



(19) INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* **PT 656117 E**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)

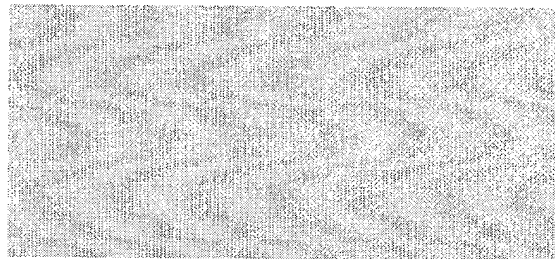
G01N033/68 A G01N033/74 B
C12N015/12 B C12N015/18 B
C07K014/655 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

<p>(22) <i>Data de depósito:</i> 1994.06.23</p> <p>(30) <i>Prioridade:</i> 1993.06.23 IT RM930409</p> <p>(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1995.06.07</p> <p>(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 2000.02.02</p>	<p>(73) <i>Titular(es):</i> ISTITUTO RIC.BIOLOGIA MOLECOLARE P.ANGELETTI SPA. VIA PONTINA KM. 30,600 I-00040 POMEZIA IT</p> <p>(72) <i>Inventor(es):</i> GENNARO CILIBERTO IT ROCCO SAVINO IT ARMIN LAHM IT</p> <p>(74) <i>Mandatário(s):</i> JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO RUA DO SALITRE, 195 R/C DTO 1250 LISBOA PT</p>
--	---

(54) *Epigrafe:* MÉTODO DE SELECÇÃO DE SUPERAGONISTAS DE ANTAGONISTAS E DE SUPERANTAGONISTAS DA INTERLEUCINA 6

(57) *Resumo:*



Descrição

“Método de selecção de superagonistas, de antagonistas e de superantagonistas da interleucina 6”

[0001] A presente invenção refere-se a uma metodologia para seleccionar superagonistas, antagonistas e superantagonistas da interleucina 6 cujo receptor complexo compreende a gp 130.

[0002] Como se sabe, a patente de invenção WO 92/21029 de ‘Genentec Inc.’ explica um método para a determinação de agonistas ou de antagonistas das hormonas do crescimento e de ligandos com uma conformação estrutural semelhante. Os agonistas e antagonistas potenciais são colocados em contacto com um receptor da hormona e isto determina a formação de um complexo ternário constituído por uma molécula do agonista ou do antagonista potencial e duas moléculas de tal receptor para que a hormona seja agonizada ou antagonizada. A dimerização de receptores, induzida por uma molécula de um ligando, permite concluir que o ligando possui dois locais diferentes de interacção (local 1 e local 2) onde é possível trabalhar por mutagénesis para gerar agonistas ou antagonistas.

[0003] Descobriu-se agora, surpreendentemente, que os ligandos do grupo das citocinas semelhantes à interleucina 6 (IL-6), isto é, a oncostatina M (OSM), o factor inibidor da leucemia (FIL), o factor neurotrófico ciliar (FNTC) e a interleucina 11 (IL-11), induzem a formação de um complexo receptor de que faz parte a molécula membrana gp 130. Neste complexo receptor estão sempre presentes, enquanto elementos comuns, o receptor específico para cada uma destas citocinas e a molécula membrana gp 130. Assim, é possível formular a hipótese de que o local 1 e o local 2 se ligam a duas moléculas diferentes nesta classe de hormonas: o local 1 a um receptor específico e o local 2 à gp 130.

[0004] A identificação dos dois locais é possibilitada, conforme adiante melhor se verá, construindo o modelo tridimensional do complexo receptor, com base na semelhança funcional entre as sequências do receptor da hormona de crescimento humano (HCh) e as sequências dos receptores das hormonas em questão. O isolamento de variantes que tenham, no que diz respeito à hormona de tipo natural, uma maior afinidade com o receptor específico (superagonistas ou superantagonistas) é conseguido por construção de bancos de fagos filamentosos, por exemplo, o M13, portadores da hormona tanto de tipo natural como na versão mutante.

[0005] A diferença entre o modelo tridimensional, por exemplo, da IL-6, aqui adoptada, e aquela que foi adoptada na patente de invenção WO 92/21029, leva a formular a hipótese de haver resíduos diferentes nas hélices A e C enquanto constituintes do local 2.

[0006] A criação de um modelo da molécula de interleucina 6 humana realiza-se conforme a seguir se descreve. Sabendo que a interleucina 6 humana, tendo em conta os dados disponíveis na literatura científica, pertence a uma classe de citoquinas que possuem 4 hélices que formam o núcleo da sua estrutura tridimensional, efectuou-se a análise da sequência de aminoácidos da interleucina 6 humana para identificar as 4 regiões em que havia a mais alta probabilidade de formação de uma hélice. Na fase subsequente criou-se um modelo destas 4 regiões helicoidais da molécula de interleucina 6, utilizando um computador equipado com uma unidade gráfica interactiva. Para começar, admitiu-se que a orientação das 4 hélices poderia ser igual à observada em hormonas tais como a hormona do crescimento ou o factor estimulador de colónias de macrófagos granulócitos. Para otimizar o acondicionamento dos aminoácidos hidrofóbicos no espaço entre as 4 hélices foram realizados ajustamentos no que diz respeito às posições relativas das hélices. A seguir criou-se um modelo dos elos que ligam as 4 hélices.

[0007] Este modelo tridimensional da interleucina 6 possibilitou a identificação dos dois locais de interacção entre a interleucina 6 humana e os seus dois receptores: o receptor gp 80 de fraca afinidade (local 1) e o receptor gp130 de elevada afinidade (local 2) para a transdução do sinal. Utilizou-se o procedimento a seguir descrito para identificar os dois locais. Por comparação de sequências sabe-se que todos os membros de uma família de receptores hematopoiéticos estão relacionados entre si pelo facto de partilharem um domínio, conhecido por domínio de reconhecimento das citoquinas. Esta semelhança de sequências indica também uma probabilidade elevada de semelhança estrutural nas partes correspondentes dos diversos receptores, incluindo os dois receptores da interleucina 6, o gp 80 e o gp 130. A observação de que as citoquinas que se ligam a estes receptores têm todas elas (ou é possível presumir que tenham) uma estrutura semelhante, isto é, uma matriz de 4 hélices, fundamenta perfeitamente a hipótese de que a interacção entre estas citoquinas e os seus receptores, por meio do domínio de reconhecimento das citoquinas, deve ser bastante semelhante nos complexos biologicamente activos.

[0008] Considerando que a estrutura tridimensional de um destes compostos (o complexo formado pela hormona do crescimento e pelo domínio extracelular do receptor dimérico da hormona do crescimento) foi determinada por cristalografia aos raios X, então o nosso modelo da interleucina 6 humana permite-nos identificar os locais potenciais de interacção entre a interleucina 6 e os seus dois receptores, o gp 80 (local 1) e o gp 130 (local 2). Conclui-se isto por comparação com o complexo a que está associada a hormona do crescimento e admitindo que os aminoácidos funcionalmente importantes estão localizados em posições semelhantes na superfície das duas hormonas.

- [0009] A necessidade de haver uma metodologia para a produção de agonistas, antagonistas e superantagonistas, para as hormonas do sistema imunitário cujo complexo receptor compreende o gp 130, será explicada tomando como referência o caso da interleucina 6.
- [0010] Como se sabe, a interleucina 6 é um polipeptido de 184 aminoácidos que pertencem, conforme descrito, à classe das citoquinas helicoidais. A interleucina 6 é uma citoquina multifuncional produzida por diversos tipos de células. Actua como um factor de diferenciação e de crescimento em células de diversos tipos tais como, por exemplo, as células do sistema imunitário, os hepatócitos, os esplenócitos, as células histaminais hematopoiéticas, os ceratinócitos e os neurónios.
- [0011] A produção de superagonistas da interleucina 6 poderia permitir a utilização de doses terapêuticas menores do que as necessárias com a interleucina 6 natural para o tratamento de inúmeras doenças graves. Com efeito, a interleucina 6 possui importantes e promissoras aplicações no tratamento do cancro da mama, da leucemia e de doenças infecciosas ou de doenças associadas a disfunções da medula óssea produtora de células.
- [0012] Por outro lado, a produção de superantagonistas ou de antagonistas da interleucina 6 humana poderia permitir a inibição da interleucina 6 em inúmeras doenças caracterizadas pela sua produção excessiva, tais como as doenças crónicas de natureza autoimunitária, o mieloma/plasmacitoma, a osteoporose pós-menopausa e a caquexia cancerosa.
- [0013] A metodologia para a selecção de superagonistas, antagonistas ou superantagonistas de uma interleucina 6, utilizando a molécula membranar gp 130 para activar o mecanismo regulador da fisiologia celular, de acordo com a presente invenção, compreende as operações seguintes:

- comparar as sequências de aminoácidos da hormona do crescimento com as sequências da referida interleucina 6;
- comparar as sequências de aminoácidos do receptor da hormona do crescimento com as dos dois receptores da interleucina 6, ou seja, com o receptor específico da interleucina 6 e com o gp 130;
- com base nas comparações anteriores, formular um modelo tridimensional do complexo receptor, assente na semelhança funcional entre as sequências do receptor da hormona do crescimento e as dos dois receptores da interleucina 6 em questão;
- identificar os resíduos da interleucina 6 de tipo natural que são uma parte do local de interacção com um receptor específico e os do local de interacção com o gp 130, respectivamente;
- introduzir mutações nos locais de interacção da interleucina 6;
- avaliar a actividade biológica dos mutantes.

[0014] Para a selecção de superagonistas da interleucina 6, a metodologia de acordo com a presente invenção compreende ainda as seguintes operações complementares:

- produção de um conjunto de fagotecas (bancos de fagos) que contenham mutações dos seguintes resíduos de tipo natural da interleucina 6, presentes sob a forma de um produto de fusão com as proteínas dos fagos filamentosos

Glu 42, Glu 51, Ser 52, Ser 53, Lis 54, Glu 55, Asn 63, Lis 66, Met 67, Ala 68,

Glu 69, Lis 70, Asp 71, Phe 170, Gln 175, Ser 176, Ser 177, Leu 181, Gln 183;

- gerar uma fagoteca, em que cada fago possui uma sequência de interleucina 6 mutante;
- seleccionar, entre a população de fagos que exprimem os mutantes de interleucina 6, aquele ou aqueles que possuam com o receptor específico uma afinidade superior à da interleucina de tipo natural;

- identificar a melhor sequência ou as melhores sequências de aminoácidos que se ligam ao receptor, por sequenciação do ADN extraído das partículas de fagos seleccionados.

[0015] Neste caso, é possível produzir um conjunto de fagotecas que contenham mutações dos referidos resíduos de tipo natural da interleucina 6, presente como produto de fusão com a proteína pIII do M13.

[0016] A metodologia para seleccionar antagonistas da interleucina 6, de acordo com a presente invenção, compreende, conjuntamente com as operações indicadas *supra*, as operações seguintes:

- mutacionar os resíduos identificados na reivindicação 1 para fazerem parte do local de interacção com o gp 130 (Arg 30, Tir 31, Gli 33, Ser 37, Ala 38, Ser 118, Lis 120, Val 121, Gln 124, Phe 125, Gln 127, Lis 128 e Lis 129), utilizando para tal técnicas convencionais da biologia molecular;

- avaliar a actividade biológica e a afinidade com o receptor específico da interleucina 6, dos mutantes produzidos conforme descrito *supra*, com a finalidade de identificar variantes da interleucina 6 cuja afinidade com o receptor específico esteja intacta e que revelem uma redução ou uma perda da actividade biológica;

- avaliar as referidas variantes da interleucina 6, enquanto antagonistas da actividade biológica da interleucina 6 de tipo natural.

[0017] No caso de se efectuar a selecção de superantagonistas da interleucina 6, por combinação das variações das sequências de aminoácidos responsáveis pela actividade antagonista, conforme indicado *supra*, com as variações de aminoácidos responsáveis por um aumento da afinidade do receptor específico com a interleucina 6.

[0018] Na metodologia para seleccionar os superantagonistas da interleucina 6, a mutagénese dos resíduos, identificados conforme enunciado antes, pode ser realizada utilizando uma técnica da biologia molecular seleccionada entre o grupo que compreende a reacção em cadeia com a polimerase, o prolongamento do iniciador, a mutagénese dirigida com um oligonucleótido e suas combinações.

[0019] Até este ponto apresentou-se uma descrição geral do assunto da presente invenção. Com o auxílio dos exemplos seguintes apresentar-se-á uma descrição minuciosa dos casos específicos da invenção, com a finalidade de se proporcionar uma melhor compreensão dos objectivos, características, vantagens e métodos da sua aplicação.

A figura 1 ilustra o arquétipo pHen Δ hIL-6 (o mesmo que pHen Δ IL-6h) e a produção de partículas fasmídicas (ver o exemplo 1 “Construção dos vectores”) utilizadas para a selecção de agonistas da hIL-6 (o mesmo que IL-6h).

A figura 2 ilustra a variação da actividade antagonista do mutante Tir31Asp/Gli35Phe/Ser118Arg/Val121Asp da IL-6 em função do aumento da sua concentração.

DEPÓSITOS

[0020] Efectuou-se o depósito de bactérias *E. coli* K12 - transformadas utilizando o plasmídeo pHen Δ hIL-6 que contém, desde o local de reconhecimento da enzima de restrição Sall até ao da enzima de restrição NotI, uma sequência nucleotídica que codifica a sequência de aminoácidos da interleucina 6 humana de tipo natural - em 10/6/1993 na Colecção Nacional de Bactérias Industriais e Marinhas Lda. (National Collection of Industrial and Marine Bacteria Ltd., NCIMB), Aberdeen, Escócia, Reino Unido, com o número de acesso NCIMB 40563.

Exemplo 1

Aplicação da metodologia de acordo com a presente invenção à selecção de agonistas de interleucina 6

1) CONSTRUÇÃO DOS VECTORES

[0021] A estratégia consiste em construir um gene híbrido que contenha toda a região que codifica a IL-6h seguida pelos últimos 157 aminoácidos da proteína pIII do fago M13 e precedida pela sequência Pel B, o qual veicula a proteína sintetizada para o espaço periplásmico.

[0022] A expressão do gene híbrido é comandada pelo promotor lacZ. A construção é realizada no contexto do vector pHenΔe e recebe o nome de pHenΔhIL-6 (ver o único número inscrito). Este plasmídeo contém também uma origem de replicação do fago. Se uma célula bacteriana que contenha este plasmídeo for infectada por um bacteriófago designado por “auxiliar”, tal como o M13K07, serão produzidas cópias filamentosas singulares pelo plasmídeo e irão ser recobertas com as proteínas do fago, exactamente como um genoma genuíno do fago. Estas partículas do fago que contêm o plasmídeo são conhecidas por fasmídeos. Conjuntamente com as moléculas pIII normais, também contêm as moléculas de fusão hIL6-pIII (o mesmo que IL-6h-pIII). Assim, uma molécula hIL-6 e o gene que codifica a sua sequência de aminoácidos estão contidos na mesma unidade. No caso das moléculas mutantes irá ser possível determinar a sequência de aminoácidos das moléculas expostas sobre as superfícies dos fagos obtidos pelos processos de selecção, sequenciando simplesmente o ADN fasmídico.

[0023] Uma outra característica da construção do pHen hIL-6 é a presença de um codão de paragem da tradução entre o gene da IL-6 e o gene da pIII. A produção da proteína híbrida tem lugar em estirpes bacterianas capazes de suprimirem este codão de paragem.

Mutatis mutandis, a utilização de estirpes não supressoras permite a produção apenas de hIL-6, directamente no espaço periplásmico.

[0024] As experiências a seguir descritas demonstram a possibilidade de se utilizar shrIL-6R (o mesmo que IL-6Rhrs) para purificar, entre o grande conjunto de interleucinas 6 mutantes expostas ao fago, utilizando pHen hIL-6, as que possuam a máxima afinidade com o referido receptor, por meio de ciclos de selecção por amplificação.

2) EXPERIÊNCIAS DE CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA

a) Teste de EISLE

[0025] Numa experiência efectuada por EISLE (o mesmo que ELISA), recobriu-se as cavidades das placas com fasmídeos de hIL-6 ou com M13K07 e fez-se com que reagissem com shrIL-6R (IL-6R humana recombinante solúvel). Após lavagens repetidas, a presença do receptor foi revelada utilizando um anticorpo monoclonal específico conjugado com fosfatase alcalina. O sinal obtido é maior no caso dos fasmídeos de hIL-6 e aumenta à medida que aumenta também a quantidade de receptor utilizado.

b) Enriquecimento do fasmídeo de hIL-6 com misturas de fasmídeo K07 utilizando shrIL-6R

[0026] Misturou-se partículas do fasmídeo de hIL-6 com partículas de M13K07 à razão de 1:100. Efectuou-se a incubação desta mistura com esferas de estireno recobertas com shrIL-6R. Após lavagens repetidas, para valores neutros do pH, submeteu-se as referidas esferas a uma lavagem rigorosa a pH 4,2, seguindo-se a eluição a pH 3,6. Determinou-se então a proporção definida pela relação fasmídeos de hIL-6:M13K07 no produto resultante da eluição. Comprovou-se que essa proporção era de 1:10, com um enriquecimento consequente em cerca de 10 vezes mais fasmídeos de hIL-6 comparativamente com o M13K07.

c) Seleção de misturas que possuem a afinidade mais elevada com o receptor gp 80, a partir de misturas de interleucinas 6 mutantes

[0027] Foram produzidas partículas fasmídicas que possuem, sobre as suas superfícies, moléculas mutantes de hIL-6 com uma afinidade superior (176 Arg) ou inferior (179 Ala) com o receptor, comparativamente com a versão natural. Misturou-se estas partículas à razão de 1:1. Efectuou-se a incubação da mistura com o receptor numa fase sólida (conforme descrito na alínea b). No produto da eluição a pH 3,6, a proporção entre os dois tipos de partículas foi de 15:1 favorável a 176 Arg.

d) Determinação da afinidade relativa das partículas de M13K07, das partículas fasmídicas de hIL-6, das partículas fasmídicas de 176 Arg e das partículas fasmídicas de 179 Ala com o receptor gp 80

[0028] Efectuou-se a incubação, separadamente, de quantidades iguais de partículas dos diversos tipos enumerados *supra* com esferas recobertas com o receptor. A seguir à habitual sequência de lavagens, determinou-se para cada tipo de fago o número de partículas recuperadas a partir do eluente, a pH 3,6. Tendo em conta que o valor das partículas recuperadas no caso do fasmídeo hIL-6 era igual a 1, obteve-se um valor igual a 3 no caso da 176 Arg, igual a 0,2 no caso da 179 Ala e igual a 0,18 no caso do M13K07. Estes valores reflectem as afinidades relativas das moléculas de IL-6 não expostas no fago. Com efeito, sabe-se que a 176 Arg se liga ao receptor com uma finidade três vezes superior à da molécula natural, ao passo que no caso da 179 Ala a afinidade de ligação ao receptor é reduzida quase a 0 (na realidade, um fasmídeo com o seu mutante, no que diz respeito à ligação ao receptor, comporta-se como o M13K07).

[0029] Este conjunto de experiências comprovou que é possível seleccionar, utilizando o método de acordo com a presente invenção, a partir de misturas de mutantes expostos aos fagos, aqueles que possuam a maior afinidade com o receptor.

Exemplo 2

Geração e selecção de antagonistas da interleucina 6 utilizando a metodologia de acordo com a presente invenção

[0030] Utilizou-se o plasmídeo Phen Δ hIL-6 como matriz para todas as reacções de mutagénese. Este plasmídeo é um derivado do plasmídeo pHEN1 e contém a zona que codifica a IL-6 humana (SEQ ID NO:1) a montante da zona que codifica a parte do terminal carboxi (desde o codão 250 até à extremidade COOH) da proteína pIII do bacteriófago M13; as duas zonas codificantes estão no quadro de leitura ininterrupta e estão separadas por um codão de paragem UAG Ambar, o qual pode ser suprimido nas estirpes bacterianas que possuam o gene do supressor SupE integrado no seu genoma. A zona que codifica a IL-6 humana também está no quadro de leitura ininterrupta, por baixo do péptido PelB, uma sequência de sinal para secreção, e o gene integral está sob o controlo do promotor LacZ. Finalmente, introduziu-se um local singular para a enzima de restrição SacI na sequência nucleotídica que codifica os aminoácidos 20-21-22 da hIL-6, sem alterar a sua identidade, e introduziu-se também um local singular para a enzima de restrição BfrI na zona codificante dos aminoácidos 38-39-40 da hIL-6, também neste caso sem efectuar modificações.

[0031] Recorreu-se a uma estratégia de RCP (Reacção em Cadeia com Polimerase) para gerar mutações dentro dos codões seleccionados na zona que codifica a interleucina 6 humana. O iniciador de jusante é o H9, um iniciador de 32 nucleótidos, correspondente às

posições 426-457 (filamento anti-sentido) do ADNc da hIL-6 (atribuindo o número 1 ao primeiro nucleótido do primeiro codão do polipeptido maduro). O local de hibridação do iniciador está a jusante do local de reconhecimento para a enzima XbaI, naturalmente presente no ADNc. O iniciador mutagénico de montante é o 'IL-6 31D/35 PCR' um iniciador de 70 nucleótidos cuja sequência é a SEQ ID NO:2.

[0032] O iniciador 'IL-6 31D/35 PCR' vai desde a posição 55 até à posição 124 (filamento de sentido normal) do ADNc da hIL-6 e introduz degenerações nos codões que codificam os aminoácidos 31 (tirosina de tipo natural) e 35 (glicina de tipo natural). Amplificou-se um fragmento de ADN de 403 pares de bases recorrendo à RCP, em conformidade com protocolos convencionais de amplificação por RCP. A amplificação foi efectuada em 35 ciclos. Cada ciclo consistiu de uma incubação durante 2 minutos a 94°C para desnaturar a matriz, 2 minutos a 50°C para hibridar o oligonucleótido e 3 minutos a 72°C para prolongar a cadeia. O fragmento amplificado foi então digerido com SacI e XbaI e purificado utilizando gel de agarose a 2%. O fragmento gerado por RCP e digerido pelas duas enzimas foi então ligado dentro do vector pHen hIL-6 digerido com as mesmas duas enzimas, purificado sobre gel de agarose a 0,8%, para substituir a sequência de tipo natural.

[0033] O quadro 1 a seguir apresentado mostra a actividade biológica, em células do hepatoma humano, e a ligação ao receptor gp 80 da interleucina 6 de tipo natural e suas mutações, estando as mutações assinaladas com um asterisco.

QUADRO 1

Propriedades de ligação ao receptor e actividade biológica da interleucina 6 de tipo natural e dos seus mutantes na hélice A

27	30				35				40				Actividade biológica	Ligação ao receptor			
Lis*	Gln	Ile	Arg	Tir*	Ile	Leu	Asp	Gli*	Ile	Ser	Ala	Leu	Arg	Lis	Glu	100%	100%
Ala	Gln	Ile	Arg	Tir	Ile	Leu	Asp	Gln	Thr	Ser	Ala	Leu	Arg	Lis	Glu	80 ■ 19%	100 ■ 4%
Lis	Gln	Ile	Arg	Asp	Ile	Leu	Asp	Tir	Ile	Ser	Ala	Leu	Arg	Lis	Glu	4,5 ■ 1%	83%
Lis	Gln	Ile	Arg	Asp	Ile	Leu	Asp	Phe	Ile	Ser	Ala	Leu	Arg	Lis	Glu	2 ■ 0,5%	80 ■ 2%
Lis	Gln	Ile	Arg	Asp	Ile	Leu	Asp	Leu	Ile	Ser	Ala	Leu	Arg	Lis	Ala	6 ■ 4%	177 ■ 7%
Lis	Gln	Ile	Arg	Asp	Ile	Leu	Asp	His	Ile	Ser	Ala	Leu	Arg	Lis	Glu	38 ■ 8%	85 ■ 15%
Lis	Gln	Ile	Arg	Asp	Ile	Leu	Asp	Cis	Ile	Ser	Ala	Leu	Arg	Lis	Glu	30 ■ 1%	82 ■ 18%

Conforme se conclui a partir deste quadro, os mutantes (Tir31Asp, Gli35Tir), (Tir31Asp, Gli35Phe) e (Tir31Asp, Gli35Leu, Glu42Ala) possuem menor actividade biológica quando comparados com a interleucina 6 de tipo natural. Na totalidade dos três casos a actividade residual é de 2-5% da actividade da interleucina 6 de tipo natural. Os três mutantes mantêm a sua capacidade total pra se ligarem ao receptor gp 80 da interleucina 6. Em conclusão, os três mutantes possuem uma actividade de transdução do sinal decrescente nas células do hepatoma. Dito por outras palavras, são antagonistas da interleucina 6 de tipo natural. Em particular, o mutante (Tir31Asp, Gli35Phe) é um antagonista particularmente eficaz na medida em que é capaz de reduzir a actividade da interleucina 6 de tipo natural quando utilizado com um excesso molar 50 vezes superior nos testes realizados com células do hepatoma humano.

Exemplo 3

Geração e selecção de outros antagonistas da interleucina 6 utilizando a metodologia de acordo com a presente invenção

Utilizou-se como matriz o plasmídeo pHEN Δ hIL-6, descrito no exemplo anterior, em todas as reacções mutagénicas. Recorreu-se a uma estratégia de RCP (Reacção em Cadeia

com Polimerase) para gerar mutações dentro dos codões seleccionados para a zona codificante da interleucina 6 humana. O iniciador referido *supra* é o HP/1, um iniciador com 29 nucleótidos, correspondendo às posições 1-19 (filamento de sentido natural) do ADNc da hIL-6 (sendo atribuído o número 1 ao primeiro nucleótido do primeiro codão do polipeptido maduro). O local de hibridação do iniciador está a montante do local de reconhecimento da enzima SacI, introduzido artificialmente no ADNc, sem alteração da sequência por este codificada, conforme descrito no exemplo 2. O iniciador mutagénico por baixo é o 'IL-6 118RCLF/121VD', um iniciador com 72 nucleótidos, cuja sequência é a SEQ ID NO:3. O iniciador 'IL-6 118RCLF/121VD' vai desde a posição 334 até à posição 405 (filamento anti-sentido) do ADNc da hIL-6 e introduz degenerações nos codões que codificam o aminoácido 118 (serina de tipo natural) e o aminoácido 121 (valina de tipo natural). Amplificou-se um fragmento de ADN de 415 pares de bases por RCP, em conformidade com protocolos convencionais de amplificação por RCP. A amplificação foi realizada em 35 ciclos. Cada ciclo consistiu de uma incubação durante 2 minutos a 94°C para desnaturar a matriz, 2 minutos a 50°C para hibridar o oligonucleótido e 3 minutos a 72°C para aumentar a cadeia. O fragmento amplificado foi digerido com as enzimas SacI e XbaI e purificado utilizando gel de agarose a 2%. O fragmento gerado por RCP e digerido pelas duas enzimas foi ligado dentro do vector pHenΔhIL-6 digerido com as mesmas duas enzimas, purificado sobre gel de agarose a 0,8%, para substituir a sequência de tipo natural.

[0034] O quadro 2 a seguir apresentado mostra a actividade biológica, nas células do hepatoma humano, e a ligação ao receptor da interleucina 6 e das suas versões com mutações nos resíduos indicados.

QUADRO 2

Propriedades de ligação ao receptor e actividade biológica da interleucina 6 de tipo natural e das versões com suas mutações na hélice C			
118 Ser	121 Val	Actividade biológica a 100%	Ligação ao receptor a 100%
Arg	Val	66%	81%
Leu	Asp	36 ■ 4%	92%
Arg	Asp	3,5 ■ 0,5%	66 ■ 5%
Ser	Asp	58 ■ 23%	78 ■ 2%

[0035] É possível observar que o mutante IL-6 Ser 118Arg/Val121Asp possui características muito semelhantes às do mutante IL-6 Tir31Asp/Gli35Phe descrito no quadro 1, ou seja, liga-se normalmente ao receptor de tipo I da interleucina 6, mas a actividade biológica das citocinas é reduzida aproximadamente 30 vezes.

Exemplo 4

Geração e selecção de antagonistas mais poderosos da interleucina 6 utilizando a metodologia de acordo com a presente invenção

[0036] Neste caso utilizou-se o plasmídeo pHEN Δ hIL-6 Tir31Asp/Gli35Phe, obtido conforme descrito no exemplo 2, como matriz para todas as reacções mutagénicas.

[0037] Praticou-se uma estratégia de RCP (Reacção em Cadeia com Polimerase) para gerar mutações dentro dos codões seleccionados para a zona que codifica a interleucina 6 humana. O iniciador referido antes é o HP/1, descrito no exemplo anterior. O iniciador mutagénico por baixo é 'IL-6 118RCLF/121VD', também descrito no exemplo anterior. Amplificou-se um fragmento de ADN de 415 pares de bases recorrendo à RCP, em conformidade com

protocolos convencionais de amplificação por RCP. A amplificação foi realizada em 35 ciclos. Cada ciclo consistiu de uma incubação durante 2 minutos a 94°C para desnaturar a matriz, 2 minutos a 50°C para hibridar o oligonucleótido e 3 minutos a 72°C para aumentar a cadeia. O fragmento amplificado foi digerido com as enzimas SacI e XbaI e purificado utilizando gel de agarose a 2%. O fragmento gerado por RCP e digerido pelas duas enzimas foi ligado dentro do vector pHen hIL-6 digerido com as mesmas duas enzimas, purificado sobre gel de agarose a 0,8%, para substituir a sequência de tipo natural.

[0038] O quadro 3 seguinte mostra a actividade biológica, em células do hepatoma humano, e a ligação ao receptor da interleucina 6 de tipo natural e das suas versões com mutações nos resíduos indicados.

QUADRO 3

Propriedades de ligação ao receptor e actividade biológica da interleucina 6 de tipo natural e das suas versões com mutações nas hélices A e C					
Hélice A		Hélice C			
31	35	118	121	Actividade biológica	Ligação ao receptor
Tir	Gli	Ser	Val	100%	100%
Asp	Phe	Leu	Val	1,4%	N.D.
Asp	Phe	Arg	Val	5,4 ■ 1,1%	66 ■ 2%
Asp	Phe	Leu	Asp	0%	63 ■ 4%
Asp	Phe	Arg	Asp	0%	97 ■ 15%
Asp	Phe	Phe	Asp	0%	76 ■ 26%

N.D. = Não determinado

[0039] Três das variantes com mutações tanto na hélice A como na hélice C não revelaram nenhum sinal de actividade biológica nas células do hepatoma humano, mantendo

contudo a sua capacidade para se ligarem ao receptor gp 80. Entre estas três proteínas, o mutante 'IL-6 Tir31Asp/Gli35Phe/Ser118Arg/Val121Asp' foi seleccionado para experiências de competição com a actividade biológica da interleucina 6 de tipo natural em células do hepatoma humano. Efectuou-se a estimulação das células com interleucina 6 de tipo natural à razão de 4 nanogramas por mililitro (ng/mL) de meio de cultura, na presença de concentrações cada vez maiores de mutante. Conforme ilustrado na figura 2 (em que a actividade biológica da interleucina 6 de tipo natural é expressa em unidades arbitrárias), as concentrações cada vez maiores de mutante permitem antagonizar totalmente os efeitos da interleucina 6 de tipo natural em células do hepatoma humano.

[0040] O quadro 4 ilustra os níveis de inibição (em percentagem) da actividade biológica da interleucina 6 de tipo natural em função da concentração de antagonista (expresso em nanogramas por mililitro, em valor de excesso molar comparativamente com a interleucina 6 de tipo natural e ainda em nanomoles por litro).

QUADRO 4

Inibição da actividade biológica da interleucina 6 de tipo natural em função da concentração de antagonista			
IL-6 g/mL	Tir31Asp/Gli35Phe/Ser118Arg/Val121Asp		Inibição da IL-6 de tipo natural (%)
	excesso molar	concentração (nM)	
16	4 X	0,7 nM	23%
60	15 X	2,7 nM	28%
164	41 X	7,5 nM	50%
500	125 X	22,7 nM	75%
1000	250 X	45,5 nM	82%
2000	500 X	90,0 nM	90%
4000	1000 X	181,8 nM	96%

Exemplo 5

O antagonista da interleucina 6, gerado e seleccionado graças à metodologia descrita na presente invenção, inibe o crescimento de células do mieloma humano dependentes da interleucina 6

[0041] No exemplo anterior demonstrou-se que um dos mutantes, designadamente o 'IL-6 Tir31Asp/Gli35Phe/Ser118Arg/Val121Asp' era capaz de inibir a actividade biológica da interleucina 6 (estimulação da transcrição por acção de um promotor induzível de interleucina 6) nas células do hepatoma humano. Na parte introdutória do presente pedido de patente de invenção afirmou-se que o desenvolvimento de antagonistas ou superantagonistas da interleucina 6 iria ter aplicação prática, visto que poderiam ser utilizados para inibir a actividade da interleucina 6 em doenças caracterizadas por uma produção excessiva de interleucina 6, tal como sucede em diversas formas de plasmacitoma/mieloma múltiplo. Apresentamos aqui um outro exemplo, demonstrando que os três mutantes

IL-6 Tir31Asp/Gli35Phe/Ser118Arg/Val121Asp (DFRD),

IL-6 Tir31Asp/Gli35Phe/Ser118Phe/Val121Asp (DFFD),

IL-6 Tir31Asp/Gli35Phe/Ser118Leu/Val121Asp (DFLD)

inibem completamente o crescimento de uma linhagem celular do mieloma humano, designada por XG-1, dependente da interleucina 6, sendo tal linhagem obtida a partir de células de mieloma recentemente isoladas num paciente com doença terminal. O crescimento da linhagem de células de mieloma XG-1 é estritamente dependente da interleucina 6 acrescentada de forma exógena, de modo idêntico ao que foi demonstrado no caso de células recentes de mieloma, pelo que esta linhagem celular pode ser considerada um excelente modelo *in vitro* da doença do mieloma múltiplo (Jourdan, M., Zhang, X-G., Portier, M., Boiron, J.-M., bataille, R. e Klein, B. (1991) 'J. Immunol.' 147, 4402-4407). Para testar o antagonismo dos mutantes

sobre a interleucina 6 de tipo natural procedeu-se à criação em cultura de células do mieloma XG-1 em placas de microtitulação de 96 cavidades à razão de 6000 células/microcavidade com interleucina 6 de tipo natural na concentração de 0,1 nanogramas por mililitro (ng/mL) de meio de cultura, na presença de concentrações cada vez maiores de cada um dos três mutantes. Ao fim de 7 dias de cultura procedeu-se a uma avaliação do número de células por determinação colorimétrica dos níveis da hexosaminidase (Landegren, U. (1984) 'J. Immunol. Methods' 67, 379-388). O quadro 5 seguinte traduz a inibição da actividade da interleucina 6 de tipo natural em função das concentrações dos três antagonistas (expressas em nanogramas de mutante por mililitro de meio de cultura).

QUADRO 5

Inibição da actividade da interleucina 6 de tipo natural (estimulação do crescimento das células do mieloma humano XG-1) em função da concentração dos três antagonistas			
Antagonista	Inibição da interleucina 6 de tipo natural em função da concentração		
	DFRD	DFFD	DFLD
3,3 ng/mL	6%	0%	0%
10 ng/mL	12%	7%	3%
30 ng/mL	25%	18%	10%
90 ng/mL	42%	35%	31%
270 ng/mL	64%	59%	53%
810 ng/mL	84%	84%	71%
2430 ng/mL	90%	90%	76%
7290 ng/mL	93%	95%	81%

[0042] Conforme se pode concluir do quadro anterior, todos os mutantes são antagonistas particularmente eficazes da actividade biológica da interleucina 6 sobre as células do mieloma humano.

Exemplo 6

Aplicação da metodologia de acordo com a presente invenção para seleccionar novos superagonistas da interleucina 6

[0043] Construiu-se uma fagoteca (contendo mutações dos resíduos Gln 175, Ser 177, Leu 181 e Leu 183 da interleucina 6 de tipo natural, presente sob a forma de um produto de fusão com a proteína de fagos filamentosos), em conformidade com a técnica da biologia molecular de Ampliação do Iniciador. O oligonucleótido mutagenético é o 'IL-6 QSLQ (AS)', um oligonucleótido de 62 nucleótidos cuja sequência é a SEQ ID NO:4. O iniciador 'IL-6 QSLQ (AS)' vai desde a posição 507 até ao codão de paragem do ADNc da interleucina 6 (cadeia anti-sentido), introduz degenerações nos codões que codificam os aminoácidos 175 (Gln de tipo natural), 177 (Ser de tipo natural), 181 (Leu de tipo natural) e 183 (Gln de tipo natural) e introduz também um local de restrição NotI a jusante do codão de paragem da interleucina 6. Utilizou-se o oligonucleótido 'IL-6 QSLQ pr. Bam', cuja sequência é a SEQ ID NO:5, como iniciador para a reacção de Ampliação do Iniciador. O oligonucleótido 'IL-6 QSLQ pr. Bam' vai desde a posição 503 até à posição 522 (cadeia de sentido normal) do ADNc da interleucina 6 e contém um local de reconhecimento BamHI dentro dos nove nucleótidos de 5'. Os dois oligonucleótidos são complementares entre si numa região correspondente à extensão desde a posição 507 até à posição 522 do ADNc da interleucina 6. Os dois oligonucleótidos foram recombinados *in vitro* e depois esses oligonucleótidos recombinados foram utilizados como substrato para uma reacção de Ampliação do Iniciador, realizada utilizando a enzima de Klenow. O fragmento de ADN de cadeia dupla assim obtido foi então digerido com BamHI (compatível com BglII) e com NotI e ligado dentro do plasmídeo 'phen Δ IL-6' digerido com BglII (compatível com BamHI) e com NotI, com a finalidade de

se efectuar a substituição da sequência de tipo natural pelas sequências mutacionadas. O produto de ligação foi inserido em bactérias, proporcionando grosso modo um milhão de transformantes independentes (“transformante” é o termo que serve para designar uma bactéria que tenha sido incorporada num plasmídeo recombinante). As bactérias transformadas foram infectadas com o bacteriófago auxiliar M13K07 para gerar a fagoteca (um banco de fasmídeos), conforme descrito no exemplo 1.

[0044] Realizou-se então na fagoteca uma selecção por incubação com esferas de polistireno recobertas com shrIL-6R, conforme descrito no exemplo 1. A população de fagos, eluída a pH 3,6, foi depois amplificada em bactérias. Ao fim de 5 ciclos de selecção/ /amplificação, os fagos seleccionados aleatoriamente foram sequenciados na região mutagenizada e as correspondentes proteínas de interleucina 6 mutantes foram produzidas no espaço periplásmico da estirpe bacteriana adequada (conforme descrito no exemplo 1) e testadas para pesquisa da ligação ao receptor e da actividade biológica sobre as células do hepatoma humano. O quadro 6 demonstra que é possível, graças à utilização da metodologia da presente invenção, seleccionar superagonistas da interleucina 6, moléculas mutantes que possuem uma maior ligação ao receptor e também uma maior actividade biológica sobre as células do hepatoma humano.

QUADRO 6

Propriedades de ligação ao receptor e actividades biológicas da interleucina 6 de tipo natural e dos seus mutantes na hélice D						
Posição	175	177	181	183	Ligação ao receptor (%)	Actividade biológica (%)
tipo natural	Gln	Ser	Leu	Gln	100%	100%
fago 5-4	Gln	Ser	Leu	Tir	240%	130%
fago 5-8	Gln	Ser	Leu	Ala	240%	120%
fago 5-2	Ile	Ser	Leu	Ala	260%	150%
fago 4-8	Gln	Ser	Ile	Asn	100%	N.D.
fago 5-3	Ile	Ser	Val	His	80%	N.D.

N.D.: não determinado

[0045] As mutações seleccionadas pela metodologia de acordo com a presente invenção podem ser utilizadas como ponto de partida para o desenvolvimento de superagonistas da interleucina 6 mais poderosos. Isto é demonstrado neste exemplo em que a mutação identificada no fago 5-2 é combinada com a mutação Ser176Arg para a qual se sabe pela técnica anterior que aumenta simultaneamente a ligação ao receptor e a actividade biológica (ver a publicação da patente de invenção internacional WO 94/11402 de um pedido de patente de invenção PCT da presente requerente, depositado a 2/11/93 com prioridade italiana de 6/11/92). As três mutações foram agrupadas no mesmo ADNc por mutagénesse dirigida com um oligonucleótido. O oligonucleótido 175I/176R/183A (S), cuja sequência é a SEQ ID NO:6, tem um comprimento de 73 nucleótidos e vai desde a posição 499 até ao codão de paragem (cadeia de sentido normal) do ADNc da interleucina 6 presente em 'phen hIL-6' e que possui um local de reconhecimento para a enzima NotI a jusante do codão de paragem. O oligonucleótido 175I/176R/183A (AS), cuja sequência é a SEQ ID NO:7, tem um comprimento de 73 nucleótidos e vai desde a posição 499 até ao codão de paragem (cadeia anti-sentido) do

ADNc da interleucina 6 presente em 'phen Δ hIL-6' e que possui um local de reconhecimento para a enzima NotI a montante do codão de paragem. Os dois oligonucleótidos são complementares entre si e codificam ambos o aminoácido isoleucina na posição 175, o aminoácido serina na posição 176 e o aminoácido alanina na posição 183. Os dois oligonucleótidos foram recombinados *in vitro*, o fragmento de ADN de cadeia dupla assim obtido foi digerido com as enzimas de restrição BglII e NotI e ligado dentro do vector 'phen Δ hIL-6' digerido com as mesmas duas enzimas, com a finalidade de se substituir a sequência de tipo natural com a sequência mutacionada. A correspondente variante da interleucina 6 portadora das três mutações desejadas foi produzida no espaço periplásmico da estirpe bacteriana adequada (conforme descrito no exemplo 1) e testada para pesquisa da ligação ao receptor e da actividade biológica sobre as células do hepatoma humano. O quadro 7 adiante apresentado resume as propriedades de ligação ao receptor e a actividade biológica sobre as células do hepatoma humano, tanto do novo mutante triplo como do mutante duplo progenitor.

QUADRO 7

Propriedades de ligação ao receptor e actividades biológicas da interleucina 6 de tipo natural e das versões com mutações duplas e triplas na hélice D					
Posição	175	176	183	Ligação ao receptor (%)	Actividade biológica (%)
tipo natural	Gln	Ser	Gln	100%	100%
fago 5-2	Ile	Ser	Ala	260%	150%
mutante triplo	Ile	Arg	Ala	450%	260%

[0046] Conforme se conclui do quadro anterior, o mutante portador das substituições Gln175Ile/Ser176Arg/Gln183Ala é um superagonista da interleucina 6 muito mais eficaz do que o mutante progenitor portador apenas das duas substituições Gln175Ile/Gln183Ala.

Exemplo 7Aplicação da metodologia de acordo com a presente invenção à selecção de superantagonistas da interleucina 6

[0047] As três mutações Gln175Ile/Ser176Arg/Gln183Ala, identificadas no exemplo 6, que aumentam fortemente a capacidade de ligação ao receptor, foram combinadas com as quatro mutações Tir31Asp/Gli35Phe/Ser118Arg/Val121Asp, descritas nos exemplos 4 e 5, que manifestam o mais forte comportamento antagonístico, por meio de uma estratégia de RCP. Testou-se a proteína mutante correspondente, designada por mutante SAnt 1, e que contém a totalidade das sete mutações, tanto para pesquisa da ligação ao receptor como para investigação do comportamento antagonístico nas células do mieloma e do hepatoma humanos, estando indicadas no quadro 8 subsequente as propriedades de ligação ao receptor tanto para o SAnt 1 como para o DFDR (o mutante a partir do qual foi obtido o SAnt 1), conjuntamente com as quantidades (em nanogramas de mutante por mililitro de meio de cultura) de mutante necessárias para inibir 50% da actividade biológica da interleucina 6 (as células do hepatoma foram estimuladas com 4 nanogramas de interleucina 6 de tipo natural por mililitro de meio de cultura, ao passo que as células do mieloma foram estimuladas com 0,1 nanogramas de interleucina 6 por mililitro de meio de cultura, devido à mais elevada sensibilidade destas últimas células à interleucina 6 de tipo natural.

QUADRO 8

Inibição da actividade da interleucina 6 de tipo natural sobre as células do mieloma e do hepatoma humanos em função da capacidade dos antagonistas para se ligarem ao receptor				
Antagonista	Ligação ao receptor (% em peso)	Inibição a 50% da actividade da interleucina 6 nas células do hepatoma		Actividade sobre as células do mieloma
		Hep3B	HepG2	
DFRD	97%	164 ng/mL	132 ng/mL	190 ng/mL
SAnt 1	406%	19 ng/mL	32 ng/mL	22 ng/mL

[0048] Conforme se infere do quadro, a introdução das três mutações descritas no exemplo 6 (Gln175Ile/Ser176Arg/Gln183Ala) aumentou simultaneamente a capacidade do mutante DFRD progenitor para se ligar ao receptor e fez diminuir fortemente a quantidade necessária de antagonista para inibir 50% da actividade biológica da interleucina 6 sobre as linhagens celulares testadas, gerando consequentemente um superantagonista muito eficaz da interleucina 6.

ENUMERAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS

INFORMAÇÃO GERAL:

(i) REQUERENTE: INSTITUTO DI RICERCHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE P.

ANGELETTI S.p.A.

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: Método de selecção de superagonistas, de antagonistas e de superantagonistas da interleucina 6

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 7

(iv) ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

(A) ENDEREÇO: Società Italiana Brevetti

(B) RUA: Piazza di Pietra, 39

(C) CIDADE: Roma

(D) PAÍS: Itália

(E) CÓDIGO POSTAL: I-00186

(viii) INFORMAÇÃO SOBRE O REPRESENTANTE/AGENTE:

(A) NOME: DI CERBO, Mario (Dr.)Svensson, Leonard R.

(C) REFERÊNCIA: RM/090075/MDC

(ix) INFORMAÇÃO PARA TELECOMUNICAÇÕES:

(A) TELEFONE: 06/6785941

(B) TELEFAX: 06/6794692

(C) TELEX: 612287 ROPAT

(1) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 555 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) TIPO DE CORDÃO: duplo

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: não

(iv) ANTI-SENTIDO: não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(vii) FONTE IMEDIATA:

(A) SÍNTESE: produção em bactérias

(ix) PARTICULARIDADES:

(A) NOME: IL-6 ADNc

(C) MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO: gel de poliacrilamida

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:1:

CCA	GTA	CCC	CCA	GGA	GAA	GAT	TCC	AAA	GAT	GTA	GCC	GCC	CCA	CAC	AGA	48
Pro	Val	Pro	Pro	Gli	Glu	Asp	Ser	Lis	Asp	Val	Ala	Ala	Pro	His	Arg	
1				5					10					15		
CAG	CCA	CTC	ACG	AGC	TCA	GAA	CGA	ATT	GAC	AAA	CAA	ATT	CGG	TAC	ATC	96
Gln	Pro	Leu	Thr	Ser	Ser	Glu	Arg	Ile	Asp	Lis	Gln	Ile	Arg	Tir	Ile	
			20					25					30			
CTC	GAC	GGC	ATC	TCA	GCC	TTA	AGA	AAG	GAG	ACA	TGT	AAC	AAG	AGT	AAC	144
Leu	Asp	Gli	Ile	Ser	Ala	Leu	Arg	Lis	Glu	Hr	Cis	Asn	Lis	Ser	Asn	
		35					40					45				
ATG	TGT	GAA	AGC	AGC	AAA	GAG	GCA	CTG	GCA	GAA	AAC	AAC	CTG	AAC	CTT	192
Met	Cis	Glu	Ser	Ser	Lis	Glu	Ala	Leu	Ala	Glu	Asn	Asn	Leu	Asn	Leu	
	50					55					60					
CCA	AAG	ATG	GCT	GAA	AAA	GAT	GGA	TGC	TTC	CAA	TCT	GGA	TTC	AAT	GAG	240
Pro	Lis	Met	Ala	Glu	Lis	Asp	Gli	Cis	Phe	Gln	Ser	Gli	Phe	Asn	Glu	
65					70					75					80	
GAG	ACT	TGC	CTG	GTG	AAA	ATC	ATC	ACT	GGT	CIT	TIG	GAG	TTT	GAG	GTA	288
Glu	Thr	Cis	Leu	Val	Lis	Ile	Ile	Thr	Gli	Leu	Leu	Glu	Phe	Glu	Val	
				85					90					95		
TAC	CTA	GAG	TAC	CTC	CAG	AAC	AGA	TTT	GAG	AGT	AGT	GAG	GAA	CAA	GCC	336
Tir	Leu	Glu	Tir	Leu	Gln	Asn	Arg	Phe	Glu	Ser	Ser	Glu	Glu	Gln	Ala	
			100					105					110			

AGA	GCT	GTC	CAG	ATG	AGT	ACA	AAA	GTC	CTG	ATC	CAG	TTC	CTG	CAG	AAA	384
Arg	Ala	Val	Gln	Met	Ser	Thr	Lis	Val	Leu	Ile	Gln	Phe	Leu	Gln	Lis	
		115					120					125				
AAG	GCA	AAG	AAT	CTA	GAT	GCA	ATA	ACC	ACC	CCT	GAC	CCA	ACC	ACA	AAT	432
Lis	Ala	Lis	Asn	Leu	Asp	Al	Ile	Thr	Thr	Pro	Asp	Pro	Thr	Thr	Asn	
		130					135					140				
GCC	AGC	CTG	CTG	ACG	AAG	CTG	CAG	GCA	CAG	AAC	CAG	TGG	CTG	CAG	GAC	480
Ala	Ser	Leu	Leu	Thr	Lis	Leu	Gln	Ala	Gln	Asn	Gln	Trp	Leu	Gln	Asp	
					150						155				160	
ATG	ACA	ACT	CAT	CTC	ATT	CTG	AGA	TCT	TTT	AAG	GAG	TTC	CTG	CAG	TCC	528
Met	Thr	Thr	His	Leu	Ile	Leu	Arg	Ser	Phe	Lis	Glu	Phe	Leu	Gln	Ser	
				165					170						175	
AGC	CTG	AGG	GCT	CTT	CGG	CAA	ATG	TAG								555
Ser	Leu	Arg	Ala	Leu	Arg	Gln	Met									
			180													

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 70 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) TIPO DE CORDÃO: cordão simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(iii) HIPOTÉTICA: não

(iv) ANTI-SENTIDO: não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(vii) FONTE IMEDIATA:

(A) SÍNTESE: sintetizador de oligonucleótidos

(ix) PARTICULARIDADES:

(A) NOME: IL-6 31D35 PCR

(C) MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO: gel de poliacrilamida

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:2:

CGCACGAGCT CAGAACGAAT TGACAAACAA ATTCGGKACA TCCTCGACYD TATCTCAGCC 60
TAAGAAAGG 70

(3) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

(A) COMPRIMENTO: 72 nucleótidos

(B) TIPO: nucleótido

(C) TIPO DE CORDÃO: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(iii) HIPOTÉTICA: não

(iv) ANTI-SENTIDO: sim

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(vii) FONTE IMEDIATA:

(A) SÍNTESE: sintetizador de oligonucleótidos

(ix) PARTICULARIDADES:

(A) NOME: IL-6 118RCLF/121VD

(C) MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO: gel de poliacrilamida

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:3:

CGCATCTAGA TTCTTTGCCT TTTTCTGCAG GAACTGGATC AGGKCTTTTG TGYZCATCTG 60
CACAGCTCTG GC 72

INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 62 nucleótidos
- (B) TIPO: nucleótido
- (C) TIPO DE CORDÃO: cordão simples
- (D) TOPOLOGIA: linear
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético
- (iii) HIPOTÉTICA: não
- (iv) ANTI-SENTIDO: sim
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: terminal carboxi
- (vii) FONTE IMEDIATA:
 - (A) SÍNTESE: sintetizador de oligonucleótidos
- (ix) PARTICULARIDADES:
 - (A) NOME: IL-6 QSLQ (AS)
 - (C) MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO: gel de poliacrilamida
- (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:4:

CCGGGCGGCC GCCCTACATM NNCCGMNNAG CCCTCAGMNN GGAMNNCAGG AACTCCTTAA 60
AG 62

INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:5:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 24 nucleótidos
 - (B) TIPO: nucleótido
 - (C) TIPO DE CORDÃO: cordão simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(iii) HIPOTÉTICA: não

(iv) ANTI-SENTIDO: não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(vii) FONTE IMEDIATA:

(A) SÍNTESE: sintetizador de oligonucleótidos

(ix) PARTICULARIDADES:

(A) NOME: IL-6 QSLQ pr. Bam

(C) MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO: gel de poliacrilamida

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:5:

CGCGGATCCT TTAAGGAGTT CCTG

24

INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 73 nucleótidos

(B) TIPO: nucleótido

(C) TIPO DE CORDÃO: cordão simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(iii) HIPOTÉTICA: não

(iv) ANTI-SENTIDO: não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: terminal carboxi

(vii) FONTE IMEDIATA:

(A) SÍNTESE: sintetizador de oligonucleótidos

(ix) PARTICULARIDADES:

(A) NOME: 175I/167R/183A (S)

(C) MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO: gel de poliacrilamida

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:6:

GCCTGAGATC TTTTAAGGAG TTCCTGATCC GTAGCCTGAG GGCTCTTCGG GCTATGTAGG 60

GCGGCCGCAT GGC 73

INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 73 nucleótidos

(B) TIPO: nucleótido

(C) TIPO DE CORDÃO: cordão simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN sintético

(iii) HIPOTÉTICA: não

(iv) ANTI-SENTIDO: sim

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(vii) FONTE IMEDIATA:

(A) SÍNTESE: sintetizador de oligonucleótidos

(ix) PARTICULARIDADES:

(A) NOME: 175I/167R/183A (AS)

(C) MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO: gel de poliacrilamida

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:7:

GCCATGCGGC CGCCCTACAT AGCCCGAAGA GCCCTCAGGC TACGGATCAG GAACTCCTTA 60

AAAGATCTCA GGC 73

Lisboa, 20 de Abril de 2000

 O Agente Oficial da Propriedade Industrial



JOSÉ DE SAMPAIO
A.O.P.L.
Rua do Salitre, 195, s/c-Drt.
1250 LISBOA

Reivindicações

1. Metodologia para seleccionar superagonistas, antagonistas e superantagonistas da interleucina 6, utilizando a molécula membranar gp 130 para activar os mecanismos reguladores da fisiologia celular, a qual compreende as operações seguintes:
 - comparar as sequências de aminoácidos da hormona do crescimento com as sequências da referida interleucina 6;
 - comparar as sequências de aminoácidos do receptor da hormona do crescimento com as dos dois receptores da interleucina 6, ou seja, com o receptor específico da interleucina 6 e com o gp 130;
 - com base nas comparações anteriores, formular um modelo tridimensional do complexo receptor assente na semelhança funcional entre as sequências do receptor da hormona do crescimento e as dos dois receptores da interleucina 6 em questão;
 - identificar os resíduos da interleucina 6 de tipo natural que são uma parte do local de interacção com um receptor específico e os do local de interacção com a gp 130, respectivamente;
 - introduzir mutações nos locais de interacção da interleucina 6;
 - avaliar a actividade biológica dos mutantes.

2. Metodologia para seleccionar superagonistas da interleucina 6 de acordo com a reivindicação 1, a qual compreende as seguintes operações complementares:
 - produção de um conjunto de fagotecas (bancos de fagos) que contenham mutações dos seguintes resíduos de tipo natural da interleucina 6, presentes sob a forma de um produto de

fusão com as proteínas dos fagos filamentosos

Glu 42, Glu 51, Ser 52, Ser 53, Lis 54, Glu 55, Asn 63, Lis 66, Met 67, Ala 68,

Glu 69, Lis 70, Asp 71, Phe 170, Gln 175, Ser 176, Ser 177, Leu 181, Gln 183;

- gerar uma fagoteca, em que cada fago possui uma sequência de interleucina 6 mutante;
- seleccionar, entre a população de fagos que exprimem os mutantes de interleucina 6, aquele ou aqueles que possuam com o receptor específico uma afinidade superior à da interleucina de tipo natural;
- identificar a melhor sequência ou as melhores sequências de aminoácidos que se ligam ao receptor, por sequenciação do ADN extraído das partículas de fagos seleccionados.

3. Metodologia para seleccionar superagonistas da interleucina 6 de acordo com a reivindicação 2, em que é produzido um conjunto de bancos de fagos contendo mutantes do referido resíduo de interleucina 6 de tipo natural presente enquanto produto de fusão com a proteína pIII do M13.

4. Metodologia para seleccionar antagonistas da interleucina 6 de acordo com a reivindicação 1, a qual compreende ainda as seguintes operações complementares:

- mutacionar os resíduos identificados na reivindicação 1 para fazerem parte do local de interacção com a gp 130 (Arg 30, Tir 31, Gli 35, Ser 37, Ala 38, Ser 118, Lis 120, Val 121, Gln 124, Phe 125, Gln 127, Lis 128 e Lis 129), utilizando para tal técnicas convencionais da biologia molecular;
- avaliar a actividade biológica e a afinidade com o receptor específico da interleucina 6 dos mutantes produzidos conforme descrito *supra*, com a finalidade de identificar

variantes da interleucina 6 cuja afinidade com o receptor específico esteja intacta e que revelem uma redução ou uma perda da actividade biológica;

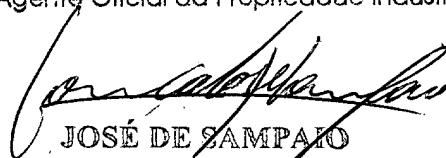
- avaliar as referidas variantes da interleucina 6 enquanto antagonistas da actividade biológica da interleucina 6 de tipo natural.

5. Metodologia para seleccionar superantagonistas da interleucina 6 de acordo com a reivindicação 1, mediante a combinação de variações de sequências de aminoácidos responsáveis pela actividade antagonista, as quais estão indicadas na reivindicação 4, com variações de aminoácidos responsáveis por uma maior afinidade do receptor específico com a interleucina 6.

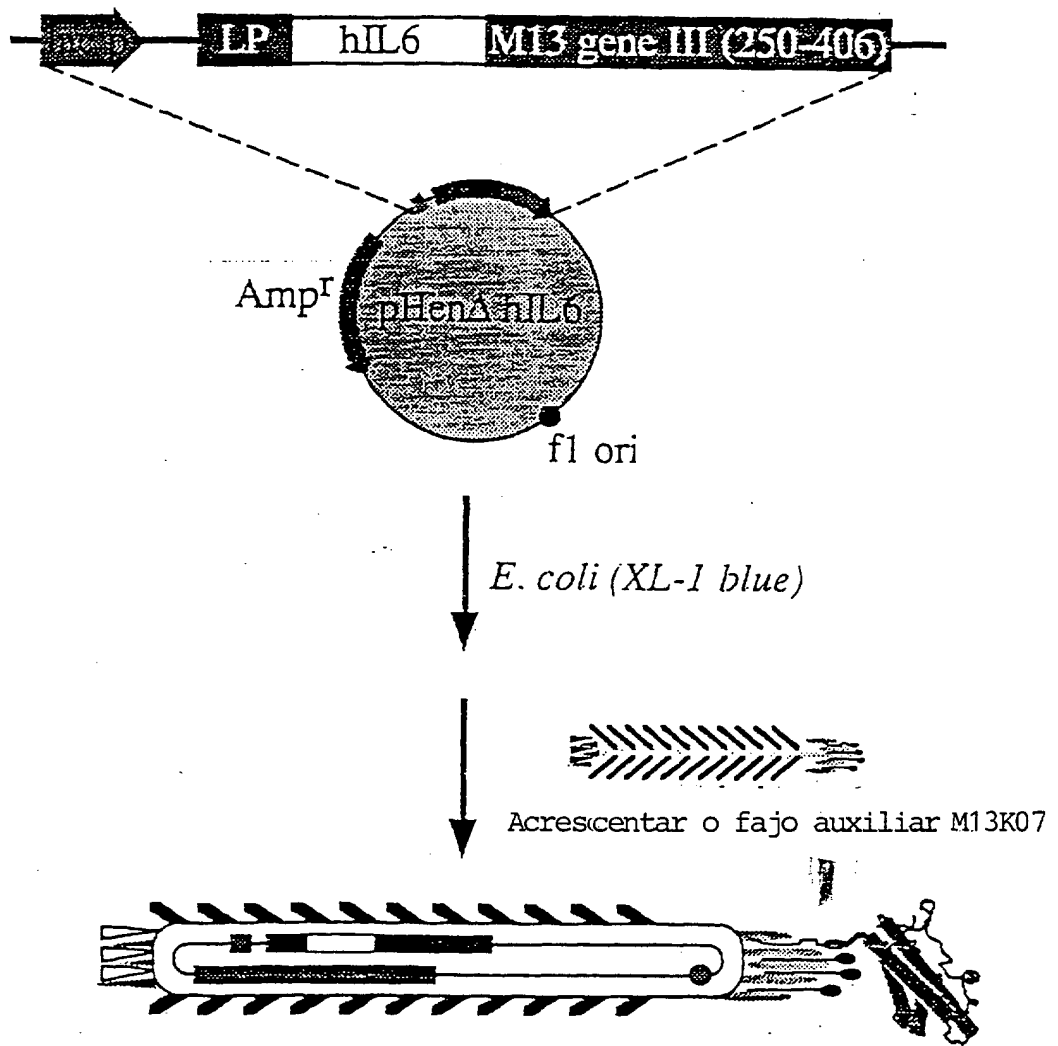
6. Metodologia para seleccionar superantagonistas da interleucina 6 de acordo com a reivindicação 5, em que a mutagénese de resíduos identificados conforme enunciado antes é realizada utilizando uma técnica da biologia molecular escolhida entre o grupo que compreende a reacção em cadeia com polimerase, a amplificação do iniciador, a mutagénese dirigida com um oligonucleótido e suas combinações.

Lisboa, 20 de Abril de 2000

 O Agente Oficial da Propriedade Industrial


JOSÉ DE SAMPAIO
A.O.P.I.
Rua do Salitre, 197, v/c-Drt.
1250 LISBOA

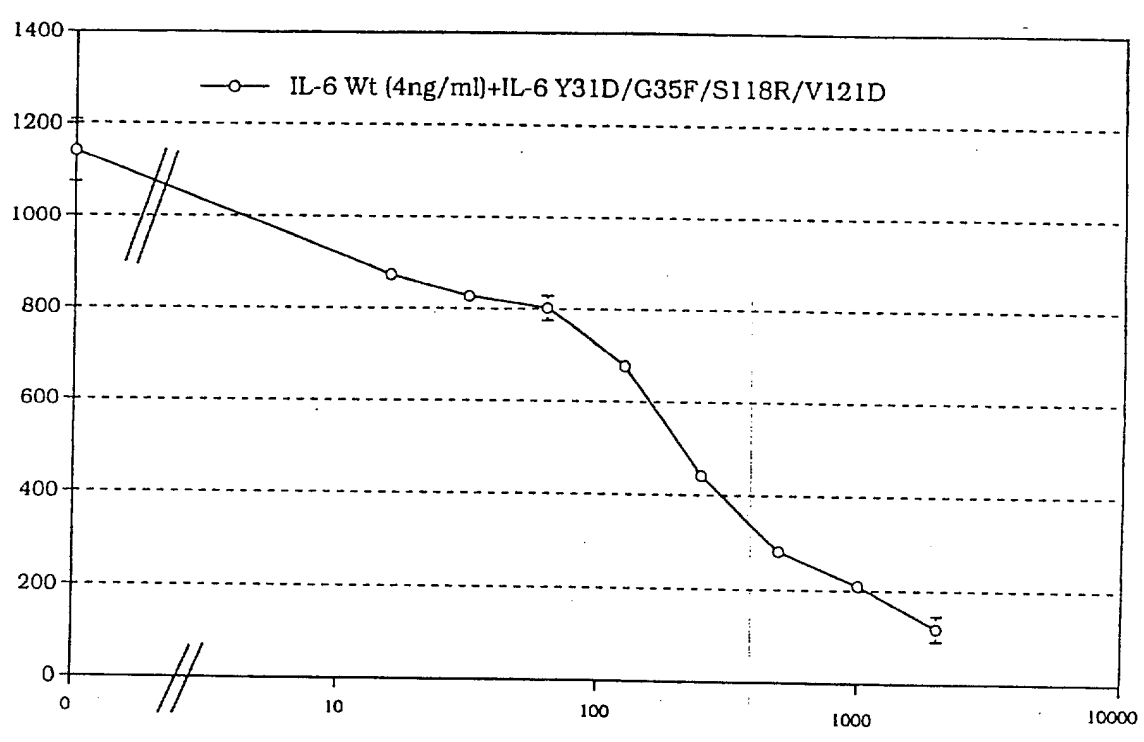
pHen: hIL6 E PRODUÇÃO DE PARTICULAS FASMÍDICAS



Partículas fasmídicas

FIG. 1

258



Concentração do agonista, ng/mL

FIG. 2