



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

(11) PI 0315652-4 B1

(22) Data do Depósito: 24/10/2003

(45) Data de Concessão: 06/02/2018



(54) Título: MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, VETOR, POLIPEPTÍDEO DE FUSÃO, E, MULTÍMERO

(51) Int.Cl.: C07K 14/715

(30) Prioridade Unionista: 28/10/2002 US 10/282,162

(73) Titular(es): REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

(72) Inventor(es): NEIL STAHL; GEORGE D. YANCOPOULOS

“MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, VETOR, POLIPEPTÍDEO DE FUSÃO, E, MULTÍMERO”

Este pedido é uma continuação-em-parte do Pedido U.S. de No. 09/787.835, depositado aos 22 de março de 2001, que é um Pedido de Estágio Nacional U.S. do Pedido Internacional de No. PCT/US99/22045, depositado aos 22 de setembro de 1999, que reivindica prioridade ao Pedido U.S. de No. 09/313.942, depositado aos 19 de maio de 1999, agora permitido, que reivindica prioridade ao Pedido Provisório U.S. de No. 60/101.858, depositado aos 25 de setembro de 1998, agora abandonado. Em todo este pedido são feitas referências várias publicações. As descrições destas publicações em suas totalidades são por meio desta incorporadas neste pedido como referências.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

A família CNTF de citocinas desempenha papéis importantes em uma ampla variedade de processos fisiológicos que proporcionam aplicações terapêuticas potenciais para ambos antagonistas e agonistas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Um objetivo da presente invenção é a produção de antagonistas de citocina que são úteis no tratamento de desordens ou doenças relacionadas com citocina.

Outro objetivo da invenção é o uso dos antagonistas de citocina descritos para o tratamento de desordens ou doenças relacionadas com citocina.

Outro objetivo da invenção é a construção de vários antagonistas de citocina IL-1 específicos, chamados de Traps IL-1, cada um possuindo seqüências diferentes mas todos sendo capazes de bloquearem a ligação de IL-1 em seu receptor, funcionando assim como antagonistas de IL-1.



BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Fig.1: Trap IL-1 humana bloqueia os efeitos *in vivo* de huIL-1 exogenamente administrada. Camundongos BALB/c receberam injeção subcutânea de huIL-1 (0,3 µg/kg) no tempo 0. Vinte quatro horas antes da injeção de huIL-1, os animais foram pré-testados quer com veículo quer com excesso molar de 150 vezes de Trap huIL-1. Duas horas antes da morte (26 horas), os camundongos foram re-desafiados com uma segunda injeção de huIL-1 (0,3 µg/kg, s.c.). Amostras de sangue foram coletadas em vários instantes de tempo e soros foram analisados para níveis de IL-1 (expressados como média ± SEM; n = 5 por grupo).

Fig. 2: Trap IL-1 humana bloqueia os efeitos *in vivo* de IL-1 humana exogenamente administrada.

Fig. 3: Trap IL-1 humana bloqueia os efeitos de IL-1 em articulações inflamadas.

Figs. 4-5: Murina-IL-1 Trap reduz a severidade de sintomas de artrite em modelo de Artrite Induzida por Colágeno (CIA) Acelerada por Zimosano.

Fig. 6: Várias concentrações de IL-1 Trap 1649 foram incubadas na presença de IL-1 humana a 5 pM durante a noite na temperatura ambiente.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

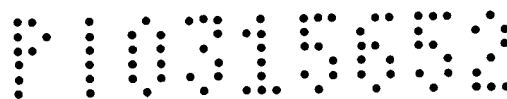
A presente invenção proporciona uma molécula de ácido nucleico isolada codificadora de um polipeptídeo de fusão capaz de se ligar em uma citocina para formar um complexo não-funcional compreendendo: (a) uma seqüência de nucleotídeos codificadora de um primeiro componente de polipeptídeo de fusão compreendendo a seqüência de aminoácidos da porção ligadora de citocina do domínio extracelular do componente determinante de especificidade de um receptor de citocina; (b) uma seqüência de nucleotídeos codificadora de um segundo componente de polipeptídeo de fusão



compreendendo a seqüência de aminoácidos da porção ligadora em citocina do domínio extracelular do componente transdutor de sinal de um receptor de citocina; e (c) uma seqüência de nucleotídeos codificadora de um terceiro componente de polipeptídeo de fusão compreendendo a seqüência de aminoácidos de um componente de multimerização.

"Porção ligadora de citocina" significa a porção mínima do domínio extracelular necessária para ligar a citocina. É aceito por aquelas pessoas experientes na técnica que uma característica definidora de um receptor de citocina é a presença de dois domínios semelhantes à fibronectina que contêm cisteínas canônicas e o box WSXWS (SEQ ID NO: 26) (Bazan (1990) PNAS 87: 6934-6938). Seqüências codificadoras dos domínios extracelulares do componente de ligação do receptor de citocina e do componente transdutor de sinal do receptor de citocina também podem ser usadas para formar o polipeptídeo de fusão da invenção. Semelhantemente, seqüências mais longas codificadoras de porções maiores dos componentes do receptor de citocina podem ser utilizadas. Contudo, é contemplado o fato de que fragmentos menores do que o domínio extracelular funcionarão para ligar a citocina e portanto, a invenção contempla um polipeptídeo de fusão compreendendo a porção mínima do domínio extracelular necessária para ligar a citocina como a porção ligadora de citocina.

A invenção compreende um "componente determinante de especificidade" de um receptor de citocina e um "componente transdutor de sinal" do receptor de citocina. Independentemente da nomenclatura utilizada para designar um componente ou uma subunidade particular de um receptor de citocina, uma pessoa experiente na técnica reconhecerá que componente ou subunidade de um receptor é responsável pela determinação do alvo celular da citocina, e assim saberá qual componente constitui o "componente determinante de especificidade". De maneira semelhante, independentemente da nomenclatura empregada, uma pessoa experiente na técnica saberá qual

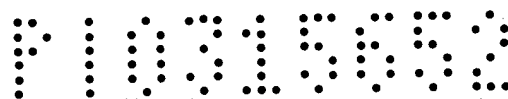


10/2

componente ou subunidade de um receptor constituirá o "componente transdutor de sinal". Como aqui usado, o "componente transdutor de sinal" é um componente do receptor nativo que não é o componente determinante de especificidade e que não se liga ou se liga fracamente em citocina na ausência do componente determinante de especificidade. No receptor nativo, o "componente transdutor de sinal" pode participar na sinalização.

Na preparação da seqüência de ácido nucleico codificadora do polipeptídeo de fusão da invenção, os primeiro, segundo e terceiro componentes do polipeptídeo de fusão são codificados em uma fita simples de nucleotídeos que, quando expressada por um sistema de vetor de hospedeiro, produz uma espécie monomérica do polipeptídeo de fusão. Os monômeros assim expressados então se multimerizam devido às interações entre os componentes de multimerização (os terceiros componentes de polipeptídeo de fusão). Produção de polipeptídeos de fusão nesta maneira evita a necessidade de purificação das misturas heterodiméricas que resultariam se os primeiro e segundo componentes fossem produzidos como moléculas separadas e então multimerizados. Por exemplo, Patente U.S. 5.470.952 publicada aos 28 de novembro de 1995 descreve a produção de proteínas heterodiméricas que funcionam como antagonistas de IL-6 ou CNTF. Os heterodímeros são purificados de linhagens celulares co-transfectadas com os componentes alfa (a) e beta (b) apropriados. Heterodímeros são então separados dos homodímeros usando métodos tais como eluição passiva de geles de poliacrilamida não-desnaturantes, preparativos ou pelo uso de cromatografia de troca catiônica de alta pressão. A necessidade desta etapa de purificação é evitada pelos métodos da presente invenção.

Em adição, Pedido PCT Internacional WO 96/11213 publicado aos 18 de abril de 1996 intitulado de "Dimeric IL-4 Inhibitors" [Inibidores de IL-4 Diméricos] afirma que tem-se preparado homodímeros nos quais dois receptores de IL-4 são ligados por um espaçador polimérico e tem preparado



heterodímeros nos quais um receptor de IL-4 é ligado por um espaçador polimérico em uma cadeia gama de receptor de IL-2. O espaçador polimérico descrito é poli(etileno-glicol) (PEG). Os dois componentes de receptor, IL-4R e IL-2R-gama são separadamente expressados e purificados. Homodímeros e heterodímeros peguados são então produzidos pela união dos componentes uns nos outros usando reagentes de PEG bifuncionais. Uma vantagem da presente invenção é que ela evita a necessidade de tais etapas de peguilação e de purificação custosas e consumidoras de tempo.

Em uma modalidade da invenção, a seqüência de ácido nucleico codificadora do primeiro componente está a montante da seqüência de ácido nucleico codificadora do segundo componente. Em outra modalidade da invenção a seqüência de ácido nucleico codificadora do primeiro componente está a jusante da seqüência de ácido nucleico codificadora do segundo componente. Outras modalidades da invenção podem ser preparadas nas quais é rearranjada a ordem dos primeiro, segundo e terceiros componentes de polipeptídeo. Por exemplo, se a seqüência de nucleotídeos codificadora do primeiro componente for chamada de 1, a seqüência de nucleotídeos codificadora do segundo componente for chamada de 2, e a seqüência de nucleotídeos codificadora do terceiro componente for chamada de 3, então a ordem dos componentes no ácido nucleico isolado da invenção como lida da 5' para 3' poderá ser qualquer uma das seguintes seis combinações: 1,2,3; 1,3,2; 2,1,3; 2,3,1; 3,1,2; ou 3,2,1.

Em modalidades específicas da invenção, a citocina ligada pelo polipeptídeo de fusão é interleucina-1 (IL-1).

Em modalidades preferidas da invenção, o componente de multimerização compreende um domínio derivado de imunoglobulina. Mais especificamente, o domínio derivado de imunoglobulina pode ser selecionado do grupo consistindo de domínio Fc de IgG, a cadeia pesada de IgG, e a cadeia leve de IgG. Ainda mais especificamente, o domínio de

imunoglobulina pode ser selecionado do grupo consistindo de domínio Fc de IgG₁ ou IgG₄, a cadeia pesada de IgG₁ ou IgG₄, e a cadeia leve de IgG₁ ou IgG₄. Em outra modalidade, o componente de multimerização pode ser um domínio Fc do qual os primeiros cinco aminoácidos (incluindo uma cisteína) têm sido removidos para produzir um componente de multimerização referido a Fc(DC1). Alternativamente, o componente de multimerização pode ser um domínio Fc no qual uma cisteína dentro dos primeiros cinco aminoácidos tem sido substituída por outro aminoácido tal como, por exemplo, serina ou alanina.

A presente invenção também proporciona polipeptídeos de fusão codificados pelas moléculas de ácido nucleico da invenção. Preferivelmente, os polipeptídeos de fusão estão na forma multimérica, devido à função do terceiro componente, o componente de multimerização. Em uma modalidade preferida, o multímero é um dímero. Os componentes de multimerização adequados são seqüências codificadoras de uma região de dobradiça de cadeia pesada de imunoglobulina (Takahashi *et al.* (1982) Cell 29:671-679); seqüências de gene de imunoglobulina, e suas porções. Em uma modalidade preferida da invenção, seqüências de gene de imunoglobulina, especialmente uma codificadora do domínio Fc, são usadas para codificarem o componente de multimerização.

A presente invenção também contempla um vetor que compreende a molécula de ácido nucleico da invenção como aqui descrita.

Uma modalidade preferida da invenção é uma molécula de ácido nucleico isolada possuindo a seqüência descrita em SEQ ID NO: 1 codificadora de um polipeptídeo de fusão possuindo a seqüência descrita em SEQ ID NO: 2, na qual o polipeptídeo de fusão forma um multímero que é capaz de ligar uma citocina para formar um complexo não-funcional; uma molécula de ácido nucleico isolada possuindo a seqüência descrita em SEQ ID NO: 3 codificadora de um polipeptídeo de fusão possuindo a seqüência



13/27

descrita em SEQ ID NO: 4, na qual o polipeptídeo de fusão forma um multímero que é capaz de ligar uma citocina para formar um complexo não-funcional; e uma molécula de ácido nucleico isolada possuindo a seqüência descrita em SEQ ID NO: 5 codificadora de um polipeptídeo de fusão possuindo a seqüência descrita em SEQ ID NO: 6, na qual o polipeptídeo de fusão forma um multímero que é capaz de ligar uma citocina para formar um complexo não-funcional; bem como polipeptídeos de fusão codificados pelas moléculas de ácido nucleico acima descritas.

Outras modalidades preferidas da invenção são moléculas de ácido nucleico isoladas possuindo as seqüências descritas em SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, e 23 codificadoras de polipeptídeos de fusão possuindo as seqüências descritas em SEQ ID NO: 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, e 22, respectivamente, nas quais cada polipeptídeo de fusão forma um multímero que é capaz de ligar IL-1 para formar um complexo não-funcional.

Também é proporcionado um vetor de expressão compreendendo uma molécula de ácido nucleico da invenção como aqui descrita, no qual a molécula de ácido nucleico está operativamente ligada em uma seqüência de controle de expressão. Também é proporcionado um sistema de vetor-hospedeiro para a produção de um polipeptídeo de fusão que compreende o vetor de expressão da invenção que tem sido introduzido dentro de uma célula hospedeira adequada para a expressão do polipeptídeo de fusão. A célula hospedeira adequada pode ser uma célula bacteriana tal como *E. coli*, uma célula de levedura, tal como *Pichia pastoris*, uma célula de inseto, tal como *Spodoptera frugiperda*, ou uma célula de mamífero, tal como uma célula COS, CHO, 293, BKH ou NS0.

A presente invenção também proporciona métodos para produzir os polipeptídeos de fusão da invenção pelo crescimento de células dos sistemas de vetor-hospedeiro aqui descritos, sob condições que permitem a produção do polipeptídeo de fusão e a recuperação do polipeptídeo de fusão

assim produzido.

Os heterodímeros sR α : β 1 preparados de acordo com a presente invenção proporcionam Traps efetivos para seus ligantes, ligação destes ligantes com afinidades na faixa picomolar sem formação de intermediários funcionais. A tecnologia aqui descrita pode ser aplicada para desenvolver um citocina-Trap para qualquer citocina que utiliza um componente- α que confere especificidade, bem como um componente- β que, quando ligado no componente de especificidade- α , possui uma afinidade maior por citocina do que qualquer componente sozinho. Conseqüentemente, antagonistas de acordo com a invenção incluem antagonistas de interleucina-1 (IL-1).

Os domínios extracelulares de receptor α e β podem ser preparados usando métodos conhecidos por aquelas pessoas experientes na técnica. As moléculas receptoras úteis para praticar a presente invenção podem ser preparadas pelas clonagem e expressão em um sistema de expressão procariótico ou eucariótico. O gene de receptor recombinante pode ser expressado e purificado utilizando qualquer um de numerosos métodos. O gene codificador do fator pode ser subclonado em um vetor de expressão bacteriana, tal como por exemplo, mas não por meio de limitação, pCP110.

Os fatores recombinantes podem ser purificados por qualquer técnica que permite a formação subsequente de uma proteína biologicamente ativa, estável. Por exemplo, e não por meio de limitação, os fatores podem ser recuperados das células quer como proteínas solúveis quer como corpos de inclusão, dos quais eles podem ser extraídos quantitativamente por diálise e cloridrato de guanidínio 8 M. Com o propósito de adicionalmente purificar os fatores, cromatografia de troca iônica convencional, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia em fase reversa ou filtração em gel podem ser usadas.

Os receptores heterodiméricos sR α : β podem ser engenhadados

usando regiões de fusão conhecidas, como descrito no Pedido PCT publicado WO 93/10151 que descreve a produção de heterodímeros de receptor β , ou podem ser preparados por ligação cruzada dos domínios extracelulares por meio químico. Os domínios utilizados podem consistir do domínio extracelular inteiro dos componentes α e β , ou podem consistir de mutantes ou seus fragmentos que mantêm a capacidade de formarem um complexo com seu ligante e outros componentes no complexo sR α : β .

Em uma modalidade da invenção, os domínios extracelulares são engenhados usando zíperes de leucina. Tem sido mostrado que os domínios de zíper de leucina dos fatores de transcrição humanos c-jun e c-fos formam heterodímeros estáveis (Busch *et al.* (1990) Trends Genetics 6:36-40; Gentz *et al.* (1989) Science 243:1695-1699) com uma estequiometria de 1:1. Embora tenha sido mostrado que também são formados os homodímeros jun-jun, são cerca de 1.000 vezes menos estáveis do que os heterodímeros jun-fos. Homodímeros fos-fos não têm sido detectados.

O domínio de zíper de leucina de qualquer um de c-jun ou c-fos é usado em matriz na terminação C dos domínios extracelulares ou solúveis dos componentes de receptor mencionados acima por genes quiméricos geneticamente engenhados. As fusões podem ser diretas ou podem empregar uma domínio ligador flexível., tal como a região de dobradiça de IgG humana, ou ligadores polipeptídicos consistindo de aminoácidos pequenos tais como glicina, serina, treonina ou alanina, em vários comprimentos e combinações. Adicionalmente, as proteínas diméricas podem ser marcadas por His-His-His-His-His-His (His6) (SEQ ID NO: 25) para purificação rápida por cromatografia de quelato-metal, e/ou por epitopos para os quais anticorpos estão disponíveis, para permitir a detecção sobre Western Blots, imunoprecipitação, ou bloqueio/depleção de atividade em bioensaios.

Em outra modalidade, o heterodímero sR α : β 1 é preparado usando o domínio-Fc de IgG1 humana (Aroffo *et al.* (1991) Cell 67:35-44).

Em contraste com o último, a formação de heterodímeros tem que ser biologicamente ativada, porque moléculas quiméricas trazendo o domínio-Fc serão expressadas como homodímeros ligados por dissulfeto. Assim, homodímeros podem ser reduzidos sob condições que favorecem o rompimento dos dissulfetos de inter-cadeias mas não afetam os dissulfetos de intra-cadeia. Então monômeros com porções extracelulares diferentes são misturados em quantidades equimolares e oxidados para formarem uma mistura de homo- e heterodímeros. Os componentes desta mistura são separados por técnicas cromatográficas. Alternativamente, a formação deste tipo de heterodímeros pode ser influenciada por moléculas geneticamente engenhadas e expressadas que consistem da porção solúvel ou extracelular dos componentes de receptor seguida pelo domínio-Fc de hIgG, seguido por qualquer um dos zíperes de leucina c-jun ou c-fos descritos acima (Kostelny *et al.* (1992) *J. Immunol.* 148: 1547-1553). Visto que estes zíperes de interleucina formam predominantemente heterodímeros, podem ser usados para conduzem a formação dos heterodímeros onde desejados. Do mesmo modo que para as proteínas quiméricas descritas usando zíperes de leucina, estes também podem ser marcados com quelatos de metal ou um epitopo. Este domínio marcado pode ser usado para purificação rápida por cromatografia de quelato-metal, e/ou por anticorpos, para permitir a detecção sobre Western Blots, imunoprecipitação, ou bloqueio/depleção de atividade em bioensaios.

Em modalidades adicionais, heterodímeros podem ser preparados usando outros domínios derivados de imunoglobulina que conduzem a formação de dímeros. Tais domínios incluem, por exemplo, as cadeias pesadas de IgG (Cg1 e Cg4), bem como as regiões constantes de cadeias leves kapa (k) e lambda (l) de imunoglobulinas humanas. A heterodimerização de Cg com a cadeia leve ocorre entre o domínio CH1 de Cg e a região constante da cadeia leve (C_L), e é estabelecida por ligação covalente dos dois domínios via uma única ponte de dissulfeto.

M
S

Conseqüentemente, construtos podem ser preparados utilizando estes domínios de imunoglobulina. Alternativamente, os domínios de imunoglobulina incluem domínios que podem ser derivados de componentes de receptor de célula T que conduzem a dimerização.

5 Em outra modalidade da invenção, os heterodímeros sRa:b1 são preparados pela expressão como moléculas quiméricas utilizando enlaces ligadores flexíveis. Um construto de DNA codificador da proteína quimérica é projetado de tal modo que ele expressa dois domínios extracelulares ou solúveis fusionados juntos em tandem ("cabeça com cabeça") por uma alça flexível. Este enlace pode ser inteiramente artificial (por exemplo repetições de poliglicina interrompidas por serina ou treonina em um certo intervalo) ou
10 "copiado" de proteínas de ocorrência natural (por exemplo a região de dobradiça de hIgG). Moléculas podem ser engenhadas nas quais a ordem dos domínios solúveis ou extracelulares fusionados é mudada (por exemplo sIL6Ra/enlace/spg130 ou spg130/enlace/sIL-6Ra) e/ou nas quais o
15 comprimento e a composição do enlace são variados, para permitir a seleção de moléculas com características desejadas.

Alternativamente, os heterodímeros preparados de acordo com a presente invenção podem ser purificados de linhagens celulares co-
20 transfetadas com os componentes α e β apropriados. Heterodímeros podem ser separados dos homodímeros usando métodos disponíveis para aquelas pessoas experientes na técnica. Por exemplo, quantidades limitadas de heterodímeros podem ser recuperadas por eluição passiva de geles de poliacrilamida, não-desnaturantes, preparativos. Alternativamente,
25 heterodímeros podem se purificados usando cromatografia de troca catiônica de alta pressão. Purificação excelente tem sido obtida utilizando uma coluna de troca catiônica Mono S.

Doses efetivas úteis para o tratamento de desordens ou doenças relacionadas com IL-1 podem ser determinadas usando métodos

conhecidos por uma pessoa experiente na técnica (veja, por exemplo, Fingl, *et al.* (1975), *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Goodman and Gilman eds., Macmillan Publishing Co., New York, pp. 1-46). Composições farmacêuticas para uso de acordo com a invenção incluem os antagonistas descritos acima em um veículo líquido, sólido, semi-sólido, farmacologicamente aceitável, ligados em um veículo ou uma molécula miradora de alvo (por exemplo, anticorpo, hormônio, fator de crescimento etc.) e/ou incorporado em lipossomos, microcápsulas, e preparação de liberação controlada (incluindo células expressando antagonista) antes da administração *in vivo*. Por exemplo, a composição farmacêutica pode compreender um ou mais dos antagonistas em uma solução aquosa, tal como água estéril, solução salina, tampão fosfato ou solução de dextrose. Alternativamente, os agentes ativos podem estar compreendidos em uma formulação sólida (por exemplo cera) ou semi-sólida (por exemplo gelatinosa) que pode ser implantada dentro de um paciente necessitando de um tal tratamento. A rota de administração pode ser qualquer modo de administração conhecido na técnica, incluindo mas não limitado a intravenoso, intratecal, subcutâneo, por injeção em tecido envolvido, intraarterial, intranasal, oral, ou via um dispositivo implantado.

A administração pode resultar na distribuição de agente ativo da invenção por todo o corpo ou em uma área localizada. Por exemplo, em algumas condições que envolvem regiões distantes do sistema nervoso, administração intravenosa ou intratecal de agente pode ser desejável. Em algumas situações, um implante contendo agente ativo pode ser posicionado dentro ou próximo da área lesionada. Implantes adequados incluem, mas não são limitados a, espuma de gel, cera, ou implantes baseados em micropartícula.

EXEMPLOS

Exemplo 1. Clonagem de componentes de polipeptídeo de fusão

Os domínios extracelulares dos receptores de citocina humana foram obtidos por técnicas de PCR padrão usando cDNAs de tecido (CLONTECH), clonados no vetor de expressão, pMT21 (Genetics Institute, Inc.), e as seqüências foram seqüenciadas por técnicas padrão usando um ABI 373A DNA Sequencer e Taq Dideoxy Terminator Cyclo Sequencing Kit (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). Para o IL-1RAcP, foram clonados nucleotídeos 1 a 1074 (correspondendo aos aminoácidos 1-358) da seqüência AB006357 do GenBank. para o IL-1RI, foram clonados nucleotídeos 55 a 999 (correspondendo aos aminoácidos 19-333) da seqüência X16896 do GenBank.

Exemplo 2. Produção de polipeptídeos de fusão (Citocina Traps)

As seqüências de nucleotídeos codificadoras dos citocina Traps foram construídas a partir de DNAs clonados individuais (descritos *supra*) por técnicas de PCR e de clonagem padrão. Em cada caso, as seqüências foram construídas em matriz de tal modo que a seqüência codificadora do primeiro componente de polipeptídeo fosse fusionada na seqüência codificadora do segundo componente de polipeptídeo de fusão seguida por um domínio Fc (dobradiça, região CH2 e CH3 de IgG1 humana) como o componente de multimerização. Em alguns casos nucleotídeos extras foram inseridos em matriz entre as seqüências codificadoras dos primeiro e segundo componentes de polipeptídeo de fusão e para adicionar uma região de ligador entre os dois componentes.

Exemplo 3. Bioensaio de MRC5 para IL-1 Traps

Células de fibroblasto de pulmão humano MRC5 respondem à IL-1 pela secreção de IL-6 e assim foram utilizadas para ensaiar a capacidade de IL-1 Traps de bloquearem a produção de IL-6 dependente de IL-1. IL-1 Trap 1SC569 foi testado contra IL-1-RI.Fc que é o domínio extracelular do receptor de IL-1 Tipo I fusionado em um domínio Fc.

Células MRC5 são suspensas em 1×10^5 células por mL em

meio e 0,1 mL de células é plaqueado (10.000 células por cavidade) na cavidades de uma placa de cultura de tecido de 96 cavidades. Placas são incubadas por 24 horas a 37°C em uma incubadora umidificada contendo 5% de CO₂.

5 IL-1 Trap e IL-1 recombinante em doses variadas são pré-incubados em uma placa de cultura de tecido de 96 cavidades e incubados por 2 horas a 37°C. 0,1 mL desta mistura é então adicionado na placa de 96 cavidades contendo as células MRC5 de tal modo que a concentração final de IL-1 Trap seja 10 nM e as concentrações finais de IL-1 variem de 2,4 pM a 5 nM. Cavidades de controle contêm apenas Trap ou nada.

Placas são então incubadas a 37°C por 24 horas em uma incubadora umidificada contendo 5% de CO₂. Sobrenadante é coletado e ensaiado para níveis de IL-6 usando R&D Systems Quantikine Immunoassay Kit de acordo com as instruções do fabricante.

15 **Exemplo 4. Bloqueio de IL-1 injetada por IL-1 Trap *in vivo***

IL-1 é uma citocina pró-inflamatória. Tem sido mostrado que a administração sistêmica de IL-1 gera respostas agudas em animais, incluindo hiperglicemia transiente, hipoinsulinemia, febre, anorexia, e níveis séricos aumentados de interleucina-6 (IL-6) (Reimers, 1998). Visto que camundongos são responsivos a ambas IL-1 murina e humana, IL-1 humana pode ser usada e efeitos de ligação *in vivo* de antagonistas de IL-1 específica humana podem ser avaliados. Este modelo agudo em camundongo foi usado para determinar a capacidade de um Trap IL-1 humana antagonizar os efeitos *in vivo* de IL-1 humana exogenamente administrada. Isto proporciona uma indicação rápida da eficácia *in vivo* do Trap IL-1 humana e pode ser usado como um ensaio para ajudar a seleção de moléculas.

Projeto experimental: Camundongos machos C57BL/6 receberam uma injeção subcutânea de IL-1 β humana recombinante (rhIL-1 β ; 0,3 mg/kg). Vinte e quatro horas antes da administração de rhIL-1 β , os

animais foram tratados quer com veículo, Trap IL-1 humana 569 (excesso molar de 50 ou 150 vezes; 0,18 mg/kg ou 0,54 mg/kg, respectivamente), quer com antagonista de receptor de IL-1 humana recombinante (rmIL-1ra; excesso molar de 150 ou 750 vezes; 45,8 μ g/kg ou 229 μ g/kg, respectivamente). Amostras de sangue foram retiradas 2 h após a administração de rhIL-1 β e os soros foram ensaiados para níveis de IL-6 usando um ELISA para IL-6 de camundongo. Administração exógena de rhIL-1 β aumentou significativamente os níveis séricos de IL-6. Pré-tratamento com um excesso molar de 50 vezes ou de 150 vezes de hIL-1 Trap bloqueou a hIL-1 β -indução de IL-6. Em contraste, injeção de rmIL-1ra em qualquer excesso molar de 150 vezes ou de 750 vezes não bloqueou indução de IL-6.

Resultados. A administração exógena de IL-1 humana resultou em uma indução dramática dos níveis séricos de IL-6. Em um excesso molar de 150 vezes, o Trap IL-1 humana completamente bloqueou o aumento de IL-6 (Fig. 1). Ainda mais, os efeitos do Trap IL-1 humana persistiram por pelo menos outras 24 horas, prevenindo um aumento de IL-6 até mesmo quando IL-1 foi readministrada (Fig. 1). Uma tal eficácia de longa duração sugere que a injeção diária de um IL-1 Trap pode não ser necessária para aplicações crônicas.

Em um experimento separado, IL-1ra em excesso molar de 150 vezes ou 750 vezes não bloqueou significativamente IL-6. Portanto, neste paradigma parece que IL-1 Trap é um melhor bloqueador da atividade de IL-1 (Fig. 2).

25 Exemplo 5. Construção de IL-1 Traps de cadeia única adicionais

As técnicas usadas para construir os vetores DNA aqui descritos são técnicas de biologia molecular padrão bem conhecidas pelo técnico experiente (veja por exemplo, Sambrook, J., E. F. Fritsch e T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edição,

Volumes 1, 2, e 3, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Ausubel *et al.*, Greene Publ. Assoc., Wiley Interscience, NY). Todo o seqüenciamento de DNA é feito por técnicas padrão usando um ABI 373A Sequencer e Taq Dideoxy Terminator Cyclo Sequencing Kit (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA).

(a) Seqüência de IL-1 Trap 823 - A seqüência de IL-1 Trap 823 consiste do domínio extracelular de IL-1RAcP humana (correspondendo aos nucleotídeos 1-1077 de SEQ ID NO: 7)) seguido pelo domínio extracelular de IL-1RI humana (correspondendo aos nucleotídeos 1078-2013 de SEQ ID NO: 7)) seguido por uma parte da região de dobradiça, os domínios CH2 e CH3 de IgG1 humana (correspondendo aos nucleotídeos 2014-2703 de SEQ ID NO: 7) contendo uma mutação nos nucleotídeos 2017-2019 (TGT→GGA) para mudar uma cisteína para uma glicina. A seqüência de ácido nucleico codifica a seqüência de polipeptídeo de fusão como descrita na SEQ ID NO: 8).

(b) Seqüência de IL-1 Trap 823-1198-B - A seqüência de IL-1 Trap 823-1198-B consiste do domínio extracelular de IL-1RAcP humana (correspondendo aos nucleotídeos 1-1077 de SEQ ID NO: 9), seguido pelo domínio extracelular de IL-1RI humana (correspondendo aos nucleotídeos 1078-2013 de SEQ ID NO: 9), seguido por um segmento de aminoácidos (correspondendo aos nucleotídeos 2014-2019 de SEQ ID NO: 9), seguido pela região de dobradiça, os domínios CH2 e CH3 de IgG4 humana (correspondendo aos nucleotídeos 2020-2709 de SEQ ID NO: 9). A seqüência de ácido nucleico codifica a seqüência de polipeptídeo de fusão como descrita em SEQ ID NO: 10.

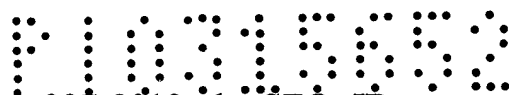
(c) Seqüência de IL-1 Trap 823-1267-C - A seqüência de IL-1 Trap 823-1267-C consiste do domínio extracelular de uma IL-1RAcP (correspondendo aos nucleotídeos 1-1077 de SEQ ID NO: 11), seguido pelo domínio extracelular de IL-1RI humana (correspondendo aos nucleotídeos

1078-2013 de SEQ ID NO: 11), seguido por um segmento de aminoácidos (correspondendo aos nucleotídeos 2014-2019 de SEQ ID NO: 11), seguido pela região de dobradiça, os domínios CH2 e CH3 de IgG4 humana (correspondendo aos nucleotídeos 2020-2709 de SEQ ID NO: 11) contendo
5 uma mutação no nucleotídeo 2047 (T>C) para mudar uma serina para uma prolina. A seqüência de ácido nucleico codifica a seqüência de polipeptídeo de fusão como descrita em SEQ ID NO: 12.

(d) Seqüência de IL-1 Trap 570-FE - A seqüência de IL-1 Trap 570-FE consiste do domínio extracelular de uma IL-1RI (correspondendo aos
10 nucleotídeos 1-996 de SEQ ID NO: 1), seguido pelo domínio extracelular de IL-1RAcP humana (correspondendo aos nucleotídeos 997-2013 de SEQ ID NO: 1), seguido pela região de dobradiça, os domínios CH2 e CH3 de IgG1 humana (correspondendo aos nucleotídeos 2014-2703 de SEQ ID NO: 1) contendo uma mutação nos nucleotídeos 2017-2019 (TGT→GGA) para
15 mudar uma cisteína para uma glicina. A seqüência de ácido nucleico codifica a seqüência de polipeptídeo de fusão como descrita em SEQ ID NO: 2.

(e) Seqüência de IL-1 Trap 570-FE-B - A seqüência de IL-1 Trap 570-FE-B consiste do domínio extracelular de uma IL-1RI (correspondendo aos nucleotídeos 1-996 de SEQ ID NO: 3), seguido pelo
20 domínio extracelular de IL-1RAcP humana (correspondendo aos nucleotídeos 997-2013 de SEQ ID NO: 3), seguido por um segmento de aminoácidos (correspondendo aos nucleotídeos 2014-2019 de SEQ ID NO: 3), seguido pela região de dobradiça, os domínios CH2 e CH3 de IgG4 humana (correspondendo aos nucleotídeos 2020-2709 de SEQ ID NO: 3). A seqüência
25 de ácido nucleico codifica a seqüência de polipeptídeo de fusão como descrita em SEQ ID NO: 4.

(f) Seqüência de IL-1 Trap 570-FE-C - A seqüência de IL-1 Trap 570-FE-C consiste do domínio extracelular de IL-1 RI (correspondendo aos nucleotídeos 1 a 996 de SEQ ID NO:5), seguido pelo domínio de IL-



1RAcP humana (correspondendo aos nucleotídeos 997-2013 de SEQ ID NO:5) seguido por um segmento de aminoácidos (correspondendo aos nucleotídeos 2014-2019 de SEQ ID NO:5) seguido pela região de dobradiça, os domínios CH2 e CH3 de IgG4 humana (correspondendo aos nucleotídeos 2020-2709 de SEQ ID NO:5) contendo uma mutação no nucleotídeo 2047 (T>C) para mudar uma serina para uma prolina. A seqüência de ácido nucleico codifica a seqüência de polipeptídeo de fusão como descrita na SEQ ID NO:6.

(g) Seqüência de IL-1 Trap 1647-CtF - A seqüência de IL-1 Trap 1647-CtF consiste do domínio extracelular de IL-1RII (correspondendo aos nucleotídeos 1-1044 de SEQ ID NO:13) seguido pelo domínio de IL-1RAcP humana (correspondendo aos nucleotídeos 1045-2058 de SEQ ID NO:13) seguido por uma parte da região de dobradiça, os domínios CH2 e CH3 de IgG1 humana (correspondendo aos nucleotídeos 2059-2748 de SEQ ID NO:13) contendo uma mutação no nucleotídeos 2062-2064 (TGT->GGA) para mudar uma cisteína para uma glicina. A seqüência de ácido nucleico codifica a seqüência de polipeptídeo de fusão como descrita na SEQ ID NO:14.

(h) Seqüência de IL-1 Trap 1647-CtF-B - A seqüência de IL-1 Trap 1647-CtF-B consiste do domínio extracelular de IL-1RII (correspondendo aos nucleotídeos 1-1044 de SEQ ID NO:15) seguido pelo domínio de IL-1RAcP humana (correspondendo aos nucleotídeos 1045-2058 de SEQ ID NO:15) seguido por um segmento de aminoácidos (correspondendo aos nucleotídeos 2059-2064 de SEQ ID NO:15) seguido pela região de dobradiça, os domínios CH2 e CH3 de IgG4 humana (correspondendo aos nucleotídeos 2065-2754 de SEQ ID NO:15). A seqüência de ácido nucleico codifica a seqüência de polipeptídeo de fusão como descrita na SEQ ID NO:16.

(i) Seqüência de IL-1 Trap 1647-CtF-C - A seqüência IL-1

Trap 1647-CtF-C consiste do domínio extracelular de IL-1RII (correspondendo aos nucleotídeos 1-1044 de SEQ ID NO:17) seguido pelo domínio de IL-1RAcP humana (correspondendo aos nucleotídeos 1045-2058 de SEQ ID NO:17) seguido por um segmento de aminoácidos (correspondendo aos nucleotídeos 2059-2064 de SEQ ID NO:17) seguido pela região de dobradiça, os domínios CH2 e CH3 de IgG4 humana (correspondendo aos nucleotídeos 2065-2754 de SEQ ID NO:17) contendo uma mutação no nucleotídeo 2092 (T>C) para mudar uma serina para uma prolina. A seqüência de ácido nucleico codifica a seqüência de polipeptídeo de fusão como descrita na SEQ ID NO:17.

(j) Seqüência IL-1 Trap 1649 - A seqüência de IL-1 Trap 1649 consiste do domínio extracelular de IL-1RAcP humana (correspondendo aos nucleotídeos 1-1074 de SEQ ID NO:19) seguido pelo domínio de IL-1RII humana (correspondendo aos nucleotídeos 1075-2058 de SEQ ID NO:19) seguido por uma parte da região de dobradiça, os domínios CH2 e CH3 de IgG1 humana (correspondendo aos nucleotídeos 2059-2748 de SEQ ID NO:19) contendo uma mutação no nucleotídeos 2062-2064 (TGT->GGA) para mudar uma cisteína para uma glicina. A seqüência de ácido nucleico codifica a seqüência de polipeptídeo de fusão como descrita na SEQ ID NO:20.

(k) Seqüência de IL-1 Trap 1649-B - A seqüência de IL-1 Trap 1649-B consiste do domínio extracelular de IL-1RAcP (correspondendo aos nucleotídeos 1-1074 de SEQ ID NO:21) seguido pelo domínio de IL-1RII humana (correspondendo aos nucleotídeos 1075-2058 de SEQ ID NO:21) seguido por um segmento de aminoácidos (correspondendo aos nucleotídeos 2059-2064) seguido pela região de dobradiça, os domínios CH2 e CH3 de IgG4 humana (correspondendo aos nucleotídeos 2065-2754 de SEQ ID NO:21). A seqüência de ácido nucleico codifica a seqüência de polipeptídeo de fusão como descrita na SEQ ID NO:22.

(1) Seqüência de IL-1 Trap 1649-C - A seqüência de IL-1 Trap 1649-C consiste do domínio extracelular de IL-1RAcP (correspondendo aos nucleotídeos 1-1074 de SEQ ID NO:23) seguido pelo domínio de IL-1RII humana (correspondendo aos nucleotídeos 1075-2058 de SEQ ID NO:23) seguido por um segmento de aminoácidos (correspondendo aos nucleotídeos 2059-2064) seguido pela região de dobradiça, os domínios CH2 e CH3 de IgG4 humana (correspondendo aos nucleotídeos 2065-2754 de SEQ ID NO:23) contendo uma mutação no nucleotídeo 2092(T>C) para mudar uma serina para uma prolina. A seqüência de ácido nucleico codifica a seqüência de polipeptídeo de fusão como descrita na SEQ ID NO:24.

Em adição às seqüências descritas *supra*, as seguintes modificações naquelas seqüências também são contempladas pela presente invenção:

1. Para IL1 Traps 823, 823-1198.B, e 823-1267.C: Alternativa AcP: Uma mudança no nucleotídeo 1043 de A para C para mudar o aminoácido de Lys para Thr. Inserção SG: Entre nucleotídeos 1077 e 1078 uma inserção dos nucleotídeos TCC GGA adicionaria um segmento de aminoácidos Ser Gly entre os dois domínios de receptor do Trap.

2. Para IL1 Traps 570-FE, 570-FE.B, e 570-FE.C: Alternativa AcP: Uma mudança no nucleotídeo 1979 de A para C para mudar o aminoácido de Lys to Thr. Inserção SG: Entre nucleotídeos 996 e 977 uma inserção dos nucleotídeos TCC GGA adicionaria um segmento de aminoácidos Ser Gly entre os dois domínios de receptor do Trap.

3. Para IL1 Traps 1647-CtF, 1647-CtF.B, e 1647-CtF.C: Alternativa AcP: Uma mudança no nucleotídeo 2027 de A para C para mudar o aminoácido de Lys to Thr. Inserção SG: Entre nucleotídeos 1044 e 1045 uma inserção dos nucleotídeos TCC GGA adicionaria um segmento de aminoácidos Ser Gly entre os dois domínios de receptor do Trap.

4. Para IL-1 Traps 1649, 1649-B, e 1649-C: Alternativa AcP:

Uma mudança no nucleotídeo 1043 de A para C para mudar o aminoácido de Lys to Thr. Inserção SG: Entre nucleotídeos 1074 e 1075 uma inserção dos nucleotídeos TCC GGA adicionaria um segmento de aminoácidos Ser Gly entre os dois domínios de receptor do Trap.

5 Em adição, uma pessoa experiente na técnica reconhecerá que pode ser desejável construir IL-1 Traps nos quais o domínio Fc é derivado de imunoglobulinas com alótipos diferentes. Nenhuma das modificações descritas *supra* alterará a capacidade do Trap de ligar IL-1.

10 **Exemplo 6. Trap IL-1 humanas bloqueia os efeitos de IL-1 em articulações inflamadas**

Fundamentos: Zimosano é um extrato de parede celular de célula de levedura que quando injetado no joelho causa inflamação aguda e supra-regulação de IL-1 β na articulação (Joosten *et al.* (1994) Clin. Exp. Immunol. 97:204-211). Condrócitos responderão à inflamação e à IL-1 β local pela infra-regulação da síntese de proteoglicano, uma característica da artrite humana que contribui para a destruição gradual da cartilagem na articulação (van den Berg *et al.* (1982) Rheum. Int. 1:165-169). Antagonistas para IL-1 β podem ser usados para avaliação de sua capacidade para bloquear os efeitos de elevações em IL-1 β induzidas por zimosano.

20 Materiais e métodos: Camundongos machos C57BL/6 (Taconic) anestesiados receberam uma injeção intra-articular (i.a.) de Zymosan A (Sigma: 300 μ g em 10 μ L) para dentro da articulação do joelho direito através de ligamento patelar. PBS estéril foi injetado i.a. (10 μ L) na articulação do joelho esquerdo através do ligamento patelar. Vinte e quatro horas antes das injeções i.a., os animais foram tratados com veículo ou com hIL-1 Trap 569 (19 mg/kg, s.c.). As patelas foram removidas 24 h após a injeção de zimosano com o propósito de medir a síntese de proteoglicano como descrita por van den Berg *et al.* (1982) *supra*. Em resumo, cada patela e ligamento associado foram incubados por 3 h a 37°C, 5% CO₂ em meio

(RPMI com HEPES, HCO₃, glutamina & penicilina/estreptomicina) contendo 10 µCi/mL de ³⁵S-sulfato (NEN DuPont). Após a incubação, tecido foi lavado e fixado durante a noite em formalina 10% (VWR). O tecido foi então deixado dentro de solução de descalcificação (J. T. Baker) por 4 h antes da dissecação da patela do tecido circundante. Cada patela foi então incubada durante a noite em Solvable (Packard) a 50°C. Fluido de cintilação líquida Ultima Gold (Packard) foi adicionado e as amostras foram contadas em um contador de cintilação líquida. Valores foram relatados como a razão de cpm de paleta com zimosano / cpm de paleta com veículo para cada animal.

Resultados: Injeção intra-articular de zimosano reduz a síntese de proteoglicano em aproximadamente 50% em relação à injeção de veículo (Fig. 3). Administração de hIL-1 Trap antes da injeção de zimosano bloqueou a ação local de IL-1β e a síntese de proteoglicano retornou para aproximadamente 90% do controle. Estes dados demonstram que hIL-1 Trap 569 pode penetrar nas articulações após injeção subcutânea para efetivamente neutralizar o efeito biológico de IL-1 dentro destas articulações.

Exemplo 7. IL-1 murina Trap reduz a severidade de sintomas de artrite em um modelo de artrite induzida por colágeno (CIA) acelerada por zimosano

Fundamentos: IL-1 tem estado implicada no desenvolvimento de inflamação e destruição de cartilagem em artrite reumatóide (Dinarello (1996) Blood 87(6):2095-2147; Wooley *et al.* (1993) Arthritis & Rheumatism 36(9):1305-1314). Artrite induzida por colágeno (CIA) é um modelo animal amplamente estudado de poliartrite inflamatória com similaridades com artrite reumatóide; características histopatológicas comuns incluem erosão e inflamação de articulação, hiperplasia sinovial e infiltração celular inflamatória (Joe *et al.* (1999) Mol. Med. Today 5:367-369). Visto que estudos anteriores têm mostrado que vários tratamentos anti-IL-1 possuem um efeito positivo sobre redução de sintomas de artrite em animais com CIA (van

den Berg *et al.* (1994) Clin. Exp. Immunol. 95:237-243; Joosten *et al.* (1999) J. Immunol. 163:5049-5055; van de Loo *et al.* (1992) J. Rheumatol. 19:348-356), examinou-se o efeito de uma versão murina do IL-1 Trap (mIL-1 Trap) sobre a progressão dos sintomas de artrite neste modelo animal. A versão humana de IL-1 Trap é fracamente reativa cruzada com IL-1 de roedor. O mIL-1 Trap consiste do domínio extracelular de IL-1RAcP murina, seguido pelo domínio extracelular de IL-1RI murina, seguido pela dobradiça, domínios CH2 e CH3 de IgG2a murina.

Materiais e métodos: Camundongos machos DBA-1 (Jackson Laboratories) foram imunizados intradermalmente na base da cauda com 100 µg/50 µL de colágeno bovino de Tipo II (CII; Chondrex) emulsificado com adjuvante de Freund completo e incompleto (razão de 2:1:1; Chondrex) e reforçados intradermalmente com CII (100 µg/50 µL) emulsificado com adjuvante de Freund incompleto no dia 21. Visto que CIA em camundongos DBA-1 ocorre gradualmente no decorrer de um período de tempo longo com uma incidência baixa (Joosten *et al.* (1994) Clin. Exp. Immunol. 97: 204-211), sincronizou-se o início dos sintomas de artrite pela injeção dos animais intraperitonealmente no dia 30 com 3 mg de zimosano (Sigma). Duas horas antes da injeção de zimosano, os camundongos foram aleatoriamente distribuídos em grupos de tratamento e receberam injeção quer de veículo quer de mIL-1 Trap (31 mg/kg ou 100 mg/kg, 3X/semana, 8 injeções, s.c.). Sintomas de artrite (resultados de ASI, como descrito por Wooley *et al.* (1993) Arthritis & Rheumatism 36(9):1305-1314) nas patas foram avaliados 3X/semana por indivíduos que estavam cegos para os grupos de tratamento. Animais foram mortos 24 h após a 8ª injeção em cujo momento a largura da pata juntamente com os resultados de ASI foram medidos.

Resultados: Dentro de 5 dias após a injeção i.p. de zimosano, os animais tratados com veículo tiveram um aumento significativo no resultado de ASI em relação àqueles que receberam mIL-1 Trap (Fig. 4) com

sintomas alcançando um máximo em 10 a 14 dias após a injeção de zimosano. IL-1 murina Trap atuou no modo dependente de dose de tal modo que os animais que receberam 10 mg/kg de Trap tiveram mais sintomas de artrite (resultado de ASI maior) do que aqueles que receberam 31 mg/kg. Contudo, ambos os grupos tratados com mIL-1 Trap tiveram larguras de para que foram semelhantes àsquelas de animais não-experimentados, não imunizados com colágeno. Estes dados indicam que mIL-1 Trap pode efetivamente neutralizar IL-1 e bloquear o desenvolvimento de articulações artríticas.

Exemplo 8. IL-1 Trap 1649 pode bloquear a atividade de IL-1 β

Várias concentrações de IL-1 Trap 1649 foram incubadas na presença de IL-1 β humana a 5 pM durante a noite na temperatura ambiente. As misturas foram então adicionadas em cavidades em duplicata de células 293-NF κ B (20.000 células/cavidade) por 5 h a 37°C/5% CO₂. Células 293-NF κ B contêm um plasmídeo repórter estavelmente integrado possuindo um gene de luciferase acionado por um promotor contendo 5 sítios NF κ B. Adição de IL-1 β resulta em expressão aumentada de gene de luciferase. Steady-Glo Reagent (Promega) foi adicionado nas células por 15 min na temperatura ambiente e a expressão de gene de luciferase foi quantificada como unidades de luz relativas (RLU) luminometria. IL-1 Trap 1649 mostra uma IC₅₀ de 32 pM que indica uma K_d de ~30 pM (Fig. 6). Estes dados indicam que IL-1 Trap 1649 potencialmente bloqueia IL-1.

A presente invenção não é para ser limitada em escopo pelas modalidades específicas aqui descritas. De fato, várias modificações da invenção em adição àsquelas aqui se tornarão evidentes para aquelas pessoas experientes na técnica a partir da descrição e das figuras acompanhantes antecedentes. Tais modificações são intencionadas para caírem dentro do escopo das reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de ácido nucleico isolada caracterizada por compreender SEQ ID NO: 7, em que a molécula de ácido nucleico isolada codifica um polipeptídeo de fusão que forma um multímero capaz de se ligar em interleucina-1 (IL-1) para formar um complexo não-funcional.

2. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de compreender a molécula de ácido nucleico isolada como definida na reivindicação 1, operativamente ligada em uma seqüência de controle de expressão.

3. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o ácido nucleico de SEQ ID NO: 7 compreende uma ou mais das seguintes mudanças:

(a) o nucleotídeo 1043 de SEQ ID NO:7 é mudado de A para C; e

(b) os nucleotídeos TCC GGA são inseridos entre os nucleotídeos 1077 e 1078.

4. Polipeptídeo de fusão, caracterizado pelo fato de compreender a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

5. Multímero, caracterizado pelo fato de ser capaz de se ligar em IL-1 para formar um complexo não-funcional compreendendo um polipeptídeo de fusão como definido na reivindicação 4.

6. Multímero de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de ser um dímero.

708

FIGURA 1

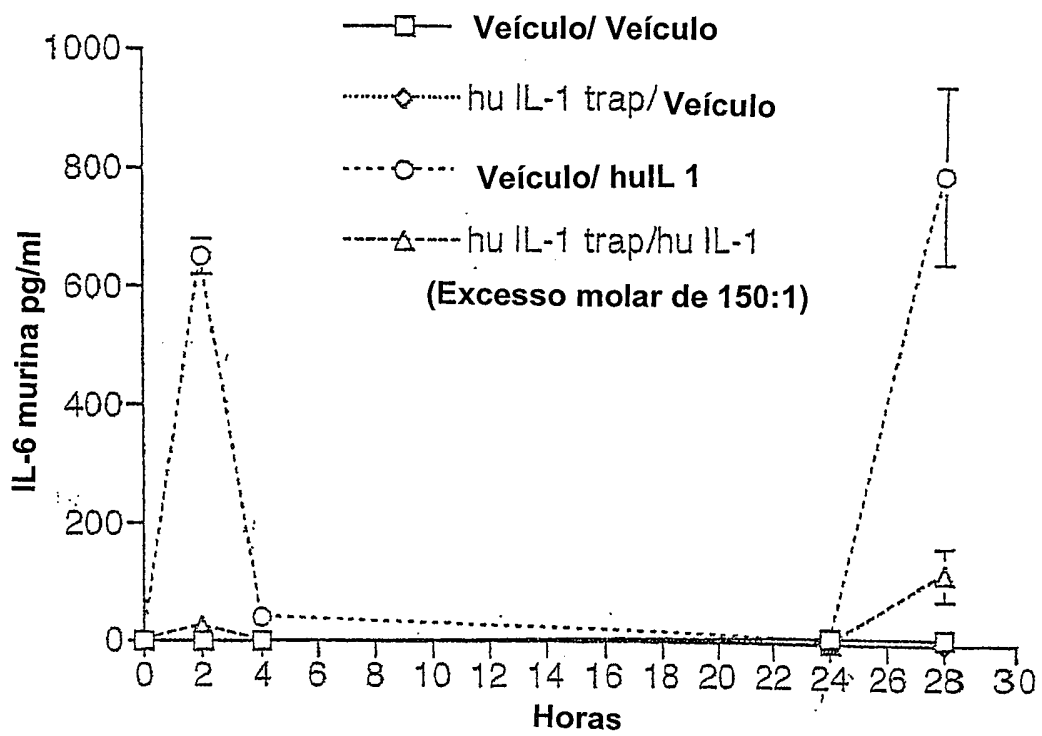
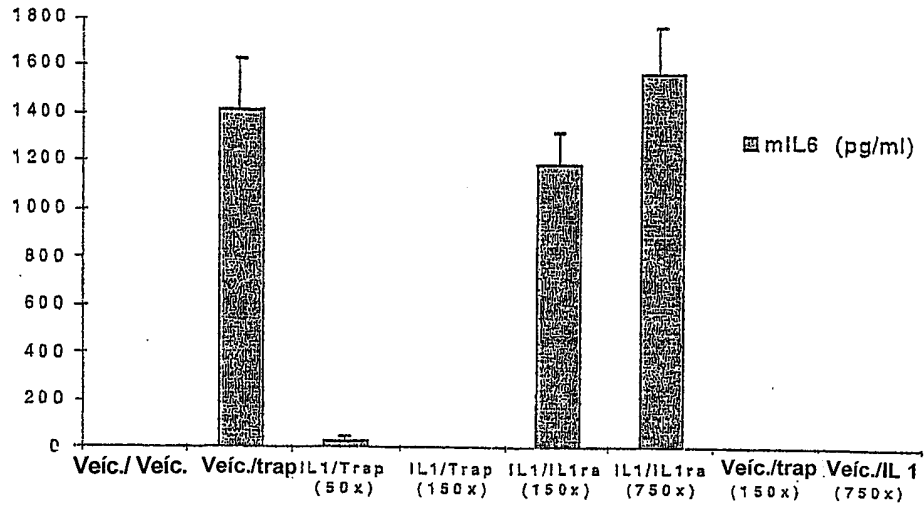


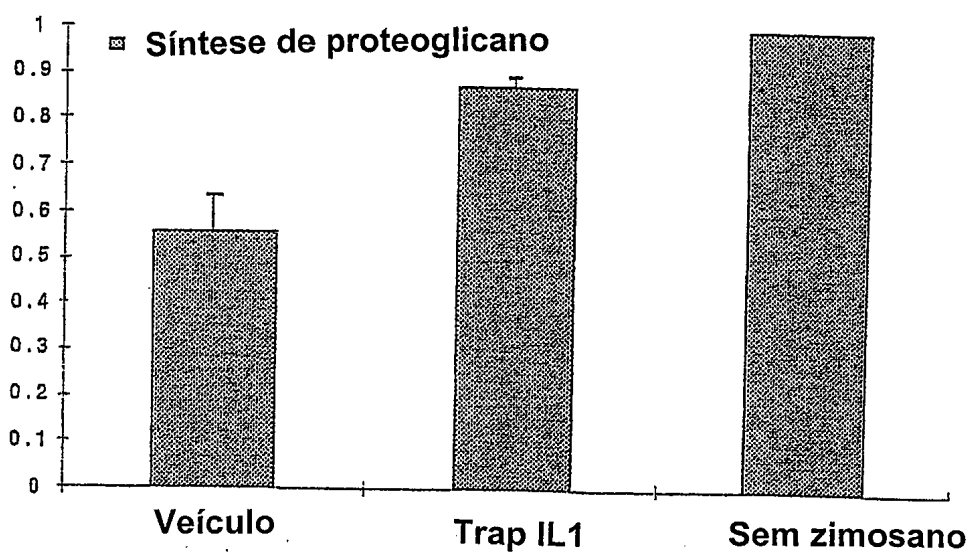


FIGURA 2



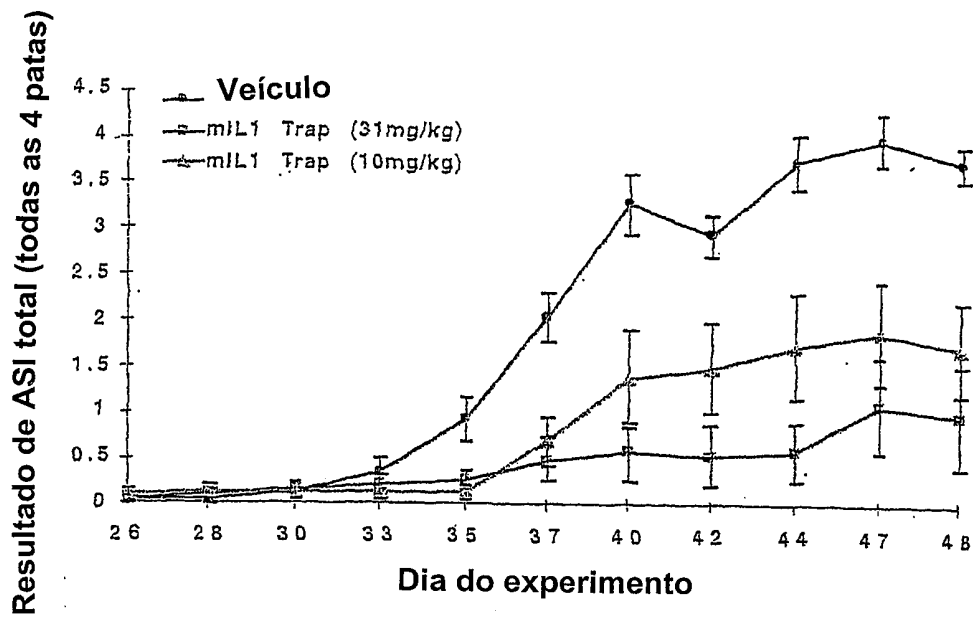
72
8

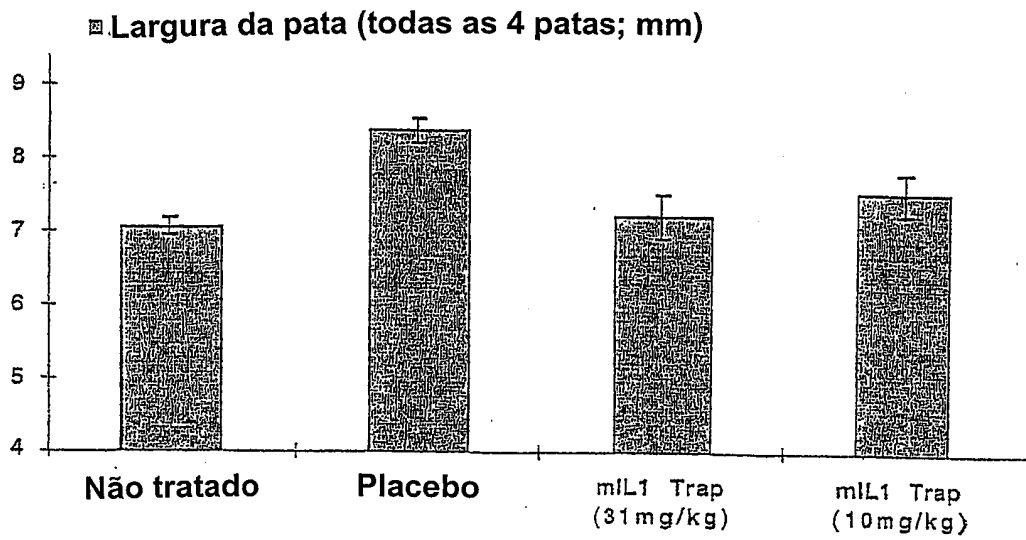
FIGURA 3



23/11

FIGURA 4



M
K**FIGURA 5**

P10315052

MA

FIGURA 6

