag aagcacatga ttggtatatg	350

<210> 78
 <211> 350
 <212> ADN
 <213> *Rattus sp.*
 <400> 78

cctgtgatta tgagcccacg gaatgagacg atggaagctg acccaggatc cacgatacaa	60
ctgatctgca acgtcacggg ccagttcacc gaccttgtct actggaagtg gaatgggtcg	120
gaaattgaat gggacgatcc aatcctagcc gaagactatc agtttttggga acacccttca	180
gccaaaagaa agtacactct cattacaaca cttaacgttt cagagggtcaa aagccagttt	240
tatcgctatc cgttcactct cttcgtaag aacactcata ttctgggagac tgcacacgta	300
cggtagtat acccagttcc tgacttcaag aattacctca tcgggggctt	350

<210> 79
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> *Rattus sp.*

<400> 79

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

Lisboa, 12 de Junho de 2012

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo humano isolado que se liga especificamente ao receptor de tipo 1 da interleucina 1 ou seu fragmento de ligação a antígeno, compreendendo:
 - a. regiões estruturais de cadeia pesada humana, uma região CDR1 de cadeia pesada, em que a região CDR1 compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 63, uma região CDR2 de cadeia pesada, em que a região CDR2 compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 66 e uma região CDR3 de cadeia pesada, em que a região CDR3 compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 69; e
 - b. regiões estruturais de cadeia leve humana, uma região CDR1 de cadeia leve, em que a região CDR1 compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 71, uma região CDR2 de cadeia leve, em que a região CDR2 compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 73 e uma região CDR3 de cadeia leve, em que a região CDR3 compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 75.
2. Anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno, da reivindicação 1, em que o anticorpo compreende uma cadeia pesada compreendendo uma região variável de cadeia pesada, compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de sequência de, pelo menos, 90% com a sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°: 16, e uma cadeia leve compreendendo uma região variável de cadeia leve, compreendendo uma sequência de aminoácidos que tem uma

identidade de sequência de, pelo menos, 90% com a sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°:18.

3. Anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno da reivindicação 2, em que a região variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°: 16 e em que a região variável de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°: 18.
4. Anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno, da reivindicação 2 compreendendo:
 - a. uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°: 40; e
 - b. uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°: 32, SEQ ID N°: 34 ou SEQ ID N°: 36, em que o fragmento de ligação a antígeno tem uma deleção no amino-terminal, uma deleção no carboxi-terminal e/ou uma deleção ou substituição interna.
5. Anticorpo da reivindicação 4, em que o fragmento de ligação a antígeno da cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de sequência de, pelo menos, 90% com a sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°: 32 e o fragmento de ligação a antígeno da cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de sequência de, pelo menos, 90% com a sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°: 40.
6. Anticorpo da reivindicação 5, em que a cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada na

SEQ ID N°: 32 e em que a cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°: 40.

7. Anticorpo da reivindicação 4, em que o fragmento de ligação a antigénio da cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de sequência de, pelo menos, 90% com a sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°: 34 e o fragmento de ligação a antigénio da cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de sequência de, pelo menos, 90% com a sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°: 40.
8. Anticorpo da reivindicação 7, em que a cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°: 34 e em que a cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°: 40.
9. Anticorpo da reivindicação 4, em que o fragmento de ligação a antigénio da cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de sequência de, pelo menos, 90% com a sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°: 36, e o fragmento de ligação a antigénio da cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos que tem uma identidade de sequência de, pelo menos, 90% com a sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°: 40.
10. Anticorpo da reivindicação 9, em que a cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°: 36 e em que a cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID N°: 40.
11. Anticorpo ou seu fragmento de ligação a antigénio, da reivindicação 1, em que a cadeia pesada compreende uma

região variável, compreendendo a sequência de aminoácidos
 EVQLMQSGAE VKKPGESLKI SCKGSGYSFS FHWIAWVRQM PGKGLEWMGI
 IHPGASDTRY SPSFQGQVTI SADNSNSATY LQWSSLKASD TAMYFCARQR
 ELDYFDYWGQ GTLVTVSS.

12. Anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno da reivindicação 1, em que a cadeia leve compreende uma região variável, compreendendo a sequência de aminoácidos de
 EIVLTQSPDF QSVTPKEKVT ITCRASQSIG SSLHWYQQKP DQSPKLLIKY
 ASQSFSGVPS RFSGSGSGTD FTLTINSLEA EDAAAYYCHQ SSSLPLTFGG
 GTKVEIK.
13. Anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno da reivindicação 1, em que a região variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos EVQLMQSGAE
 VKKPGESLKI SCKGSGYSFS FHWIAWVRQM PGKGLEWMGI IHPGASDTRY
 SPSFQGQVTI SADNSNSATY LQWSSLKASD TAMYFCARQR ELDYFDYWGQ
 GTLVTVSS, e em que a região variável de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos EIVLTQSPDF
 QSVTPKEKVT ITCRASQSIG SSLHWYQQKP DQSPKLLIKY ASQSFSGVPS
 RFSGSGSGTD FTLTINSLEA EDAAAYYCHQ SSSLPLTFGG GTKVEIK.
14. Molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência nucleotídica que codifica a região variável da cadeia pesada e da cadeia leve dos anticorpos de qualquer uma das reivindicações 1 a 13.
15. Vector de expressão compreendendo o ácido nucleico da reivindicação 14.
16. Célula hospedeira contendo o vector de expressão da reivindicação 15.

17. Anticorpo das reivindicações 1 a 13, em que as regiões variáveis da cadeia pesada e da cadeia leve estão ligadas através de um ligante flexível para formar um anticorpo de cadeia simples.
18. Anticorpo da reivindicação 17, o qual é um anticorpo Fv de cadeia simples.
19. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 10, o qual é um anticorpo Fab.
20. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 10, o qual é um anticorpo Fab'.
21. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 10, o qual é um anticorpo (Fab')₂.
22. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 13 e 17 a 21, em que o anticorpo é um anticorpo totalmente humano.
23. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 13 e 17 a 21, o qual é um anticorpo IgG2.
24. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 2, 3, 4, 6, 8, 10, o qual se liga especificamente ao polipéptido de SEQ ID N°: 76.
25. Anticorpo da reivindicação 24, o qual se liga especificamente à sequência de aminoácidos YSV.
26. Utilização de um anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 25 para a preparação de uma composição farmacêutica para tratar uma doença mediada por IL-1 num

doente, em que a doença mediada por IL-1 é seleccionada de doença pulmonar, doença pulmonar obstrutiva crónica ou COPD, proteinose alveolar pulmonar, pneumopatia induzida por bleomicina, fibrose pulmonar, fibrose pulmonar idiopática, fibrose pulmonar induzida por radiação, fibrose cística, acumulação de colagénio nos pulmões, síndrome de dificuldade respiratória aguda ou ARDS, displasia bronco-pulmonar ou BPD, doenças pulmonares obstrutivas crónicas seleccionadas de enfisema e bronquite crónica, doença pulmonar fibrótica crónica, asbestose, pneumoconiose do mineiro de carvão, silicose, bronquiolite obliterante com pneumonia organizada, sarcoidose pulmonar, rinite alérgica, dermatite de contacto, dermatite atópica, diabetes, doença inflamatória intestinal, artrite reumatóide e asma.

27. Composição farmacêutica compreendendo um veículo farmaceuticamente aceitável e uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 25.

Lisboa, 12 de Junho de 2012

FIG. 1A

Região Constante da Cadeia Pesada de IgG1

gcctccacca	agggcccatc	ggtcttcccc	ctggcacccct	cctccaagag	cacctctggg	60
ggcacagcgg	ccctgggctg	cctgggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggt	gacggtgtcg	120
tggaaactcag	gcgccctgac	cagcggcgtg	cacaccttcc	cggctgtcct	acagtcctca	180
ggactctact	ccctcagcag	cgtgggtgacc	gtgccctcca	gcagcttggg	cacccagacc	240
tacatctgca	acgtgaatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggacaagaa	agttgagccc	300
aaatcttggt	acaaaactca	cacatgccca	ccgtgcccag	cacctgaact	cctgggggga	360
ccgtcagtc	tcctcttccc	cccaaaaccc	aaggacaccc	tcgatgctc	ccggacccct	420
gaggtcacat	gcgtgggtgt	ggacgtgagc	cacgaagacc	ctgaggtcaa	gttcaactgg	480
tacgtggacg	gcgtggaggt	gcataatgcc	aagacaaagc	cgcgggagga	gcagtacaac	540
agcacgtacc	gtgtgggtcag	cgtcctcacc	gtcctgcacc	aggactggct	gaatggcaag	600
gagtacaagt	gcaagggtctc	caacaaagcc	ctcccagccc	ccatcgagaa	aaccatctcc	660
aaagccaaag	ggcagccccg	agaaccacag	gtgtacaccc	tgcccccatc	ccgggatgag	720
ctgaccaaga	accaggtcag	cctgacctgc	ctgggtcaaag	gcttctatcc	cagcgacatc	780
gccgtggagt	gggagagcaa	tgggcagccg	gagaacaact	acaagaccac	gcctcccgtg	840
ctggactccg	acggtctcct	cttcctctat	agcaagetca	ccgtggacaa	gagcaggtgg	900
cagcagggga	acgtcttctc	atgctccgtg	atgcatgagg	ctctgcacaa	ccactacacg	960
cagaagagcc	tctccctgtc	tccgggtaaa				990

FIG. 1B

ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	60
GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT	YICNVNHNKPS	NTKVDKKVEP	KSCDKTHTCP	PCPAPELLGG	120
PSVFLFPPKP	KDTLMISRTP	EVTCVVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN	180
STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ	VYTLPPSRDE	240
LTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTTPPV	LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW	300
QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPGK				330

FIG. 2A

Região Constante da Cadeia Kapa

cgaactgtgg	ctgcaccatc	tgtcttcac	ttcccggccat	ctgatgagca	gttgaaatct	60
ggaactgcct	ctggtgtgtg	cctgctgaat	aactttctatc	ccagagaggc	caaagtacag	120
tggaagggtg	ataacgccct	ccaatcgggt	aactcccagg	agagtgtcac	agagcaggac	180
agcaaggaca	gcacctacag	cctcagcagc	accctgacgc	tgagcaaagc	agactacgag	240
aaacacaaaag	tctacgcctg	cgaagtcacc	catcaggggc	tgagctcgcc	cgtcacaaaag	300
agcttcaaca	ggggagagtg	t				321

FIG. 2B

RTVAAPSVFI	FPPSDEQLKS	GTASVVCLLN	NFYPREAKVQ	WKVDNALQSG	NSQESVTEQD	60
SKDSTYSLSS	TLTLKADYE	KHKVYACEVT	HQGLSSPVTK	SFNRGEC		107

FIG. 3A

Região Constante da Cadeia Pesada de IgG2

gcctccacca	agggcccatc	ggtcttcccc	ctggcgccct	gctccaggag	cacctccgag	60
agcacagcgg	ccctgggctg	cctgggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggt	gacggtgtcg	120
tggaaactcag	gcgctctgac	cagcggcggtg	cacaccttcc	cagctgtcct	acagtccctca	180
ggactctact	ccctcagcag	cgtgggtgacc	gtgccctcca	gcaacttcgg	caccagagacc	240
tacacctgca	acgtagatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggacaagac	agttgagcgc	300
aaatggttg	tcgagtgccc	accgtgcccc	gcaccacctg	tggcaggacc	gtcagtcttc	360
ctcttcccc	caaaacccaa	ggacaccctc	atgatctccc	ggacccctga	ggtcacgtgc	420
gtggtggtgg	acgtgagcca	cgaagacccc	gaggtcaggt	tcaactggta	cgtggacggc	480
gtggagggtgc	ataatgccaa	gacaaaagcca	cgggaggagc	agttcaacag	cacgttccgt	540
gtggtcagcg	tcctcacctg	tgtgcaccag	gactggctga	acggcaagga	gtacaagtgc	600
aagggtctcca	acaaaggcct	cccagccccc	atcgagaaaa	ccatctccaa	aaccaagggg	660
cagccccgag	aaccacaggt	gtacaccctg	cccccatccc	gggaggagat	gaccaagaac	720
cagggtcagcc	tgacctgcct	gggtcaaaggc	ttctacccca	gcgacatcgc	cgtggagtgg	780
gagagcaatg	ggcagccgga	gaacaactac	aagaccacac	ctcccatgct	ggactccgac	840
ggctccttct	tcctctacag	caagctcacc	gtggacaaga	gcagggtggca	gcaggggaac	900
gtcttctcat	gctccgtgat	gcatgaggct	ctgcacaacc	actacacgca	gaagagcctc	960
tcctctgtctc	cgggtaaa					978

FIG. 3B

ASTKGPSVFP	LAPCSRSTSE	STAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	60
GLYSLSSVVT	VPSSNFGTQT	YTCNVDPKPS	NTKVDKTVR	KCCVECPPCP	APPVAGPSVF	120
LFPPKPKDTL	MISRTPEVTC	VVVDVSHEDP	EVQFNWYVDG	VEVHNAKTKP	REEQFNSTFR	180
VVSVLTVVHQ	DWLNGKEYKC	KVSNKGLPAP	IEKTISKTKG	QPREPQVYTL	PPSREEMTKN	240
QVSLTCLVKG	FYPSDIAVEW	ESNGQPENNY	KTTPPMLDSD	GSFFLYSKLT	VDKSRWQQGN	300
VFSCSVMHEA	LHNHYTQKSL	SLSPGK				326

FIG. 4A

Região Constante da Cadeia Pesada de IgG4

gccagcacca	agggggccatc	cgtcttcccc	ctggcgccct	gctccaggag	cacctccgag	60
agcacagccg	ccctgggctg	cctgggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggg	gacgggtgtcg	120
tggaaactcag	gcgccttgac	cagcggcgctg	cacaccttcc	cggctgtcct	acagtccctca	180
ggactctact	ccctcagcag	cgtgggtgacc	gtgccctcca	gcagcttggg	cacgaagacc	240
tacacctgca	acgtagatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggacaagag	agttgagtcc	300
aaatatggtc	ccccatgccc	atcatgccca	gcacctgagt	tcctgggggg	accatcagtc	360
ttcctgttcc	ccccaaaacc	caaggacact	ctcatgatct	cccgacccc	tgaggtcacg	420
tgcgtgggtg	tggacgtgag	ccaggaagac	cccgagggtcc	agttcaactg	gtacgtggat	480
ggcgtggagg	tgcataatgc	caagacaaag	ccgcgggagg	agcagttcaa	cagcacgtac	540
cgtgtgggtca	gcgtcctcac	cgtcctgcac	caggactggc	tgaacggcaa	ggagtacaag	600
tgcaagggtct	ccaacaaagg	cctcccgtcc	tccatcgaga	aaaccatctc	caaagccaaa	660
gggcagcccc	gagagccaca	ggtgtacacc	ctgcccccat	cccaggagga	gatgaccaag	720
aaccagggtca	gcctgacctg	cctgggtcaaa	ggcttctacc	ccagcgacat	cgcctgggag	780
tgggagagca	atgggcagcc	ggagaacaac	tacaagacca	cgcctcccgt	gctggactcc	840
gacggctcct	tcttcctcta	cagcaggcta	accgtgraca	agagcagggtg	gcaggagggg	900
aatgtcttct	catgtccgt	gakgcatgag	gctctgcaca	accactacac	acagaagagc	960
ctctccctgt	ctctgggtaa	a				981

FIG. 4B

ASTKGPSVFP	LAPCSRSTSE	STAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	60
GLYSLSSVVT	VPSSSLGTKT	YTCNVDHKPS	NTKVDKRVES	KYGPPCPSCP	APEFEGGPSV	120
FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSQED	PEVQFNWYVD	GVEVHNAKTK	PREEQFNSTY	180
RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKGLPS	SIEKTIKAK	GQPREPQVYT	LPPSQEEMTK	240
NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPVLD	DGSFFFLYSRL	TVDKSRWQEG	300
NVFSCSVMHE	ALHNHYTQKS	LSLSLGK				327

FIG. 5A

Cadeia Pesada de 26F5

atggagtttg	ggctgagctg	ggtcttcctc	gttgctcttt	taagaggtgt	ccagtgtcag	60
gtgcagctgg	tggagtcttg	gggaggcgtg	gtccagcctg	ggaggtccct	gagactctcc	120
tgtgcagcgt	ctggattcac	cttcagcaac	tatggcatgc	actgggtccg	ccaggctcca	180
ggcaaggggc	tggagtgggt	ggcaggcatt	tggaatgatg	gaattaataa	ataccatgca	240
cactccgtga	ggggccgatt	caccatctcc	agagacaatt	ccaagaacac	gctgtatctg	300
caaatgaaca	gcccgagagc	cgaggacacg	gctgtgtatt	actgtgcgag	agcacggtct	360
ttcgactggc	tattatttga	gttctggggc	caggggaacc	tggtcaccgt	ctctagt	417

FIG. 5B

MEFGLSWVFL	VALLRGVQCQ	VQLVESGGGV	VQPGRLRLS	CAASGFTFSN	YGMHWVRQAP	60
GKGLEWVAGI	WNDGINKYHA	HSVRGRFTIS	RDNSKNTLYL	QMNSPRAEDT	AVYYCARARS	120
FDWLLFEFWG	QGTLVTVSS					139

FIG. 6A

Cadeia Kapa de 26F5

atggaagccc	cagctcagct	tctcttcctc	ctgtactctt	ggctcccaga	taccaccgga	60
gaaattgtgt	tgacacagtc	tccagccacc	ctgtctttgt	ctccagggga	aagagccacc	120
ctctcctgca	gggccagtca	gagtgttagc	agctacttag	cctggtacca	acagaaacct	180
ggccaggctc	ccaggctcct	catctatgat	gcatccaaca	gggccactgg	catcccagcc	240
aggttcagtg	gcagtgggtc	tgggacagac	ttcactctca	ccatcagcag	cctagagcct	300
gaagattttg	cagtttatta	ctgtcagcag	cgtagcaact	ggcctccgct	cactttcggc	360
ggagggacca	aggtggagat	caaa				384

FIG. 6B

MEAPAQLLFL	LLLWL PDTTG	EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SYLAWYQQKP	60
GQAPRLLIYD	ASNRATGIPA	RFSGSGSGTD	FTLTISLEP	EDFAVYQCQQ	RSNWPPLTFG	120
GGTKVEIK						128

FIG. 7A

Cadeia Pesada de 27F2

atggagtttg	ggctgagctg	ggttttcctc	gttgctcttt	taagaggtgt	ccagtgtcag	60
gtgcagctgg	tggagtctgg	gggaggcgtg	gtccagcctg	ggaggtccct	gagactctcc	120
tgtgcagtgt	ctggattcac	cttcagtaac	tatggcatgc	actgggtccg	ccaggctcca	180
ggcaaggggc	tggagtgggt	ggcagctata	tggaatgatg	gagaaaataa	acaccatgca	240
ggctccgtga	ggggccgatt	caccatctcc	agagacaatt	ccaagaacac	gctgtatctg	300
caaatgaaca	gcctgagagc	cgaggacacg	gctgtgtatt	actgtgcgag	aggacgatat	360
tttgactggt	tattatttga	gtattggggc	cagggaaacc	tggtcaccgt	ctctagt	417

FIG. 7B

MEFGLSWVFL	VALLRGVQCQ	VQLVESGGGV	VQPGRSLRLS	CAVSGFTFSN	YGMHWVRQAP	60
GKGLEWVAAL	WNDGENKHHA	GSVRGRFTIS	RDNSKNTLYL	QMNSLRAEDT	AVYYCARGRY	120
FDWLLFEYWG	QGTLVTVSS					139

FIG. 8A

Cadeia Pesada de 15C4

atgggggtcaa	ccgccatcct	cgccctcctc	ctggctgttc	tccaaggagt	ctgtgccgag	60
gtgcagctga	tgcagtctgg	agcagaggtg	aaaaagcccg	gggagtctct	gaagatctcc	120
tgtaaggggt	ctggatacag	cttttccttc	cactggatcg	cctgggtgcg	ccagatgcc	180
gggaaaggcc	tggagtggat	ggggatcatc	catcctgggtg	cctctgatac	cagatacagc	240
ccgtccttcc	aaggccaggt	caccatctca	gccgacaact	ccaacagcgc	cacctacctg	300
cagtggagca	gcctgaaggc	ctcggacacc	gccatgtatt	tctgtgcgag	acaaagggaa	360
ctcgactact	ttgactactg	gggccaggga	accctgggtca	ccgtctctag	t	411

FIG. 8B

MGSTAILALL	LAVLQGVCAE	VQLMQSGAEV	KKPGESLKIS	CKGSGYSFSF	HWIAWVRQMP	60
GKGLEWMGII	HPGASDTRYs	PSFQGQVTIS	ADNSNSATYL	QWSSLKASDT	AMYFCARQRE	120
LDYFDYWGQG	TLVTVSS					137

FIG. 9A

Cadeia Kapa de 15C4

atgtcgccat	cacaactcat	tgggtttctg	ctgctctggg	ttccagcctc	caggggtgaa	60
attgtgctga	ctcagtctcc	agactttcag	tctgtgactc	caaaggagaa	agtcaccatc	120
acctgccggg	ccagtcagag	cattggtagt	agcttacact	ggtaccagca	gaaaccagat	180
cagtctcaa	agctcctcat	caagtatgct	tcccagtcct	tctcaggggt	cccctcgagg	240
ttcagtggca	gtggatctgg	gacagatttc	accctcacca	tcaatagcct	ggaagctgaa	300
gatgctgcag	cgtattactg	tcatcagagt	agtagtttac	ctctcacttt	cggcggaggg	360
accaaggtgg	agatcaaa					378

FIG. 9B

MSPSQLIGFL	LLWVPASRGE	IVLTQSPDFQ	SVTPKEKVTI	TCRASQSIGS	SLHWYQQKPD	60
QSPKLLIKYA	SQSFSGVPSR	FSGSGSGTDF	TLTINSLEAE	DAAAYYCHQS	SSLPLTFGGG	120
TKVEIK						126

FIG. 10

				CDR1		CDR2
26F5	QVQLVESGGG	VVQPGRLRL	SCAASGFTFS	<u>NYGMHWVRQA</u>	<u>PGKGLEWVAG</u>	<u>IWNDGINKYH</u>
27F2	QVQLVESGGG	VVQPGRLRL	SCAVSGFTFS	<u>NYGMHWVRQA</u>	<u>PGKGLEWVAA</u>	<u>IWNDGENKHH</u>
15C4	EVQLMQSGAE	VKKPGESLKI	SCKGSGYSFS	<u>FHWIAWVRQM</u>	<u>PGKGLEWMGI</u>	<u>IHPGASDTRY</u>

				CDR3		
26F5	<u>AHSVRGRFTI</u>	SRDNSKNTLY	LQMNSPRAED	<u>TAVYYCARAR</u>	<u>SFDWLLFEFW</u>	<u>GQGTTLVTVSS</u>
27F2	<u>AGSVRGRFTI</u>	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	<u>TAVYYCARGR</u>	<u>YFDWLLFEYW</u>	<u>GQGTTLVTVSS</u>
15C4	<u>SPSFQGQVTI</u>	SADNSNSATY	LQWSSLKASD	<u>TAMYFCARQR</u>	<u>ELDYFDYWGQ</u>	<u>GTLVTVSS</u>

FIG. 11

	CDR1
26F5/27F2	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
15C4	EIVLTQSPDF QSVTPKEKVT ITCRASQSIG SSLHWYQQKP DQSPKLLIKY
	CDR2
26F5/27F2	ASNRAIGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPLTFG
15C4	ASQSFSGVPS RFSGSGSGTD FTLTINSLEA EDAAAYYCHQ SSSLPLTFGG
	CDR3
26F5/27F2	GGTKVEIK
15C4	GTKVEIK

FIG. 12

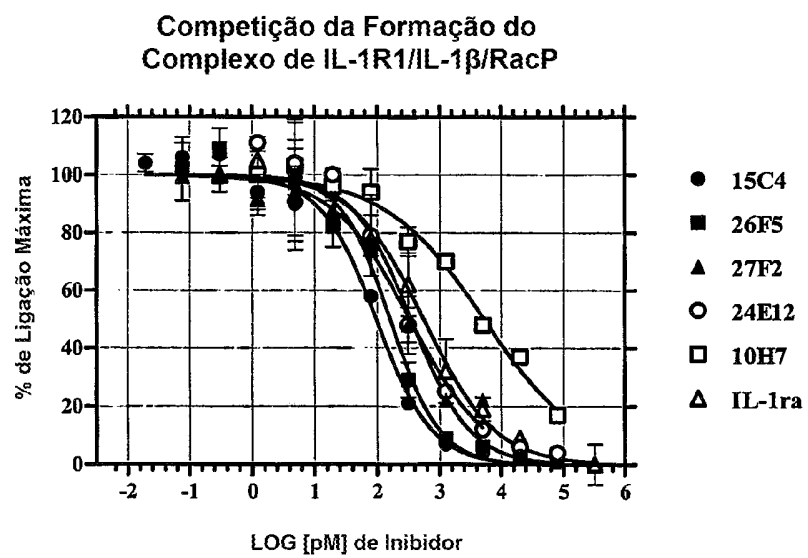


FIG. 13

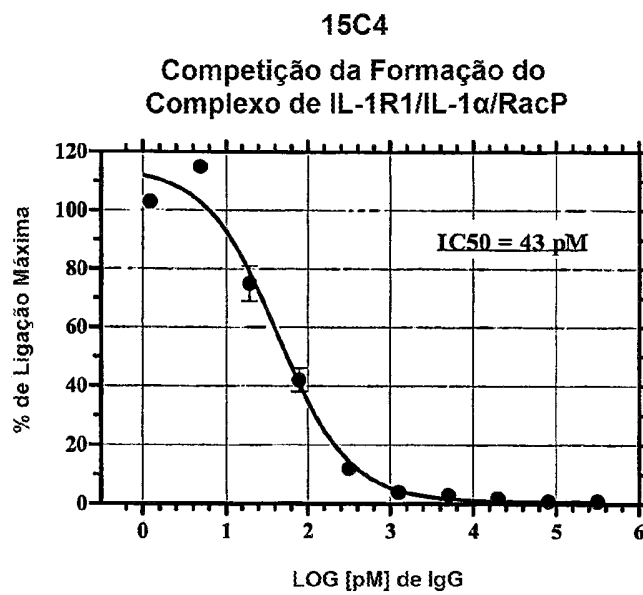


FIG. 14

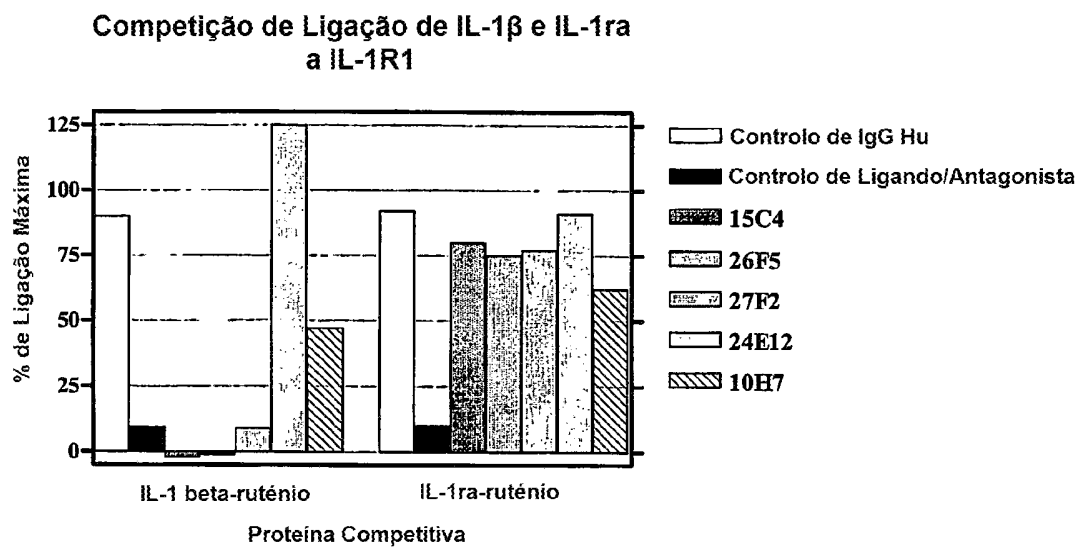


FIG. 15A

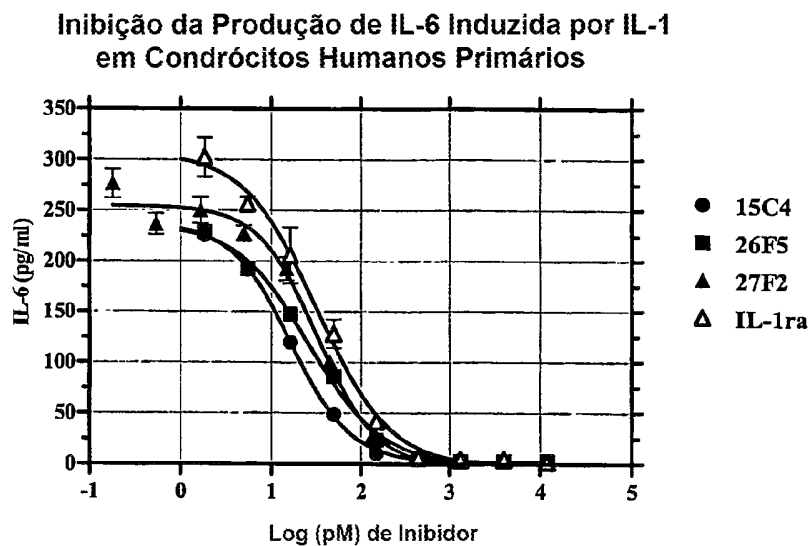


FIG. 15B

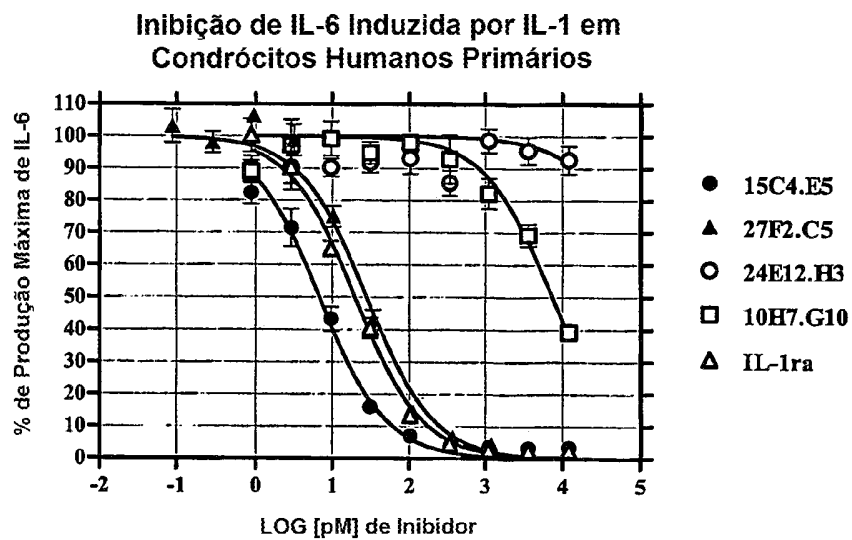
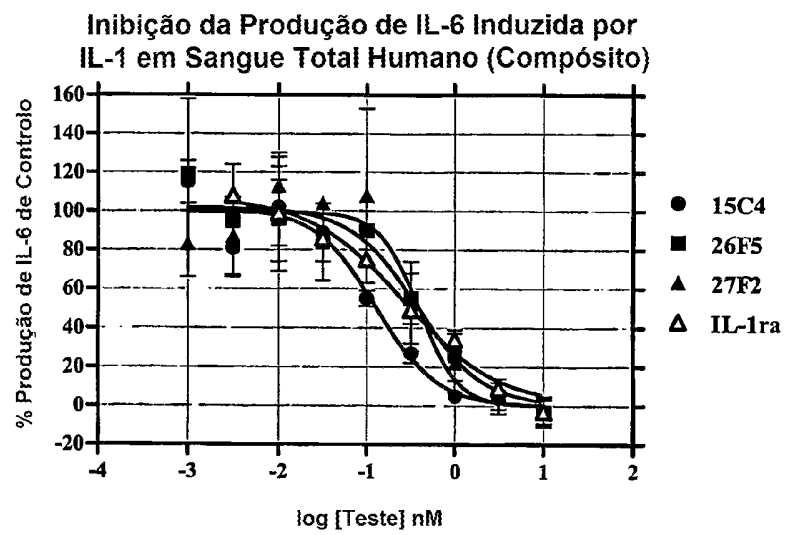


FIG. 16



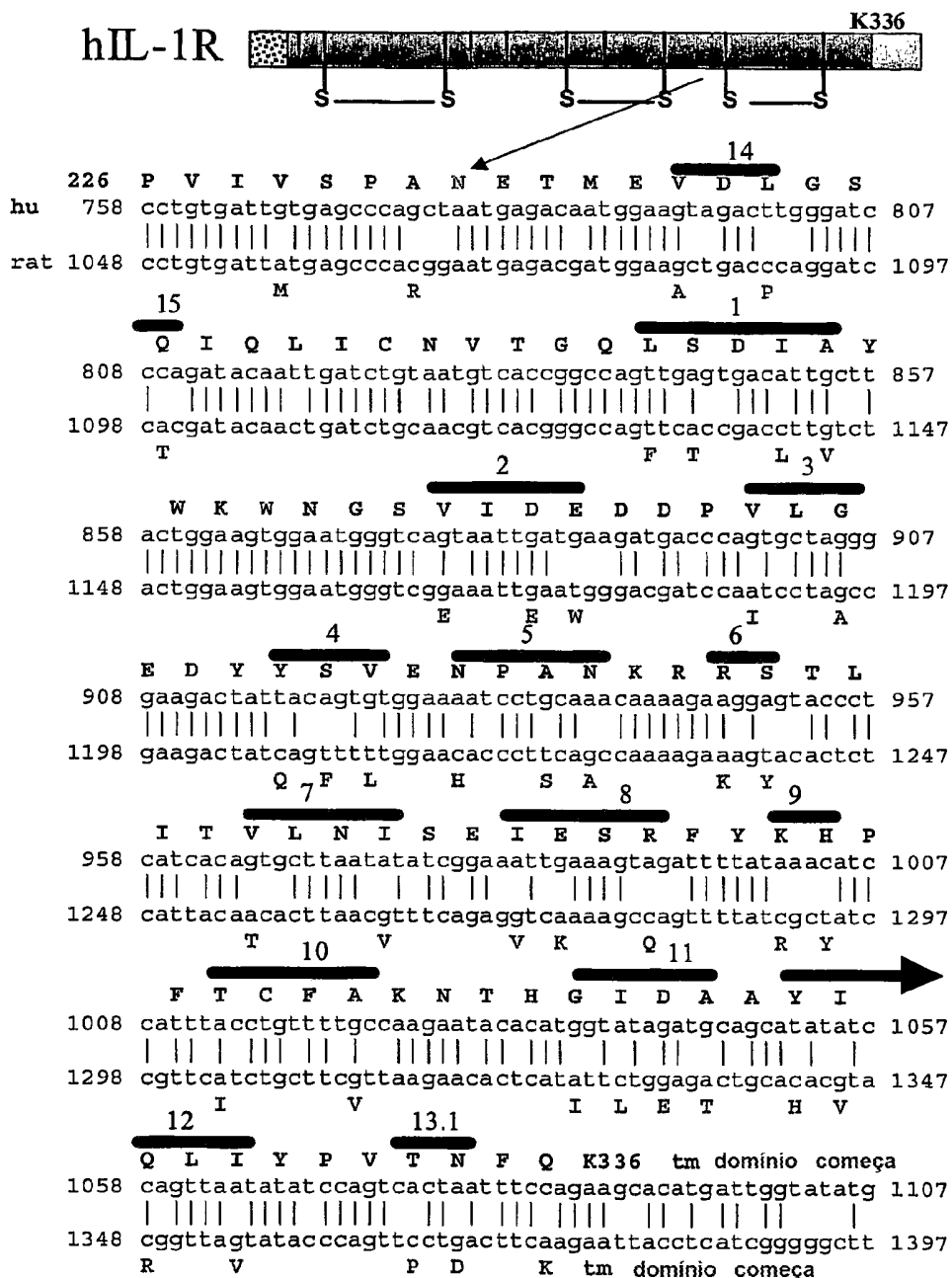


FIG. 18

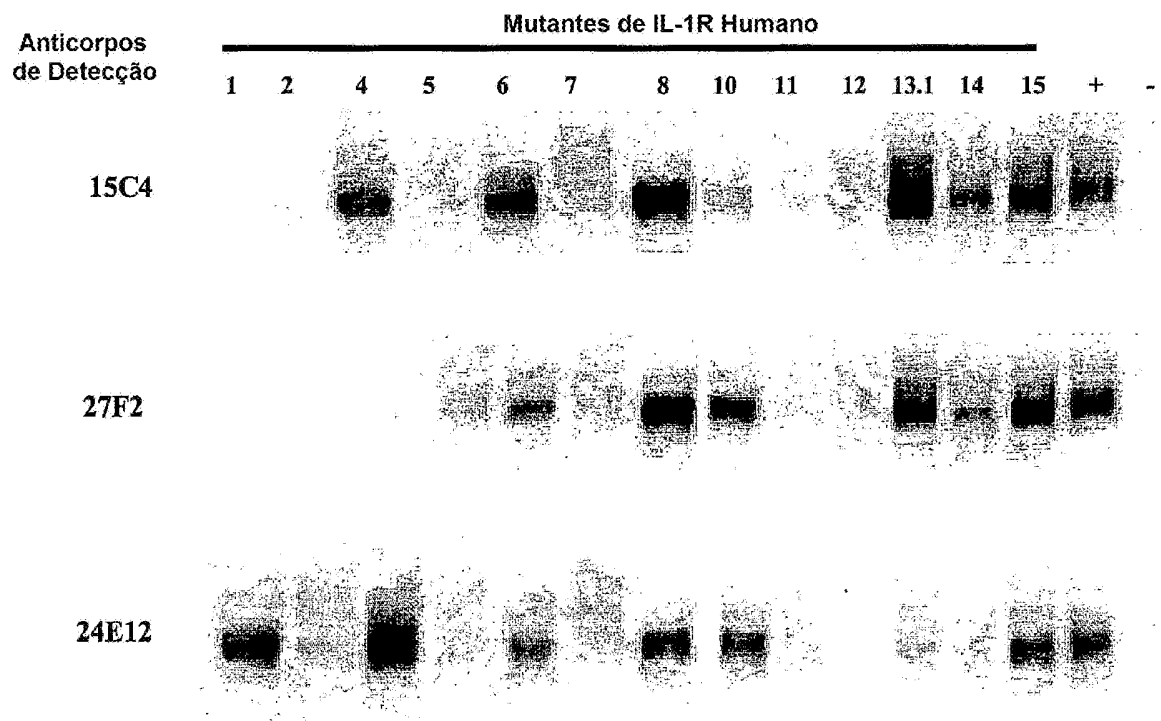


FIG. 19

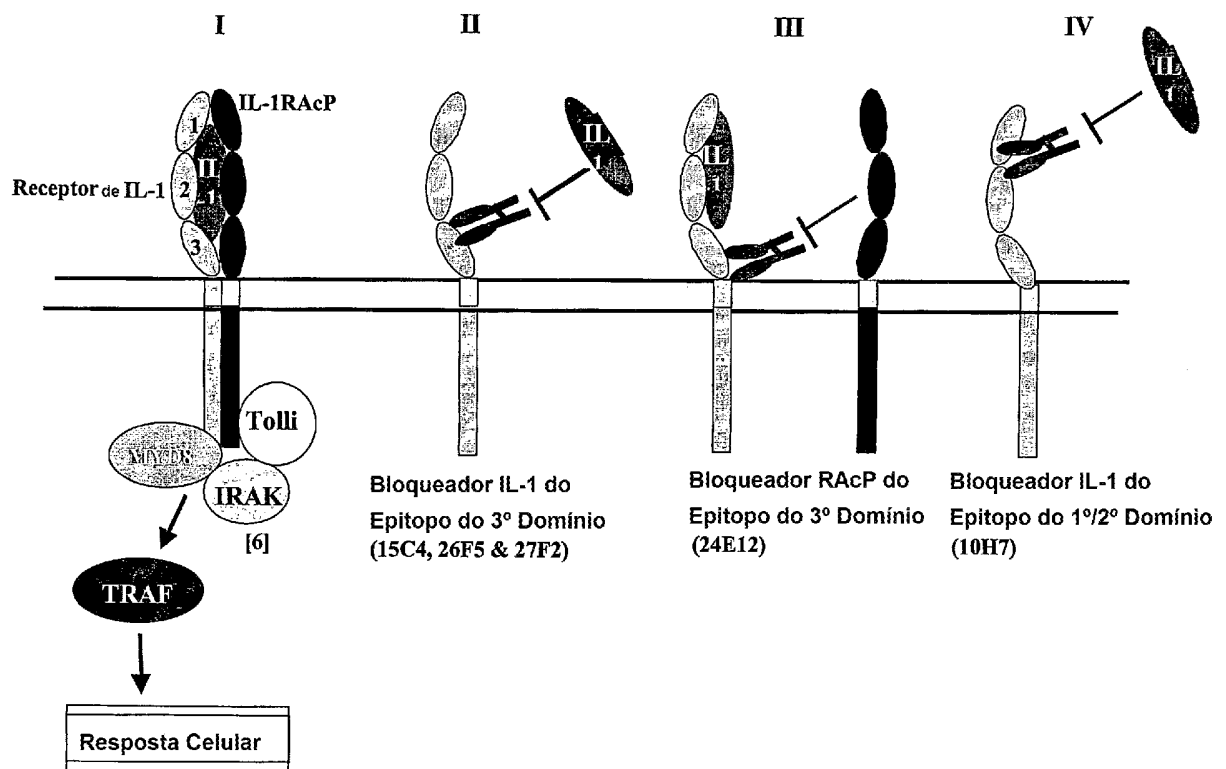


FIG. 20



FIG. 21

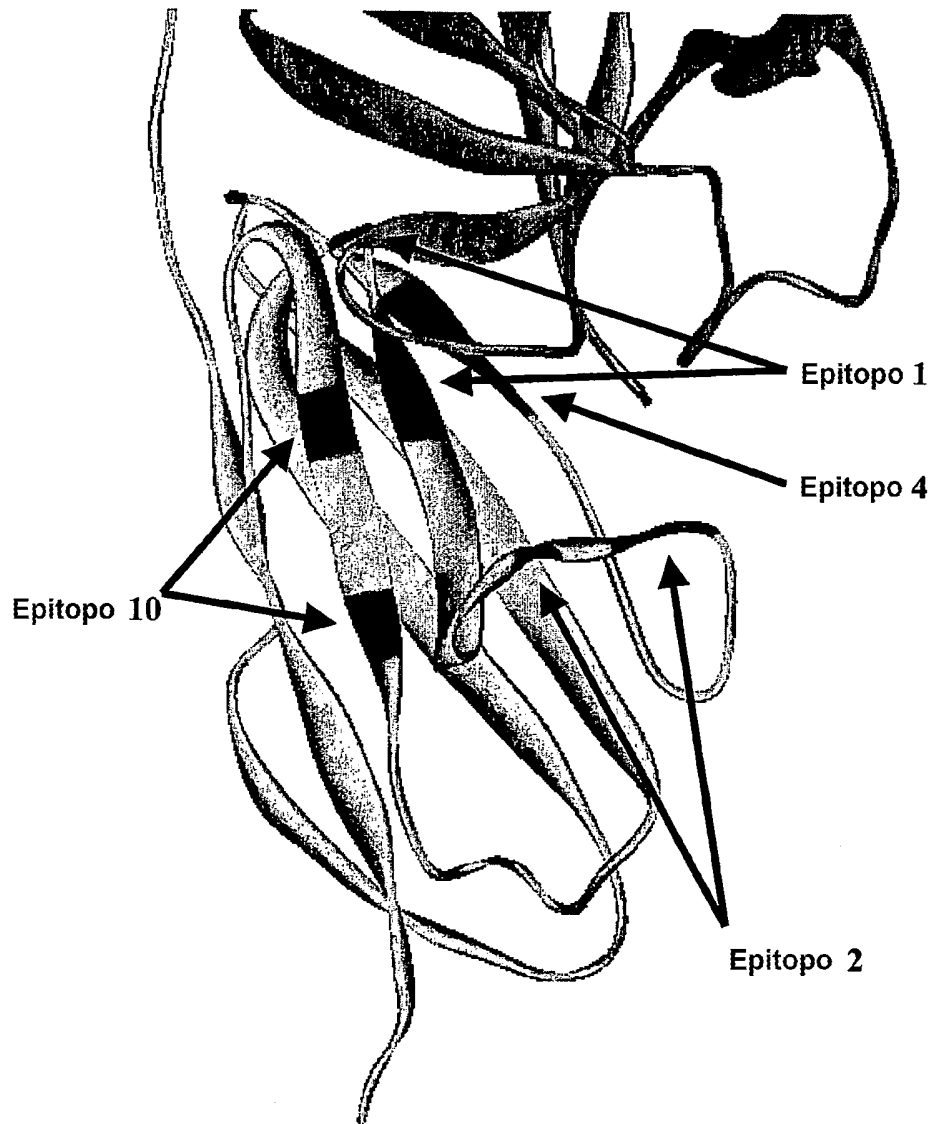


FIG. 22

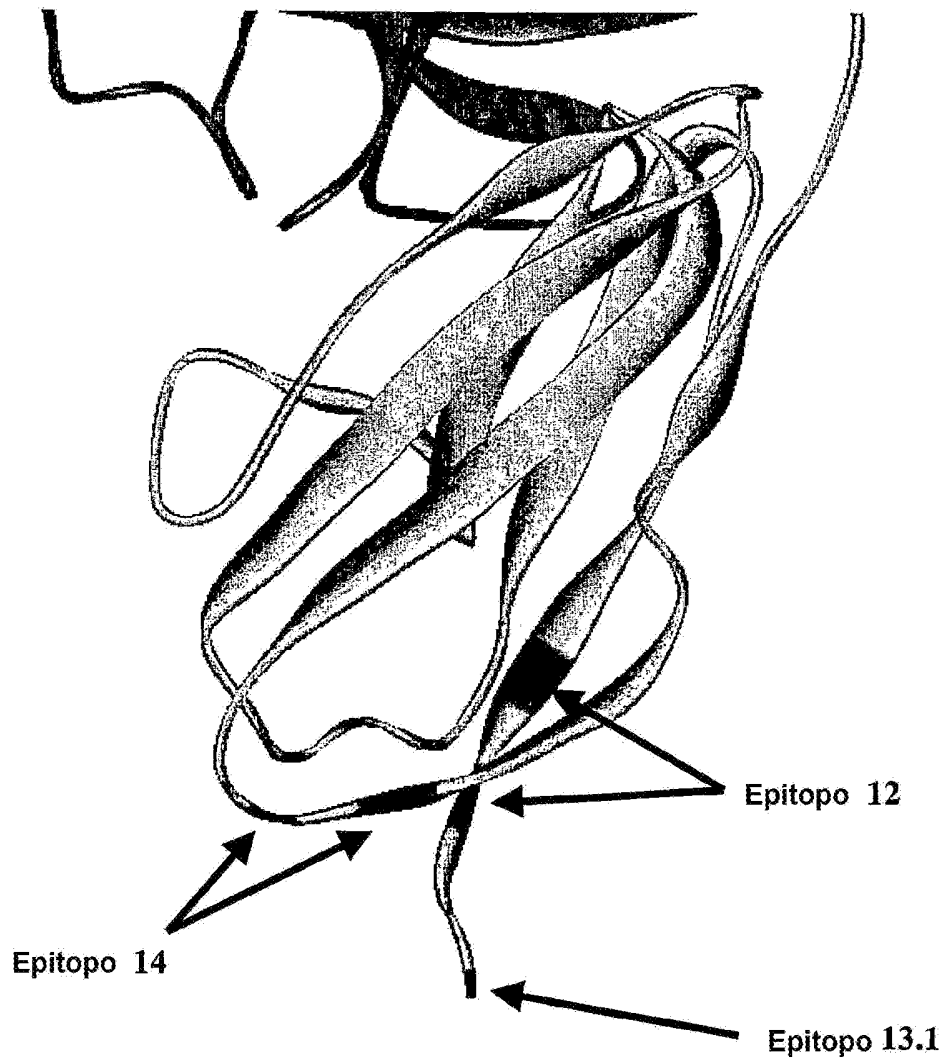


FIG. 23

MVHATSPLLL	LLLLSLALVA	PGLSARKCSL	TGKWTNDLGS	NMTIGAVNSK	GEFTGTYTTA	60
VTATSNEIKE	SPLHGTQNTI	NKRTQPTFGF	TVNWKFSSEST	TVFTGQCFID	RNGKEVLKTM	120
WLLRSSVNDI	GDDWKATRVG	INIFTRLRTQ	KEQLLASLLE	ADKCKEREK	IILVSSANEI	180
DVRPCPLNPN	EHKGTITWYK	DDSKTPVSTE	QASRIHQHKE	KLWFPAMVE	DSGHYYCVVR	240
NSSYCLRIKI	SAKFVENEPN	LCYNAQAIFK	OKLPVAGDGG	LVCPYMEFFK	NENNELPKLQ	300
WYKDCKPLLL	DNIHFSGVKD	RLIVMNVAEK	HRGNYTCHAS	YTYLGKQYPI	TRVIEFITLE	360
ENKPTRPVIV	SPANETMEVD	LGSQIQLICN	VTGQLSDIAY	WKWNGSVIDE	DDPVLGEDYY	420
SVENPANKRR	STLITVLNIS	EIESRFYKHP	FTCFAKNTHG	IDAAIYQLIY	PVTNFKDYK	480
DDDDK						485

FIG. 24

1 MVHATSPLLL LLLLSLALVA PGLSARKCSL TGKWTNDLGS NMTIGAVNSK GEFTGTYYTAA
61 VTATSNEIKE SPLHGTQNTI NKRTQPTFGF TVNWKFSEST TVFTGQCFID RNGKEVLKTM
121 WLLRSSVNDI GDDWKATRVG INIFTRLRTQ KEQLLASLLE ADKCNEREK IILVSSANEI
181 DVRPCPLNPN EYKGTITWYK NDSKTPISTE QASRIHQHKK KLWFVPAKVE DSGHYECVVR
241 NSSYCLRIKI TAKFVENEPN LCYNAAEAFK QRLPVAGDGG LVCPYMEFFK DENNELPKLL
301 WYKDCPLLLL DNIHFGVKD RLIVMNVAEK HRGNYTCHAS YTYLGKQYPI TRVIEFILE

mutação 1 mutação 2

361 ENKPTRPVIV SPANETIEVD LGSQIQLICN VTGQLSDTAY WKWNGSFIDE DDPVLGEDYY
humano

I

V

mutação 10.1 mutação 10.2

421 SVENPANKRR STLITVLNIS ETESRFYKHP FTCLARNTHG MDAAYVQLII PVTKFQKDYG
humano

F K

481 DDDDK

FIG. 25A

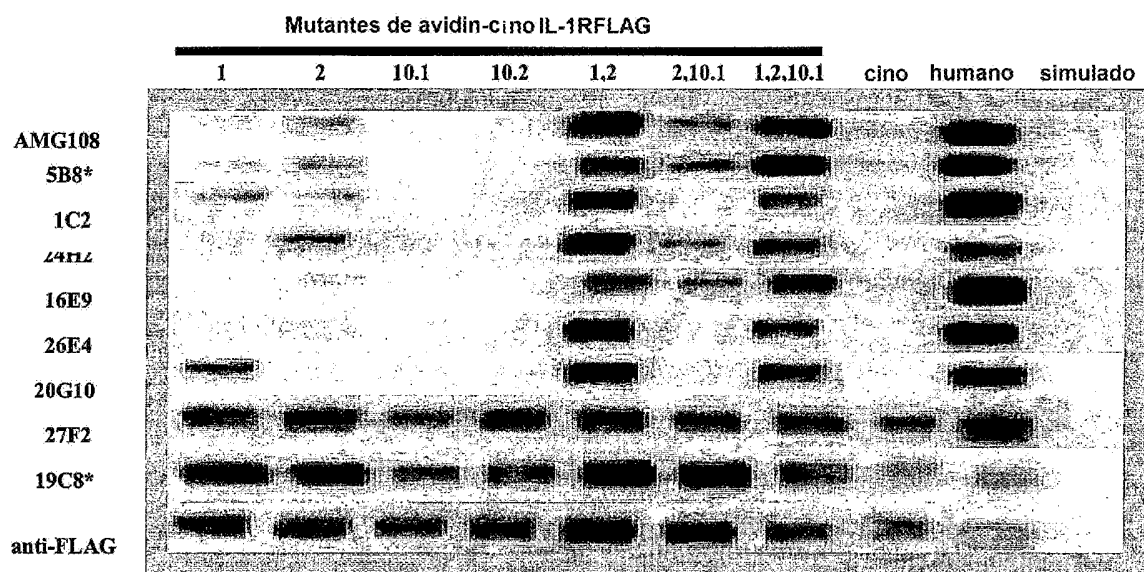
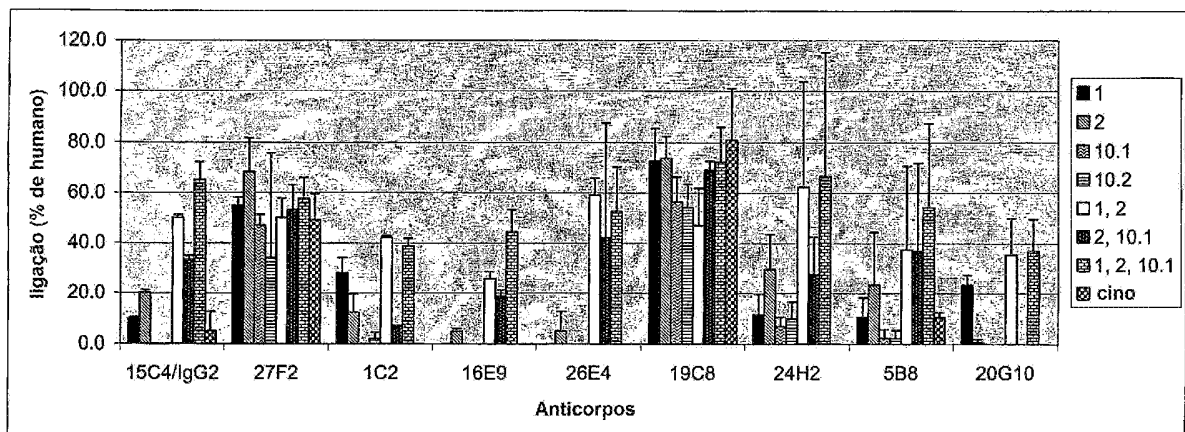


FIG. 25B



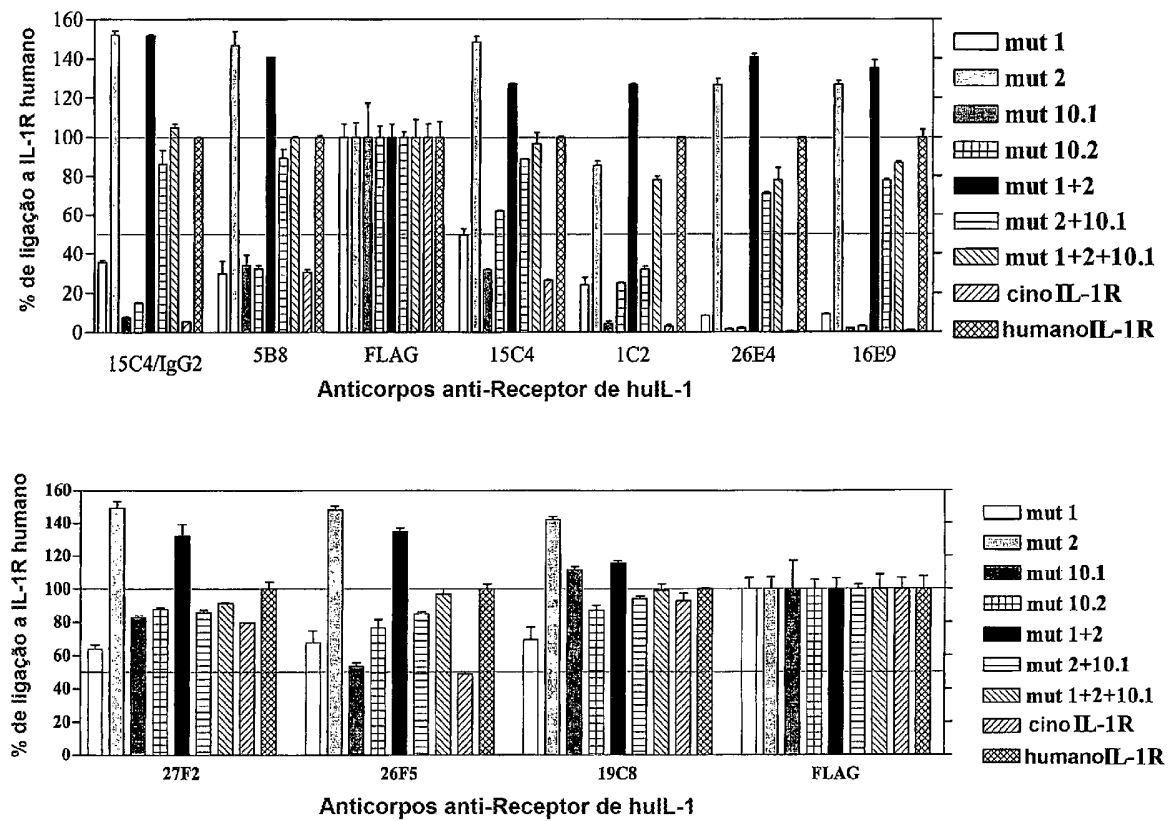


FIG. 26