



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

(21) PI 0711193-2 A2



* B R P I 0 7 1 1 1 9 3 A 2 *

(22) Data de Depósito: 25/04/2007
(43) Data da Publicação: 18/06/2013
(RPI 2215)

(51) Int.CI.:
C12N 15/13
C12N 15/62
C07K 14/705
C07K 16/00
A61K 38/17

(54) Título: PROTEÍNAS DE FUSÃO RAGE,
FORMULAÇÕES E MÉTODOS DE USO DOS MESMOS

(30) Prioridade Unionista: 05/05/2006 US 60/798.455

(73) Titular(es): Transtech Pharma, Inc.

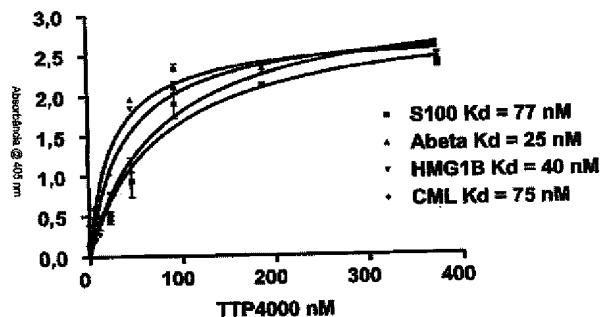
(72) Inventor(es): Adnan M.M. Mjalli, Eric J. Benjamin, Jeffrey C. Webster, Robert Rothlein, Ye Edward Tian

(74) Procurador(es): Nellie Anne Daniel-Shores

(86) Pedido Internacional: PCT US2007010125 de
25/04/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/130302de
15/11/2007

(57) Resumo: PROTEÍNAS DE FUSÃO RAGE, FORMULAÇÕES, E MÉTODOS DE USO DOS MESMOS. São reveladas proteínas de fusão RAGE compreendendo seqüências polipeptídicas de RAGE ligadas a um segundo peptídeo não RAGE. A proteína de fusão RAGE pode utilizar um domínio polipeptídeo RAGE compreendendo um sítio de ligação do ligante RAGE e ligante interdomínio diretamente ligado a um N-terminal de um domínio da C_H2 da imunoglobulina. Também revelado são formulações de proteínas de fusão RAGE e o uso das proteínas de fusão RAGE e formulações de proteína de fusão RAGE como terapia para patologias mediadas por RAGE.



"PROTEÍNAS DE FUSÃO RAGE, FORMULAÇÕES E MÉTODOS DE USO DOS MESMOS"

Referência cruzada para os pedidos relacionados

O presente pedido reivindica prioridade sobre 35 U.S.C. §119 (e) a partir do Pedido 5 de Patente Seriado Provisório dos EUA No. 60/798.455, depositado em 05 de Maio de 2006. A revelação do Pedido de Patente Provisório dos EUA 60/798.455 é aqui incorporada por referência em sua totalidade.

Campo da invenção

A presente invenção relaciona-se à regulação do Receptor para Endoprodutos Glicosilados Avançados (RAGE). Mais particularmente, a presente invenção descreve proteínas de fusão compreendendo um polipeptídeo RAGE, métodos de produção de tais proteínas de fusão, e formulações de tais proteínas de fusão, e o uso de tais proteínas de fusão RAGE para tratamento de distúrbios baseados em RAGE.

Antecedente

15 A incubação de proteínas ou lipídeos com açúcares aldose resulta em glicação não enzimática e oxidação de grupos amino nas proteínas para formar adutos Amadori. Ao longo do tempo, os adutos passam por rearranjos adicionais, desidratações, e ligação cruzada com outras proteínas para formar complexos conhecidos como Glicação Avançada de Produtos Finais (AGEs). Fatores que promovem a formação de AGEs incluem atraso na renovação de proteína (por exemplo como em amiloidoses), acúmulo de macromoléculas tendo alto conteúdo de lisina, e altos níveis de glicose sanguínea (por exemplo, como na diabetes) (Hori e colaboradores, J. Biol. Chem. 270:25752-761, (1995)). AGEs têm sido implicados em uma variedade de distúrbios incluindo complicações associadas com diabetes e envelhecimento normal.

25 AGEs demonstram ligação específica e saturável à receptores de superfície celular em monócitos, macrófagos, células endoteliais da microvasculatura, células do músculo liso, células mesangiais, e neurônios. O domínio extracelular Receptor para Endoprodutos Glicosilados Avançados (RAGE) é um membro da família de supergenes de imunoglobulinas de moléculas. O domínio extracelular (N-terminal) de RAGE inclui três regiões do tipo imunoglobulina: um domínio tipo V (variável) seguido por dois domínios do tipo C (constante) (Neeper e colaboradores, J. Biol. Chem., 267:14998-15004 (1992); Schmidt e colaboradores, Circ. (Suplem.) 96#194 (1997)). Um único domínio transmembranar e uma curta e altamente carregada cauda citosólica segue o domínio extracelular. O domínio extracelular N-terminal pode ser isolado por proteólise de RAGE ou por abordagens de biologia molecular 30 para gerar RAGE solúvel (RAGEs) compreendido de domínios V e C.

RAGE é expresso em múltiplos tipos de célula, incluindo leucócitos, neurônios, células da microglia e endotélio vascular (por exemplo, Hori e colaboradores, J. Biol. Chem.,

270:25752-761 (1995)). Níveis aumentados de RAGE são também encontrados em tecidos envelhecidos (Schleicher e colaboradores, *J. Clin. Invest.*, 99 (3): 457-468 (1997)), e na retina, vasculatura e rins diabéticos (Schmidt e colaboradores, *Nature Med.*, 1:1002-1004 (1995)).

- 5 Em adição aos AGEs, outros compostos podem se ligar à RAGE e modulá-la. RAGE se liga a ligantes estruturalmente diversos e de múltiplas funcionalidades, incluindo beta amilóide ($\text{A}\beta$), soro amilóide A (SAA), produtos da Glicação Final Avançada (AGEs), S100 (um membro pró-inflamatório da família da Calgranulina), carboximetil lisina (CML), anfotericina e CD11b/CD18 (Bucciarelli e colaboradores, *Cell. Mol. Life Sci.*, 59:1117-128 (2002);
 10 Chavakis e colaboradores, *Microbes Infect.*, 6:1219-1225 (2004). Kokkola e colaboradores, *Scand. J. Immunol.*, 61:1-9 (2005). Schmidt e colaboradores, *J. Clin. Invest.*, 108:949-955 (2001); Rocken e colaboradores, *Am. J. Pathol.*, 162:1213-1220 (2003)).

- 15 A ligação de ligantes tais como AGEs, S100/calgranulina, β -amilóide, CML ($\text{N}^{\epsilon} \sim$ Carboximetil lisina), e anfotericina para RAGE tem sido demonstrado modificar a expressão de uma variedade de genes. Essas interações podem então iniciar mecanismos de transdução de sinal incluindo ativação de p38, p21ras, MAP quinases, fosforilação da Erk1-2, e a ativação do mediador transcricional de sinal inflamatório, NF- κB (Yeh e colaboradores, *Diabetes*, 50:1495-1504 (2001)). Por exemplo, em muitos tipos de células, a interação entre RAGE e seus ligantes pode gerar estresse oxidativo, que através do mesmo resultam na ativação dos radicais livres sensíveis à transcrição do fator NF- κB , e a ativação dos genes reguladores de NF- κB , tais como as citocinas IL-1 β e TNF- α . Além do mais, a expressão de RAGE é super regulada através de NF- κB e mostra aumento da expressão em sítios de inflamação ou estresse oxidativo (Tanaka e colaboradores, *J. Biol. Chem.*, 275:25781-25790 (2000)). Então, um espiral ascendente e sempre prejudicial pode ser abastecido por uma alça de resposta positiva iniciada por ligação do ligante.

- 20 25 A ativação de RAGE em diferentes tecidos e órgãos podem levar a um número de consequências patofisiológicas. RAGE tem sido implicado em uma variedade de condições incluindo: inflamação aguda e crônica (Hofmann e colaboradores, *Cell* 97:889-901 (1999)), o desenvolvimento de complicações diabéticas tardias tais como aumento da permeabilidade vascular (Wautier e colaboradores, *J. Clin. Invest.*, 97:238-243 (1995)), neuropatia (Teillet e colaboradores, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 11:1488-1497 (2000)), arteriosclerose (Vlassara e colaboradores, The Finnish Society DUODECIM, *Ann. Med.*, 28:419-426 (1996)), e retinopatia (Hammes e colaboradores, *Diabetologia*, 42:603-607 (1999)). RAGE tem também sido implicada em doença de Alzheimer (Yan e colaboradores, *Nature*, 382:685-691 (1996)), e em invasão de tumor e metástase (Taguchi e colaboradores, *Nature*, 405:354-357 (2000)).

30 35 A despeito da ampla expressão de RAGE e seu aparente papel pleiotrópico em múltiplos modelos de doenças diversas, RAGE não parece ser essencial para o desenvolvi-

mento normal. Por exemplo, camundongos deficientes em RAGE são sem fenótipo anormal visível, sugerindo que enquanto RAGE pode desempenhar um papel em doença patológica quando estimulada cronicamente, a inibição de RAGE não parece contribuir para qualquer fenótipo agudo não desejado (Liliensiek e colaboradores, Clin. Invest. 113:1641-50 (2004)).

5 Antagonizando a ligação de ligantes fisiológicos para RAGE pode diminuir as mudanças patofisiológicas trazidas pelas concentrações excessivas de AGEs e outros ligantes de RAGE. Por redução de ligações de ligantes endógenos para RAGE, sintomas associados com doenças mediadas por RAGE podem ser reduzidos. RAGE solúvel (RAGEs) é capaz de efetivamente antagonizar a ligação de ligantes de RAGE ao RAGE. Entretanto, RAGEs podem ter uma meia vida quando administradas in vivo que podem ser também curtas para ser terapeuticamente úteis para uma ou mais doenças. Então, existe a necessidade de desenvolverem compostos que antagonizem a ligação de AGEs e outros ligantes fisiológicos ao receptor RAGE onde o composto tem um perfil farmacocinético desejável.

Resumo

15 Modalidades da presente invenção compreendem proteínas de fusão RAGE e métodos de uso dessas proteínas. A presente invenção pode ser modalidade em uma variedade de formas. Modalidades da presente invenção compreendem uma proteína de fusão RAGE compreendendo um polipeptídeo RAGE ligado a um segundo polipeptídeo não RAGE. Em uma modalidade, a proteína de fusão RAGE compreende um sítio de ligação do ligante RAGE. A proteína de fusão RAGE pode ainda compreender um polipeptídeo RAGE diretamente ligado a um polipeptídeo compreendendo o domínio C_H2 de uma imunoglobulina, ou uma porção do domínio C_H2. Em certas modalidades, a proteína de fusão RAGE compreende uma sequência aminoácida com o revelado na SEQ ID NO:56 ou SEQ ID NO:57, ou uma sequência pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 96%, 97%, 98% ou 99% 20 idêntica a mesma. Por exemplo, em algumas modalidades, a sequência pelo menos 90% idêntica à SEQ ID NO:56 ou SEQ ID NO:57 compreende a sequência da SEQ ID NO:56 ou SEQ ID NO:57 sem a lisina C-terminal.

25 A presente invenção também compreende um método para fazer uma proteína de fusão RAGE. Em uma modalidade o método compreende ligar um polipeptídeo RAGE a um segundo polipeptídeo não RAGE. Em uma modalidade, o polipeptídeo RAGE compreende um sítio de ligação do ligante RAGE. O método pode compreender uma ligação de um polipeptídeo RAGE diretamente a um polipeptídeo compreendendo o domínio C_H2 de uma imunoglobulina ou uma porção do domínio C_H2. Em certas modalidades, a proteína de fusão RAGE compreende uma sequência aminoácida como revelado na SEQ ID NO:56 ou SEQ ID NO:57, ou uma sequência pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica a mesma. Por exemplo, em algumas modalidades, a sequência pelo menos 30 90% idêntica à SEQ ID NO:56 ou SEQ ID NO:57 compreende a sequência da SEQ ID NO:56 ou SEQ ID NO:57 sem a lisina C-terminal.

NO:56 ou SEQ ID NO:57 sem a lisina C-terminal.

Em outras modalidades, a presente invenção pode compreender métodos e composições para tratamento de doença mediada por RAGE em um paciente. O método pode compreender a administração de uma proteína de fusão RAGE da presente invenção a um paciente. A composição pode compreender uma proteína de fusão RAGE da presente invenção em um veículo farmaceuticamente aceitável.

Em outras modalidades da presente invenção também são providas formulações compreendendo uma mistura liofilizada de um lioprotetor, uma proteína de fusão RAGE, e tampão. Por exemplo, em certas modalidades, a presente invenção pode compreender uma formulação estável reconstituída compreendendo uma proteína de fusão RAGE em uma quantidade de pelo menos 50 mg/mL, e um diluente, onde a formulação reconstituída tem sido preparada a partir de uma mistura liofilizada da proteína de fusão RAGE e um lioprotetor.

Modalidades da presente invenção pode também compreender artigos de fabricação. Em certas modalidades, os artigos de fabricação podem compreender um recipiente que contém uma formulação compreendendo uma proteína de fusão RAGE liofilizada. O artigo de fabricação pode também compreender instruções para reconstituir a formulação liofilizada com um diluente.

Em outras modalidades, a presente invenção pode também compreender métodos para preparar uma formulação reconstituída estável de uma proteína de fusão RAGE. Em certas modalidades, o método pode compreender reconstituição de uma mistura liofilizada de uma proteína de fusão RAGE e um lioprotetor em um diluente tal que a concentração da proteína de fusão RAGE na formulação reconstituída é pelo menos 50 mg/mL. Por exemplo, em uma modalidade, o método pode compreender os passos de liofiltrar uma mistura compreendendo uma proteína de fusão RAGE e uma quantidade lioprotetora de um lioprotetor, e reconstituindo a mistura liofilizada em um diluente.

Existem várias vantagens que podem ser associadas com modalidades particulares da presente invenção. Em uma modalidade, as proteínas de fusão RAGE da presente invenção podem ser metabolicamente estáveis quando administradas a um paciente. Também, as proteínas de fusão RAGE da presente invenção podem exibir alta afinidade de ligação para ligantes RAGE. Em certas modalidades, as proteínas de fusão RAGE da presente invenção ligam-se à ligantes RAGE com afinidades em variações de alto nanomolar a baixo micromolar. Por ligação de alta afinidade aos ligantes RAGE fisiológicos, as proteínas de fusão RAGE da presente invenção podem ser utilizadas para inibir a ligação endógena dos ligantes à RAGE, dessa forma provendo um meio de melhorar doenças mediadas por RAGE.

Também, as proteínas de fusão RAGE da presente invenção podem ser providas

na forma de proteína ou ácido nucléico. Em um exemplo de modalidade, a proteína de fusão RAGE pode ser administrada sistematicamente e permanecer na vasculatura para potencializar o tratamento de doenças vasculares mediadas em parte por RAGE. Em outro exemplo de modalidade, a proteína de fusão RAGE pode ser administrada localmente para tratar 5 doenças onde os ligantes RAGE contribuem para a patologia da doença. Alternativamente, um ácido nucléico construído codificando a proteína de fusão RAGE pode ser distribuído para um sítio pelo uso de um veículo apropriado tal como um vírus ou como um DNA sozinho onde a expressão local transiente pode localmente inibir a interação entre os ligantes RAGE e receptores. Então, a administração pode ser transiente (por exemplo, como onde a 10 proteína de fusão RAGE é administrada) ou mais permanente ao natural (por exemplo, com onde a proteína de fusão RAGE é administrada como um DNA recombinante).

Existem características adicionais da invenção que serão descritas aqui abaixo. É para ser entendido que a invenção não é limitada em seu pedido aos detalhes apresentados nas seguintes reivindicações, descrições e figuras. A invenção é capaz de outras modalidades e ser praticada ou realizada de várias maneiras.

Breve descrição das figuras

Várias características, aspectos e vantagens da presente invenção se tornarão mais aparentes com referência às seguintes figuras.

FIG. 1 mostra várias seqüências RAGE e sequências de imunoglobulinas em acordo com modalidades alternadas da presente invenção: Painel A, SEQ ID NO:1, a seqüência aminoácida para RAGE humana; e SEQ ID NO:2, a seqüência aminoácida para RAGE humana sem a seqüência sinal de aminoácidos I-22; Painel B, SEQ ID NO:3, a seqüência aminoácida para RAGE humana sem a seqüência sinal de aminoácidos 1-23; Painel C, SEQ ID NO:4, a seqüência aminoácida de RAGEs humanas; SEQ ID NO:5, a seqüência aminoácida de RAGEs humana sem a seqüência sinal de aminoácidos 1-22, e SEQ ID NO:6, a seqüência aminoácida de RAGEs humanas sem a seqüência sinal de aminoácidos 1-23; Painel D, SEQ ID NO:7, uma seqüência aminoácida compreendendo o domínio V de dos aminoácidos 1-23; Painel D, SEQ ID NO:7, uma seqüência aminoácida compreendendo o domínio V da RAGE humana; SEQ ID NO:8, uma seqüência aminoácida alternada compreendendo o domínio V da RAGE humana; SEQ ID NO:9, um fragmento N-terminal do domínio V da RAGE humana; SEQ ID NO:10, um fragmento N-terminal do domínio V da RAGE humana; SEQ ID NO:11, a seqüência aminoácida para aminoácidos 124-221 da RAGE humana; SEQ ID NO:12, a seqüência aminoácida para aminoácidos 227-317 da RAGE humana; SEQ ID NO:13, a seqüência aminoácida para aminoácidos 23-123 da RAGE humana; Painel E, SEQ ID NO:14, a seqüência aminoácida para aminoácidos 24-123 da RAGE humana; SEQ ID NO:15, a seqüência aminoácida para aminoácidos 23-136 da RAGE humana; SEQ ID NO:16, a seqüência aminoácida para aminoácidos 24-136 da RAGE humana; SEQ ID

NO:17, a seqüência aminoácida para aminoácidos 23-226 da RAGE humana; SEQ ID NO:18, a seqüência aminoácida para aminoácidos 24-226 da RAGE humana; Painel F, SEQ ID NO:19, a seqüência aminoácida para aminoácidos 23-251 da RAGE humana; SEQ ID NO:20, a seqüência aminoácida para aminoácidos 24-251 da RAGE humana; SEQ ID NO:21, um ligante RAGE interdomínio; SEQ ID NO:22, um segundo ligante RAGE interdomínio; SEQ ID NO:23, um terceiro ligante RAGE interdomínio; SEQ ID NO:24, um quarto ligante RAGE interdomínio; Painel G, SEQ ID NO:25, DNA codificando aminoácidos 1-118 para RAGE humana; SEQ ID NO:26, DNA codificando aminoácidos 1-123 para RAGE humana; e SEQ ID NO:27, DNA codificando aminoácidos 1-136 para RAGE humana; Painel H, SEQ ID NO:28, DNA codificando aminoácidos 1-230 para RAGE humana; e SEQ ID NO:29, DNA codificando aminoácidos 1-251 para RAGE humana; Painel I, SEQ ID NO:38, uma seqüência parcial de aminoácidos para os domínios C_H2 e C_H3 da IgG humana; SEQ ID NO:39, DNA codificando uma porção de domínios C_H2 e C_H3 humanos de IgG humana; SEQ ID NO:40, uma seqüência aminoácida para domínios C_H2 e C_H3 de IgG humana; Painel J, SEQ ID NO:41, um DNA codificando os domínios C_H2 e C_H3 humanos de IgG humana; SEQ ID NO:42, uma seqüência aminoácida para o domínio C_H2 de IgG humana; SEQ ID NO:43, uma seqüência aminoácida para o domínio C_H3 de IgG humana; e SEQ IS NO: 44, um quinto ligante RAGE interdomínio. Painel K, SEQ ID NO:45, a sequência aminoácida da sRAGE humana sem a sequência dinal dos aminoácidos 1-23 onde o resíduo glutamina no terminal N tem ciclizado para formar ácido piroglutâmico, SEQ ID NO:46, uma sequência aminoácida alternada compreendendo o domínio V da sRAGE humana onde o resíduo no terminal N tem ciclizado para formar ácido piroglutâmico, SEQ ID NO:47, um fragmento terminal N do domínio V da RAGE humana onde o resíduo glutamina no terminal N tem ciclizado para formar ácido piroglutâmico, SEQ ID NO:48, a sequência aminoácida para os aminoácidos 24-123 da RAGE humana onde o resíduo glutamina na terminação N tem ciclizado para formar o ácido piroglutâmico; Painel L, SEQ ID NO:49, a sequência aminoácida para os aminoácidos 24-136 da RAGE humana onde o resíduo glutamina na terminação N tem ciclizado para formar ácido piroglutâmico, SEQ ID NO:50, a sequência aminoácida para os aminoácidos 24-226 da RAGE humana onde o resíduo glutamina na terminação N tem ciclizado para formar ácido piroglutâmico, SEQ ID NO:51, a sequência aminoácida para os aminoácidos 24-251 da RAGE humana onde o resíduo glutamina na terminação N tem ciclizado para formar ácido piroglutâmico; Painel M, SEQ ID NO:52 uma seqüência de DNA alternada codificando uma porção dos domínios C_H2 e C_H3 humanos da IgG humana na SEQ ID NO:38, e SEQ ID NO:53 uma seqüência de DNA alternada codificando uma porção dos domínios C_H2 e C_H3 humanos da IgG humana na SEQ ID NO:40.

FIG. 2 mostra DNA alternado (sequências SEQ ID NO: 30) (Painel A) e SEQ ID NO:54 (Painel B) que codifica a primeira proteína de fusão RAGE (TTP-4000) de acordo

com uma modalidade da presente invenção. A seqüência codificante 1-753 realçado em negrito codifica a seqüência do N-terminal da proteína RAGE enquanto que a seqüência 754-1386 codifica a seqüência protéica da IgG Fc ($\gamma 1$) humana sem a região da dobradiça (hinge).

5 FIG. 3 mostra DNA alternado (seqüências SEQ ID NO: 31) (Painel A) e SEQ ID NO:55 (Painel B) que codifica uma segunda proteína RAGE de fusão (TTP-3000) de acordo com uma modalidade da presente invenção. A seqüência codificadora 1-408 realçado em negrito codifica a seqüência N-terminal da proteína RAGE enquanto que a seqüência 409-1041 codifica a seqüência da proteína IgG Fc ($\gamma 1$) humana sem a região de dobradiça.

10 FIG. 4 mostra as seqüências de aminoácidos, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO:33, e SEQ ID NO:34, e SEQ ID NO: 56 que cada uma codifica um quarto domínio para a proteína de fusão RAGE de acordo com modalidades alternadas da presente invenção. A seqüência RAGE está realçada com fonte negrita.

15 FIG. 5 mostra as seqüências de aminoácidos, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, e SEQ ID NO: 57 que cada uma codifica um terceiro domínio da proteína de fusão RAGE de acordo com modalidades alternadas da presente invenção. A seqüência RAGE é realçada com fonte negrita.

20 FIG. 6, Painel A, mostra uma comparação dos domínios protéticos na RAGE humana e proteína Ig gama-1 Fc humana, e pontos de clivagem utilizados para fazer a TTP-3000 (na posição 136) e TTP-4000 (na posição 251) de acordo com modalidades alternativas da presente invenção; e o Painel B mostra a estrutura do domínio para TTP-3000 e TTP-4000 de acordo com modalidades alternativas da presente invenção.

25 FIG. 7 mostra resultados de um ensaio de ligação in vitro para sRAGE, e uma primeira proteína de fusão RAGE TTP-4000 (TT4) e uma segunda proteína de fusão RAGE TTP-3000 (TT3), para os ligantes RAGE beta amilóide (A-beta), S100b (S100), e anfotericina (Anfo), de acordo com uma modalidade da presente invenção.

30 FIG. 8 mostra resultados de um ensaio de ligação in vitro para uma primeira proteína de fusão RAGE TTP-4000 (TT4) ("Proteína") a amilóide-beta como comparado a um controle negativo somente incluindo os reagentes de imunodetecção ("Complexo Sozinho"), e antagonismo de tal ligação por um antagonista RAGE ("Ligante RAGE") de acordo com uma modalidade da presente.

35 FIG. 9 mostra resultados de um ensaio de ligação in vitro para uma segunda proteína de fusão RAGE TTP-3000 (TT3) ("Proteína") a amilóide-beta como comparado a um controle negativo somente incluindo os reagentes de imunodetecção ("Complexo Sozinho"), e antagonismo de tal ligação por antagonismo RAGE ("Ligante RAGE") de acordo com uma modalidade da presente invenção.

FIG. 10 mostra resultados de um ensaio baseado em célula medindo a inibição de

produção induzida S100b-RAGE de TNF- α por proteínas de fusão RAGE TTP-3000 (TT3) e TTP-4000 (TT4), e RAGEs de acordo com uma modalidade da presente invenção.

FIG. 11 mostra resultados de um ensaio baseado em célula medindo a inibição de HMGB-1RAGE induzindo produção de TNF- α por proteína de fusão RAGE TTP-4000 e um anticorpo anti-RAGE de acordo com uma modalidade da presente invenção.

FIG. 12 mostra um perfil farmacocinético para proteína de fusão RAGE TTP-4000 de acordo com uma modalidade da presente invenção em que cada curva representa um animal diferente sob as mesmas condições experimentais.

FIG. 13 mostra os níveis relativos de TNF- α liberados a partir de células THP-1 devido a estimulação por proteínas de fusão RAGE TTP-4000 e estimulação de IgG humana como medida de uma resposta inflamatória de acordo com uma modalidade da presente invenção.

FIG. 14 mostra o uso da proteína de fusão RAGE TTP-4000 para reduzir a restenose em animais diabéticos de acordo com modalidades alternativas da presente invenção, em que o painel A mostra que a proteína de fusão RAGE TTP-4000 reduziu a taxa íntima/média como comparado a um controle negativo (IgG), e o painel B mostra que a proteína de fusão RAGE TTP-4000 reduziu a proliferação de célula do músculo liso de forma dose-responsiva.

FIG. 15 mostra o uso da proteína de fusão RAGE TTP-4000 para reduzir a formação amilóide e disfunção cognitiva em animais com Doença de Alzheimer (DA) de acordo com modalidades alternativas da presente invenção em que o painel A mostra que a proteína de fusão RAGE TTP-4000 reduziu a carga amilóide no cérebro, e o painel B mostram que a proteína de fusão RAGE TTP-4000 aumentou a função cognitiva.

FIG. 16 mostra curvas de saturação de ligação com TTP-4000 em vários ligantes RAGE conhecidos imobilizados de acordo com uma modalidade da presente invenção.

FIG. 17 mostra o uso da proteína de fusão RAGE TTP-4000 para reduzir a rejeição de transplantes de células da ilhota pancreática alogenêicas de acordo com modalidades alternadas da presente invenção onde círculos abertos (não preenchidos) designam animais controles não tratados; círculos com a diagonal hachurada designam animais tratados com TTP-4000 na primeira dose; círculos hachurados com ondas designam animais tratados com TTP-4000 em uma segunda dose; círculos preenchidos com losangos designam animais tratados com controle PBS; e círculos sólidos designam animais tratados com controle IgG.

FIG. 18 mostra o uso de proteínas de fusão RAGE TTP-4000 para reduzir a rejeição de transplantes de células da ilhota pancreática singenêicas de acordo com modalidades alternadas da presente invenção onde círculos abertos (não preenchidos) designam animais controles não tratados; e círculos sólidos designam animais tratados com TTP-4000.

Descrição detalhada

A menos que indicado em contrário, os parâmetros numéricos apresentados na seguinte especificação são aproximações que podem variar dependendo das propriedades desejadas para ser obtida pela presente invenção. No mínimo, e não como uma tentativa de limitar o pedido do dogma de equivalentes no objetivo das reivindicações, cada parâmetro numérico deve pelo menos ser construído na luz do número de dígitos significantes informados e por aplicação de técnicas de arredondamento comuns.

Não obstante que as variações numéricas e parâmetros de apresentação do amplo objetivo da invenção são aproximações, os valores numéricos apresentados nos exemplos específicos são relatados tão precisamente como possíveis. Qualquer valor numérico, entre tanto, contém certos erros inerentes necessariamente resultantes a partir do desvio padrão encontrado nas suas respectivas medidas testes. Além disso, todas as variações reveladas aqui são para serem entendidas como abrangendo qualquer e todas as variações aqui incluídas. Por exemplo, uma variação determinada de "1 a 10" deve ser considerada para incluir qualquer e todas as variações entre (e inclusive de) o valor mínimo de 1 e o valor máximo de 10; que é, todas as variações começando com um valor mínimo de 1 ou mais, por exemplo, 1 a 6,1, e terminando com um valor máximo de 10 ou menos, por exemplo, 5,5 a 10. Adicionalmente, qualquer referência referida como sendo "aqui incorporada" é para ser entendido como sendo incorporada em sua totalidade.

É ainda notado que, como utilizado nesta especificação, as formas singulares "um" e "o" incluem plurais referentes a menos que expressamente e inequivocadamente limitados a uma referência. O termo "ou" é utilizado com o termo "e/ou" a menos que o contexto claramente indique outra coisa.

Também, os termos "porção" e "fragmento" são utilizados de forma passível de mudança para se referir às partes de um polipeptídeo, ácido nucléico, ou outra construção molecular.

"Polipeptídeo" e "proteína" são utilizados de forma intercambiável para descrever moléculas de proteína que podem compreender ou proteínas parciais ou de comprimento completo.

Como é conhecido na técnica, "proteínas", "peptídeos", "polipeptídeos" e "oligopeptídeos" são cadeias de aminoácidos (tipicamente L-aminoácidos) cujos alfa carbonos são ligados através de ligações peptídicas formadas por uma reação de condensação entre o grupo carboxila do carbono alfa do aminoácido a o grupo amino do carbono alfa de outro aminoácido. Tipicamente, os aminoácidos construindo uma proteína são numerados em ordem, começando no resíduo amino-terminal e aumentado em direção ao resíduo carbóxil terminal da proteína.

Como aqui utilizado, o termo "a montante" refere-se a um resíduo que é N-terminal a um segundo resíduo onde a molécula é um proteína, ou 5' a um segundo resíduo, onde a

molécula é um ácido nucléico. Também como aqui utilizado, o termo "a downstream (a favor da corrente)" refere-se a um resíduo que é C-terminal a um segundo resíduo onde a molécula é uma proteína, ou 3' a um segundo resíduo onde a molécula é um ácido nucléico.

A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos utilizados aqui têm o mesmo significado como comumente entendido por um versado na técnica. Praticantes são particularmente direcionados a "Current Protocols in Molecular Biology" (ver, por exemplo, Ausubel, F.M. et al, Short Protocols in Molecular Biology, 4^a Ed. Capítulo 2, John Wiley & Sons, N.I.) para definições e termos da técnica. Abreviações para resíduos aminoácidos são os códigos padrões 3-letras e/ou 1-letra utilizados na técnica referem-se a um de 20 aminoácidos comuns.

Um "ácido nucléico" é um polinucleotídeo tal como ácido dioxirribonucléico (DNA) ou ácido ribonucléico (RNA). O termo é utilizado para incluir ácidos nucléicos de fita simples, ácidos nucléicos de fita dupla, e RNA e DNA feitos de análogos nucleotídeos ou nucleosídeos.

O termo "vetor" refere-se a uma molécula de ácido nucléico que pode ser para transportar uma segunda molécula de ácido nucléico em uma célula. Em uma modalidade, o vetor leva em conta a replicação de seqüências de DNA inseridas em um vetor. O vetor pode compreender um promotor para aumentar a expressão de uma molécula de ácido nucléico em pelo menos algumas células hospedeiras. Vetores podem replicar autonomamente (extracromossomal) ou podem ser integrados em um cromossomo de célula hospedeira. Em uma modalidade, o vetor pode compreender um vetor de expressão capaz de produzir uma proteína derivada de pelo menos parte de uma seqüência de ácido nucléico inserida no vetor.

Como é conhecido na técnica, condições para cada uma das seqüências de ácidos nucléicos hibridizadas podem ser descritas como variando de baixa a alta rigidez. Geralmente, condições de hibridização de alta rigidez referem-se a lavagem de híbridos em tampão com pouco sal e altas temperaturas. A hibridização pode ser para filtrar a ligação de DNA utilizando soluções de hibridização padrões na técnica tal como NaHPO₄ a 0,5 M, dodecil sulfato de sódio a 7% (SDS), a 65°C, e lavagem em NaHOP₄ a 0,25 M, 3,5% de SDS seguido por lavagem em SSC 0,1x / SDS 0,1% em uma temperatura variando da temperatura ambiente a 68°C, dependendo no comprimento da sonda. Por exemplo, uma lavagem de alta rigidez compreende lavagem em SSC 6x / pirofosfato de sódio 0,05% a 37°C para uma sonda de oligonucleotídeo de 14 bases, ou a 48°C para uma sonda de oligonucleotídeo de 17 bases, ou a 55°C para uma sonda de oligonucleotídeo de 20 bases, ou a 60°C para uma sonda de oligonucleotídeo de 25 bases, ou a 65°C para uma sonda de oligonucleotídeo de 250 nucleotídeos no comprimento. Sondas de ácido nucléico podem ser marcadas com radionucleotídeos por marcação final com, por exemplo, [γ -³²P]ATP, ou incorporação de nucle-

otídeos radiomarcados tais como $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]d\text{CTP}$ por marcação de iniciador aleatório. Alternativamente, sondas podem ser marcadas por incorporação de nucleotídeos biotinilados ou marcados com fluoresceína, e a sonda detectada utilizando estreptavidina ou anticorpos anti-fluoresceína.

- 5 Como aqui utilizado, "moléculas orgânicas pequenas" são moléculas de peso molecular menor que 2.000 Dalton que contêm pelo menos um átomo de carbono.

- O termo "proteína de fusão" refere-se a uma proteína ou polipeptídeo que tem uma seqüência aminoácida derivada a partir de duas ou mais proteínas. A proteína de fusão pode também incluir regiões de ligação de aminoácidos entre porções de aminoácidos derivados
10 a partir de proteínas separadas.

- Como aqui utilizado, um "polipeptídeo não RAGE" é qualquer polipeptídeo que não é derivado de RAGE ou um fragmento da mesma. Tais polipeptídeos não RAGE incluem peptídeos imunoglobulinas, polipeptídeos dimirizados, polipeptídeos estabilizantes, peptídeos anfifílicos, ou polipeptídeos compreendendo seqüências aminoácidas que provêem
15 marcadores para alvo ou purificação da proteína.

- Como aqui utilizado, "peptídeos imunoglobulinas" podem compreender uma cadeia pesada da imunoglobulina ou uma porção da mesma. Em uma modalidade, a porção da cadeia pesada pode ser o fragmento Fc ou uma porção da mesma. Como aqui utilizado, os domínios C_H2 e C_H3 da cadeia pesada de uma imunoglobulina ou na forma monomérica ou
20 na forma dimérica. Ou, o C_H1 e fragmento Fc podem ser utilizados como o polipeptídeo imunoglobulina. A cadeia pesada (ou porção da mesma) pode ser derivada a partir de qualquer um dos isotipos de cadeia pesada conhecidos: IgG (γ), IgM (μ), IgD (δ), IgE (ϵ), ou IgA (α). Em adição, a cadeia pesada (ou porção da mesma) pode ser derivada de qualquer um dos subtipos de cadeia pesada: IgG1 (γ_1), IgG2 (γ_2), IgG3 (γ_3), IgG4 (γ_4), IgA1 (α_1), IgA2 (α_2),
25 ou mutações desses isotipos ou subtipos que alteram a atividade biológica. Um exemplo de atividade biológica que pode ser alterada inclui redução de uma habilidade do isotipo em se ligar a alguns receptores Fc como, por exemplo, por modificação da região da dobradiça.

- Os termos "identidade" ou "porcentagem idêntica" referem-se à seqüência de identidade entre duas seqüências aminoácidas ou entre duas seqüências de ácido nucléico.
30 Porcentagem de identidade pode ser determinada por alinhamento de duas seqüências e refere-se ao número de resíduos idênticos (isto é, aminoácido ou nucleotídeo) nas posições divididas pelas seqüências comparadas. Alinhamento e comparação de seqüências podem ser conduzidos utilizando os algoritmos padrões na técnica (por exemplo, Smith e Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2: 482; Needleman e Wunsch, 1970, J. Mol. Biol., 48:443; Pearson e Lipman, 1988, Proc. Natl., Acad. Sci., EUA, 85:2444) ou por versões computadorizadas desses algoritmos (Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, WI) publicamente disponível como BLAST e

FASTA. Também, ENTREZ, disponível através do Instituto Nacional de Saúde, Bethesda MD, pode ser utilizado para comparação de seqüência. Em uma modalidade, a porcentagem de identidade de duas seqüências podem ser determinadas utilizando GCG com um espaço de peso de 1, tal que cada espaço aminoácido é pesado como se eles fossem um aminoácido único de igual imprecisão entre as duas seqüências.

Como aqui utilizado, o termo "resíduos conservados" referem-se a aminoácidos que são os mesmos entre uma pluralidade de proteínas tendo a mesma estrutura e/ou função. Uma região de resíduos conservados pode ser importante para a estrutura ou função da proteína. Então, resíduos conservados contíguos como identificados em uma proteína tridimensional podem ser importantes para a estrutura ou função da proteína. Para encontrar resíduos conservados, ou regiões conservadas de estrutura 3-D, uma comparação de seqüências para as mesmas proteínas ou proteínas similares de diferentes espécies, ou de indivíduos de todas as espécies, pode ser feita.

Como aqui utilizado, o termo "homólogo" significa um polipeptídeo tendo um grau de homologia ou identidade com a seqüência aminoácida selvagem. Comparações de homologia podem ser conduzidas pelo olho, ou mais usualmente, com a ajuda de programas de comparação de seqüências facilmente disponíveis. Esses programas de computador comercialmente disponíveis podem calcular a porcentagem de homologia entre duas ou mais seqüências (por exemplo, Wilbur, W. J. e Lipman, D. J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 80:726-730). Por exemplo, seqüências homólogas podem ser tomadas para incluir uma seqüência aminoácida que em modalidades alternadas são pelo menos 70% idênticas, 75% idênticas, 85% idênticas, 90% idênticas, ou 95% idênticas, 96% idênticas, 97% idênticas, 98% idênticas ou 99% idênticas para cada uma.

Como aqui utilizado, o termo pelo menos 90% idêntica a mesma inclui seqüências que variam de 90 a 99,99% de identidade às seqüências indicadas e incluem todas as variações entre elas. Então, o termo pelo menos 90% idêntico ao mesmo inclui seqüências que são 91, 91,5, 92, 92,5, 93, 93,5, 94, 94,5, 95, 95,5, 96, 96,5, 97, 97,5, 98, 98,5, 99, 99,5 porcento idênticas à seqüência indicada. Similarmente, o termo "pelo menos 70% idêntica" incluir seqüências que variam de 70 a 99,99% idênticas, com todas as variações entre elas.

A determinação da porcentagem de identidade é determinada utilizando os algoritmos descritos aqui.

Como aqui utilizado, um "domínio" de polipeptídeo ou proteína compreende uma região ao longo de um polipeptídeo ou proteína que compreenda uma unidade independente. Domínios podem ser definidos em termos de estrutura, seqüência e/ou atividade biológica. Em uma modalidade, um domínio polipeptídeo pode compreender uma região de uma proteína que prega em uma maneira que é substancialmente independente do resto da proteína. Domínios que são identificados utilizando bases de dados de domínios tais como, mas

não limitados a PFAM, PRODOM, PROSITE, BLOCKS, PRINTS, SBASE, ISREC, PROFILES, SAMRT e PROCLASS.

Como aqui utilizado, “domínio de imunoglobulina” é uma seqüência de aminoácidos que é estruturalmente homóloga, ou idêntica a, um domínio de uma imunoglobulina. O comprimento da seqüência de aminoácidos de um domínio de imunoglobulina pode ser qualquer comprimento. Em uma modalidade, um domínio de imunoglobulina pode ser menor que 250 aminoácidos. Em um exemplo de modalidade, um domínio de imunoglobulina pode ser de cerca de 80-150 aminoácidos no comprimento. Por exemplo, a região variável, e as regiões C_H1, C_H2 e C_H3 de uma IgG são cada um domínios de imunoglobulina. Em outro exemplo, as regiões variáveis, C_H1, C_H2, C_H3 e C_H4 de uma IgM são cada um domínios de imunoglobulina.

Como aqui utilizado, um “domínio de imunoglobulina RAGE” é uma seqüência de aminoácidos a partir da proteína RAGE que é estruturalmente homologam ou idêntica a um domínio de uma imunoglobulina. Por exemplo, um domínio de imunoglobulina RAGE pode compreender o domínio-V RAGE, o domínio C2 tipo 1 tipo RAGE Ig (“domínio C1”), ou o domínio C2 tipo 2 tipo RAGE Ig (“domínio C2”).

Como aqui utilizado, um “ligante interdomínio” compreende um polipeptídeo que une dois domínios juntos. Uma região dobradiça Fc é um exemplo de um ligante interdomínio em uma IgG.

Como aqui utilizado, “diretamente ligado” identifica uma ligação covalente entre dois grupos diferentes (por exemplo, seqüências de ácido nucléico, polipeptídeos, domínios de polipeptídeos) que não têm quaisquer átomos intervindo entre os dois grupos que estão sendo ligados.

Como aqui utilizado, “domínio de ligação de ligante” refere-se a um domínio de uma proteína responsável para a ligação de um ligante. O termo domínio de ligação de ligante inclui homólogos de um domínio de ligação de ligante ou porções do mesmo. Por este ângulo, substituições de aminoácidos deliberadas podem ser feitas no sítio de ligação de ligante na base de similaridade na polaridade, carga, solubilidade, hidrofobicidade, ou hidrofilicidade dos resíduos, contanto que a especificidade de ligação do domínio de ligação do ligante seja mantida.

Como aqui utilizado, um “sítio de ligação de ligante” compreende resíduos em uma proteína que diretamente interage com um ligante, ou resíduos envolvidos no posicionamento do ligante na proximidade desses resíduos que diretamente interagem com o ligante. A interação de resíduos no sítio de ligação dos ligantes pode ser definida pela proximidade espacial dos resíduos a um ligante no modelo ou estrutura. O termo sítio de ligação do ligante inclui homólogos de um sítio de ligação do ligante, ou porções do mesmo. Por este ângulo, substituições de aminoácidos deliberadas podem ser feitas no sítio de ligação do ligante

na base da similaridade na polaridade, carga, solubilidade, hidrofobicidade, ou hidrofilicidade dos resíduos, contanto que a especificidade de ligação do sítio de ligação do ligante seja mantida. Um sítio de ligação pode existir em um ou mais domínios de ligação de ligante de uma proteína ou polipeptídeo.

5 Como aqui utilizado, o termo "interagir" refere-se a uma condição de proximidade entre um ligante ou composto, ou porções ou fragmentos do mesmo, e uma porção de uma segunda molécula de interesse. A interação pode ser não covalente, por exemplo, como um resultado de ponte de hidrogênio, interação de van der Waals, ou interações eletrostáticas ou hidrofóbicas, ou ela pode ser covalente.

10 Como aqui utilizado, um "ligante" refere-se a uma molécula ou composto ou entidade que interage com um sítio de ligação de ligante, incluindo substratos ou análogos ou partes dos mesmos. Como aqui descrito, o termo "ligante" pode referir a compostos que se ligam à proteína de interesse. Um ligante pode ser um agonista, um antagonista, ou um modulador. Ou, um ligante pode não ter efeito biológico. Ou, um ligante pode bloquear a ligação de outros ligantes, dessa forma inibindo um efeito biológico. Ligantes podem incluir, mas não são limitados a pequenas moléculas inibidoras. Essas pequenas moléculas podem incluir peptídeos, peptidomiméticos, compostos orgânicos e semelhantes. Ligantes podem também incluir polipeptídeos e/ou proteínas.

15 Como aqui utilizado, um "composto modulador" refere-se a uma molécula que muda ou altera a atividade biológica de uma molécula de interesse. Um composto modulador pode aumentar ou diminuir a atividade, ou mudar as características físicas ou químicas, ou propriedades funcionais ou imunológicas, da molécula de interesse. Para RAGE, um composto modulador pode aumentar ou diminuir a atividade, ou mudar as características, ou propriedades imunológicas da RAGE, ou uma porção da mesma. Um composto modulador pode incluir peptídeos naturais e/ou quimicamente sintetizados ou artificiais, peptídeos modificados (por exemplo, fosfopeptídeos), anticorpos, carboidratos, monossacarídeos, oligossacarídeos, polissacarídeos, glicolipídeos, compostos heterocíclicos, nucleosídeos ou nucleotídeos ou partes das mesmas e pequenas moléculas orgânicas ou inorgânicas. Um composto modulador pode ser um composto fisiológico endógeno ou ele pode ser um composto natural ou sintético. Ou, o composto modulador pode ser uma molécula orgânica pequena. O termo "composto modulador" também inclui um ligante ou composto quimicamente modificado, e incluem isômeros e formas racêmicas.

20 Um "agonista" comprehende um composto que se liga a um receptor para formar um complexo que elicitá uma resposta farmacológica específica ao receptor envolvido.

25 Um "antagonista" comprehende um composto que se liga a um agonista ou a um receptor para formar um complexo que não dá origem a uma resposta farmacológica substancial e pode inibir a resposta biológica induzida por um agonista.

Agonistas RAGE podem por este motivo se ligar à RAGE e estimular processos celulares mediados por RAGE, e antagonistas RAGE podem inibir processos mediados por RAGE sendo estimulados por um agonista RAGE. Por exemplo, em uma modalidade, o processo celular estimulado por agonistas de RAGE compreender ativação da transcrição do gene TNF- α .

O termo "peptídeos miméticos" refere-se a estruturas que como substitutas para peptídeos em interações entre moléculas (Morgan e colaboradores, 1989, Ann. Reports Med. Chem. 24:243-252). Peptídeos miméticos podem incluir estruturas sintéticas que podem ou não conter ligações de aminoácidos e/ou peptídeos que retém as características estruturais e funcionais de um peptídeo, ou agonista, ou antagonista. Peptídeos miméticos também incluem peptídios, oligopeptídios (Simon e colaboradores, 1972, Proc. Natl. Acad. Sci., EUA, 69:9367); e coleções de peptídeos contendo peptídeos de um comprimento designado representando todas as seqüências possíveis de aminoácidos correspondentes a um peptídeo, ou agonista ou antagonista da invenção.

O termo "tratamento" ou "tratar" refere-se ao aumento de um sintoma de uma doença ou desordem e pode compreender cura da doença, substancialmente prevenindo o início da doença, ou aumentando a condição do paciente. O termo "tratamento" como aqui utilizado, refere-se ao espectro inteiro de tratamento para uma dada doença a partir do que o paciente está sofrendo, incluindo alívio de um sintoma ou mais dos sintomas resultantes desta doença, uma cura a doença particular, ou prevenção do início da doença.

Como aqui utilizado, o termo "EC50" é definido com a concentração de um agente que resulta em 50% de um efeito biológico medido. Por exemplo, o EC50 de um agente terapêutico tendo um efeito biológico mensurável pode compreender o valor ao qual o agente demonstra 50% de efeito biológico.

Como aqui utilizado, o termo "IC50" é definido como a concentração de um agente que resulta em 50% de inibição de um efeito mensurável. Por exemplo, o IC50 de um ligante antagonista da RAGE compreende o valor ao qual o antagonista reduz a ligação do ligante ao sítio de ligação de RAGE em 50%.

Como aqui utilizado, uma "quantidade efetiva" significa a quantidade de um agente que é efetivo para produzir um efeito desejado em um paciente. O termo "quantidade terapeuticamente efetiva" denota que a quantidade de fármaco ou agente farmacêutico que elicitará resposta terapêutica de um animal ou humano que está procurando. A dose atual que compreende a quantidade efetiva pode depender da rota de administração, o tamanho e saúde do paciente, a doença ser tratada e semelhante.

O termo "veículo farmaceuticamente aceitável" como aqui utilizado pode referir-se aos compostos e composições que são adequados para uso em pacientes humanos ou animais, como por exemplo, para composições terapêuticas administradas para o tratamento

de doença ou desordem mediada por RAGE.

O termo "composição farmacêutica" é utilizado aqui para denotar uma composição que pode ser administrada a um hospedeiro mamífero, por exemplo, oralmente, parenteralmente, topicalmente, por inalação pulverização, intranasalmente, ou retalmente, em formulações de dose unitária contendo veículos convencionais não tóxicos, diluentes, adjuvantes, veículos e semelhantes.

O termo "parenteral" como aqui utilizado inclui injeções subcutâneas, intravenosas, intramusculares, injeção intracisternal, ou técnicas de infusão.

Como aqui utilizado "rejeição" refere-se a resposta imune ou inflamatória no tecido que leva a destruição de células, tecidos ou órgãos, ou que leva ao dano de células, tecidos ou órgãos. As células, tecido ou órgão rejeitados podem ser derivados a partir do mesmo paciente que está montando a resposta de rejeição, ou podem ser transplantados a partir de um paciente diferente em um paciente que é demonstrando rejeição.

Como aqui utilizado, o termo "célula" refere-se a unidades estruturais e funcionais de um sistema de mamífero vivo que cada uma compreende um sistema vivo independente. Como é conhecido na técnica, células incluem um núcleo, citoplasma, organelas intracelulares, e uma parede celular que confina a célula e permite a célula ser independente de outras células.

Como aqui utilizado, o termo "tecido" refere-se a um agregado de células que têm uma estrutura e função similar, ou que trabalha para fazer uma função particular. Um tecido pode incluir uma coleção de células similares e as substâncias intercelulares ao redor das células. Tecidos incluem, mas não são limitados a tecido muscular, tecido nervoso e ósseo.

Como aqui utilizado um "órgão" refere-se a uma unidade estrutural e funcional completamente diferenciada em um animal que é especializada para alguma função específica. Um órgão pode compreender um grupo de tecidos que desempenham uma função específica ou grupo de funções. Órgãos incluem, mas não são limitados a coração, pulmões, cérebro, olhos, estômago, baço, pâncreas, rins, fígado, intestinos, pele, útero, bexiga e ossos.

Uma formulação "estável" é uma em que a proteína de fusão RAGE na mesma essencialmente retém sua estabilidade física e química e atividade biológica sob estocagem. Várias técnicas analíticas para medir a estabilidade da proteína são disponíveis na técnica e são revisadas em Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc. Nova Iorque, NY, Pubs (1991) e Jones, A, Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90 (1993). Estabilidade pode ser medida em uma temperatura selecionada para um período de tempo selecionado. Para rápida seleção, a formulação pode ser mantida a 40°C por 1 semana a 1 mês, em cujo tempo a estabilidade é medida. Por exemplo, a extensão de agregação seguindo a lyophilização e estocagem podem ser utilizadas como um indicador de estabilidade

de proteína de fusão RAGE (ver Exemplos aqui). Por exemplo, uma formulação "estável" pode ser uma em que menos que 10% e preferivelmente menos que cerca de 5% da proteína de fusão RAGE está presente como um agregado na formulação. Em outras modalidades, um aumento na formulação agregada seguindo de liofilização e estocagem da formulação liofilizada pode ser determinada. Por exemplo, uma formulação liofilizada "estável" pode ser uma em que o aumento no agregado na formulação liofilizada é menor que cerca de 5% ou menos que 3%, quando a formulação liofilizada é incubada a 40oC por pelo menos uma semana. Em outras modalidades, estabilidade da formulação da proteína de fusão RAGE pode ser medida utilizando um ensaio de atividade biológica tal como um ensaio de ligação 5 como descrito aqui.

Uma formulação "reconstituída" é uma que tenha sido preparada por dissolução de uma formulação de proteína de fusão RAGE liofilizada em um diluente tal que a proteína de fusão RAGE é dispersa e/ou dissolvida na formulação reconstituída. A formulação reconstituída pode ser adequada para administração (por exemplo, administração parenteral) a um 10 paciente a ser tratado com a proteína de fusão e, em certas modalidades da invenção, pode ser uma que é adequada para administração subcutânea.

Por "isotônico" é entendido que a formulação de interesse tem uma pressão osmótica de cerca de 240 a cerca de 340 mOsm/kg. Em uma modalidade, uma formulação isotônica é uma tendo uma pressão osmótica que é essencialmente a mesma como sangue humano (285-310 mOsm/kg). Isotonicidade pode ser medida utilizando uma pressão de vapor ou uma depressão de ponto de congelamento tipo osmômetro.

Um "lioprotetor" é uma molécula que, quando combinada com uma proteína de fusão RAGE, significantemente previne ou reduz instabilidade química e/ou física da proteína sob liofilização e subsequente estocagem. Exemplos de lioprotetores incluem açúcares tais 15 como sacarose ou trealose; um poliol tal como álcool açúcar, por exemplo eritritol, arabinol, xilitol, sorbitol e manitol; ou combinações dos mesmos. Em uma modalidade, o lioprotetor pode compreender um açúcar. Em outra modalidade, o lioprotetor pode compreender um açúcar não redutor. Em uma modalidade adicional, o lioprotetor pode compreender um açúcar não redutor tal como sacarose. O lioprotetor pode ser adicionado à formulação pré- 20 liofilizada em uma "quantidade lioprotetora" que significa que, seguindo a formulação da proteína em presença de quantidade lioprotetora do lioprotetor, a proteína de fusão RAGE essencialmente retém sua estabilidade física e química e atividade biológica sob liofilização e estocagem.

O "diluente" para uma formulação liofilizada aqui é um que é farmaceuticamente aceitável (seguro e não tóxico para administração a um humano) e é útil para a preparação 25 de uma formulação reconstituída. Diluentes exemplares incluem água estéril, água bacteriostática para injeção (ABPI), uma solução de pH tamponado (por exemplo, solução salina

40
E

tamponada com fosfato), solução salina estéril, solução de Ringer ou solução de dextrose. Em uma modalidade, o diluente provê uma formulação reconstituída adequada para injeção. Em outra modalidade, onde o diluente provê uma formulação adequada para injeção, o diluente pode compreender água para injeção (API).

- 5 Um "conservante" para uma formulação reconstituída é um composto que pode ser adicionado ao diluente ou à formulação reconstituída para essencialmente reduzir a ação bacteriana na formulação reconstituída. Em uma modalidade, a quantidade de conservante pode ser adicionada em uma quantidade útil para facilitar a produção de uma formulação reconstituída multi-uso. Exemplos de potenciais conservantes incluem cloreto de octadenil-dimetilbenzilamônio, cloreto de hexametônio, cloreto de benzalcônio (uma mistura de cloreto de alquilbenzildimetilamônio em que os grupos alquil são compostos de cadeia longa), e cloreto de benzetônio. Outros tipos de conservantes incluem alcóois aromáticos tais como fenol, butil e benzil álcool, alil parabenos tais como metil ou propil parabeno, catecol, resorcinol, cicloexanol, 3-pentanol e m-cresol.
- 10 15 Um "agente de enchimento" para uma formulação liofilizada é um composto que adicionada massa à mistura liofilizada e contribui para a estrutura física do bolo liofilizado (por exemplo, facilita a produção de uma massa liofilizada essencialmente uniforme que mantém uma estrutura de poro aberta). Agentes de massa exemplares incluem, mas não são limitados a manitol, glicina e xorbitol.

20 **Proteínas de Fusão RAGE**

Modalidades da presente invenção compreendem proteínas de fusão RAGE, métodos de fazer tais proteínas de fusão, e métodos de uso de tais proteínas de fusão. A presente invenção pode ter modalidade em uma variedade de caminhos.

- 25 Por exemplo, modalidades da presente invenção provêm proteínas de fusão RAGE compreendendo um polipeptídeo RAGE ligado e um segundo polipeptídeo não RAGE. Em uma modalidade, a proteína de fusão RAGE pode compreender um sítio de ligação do ligante RAGE. Em uma modalidade, o sítio de ligação do ligante compreende o domínio mais N-terminal da proteína de fusão RAGE. O sítio de ligação do ligante RAGE pode compreender o domínio V de RAGE, ou uma porção da mesma. Em uma modalidade, o sítio de ligação do ligante RAGE compreende a SEQ ID NO:9 ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica a mesma, ou SEQ ID NO:10 ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica a mesma, ou SEQ ID NO:47 ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica a mesma (FIG 1).

- 30 35 Em uma modalidade, o polipeptídeo RAGE pode ser ligado a um polipeptídeo compreendendo um domínio de imunoglobulina ou uma porção (por exemplo, um fragmento da mesma) de um domínio de imunoglobulina. Em uma modalidade, o polipeptídeo compreendendo um domínio de imunoglobulina compreende pelo menos uma porção de pelo menos um dos domínios C_H2 ou o C_H3 de uma IgG humana.

- Em certas modalidades, a proteína de fusão RAGE compreende uma sequência de aminoácidos como revelado na SEQ ID NO:56 ou SEQ ID NO:57, ou uma sequência pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica a mesma. Por exemplo, em algumas modalidades, uma sequência pelo menos 90% idêntica a SEQ ID NO:56 ou SEQ ID NO:57 compreende a sequência de SEQ ID NO:56 ou SEQ ID NO:57 sem a lisina C-terminal.

Uma proteína ou polipeptídeo RAGE pode compreender uma proteína RAGE humana de comprimento completo (por exemplo, SEQ ID NO:1), ou um fragmento de uma RAGE humana. Como aqui utilizado, um fragmento de um polipeptídeo RAGE tem pelo menos de 5 aminoácidos de comprimento, pode ser maior que 30 aminoácidos no comprimento, mas é menor que a seqüência aminoácidica inteira. Em modalidades alternativas das proteínas de fusão, composições e métodos da presente invenção, o polipeptídeo RAGE pode compreender uma seqüência que é pelo menos cerca 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à RAGE humana, ou a um fragmento da mesma. Por exemplo, em uma modalidade, o polipeptídeo RAGE pode compreender RAGE humana, ou um fragmento da mesma, com Glicina como o primeiro resíduo em vez de uma Metionina (ver, por exemplo, Neeper e colaboradores, (1992)). Ou, a RAGE humana pode compreender RAGE de comprimento completo com o sinal de seqüência removido (por exemplo, SEQW ID NO:2 ou SEQ ID NO:3) (FIGS 1A e 1B) ou uma porção desta seqüência aminoácidica.

As proteínas de fusão RAGE da presente invenção podem também compreender RAGEs (por exemplo, SEQ ID NO:4), um polinucleotídeo pelo menos 90% idêntico à RAGEs, ou um fragmento de RAGEs. Como aqui utilizado, RAGEs é a proteína RAGE que não inclui a região transmembranar ou a cauda citoplasmática (Park e colaboradores, Nature Med. 4:1025-1031 (1998)). Por exemplo, com Glicina como o primeiro resíduo em vez de uma Metionina (Ver, por exemplo, Neeper e colaboradores, (1992)). Ou, um polipeptídeo RAGE pode compreender RAGEs humanas com a seqüência sinal removida (Ver, por exemplo, SEQ ID NO:5 ou SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:45 na FIG. 1) ou uma porção desta seqüência aminoácidica.

Em outras modalidades, a proteína RAGE pode compreender um domínio-V RAGE (ver, por exemplo, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, ou SEQ ID NO:46 na FIG. 1) (Neeper e colaboradores, (1992); Schmidt e colaboradores (1997)). Ou, uma seqüência pelo menos 90% idêntica ao domínio-V RAGE ou um fragmento do mesmo pode ser utilizado.

Ou, a proteína RAGE pode compreender um fragmento do domínio-V RAGE (por exemplo, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 ou SEQ ID NO:47 na FIG. 1). Em uma modalidade a proteína RAGE pode compreender um sítio de ligação de ligante. Em uma modalidade, o sítio de ligação do ligante pode compreender a SEQ ID NO:9, ou uma seqüência pelo me-

nos 90% idêntica a mesma, ou SEQ ID NO:10, ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica a mesma ou SEQ ID NO:47, ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a mesma. Em ainda outra modalidade, o fragmento RAGE é um peptídeo sintético.

Em outra modalidade, o sítio ligante do ligador pode compreender aminoácidos 23-53 da SEQ ID NO:1 (FIG 1). Em outra modalidade, o sítio de ligação do ligador pode compreender aminoácido 24-52 da SEQ ID NO:1. Em outra modalidade, o sítio de ligação do ligador pode compreender aminoácidos 31-52 da SEQ ID NO:1. Em outra modalidade, o sítio de ligação do ligador pode compreender aminoácidos 19-52 da SEQ ID NO:1. Por exemplo, o sítio de ligação do ligante pode compreender um domínio RAGE V ou uma porção 10 do mesmo tal como o domínio de ligação do ligador RAGE (por exemplo, aminoácidos 1-118, 23-118, 24-118, 1-116, 23-116, 24-116, 31-116, 1-54, 23-54, 24-54, 1-53, 23-53, 24-53, ou 31-53 da SEQ ID NO:1, ou fragmentos dos mesmos). Ou fragmentos de polipeptídeos que funcionalmente se ligam ao ligador RAGE podem ser utilizados. Ou, uma sequência pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao domínio RAGE 15 V ou um fragmento do mesmo (por exemplo, como descrito acima) pode ser utilizado. Ainda, como é conhecido na técnica, em modalidades onde o N-terminal da proteína de fusão é glutamina, como por exemplo sob remoção da sequência de sinal compreendendo resíduos 1-23 da SEQ ID NO:1 (por exemplo, Q24 para um polipeptídeo compreende aminoácidos 24-118 ou SEQ ID NO:1), a glutamina pode ciclizar para formar ácido piroglutâmico (pE).

Dessa maneira, o polipeptídeo RAGE utilizado nas proteínas de fusão RAGE da presente invenção pode compreender um fragmento de RAGE de comprimento inteiro. Como é conhecido na técnica, RAGE compreende três domínios polipeptídicos tipo imunoglobulina, o domínio V, e os domínios C1 e C2 são ligados um ao outro por um ligante interdomínio. RAGE de comprimento inteiro inclui um polipeptídeo transmembranar e uma cauda 20 citoplasmática "downstream" (C-terminal) do domínio C2, e ligado ao domínio C2.

Em uma modalidade, o polipeptídeo RAGE não inclui qualquer resíduo de seqüência sinalizadora. A seqüência sinalizadora de RAGE pode compreender os resíduos 1-22 ou resíduos 1-23 do RAGE de comprimento total. Ainda, como é conhecido na técnica, em modalidades onde o N-terminal da proteína de fusão é glutamina (por exemplo, 25 a sequência sinalizadora compreende resíduos 1-23), a glutamina N-terminal (Q24) pode ciclizar para formar ácido glutâmico (pE). Exemplos de construções de tais moléculas são polipeptídios tendo as sequências aminoácidas como revelado nas SEQ ID NOs: 45, 46, 47, 48, 49, 50 e 51 (FIG. 1), bem como proteínas de fusão RAGE tendo as sequências aminoácidas reveladas na SEQ ID NOs 56 e 57 (FIG. 4).

Como reconhecido na técnica, a região CH3 das proteínas de fusão RAGE da presente invenção podem ter aminoácidos C-terminais clivados através de uma modificação tradicional quando expressos em certos sistemas recombinantes. (Ver, por exemplo, Li et

al, BioProcessing J., 4; 23-30 (2005)). Em uma modalidade, o aminoácido C-terminal clivado é lisina (K). Então, em modalidades alternativas, a proteína de fusão RAGE da presente invenção pode compreender um polipeptídeo tendo a sequência aminoácidica como revelado na SEQ ID NOs: 32-37, 56 e 57 sem a lisina C-terminal (K).

5 Então em várias modalidades, o polipeptídeo RAGE pode compreender aminoácidos 23-116 de RAGE humana (SEQ ID NO:7) ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a mesma, ou aminoácidos 24-116 da RAGE humana (SEQ ID NO:8) ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a mesma, ou aminoácidos 24-116 da RAGE humana onde Q24 cicliza para formar pE (SEQ ID NO:46) ou uma sequência pelo menos 90% idêntica da mesma,

10 correspondendo ao domínio V da RAGE. Ou, o polipeptídeo RAGE pode compreender aminoácidos 124-221 da RAGE humana (SEQ ID NO:11) ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a mesma, correspondendo ao domínio C1 da RAGE. Em outra modalidade, o polipeptídeo RAGE pode compreender aminoácidos 227-317 da RAGE humana (SEQ ID NO:12) ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a mesma, correspondendo ao domínio

15 C2 da RAGE. Ou, o polipeptídeo RAGE pode compreender aminoácidos 23-123 da RAGE humana (SEQ ID NO:13) ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a mesma, ou aminoácidos 24-123 da RAGE humana (SEQ ID NO:14) ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a mesma, correspondendo ao domínio V da RAGE e um ligador interdomínio a jusante. Ou, o polipeptídeo RAGE pode compreender aminoácidos 24-123 da RAGE humana onde O24 cicliza para formar pE (SEQ ID NO:48) ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a mesma. Ou, o polipeptídeo RAGE pode compreender aminoácidos 23-226 da RAGE humana (SEQ ID NO:17) ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a mesma, ou aminoácidos 24-226 da RAGE humana (SEQ ID NO:18) ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a mesma, correspondendo ao domínio V, o domínio C1 e o ligador interdomínio ligando esses

20 dois domínios. Ou o polipeptídeo RAGE pode compreender aminoácidos 24-226 da RAGE humana onde Q24 cicliza para formar pE (SEQ ID NO:50), ou uma sequência de pelo menos 90% idêntica a mesma. Ou, o polipeptídeo RAGE pode compreender aminoácidos 23-339 da RAGE humana (SEQ ID NO:5) ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a mesma, ou 24-339 da RAGE humana (SEQ ID NO:6) ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a mesma, correspondendo a sRAGE (isto é, codificando os domínios V, C1 e C2 e ligadores interdomínios). Ou, o polipeptídeo RAGE pode compreender aminoácidos 24-339 da RAGE humana onde Q24 cicliza para formar pE (SEQ ID NO:45) ou uma sequência pelo menos 90% idêntica do mesmo. Ou, fragmentos de cada uma dessas sequências podem ser utilizados. Ver FIG 1, para sequências aminoácidicas desses polipeptídeos.

25 A proteína fusão RAGE pode incluir vários tipos de peptídeos que não são derivados de RAGE ou um fragmento da mesma. O segundo polipeptídeo da proteína de fusão RAGE pode compreender um polipeptídeo derivado a partir de uma imunoglobulina. Em

- uma modalidade, o polipeptídeo imunoglobulina pode compreender uma cadeia pesada da imunoglobulina ou uma porção (isto é, fragmento) da mesma. Por exemplo, o fragmento de cadeia pesada pode compreender um polipeptídeo derivado a partir do fragmento Fc de uma imunoglobulina em que o fragmento Fc compreende a dobradiça da cadeia pesada do polipeptídeo, e os domínios C_H2 e C_H3 da cadeia pesada da imunoglobulina como um monômero. A cadeia pesada (ou porção da mesma) pode ser derivada a partir de qualquer um dos isótopos de cadeia pesada conhecidos: IgG (γ), IgM (μ), IgD (δ), IgE (ε), ou IgA (α). Em adição, a cadeia pesada (ou porção da mesma) pode ser derivada a partir de qualquer um dos subtipos de cadeia pesada conhecidos: IgG1 (γ_1), IgG2 (γ_2), IgG3 (γ_3), IgG4 (γ_4), IgA1 (α_1), 5 IgA2 (α_2), ou mutações desses isótopos ou subtipos que alteram a atividade biológica. O segundo polipeptídeo compreende os domínios C_H2 e C_H3 de uma IgG1 humana ou porções de um ou ambos os domínios. Como um exemplo de modalidade, o polipeptídeo compreende os domínios C_H2 e C_H3 de uma IgG1 humana ou uma porção da mesma pode compreender a SEQ ID NO:40 (FIG 1) ou ma porção da mesma. Em uma modalidade, o polipeptídeo compreendendo os domínios CH2 e CH3 de uma IgG 1 humana, ou uma porção da mesma, podem compreender SEQ ID NO:38 ou um fragmento da mesma. O peptideo imunoglobulina pode ser codificado pela sequência de ácido nucléico de SEQ ID NO:39 ou SEQ ID NO:41 (FIG 1). A sequência imunoglobulina na SEQ ID NO:38 ou SEQ ID NO:40 pode também ser codificada pela SEQ ID NO:52 ou SEQ ID NO: 53 (FIG 1), onde a base silenciadora muda para os códons que codificam para prolina (CCG a CCC) e glicina (GGT a GGG) no C-terminal da sequência remove uma sítio de splice do RNA críptico perto do códon terminal (isto é, nucleotídeos 622-627 da SEQ ID NO:39 são modificados para gerar SEQ ID NO:52 ou nucleotídeos 652-657 da SEQ ID NO:41 são modificados para gerar SEQ ID NO:53).
- 10 15 20 25 30 35
- A região dobradiça da porção Fc da cadeia da imunoglobulina deve ser pró-inflamatória in vivo. Então, em uma modalidade, a proteína de fusão RAGE da presente invenção compreende um ligante interdomínio derivado de RAGE em vez de um interdomínio dobradiça de polipeptídeo derivado de uma imunoglobulina.
- Dessa certas modalidades, uma proteína de fusão RAGE compreende um polipeptídeo RAGE diretamente ligado a um polipeptídeo compreendendo um domínio C_H2 de uma imunoglobulina, ou um fragmento ou porção do domínio C_H2 de uma imunoglobulina. Em uma modalidade, o domínio C_H2, ou um fragmento do mesmo compreende a SEQ ID NO:42 (FIG 1). Em uma modalidade, o fragmento da SEQ ID NO:42 compreende SEQ ID NO:42 com os primeiros dez aminoácidos compreendendo pelo menos uma porção da região dobradiça de Fc removida. Em uma modalidade, o polipeptídeo RAGE pode compreender um sítio de ligação do ligante. O sítio de ligação do ligante RAGE pode compreender o domínio V da RAGE, ou uma porção do mesmo. Em uma modalidade, o sítio de ligação do ligante

RAGE compreende a SEQ ID NO:9 ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica a mesma, ou a SEQ ID NO:10 ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica da mesma, ou SEQ ID NO:47, ou uma sequência pelo menos 90% idêntica da mesma.

O polipeptídeo RAGE utilizado nas proteínas de fusão RAGE da presente invenção 5 pode compreender um domínio da imunoglobulina RAGE. Adicionalmente ou alternativa- mente, o fragmento da RAGE pode compreender um ligante interdomínio. Ou, o polipeptí- deo RAGE pode compreender um domínio da imunoglobulina RAGE ligado a um ligante in- terdomínio "upstream" (isto é, mais perto do N-terminal) ou "downstream" (isto é, mais perto do C-terminal). Em ainda outra modalidade, o polipeptídeo RAGE pode compreender dois 10 (ou mais) domínios de imunoglobulina RAGE cada ligado ao outro por um ligante interdomí- nio. O polipeptídeo RAGE pode ainda compreender múltiplos domínios de imunoglobulina RAGE ligada a cada um por um ou mais ligantes interdomínios e tendo um ligante interdo- mímio terminal ligado ao domínio N-terminal da imunoglobulina RAGE e/ou ao domínio C- terminal da imunoglobulina. Combinações adicionais dos domínios da imunoglobulina RAGE 15 e ligantes interdomínios estão dentro do objetivo da presente invenção.

Em uma modalidade, o polipeptídeo RAGE compreende um ligante interdomínio RAGE ligado a um domínio da imunoglobulina RAGE tal que o aminoácido C-terminal do domínio da imunoglobulina RAGE está ligado ao aminoácido N-terminal do ligante interdomínio e o aminoácido C-terminal do ligante interdomínio RAGE está diretamente ligado ao 20 aminoácido N-terminal de um polipeptídeo compreendendo um domínio C_H2 de uma imuno- globulina, ou um fragmento da mesma. O polipeptídeo compreendendo um domínio C_H2 de uma imunoglobulina pode compreender os domínios C_H2 e C_H3 de uma IgG1 humana ou uma porção de uma ou ambos os domínios. Como exemplo das modalidades, o polipeptídeo 25 compreendendo os domínios C_H2 e C_H3, ou uma porção dos mesmos, de uma IgG1 humana pode compreender a SEQ ID NO:40 ou uma porção da mesma. Em uma modalidade, o polipeptídeo pode compreender os domínios CH2 e CH3; de um IgG1, ou uma porção da mes- ma, pode compreender SEQ ID NO:38 ou um fragmento da mesma. Ou a IgG1 humana po- de compreender a SEQ ID NO:38 ou SEQ ID NO:40 com a lisana terminal (K) removida.

Como descrito acima, a proteína de fusão RAGE da presente invenção pode com- 30 preender um domínio único ou múltiplo de RAGE. Também, o polipeptídeo RAGE compre- endendo um ligante interdomínio ligado a um domínio polipeptídeo RAGE pode compreen- der um fragmento de proteína RAGE de comprimento total. Por exemplo, o polipeptídeo RAGE pode compreender aminoácidos 23-136 de RAGE humana (SEQ ID NO:15) ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica da mesma ou aminoácidos 24- 35 136 da RAGE humana onde Q24 cicliza para formar pE (SEQ ID NO:49), ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a mesma, correspondendo ao domínio V da RAGE e um ligante

interdomínio "downstream". Ou, o polipeptídeo RAGE podem compreender aminoácidos 23-251 da RAGE humana (SEQ ID NO:19) ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica a mesma, ou aminoácidos 24-251 da RAGE humana (SEQ ID NO:20) ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica a mesma, ou aminoácidos 24-251 da RAGE humana onde Q24 cicliza 5 para formar pE (SEQ ID NO:51), ou uma sequência pelo menos 90% idêntica da mesma, correspondendo ao domínio V, o domínio C1, o ligante interdomínio ligando esses dois domínios, e um segundo ligante interdomínio "downstream" de C1.

Por exemplo, em uma modalidade, a proteína de fusão RAGE pode compreender 10 dois domínios de imunoglobulinas derivados da proteína RAGE e dois domínios de imuno- globulinas derivados do polipeptídeo Fc humano. A proteína de fusão RAGE pode compreender 15 um primeiro domínio de imunoglobulina RAGE e um primeiro ligante interdomínio RAGE ligado a um segundo domínio da imunoglobulina RAGE e um segundo ligante interdomínio RAGE, tal que o aminoácido N-terminal do primeiro ligante interdomínio está ligado ao aminoácido C-terminal do primeiro domínio RAGE, o aminoácido N-terminal do segundo 20 domínio da imunoglobulina RAGE está ligado ao aminoácido C-terminal do primeiro ligante interdomínio, o aminoácido N-terminal do segundo ligante interdomínio está ligado ao aminoácido C-terminal do segundo domínio da imunoglobulina RAGE, e o aminoácido C-terminal do segundo ligante interdomínio RAGE está diretamente ligado ao aminoácido N-terminal do domínio da imunoglobulina C_H2. Em modalidades alternativas, um quarto domínio da proteína de fusão RAGE é codificado por SEQ ID NO:30 ou SEQ ID NO:54 (FIG 2). Em modalidades alternativas, um quarto domínio da proteína fusão RAGE compreende SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34 ou SEQ ID NO:56 (FIG 4).

Alternativamente, um terceiro domínio da proteína de fusão RAGE pode compreender 25 um domínio da imunoglobulina derivado de RAGE e dois domínios de imunoglobulinas derivados de um polipeptídeo Fc humano. Por exemplo, a proteína de fusão RAGE pode compreender um domínio de imunoglobulina RAGE único ligado através de um ligante interdomínio RAGE ao aminoácido N-terminal de um domínio de imunoglobulina C_H2 ou uma porção de um domínio da imunoglobulina C_H2. Em uma modalidade, um terceiro domínio da proteína de fusão RAGE pode compreender a SEQ ID NO:35. Em modalidades alternativas, 30 um terceiro domínio da proteína de fusão RAGE é codificado pela SEQ ID NO:31 ou SEQ ID NO:55 (FIG 3). Em uma modalidade, um terceiro domínio da proteína de fusão RAGE é codificado pela SEQ ID NO:35 (FIG 5). Em modalidades alterativas, um terceiro domínio da proteína de fusão RAGE é codificado pela SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37 ou SEQ ID NO:57 (FIG 5).

35 Um fragmento de ligante interdomínio RAGE pode compreender uma seqüência de peptídeo que é naturalmente "downstream" de, e dessa forma, ligada a um domínio de imunoglobulina RAGE. Por exemplo, para o domínio V RAGE, o ligante interdomínio pode com-

compreender seqüências de aminoácidos que são naturalmente "downstream" a partir do domínio V. Em uma modalidade, o ligante pode compreender a SEQ ID NO:21, correspondendo aos aminoácidos 117-123 da RAGE de comprimento total. Ou, o ligante pode compreender um peptídeo tendo porções adicionais da seqüência RAGE natural. Por exemplo, um ligante interdomínio compreendendo vários aminoácidos (por exemplo, aminoácidos 1-3, 1-5, ou 1-10, ou 1-15) "a montante" e "a jusante" da SEQ ID NO:21 podem ser utilizados. Dessa forma, em uma modalidade, o ligante interdomínio compreende a SEQ ID NO:23 compreendendo aminoácidos 117-136 da RAGE de comprimento total. Ou, fragmentos da SEQ ID NO:21 suprimindo, por exemplo, 1, 2, ou 3 aminoácidos de cada final do ligante pode ser utilizado. Em modalidades alternativas, o ligante pode compreender um peptídeo que é pelo menos 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica a SEQ ID NO:21 ou SEQ ID NO:23.

Para o domínio RAGE C1, o ligante pode compreender seqüência peptídica que é naturalmente "downstream" do domínio C1. Em uma modalidade, o ligante pode compreender a SEQ ID NO:22, correspondendo aos aminoácidos 222-251 da RAGE de comprimento total. Ou, o ligante pode compreender um peptídeo tendo porções adicionais da seqüência RAGE natural. Por exemplo, um ligante compreendendo vários aminoácidos "upstream" e "downstream" (aminoácidos 1-3, 1-5, ou 1-10, 1-15) da SEQ ID NO:22 podem ser utilizados, suprimindo por exemplo, aminoácidos 1-3, 1-5, ou 1-10, ou 1-15 de cada terminação do ligante. Por exemplo, em uma modalidade, um ligante interdomínio RAGE pode compreender a SEQ ID NO:24, correspondendo aos aminoácidos 222-226. Em modalidades alternativas, o ligador pode compreender um peptídeo que é pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica a SEQ ID NO:22 ou SEQ ID NO:24.

Ou um ligador interdomínio pode compreender SEQ ID NO:44, correspondendo aos aminoácidos RAGE 318-342. Em modalidades alternativas, o ligador pode compreender um peptídeo que é pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntico a SEQ ID NO:44.

Além disso, um versado na técnica reconhecerá que substituições, deleções ou adições individuais que altera, adicionam ou deletam um aminoácido único ou uma pequena porcentagem de aminoácidos (tipicamente menos que cerca de 5%, mais tipicamente menos que cerca de 1%) em uma sequência codificada são conservativamente modificadas variações onde as alterações resultam na substituição de um aminoácido com um aminoácido quimicamente similar. Tabelas de substituições conservativas provendo aminoácidos funcionalmente similares são bem conhecidas na técnica. Os seguintes grupos de exemplos contêm aminoácidos que são substituições conservativas para um outro:

- 1) Alanina(A), Serina (S), Treonina (T);
- 2) Ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E);

- 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); e
- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptofano (W),

5 Uma substituição conservativa é uma substituição em que o aminoácido substituído (naturalmente ocorrendo ou modificado) é estruturalmente relacionado ao aminoácido sendo substituído, isto é, tem cerca do mesmo tamanho e propriedades eletrônicas como o aminoácido sendo substituído. Então, o aminoácido de substituição pode ter o mesmo grupo funcional ou similar na cadeia lateral como o aminoácido original. Uma "substituição conservativa" também refere-se a utilização um aminoácido de substituição que é idêntica para o aminoácido sendo substituído exceto que um grupo funcional na cadeia lateral é protegido com um grupo protetor adequado.

Como é conhecido na técnica, aminoácidos podem se tornar quimicamente modificados a partir da estrutura natural, ou por mecanismos de reação enzimática ou não enzimática. Por exemplo, em uma modalidade, um ácido glutâmico N-terminal ou glutamina pode ciclizar, com perda de água, para formar ácido piroglutâmico (piroE ou pE) (Chelius et al, Anal. Chem. 78:2370-2376 (2006) e Burstein et al, Proc. National Acad. Sci. 73:1604-2608 (1976)). Alternativamente, uma proteína tendo um ácido piroglutâmico N-terminal pode potencialmente ser acessado através de uma sequência de ácido nucléico codificando para ácido glutâmico na posição na proteína que através de processo pós-traducional se torna o N-terminal (por exemplo, onde o resíduo 24 da SEQ ID NO:1 é glutamato ao invés de uma glutamina).

Métodos de Produção das Proteínas de Fusão RAGE

A presente invenção também compreende um método para fazer a proteína de fusão RAGE. Dessa forma, em uma modalidade, a presente invenção compreender um método de fazer uma proteína de fusão RAGE compreendendo o passo de ligar covalentemente um polipeptídeo RAGE ligado a um segundo, polipeptídeo não RAGE, em que o polipeptídeo RAGE compreende um sítio de ligação do ligante RAGE. Por exemplo, o polipeptídeo RAGE ligado e o segundo polipeptídeo não RAGE podem ser codificados por um DNA recombinante construído. O método pode ainda compreender o passo de incorporação do DNA construído em um vetor de expressão. Também, o método pode compreender o passo de inserir o vetor de expressão em uma célula hospedeira.

Por exemplo, modalidades da presente invenção provêm proteínas de fusão RAGE compreendendo um polipeptídeo RAGE ligado a um segundo polipeptídeo não RAGE. Em uma modalidade, a proteína de fusão RAGE pode compreender um sítio de ligação ao ligante RAGE. Em uma modalidade, o sítio de ligação do ligante compreende o domínio N-terminal de uma proteína de fusão RAGE. O sítio de ligação do ligante RAGE pode compre-

ender o domínio V da RAGE, ou uma porção do mesmo. Em uma modalidade, o sítio de ligação do ligante RAGE compreende a SEQ ID NO:9 ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica a mesma, ou a SEQ ID NO:10 ou uma seqüência pelo menos idêntica 90% idêntica a mesma, ou SEQ ID NO:47, ou uma sequência de pelo menos 90% idêntica do mesmo.

5 Em uma modalidade, o polipeptídeo RAGE pode ser ligado a um polipeptídeo compreendendo um domínio de imunoglobulina ou uma porção (por exemplo, um fragmento do mesmo) de um domínio de imunoglobulina. Em uma modalidade, o polipeptídeo compreendendo um domínio de imunoglobulina compreende pelo menos uma porção de pelo menos um dos domínios C_H2 ou o C_H3 de uma IgG humana.

10 Então, modalidades da presente invenção pode compreender moléculas de DNA isolado que codifica as proteínas de fusão RAGE que codifica as proteínas de fusão RAGE da presente invenção. Em certas modalidades, as moléculas de DNA codificam para a proteína fusão RAGE compreendendo uma sequência aminoácida como revelado na SEQ ID NO:56 ou SEQ ID NO:57, ou uma sequência pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% iy 99% idêntica da mesma. Por exemplo, em algumas modalidades, a sequência pelo menos 90% idêntica a SEQ ID NO:56 ou SEQ ID NO:57 compreende a sequência de SEQ ID NO:56 ou SEQ ID NO:57 sem a lisina C-terminal. Ental, em certas modalidades, a presente invenção pode compreender uma molécula de DNA tendo a sequência revelada na SEQ ID NO:54 ou SEQ ID NO:55, ou uma sequência pelo menos 70%, 75%, 80% 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica da mesma.

15

20 A proteína de fusão RAGE pode ser construída por técnicas de DNA recombinante. Por exemplo, em uma modalidade, a presente invenção pode compreender uma seqüência de ácido nucléico isolada compreendendo, complementar a, ou tendo identidade significante com uma seqüência polinucleotídica que codifica para um polipeptídeo RAGE ligado a um segundo polipeptídeo não RAGE. Em uma modalidade, o polipeptídeo RAGE pode compreender um sítio de ligação do ligante RAGE.

25

30 A proteína ou polipeptídeo RAGE pode compreender RAGE humana de comprimento total (por exemplo, SEQ ID NO:1), o um fragmento da RAGE humana. Em uma modalidade, o polipeptídeo RAGE não inclui qualquer resíduo de seqüências sinalizadoras. A 35 seqüência sinalizadora de RAGE pode compreender ou resíduos 1-22 ou resíduos 1-23 da RAGE de comprimento total (SEQ ID NO:1). Em modalidades alternativas, o polipeptídeo RAGE pode compreender uma seqüência pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas à RAGE humana, ou um fragmento da mesma. Por exemplo, em uma modalidade, o polipeptídeo RAGE pode compreender RAGE humana, ou um fragmento da mesma, com Glicina como o primeiro resíduo em vez de Metionina (ver, por exemplo, Nepper e colaboradores (1992)). Ou, a RAGE humana pode compreender a RAGE de tamanho completo com a seqüência sinalizadora removida (por exemplo, SEQ ID

NO:2 ou SEQ ID NO:3) (FIGS. 1A e 1B) ou uma porção desta seqüência aminoácida. As proteínas de fusão RAGE da presente invenção podem também compreender RAGEs (por exemplo, SEQ ID NO:4), um polipeptídeo pelo menos 90% idêntico às RAGEs, ou um fragmento de RAGEs. Por exemplo, o polipeptídeo RAGE pode compreender RAGEs humanas, 5 ou fragmentos das mesmas, com Glicina como o primeiro resíduo em vez de Metionina (ver, por exemplo, Nepper e colaboradores (1992)). Ou, a RAGE humana pode compreender RAGEs com a seqüência sinalizadora removida (Ver, por exemplo, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:45 na FIG. 1) ou uma porção desta seqüência aminoácida. Em outras modalidades, a proteína RAGE pode compreender um domínio V (Ver, por exemplo, SEQ ID 10 NO:7, SEQ ID NO:8 ou SEQ ID NO:46 na FIG 1). Ou, uma seqüência pelo menos 90% idêntica ao domínio V ou um fragmento da mesma pode ser utilizado. Ou, a proteína RAGE pode compreender um fragmento de RAGE compreendendo uma porção do domínio V (Ver, por exemplo, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 ou SEQ ID NO:47 na FIG. 1). Em uma modalidade, o sítio de ligação do ligante pode compreender a SEQ ID NO:9, ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica a mesma, ou SEQ ID NO:10, ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica a mesma, ou SEQ ID NO:47, ou uma sequência pelo menos 90% idêntica do mesmo. Em 15 ainda outra modalidade, o fragmento RAGE é um peptídeo sintético.

Em uma modalidade, a seqüência de ácido nucléico compreende a SEQ ID NO:25 para codificar aminoácidos 1-118 da RAGE humana ou um fragmento da mesma. Por exemplo, uma seqüência compreendendo os nucleotídeos 1-348 da SEQ ID N O:25 pode ser utilizada para codificar os aminoácidos 1-116 da RAGE humana. Ou, o ácido nucléico pode compreender a SEQ ID NO:26 para codificar os aminoácidos 1-123 da RAGE humana. Ou, o ácido nucléico pode compreender a SEQ ID NO:27 para codificar os aminoácidos 1-136 da RAGE humana. Ou, o ácido nucléico pode compreender a SEQ ID NO:28 para codificar os aminoácidos 1-230 da RAGE humana. Ou, o ácido nucléico pode compreender a SEQ ID 20 NO:29 para codificar aminoácidos 1-251 da RAGE humana. Os fragmentos dessas seqüências de ácidos nucléicos podem ser utilizados para codificar os fragmentos de polipeptídeo RAGE.

A proteína de fusão RAGE pode incluir vários tipos de peptídeos que não são derivados da RAGE ou um fragmento da mesma. O segundo polipeptídeo da proteína de fusão RAGE pode compreender um polipeptídeo derivado de uma imunoglobulina. A cadeia pesada (ou porção da mesma) pode ser derivada de qualquer um dos isótopos de cadeia pesada conhecidos: IgG (γ), IgM (μ), IgD (δ), IgE (ϵ), ou IgA (α). Em adição, a cadeia pesada (ou porção da mesma) pode ser derivada a partir de qualquer um dos subtipos de cadeia pesada conhecidos: IgG1 ($\gamma 1$), IgG2 ($\gamma 2$), IgG3 ($\gamma 3$), IgG4 ($\gamma 4$), IgA1 ($\alpha 1$), IgA2 ($\alpha 2$), ou mutações desses isotipos ou subtipos que alteram a atividade biológica. O segundo polipeptídeo pode 30 35 compreender os domínios C_H2 e C_H3 de uma IgG1 ou uma porção de um ou ambos desses

domínios. Como um exemplo de modalidades, o polipeptídeo compreendendo os domínios C_H2 e C_H3 da IgG1 humana ou uma porção da mesma pode compreender a SEQ ID NO: 38 ou SEQ ID NO:40. Em uma modalidade, o polipeptídeo compreendendo os domínios C_H2 e C_H3 de uma IgG1 humana, ou uma porção da mesma, pode compreender SEQ ID NO:38 ou 5 um fragmento do mesmo. O peptídeo da imunoglobulina pode ser codificado pela seqüência de SEQ ID NO:39 ou SEQ ID NO:41. Em modalidades alternativas, a sequência de imuno-globulina na SEQ ID NO:38 ou SEQ ID NO:40 pode também ser codificada pela SEQ ID NO:52 ou SEQ ID NO:53, respectivamente.

A região da dobradiça da porção Fc da cadeia da imunoglobulina pode ser pró-inflamatória in vivo. Dessa forma, a proteína de fusão RAGE da presente invenção pode 10 compreender um ligante interdomínio derivado da RAGE em vez de um interdomínio da dobradiça do polipeptídeo derivado de uma imunoglobulina.

Dessa forma, em uma modalidade, a presente invenção compreende um método de fazer uma proteína de fusão RAGE compreendendo o passo de ligar covalentemente um 15 polipeptídeo RAGE a um polipeptídeo compreendendo um domínio C_H2 de uma imunoglobulina ou uma porção de um domínio C_H2 de uma imunoglobulina. Em uma modalidade, a proteína de fusão RAGE pode compreender um sítio de ligação de um ligante RAGE. O sítio de ligação do ligante RAGE pode compreender o domínio V da RAGE, ou uma porção do mesmo. Em uma modalidade, o sítio de ligação do ligante RAGE compreende a SEQ ID 20 NO:9 ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica da mesma, ou a SEQ ID NO:10 ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica a mesma, ou SEQ ID NO:47, ou uma sequência pelo menos 90% idêntica da mesma.

Em uma modalidade, a proteína de fusão RAGE pode ser codificada por uma construção de DNA recombinante. O método pode compreender o passo de incorporar a construção de DNA em um vetor de expressão. Também, o método pode compreender transfectar o vetor de expressão em uma célula do hospedeiro. Então, modalidades da presente invenção também compreendendo vetores de expressão codificando moléculas de DNA que codificam as proteínas de fusão de RAGE da presente invenção. Em certas modalidades, as moléculas de DNA codificam para uma proteína de fusão RAGE compreendendo uma sequência aminoácida como revelado na SEQ ID NO:56 ou SEQ ID NO: 57, ou uma sequência pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica a mesma. Por exemplo, em algumas modalidades, uma sequência de pelo menos 90% idêntica a SEQ 30 ID NO:56 ou uma SEQ ID NO:57 compreendendo a sequência de SEQ ID NO:56 ou SEQ I DNO:57 sem a lisina C-terminal.

35 Ainda outras modalidades da presente invenção também compreendem células transfetadas com um vetor de expressão codificando moléculas de DNA que codificam as proteínas de fusão RAGE da presente invenção. Em certas modalidades, as moléculas DNA

- codifica para uma proteína de fusão RAGE compreendendo uma sequência aminoácida como revelado na SEQ ID NO:56 ou SEQ ID NO:57, ou uma sequência pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96% 97%, 98% ou 99% idêntica da mesma. Por exemplo, em algumas modalidades, uma sequência pelo menos 90% idêntica a SEQ ID NO:56 ou SEQ ID NO:57 compreende a sequência de SEQ ID NO:56 ou SEQ ID NO:57 sem a lisina C-terminal.

Por exemplo, em uma modalidade, a presente invenção compreende um ácido nucléico codificando um polipeptídeo RAGE diretamente ligado a um polipeptídeo compreendendo um domínio CH2 de uma imunoglobulina, ou um fragmento da mesma. Em uma modalidade, o domínio CH2, ou um fragmento do mesmo, compreende a SEQ ID NO:42. Em uma modalidade, o fragmento da SEQ ID NO:42 compreende SEQ ID NO:42 com os primeiros 10 aminoácidos removidos. O segundo polipeptídeo pode compreender os domínios CH2 e CH3 de uma IgG1. Como exemplo de modalidades, o polipeptídeo compreendendo os domínios CH2 e CH3 de uma IgG1 humana podem compreender as SEQ ID NO:38 ou um fragmento do mesmo. O peptídeo da imunoglobulina pode ser codificado pela seqüência de ácido nucléico de SEQ ID NO:39 ou SEQ ID NO:41. A sequência de imunoglobulina na SEQ ID NO:38 ou SEQ ID NO:40 pode também ser codificado pela SEQ ID NO:52 ou SEQ ID NO:53, onde a base silenciadora muda para os códons que codifica para prolina (CCG a CCC) e glicina (GGT a GGG) no C-terminal da sequência remove um sítio splice de RNA críptico perto do códon terminal (isto é, nucleotídeos 622-627 da SEQ ID NO:39 são modificadas para gerar SEQ ID NO:52 ou nucleotídeos 652-657 de SEQ ID NO:41 são modificada para gerar SEQ ID NO:53).

Em uma modalidade, o polipeptídeo RAGE pode compreender um ligante interdomínio RAGE ligado a um domínio de imunoglobulina RAGE tal que o aminoácido C-terminal da imunoglobulina RAGE está ligado ao aminoácido N-terminal do ligante interdomínio, e o aminoácido C-terminal do ligante interdomínio RAGE está diretamente ligado ao aminoácido N-terminal de um polipeptídeo compreendendo um domínio CH2 de uma imunoglobulina, ou um fragmento do mesmo. O polipeptídeo compreendendo um domínio CH2 de uma imunoglobulina, ou uma porção do mesmo, pode compreender um polipeptídeo compreendendo os domínios CH2 e CH3 de uma IgG1 humana ou uma porção de ambos, ou desses domínios. Como exemplo de modalidades, o polipeptídeo compreendendo os domínios CH2 e CH3 de uma IgG1 humana, ou uma porção da mesma, pode compreender a SEQ ID NO:38 ou SEQ ID NO:40. Em uma modalidade, o polipeptídeo compreendendo os domínios CH2 e CH3 de uma IgG1 humana, ou uma porção da mesma, pode compreender SEQ ID NO:38 ou um fragmento da mesma. Em certas modalidades, o polipeptídeo compreendendo os domínios CH2 e CH3 de uma IgG1 humana, ou uma porção do mesmo, podem compreender SEQ ID NO:38 ou SEQ ID NO:40 com a lisina C-terminal (K) removida.

A proteína de fusão RAGE da presente invenção pode compreender um domínio único ou múltiplo da RAGE. Também, o polipeptídeo RAGE compreendendo um ligante interdomínio ligado a um domínio da imunoglobulina RAGE pode compreender um fragmento de uma proteína RAGE de comprimento total. Por exemplo, em uma modalidade, a proteína de fusão RAGE pode compreender dois domínios de imunoglobulinas derivados da proteína RAGE e dois domínios de imunoglobulinas derivados de um polipeptídeo Fc humano. A proteína de fusão RAGE pode compreender um primeiro domínio de imunoglobulina RAGE e um segundo ligante interdomínio RAGE, tal que o aminoácido N-terminal do primeiro ligante interdomínio está ligado ao aminoácido C-terminal do primeiro domínio da imunoglobulina RAGE, o aminoácido N-terminal do segundo domínio da imunoglobulina RAGE está ligado ao aminoácido C-terminal do primeiro ligante interdomínio, o aminoácido N-terminal do segundo ligante interdomínio está ligado ao aminoácido C-terminal do segundo domínio da imunoglobulina RAGE, e o aminoácido C-terminal do segundo ligante interdomínio RAGE está diretamente ligado ao aminoácido N-terminal do polipeptídeo compreendendo um domínio C_H2 da imunoglobulina ou um fragmento do mesmo. Por exemplo, o polipeptídeo RAGE pode compreender aminoácidos 23-251 da RAGE humana (SEQ ID NO:19) ou uma seqüência 90% idêntica a mesma, ou aminoácidos 24-251 da RAGE humana (SEQ ID NO:20) ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica a mesma, ou aminoácidos 24-251 da RAGE humana onde Q24 cicliza para formar pE (SEQ ID NO:51) ou uma sequência pelo menos 90% idêntica da mesma, correspondendo ao domínio V, o domínio C1, o ligante interdomínio ligando esses dois domínios, e um segundo ligante interdomínio "downstream" de C1. Em uma modalidade, um ácido nucléico construído compreendendo a SEQ ID NO:30 ou um fragmento da mesma pode codificar um quarto domínio da proteína de fusão RAGE (FIG. 2A). Em outra modalidade, contrução de ácido nucléico compreendendo SEQ ID NO:54 (FIG. 2B) pode codificar para um quarto domínio da proteína de fusão RAGE, onde base silencionadora muda para os códons que codificam para prolina (CCG a CCC) e glicina (GGT a GGG) no C-terminal da sequência são iniciador para remover o sítio splice do RNA críptico perto do códon terminal (isto é, nucleotídeos 1375-1380 da SEQ ID NO:30 são modificadas para gerar SEQ ID NO:54).

Alternativamente, um terceiro domínio da proteína de fusão RAGE pode compreender um domínio de imunoglobulina derivado de RAGE e dois domínios da imunoglobulina derivados de um polipeptídeo Fc humano. Por exemplo, a proteína de fusão RAGE pode compreender um domínio de imunoglobulina RAGE único através de um ligante interdomínio RAGE ao aminoácido N-terminal do polipeptídeo compreendendo um domínio C_H2 da imunoglobulina ou um fragmento do mesmo. Por exemplo, o polipeptídeo RAGE pode compreender os aminoácidos 23-136 da RAGE humana (SEQ ID NO:15) ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica a mesma ou os aminoácidos 24-136 da RAGE humana (SEQ ID

NO:16) ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica a mesma, ou aminoácidos 24-136 da RAGE humana onde Q24 cicliza para formar pE (SEQ ID NO:49) ou uma sequência pelo menos 90% idêntica da mesma, correspondendo ao domínio V da RAGE e um ligante interdomínio "a jusante" (FIG 1). Em uma modalidade, um ácido nucléico construído compreendendo a SEQ ID NO:31 ou um fragmento da mesmo pode codificar para um terceiro domínio da proteína de fusão RAGE (FIG 3A). Em outra modalidade, construção de ácido nucléico compreendendo da SEQ ID NO:55 pode codificar para os três domínios da proteína de fusão RAGE, onde mudanças da base silenciadora para códons que codificam para prolina (CCG a CCC) e glicina (GGT a GGG) no C-terminal da seqüência remove o sítio splice to RNA críptico perto do códon terminal (isto é, nucleotídeos 1030-1035 da SEQ ID NO:31 são modificadas gerar SEQ ID NO:55) (FIG 3B).

Um fragmento ligante interdomínio RAGE pode compreender uma seqüência de peptídeo que é naturalmente "downstream" de, e então, ligada a um domínio da imunoglobulina RAGE. Por exemplo, para o domínio V RAGE, o ligante interdomínio pode compreender seqüências aminoácidas que são naturalmente "downstream" do domínio V. Em uma modalidade, o ligante pode compreender a SEQ ID NO:21, correspondendo aos aminoácidos 117-123 da RAGE de comprimento total. Ou, o ligante pode compreender um peptídeo tendo porções adicionais da seqüência RAGE natural. Por exemplo, um ligante interdomínio compreendendo vários aminoácidos "a montante" e "a jusante" (por exemplo, aminoácidos 1-3, 1-5, ou 1-10, ou 1-15) da SEQ ID NO:21 pode ser utilizada. Desse modo, em uma modalidade, o ligante interdomínio compreende a SEQ ID NO:23 compreendendo os aminoácidos 117-136 da RAGE de comprimento total. Ou, fragmentos da SEQ ID NO:21 suprimindo, por exemplo, aminoácidos 1, 2, ou 3 da terminalização do ligante podem ser utilizados. Em modalidades alternativas, o ligante pode compreender uma seqüência que é pelo menos 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à SEQ ID NO:21 ou SEQ ID NO:23.

Para o domínio C1 da RAGE, o ligante pode compreender uma seqüência peptídica que é naturalmente "downstream" do domínio C1. Em uma modalidade, o ligante pode compreender a SEQ ID NO:22, correspondendo aos aminoácidos 222-251 da RAGE de comprimento total. Ou, o ligante pode compreender um peptídeo tendo porções adicionais da seqüência RAGE natural. Por exemplo, um ligante compreendendo vários aminoácidos "upstream" e "downstream" (aminoácidos 1-3, 1-5, ou 1-10, ou 1-15) da SEQ ID NO:22 podem ser utilizados. Ou, fragmentos da SEQ ID NO:22 podem ser utilizados, suprimindo por exemplo, aminoácidos 1-3, 1-5, ou 1-10, ou 1-15 da terminalização do ligante. Por exemplo, em uma modalidade, o ligante interdomínio RAGE pode compreender a SEQ ID NO:24, correspondendo aos aminoácidos 222-226. Em uma modalidade alternativa, o ligador pode compreender uma seqüência que é pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica a SEQ ID NO:22 ou SEQ ID NO:24.

Ou um ligante interdomínio pode compreender a SEQ ID NO:44, correspondendo aos aminoácidos RAGE 318-342. Em uma modalidade alternativa, o ligador pode compreender uma sequência que é pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica a SEQ ID NO:44.

- 5 O método pode ainda compreender o passo de incorporação do DNA construído em um vetor de expressão. Desse modo em uma modalidade da presente invenção compreende um vetor de expressão que codifica para uma proteína de fusão RAGE compreendendo um polipeptídeo RAGE diretamente ligado a um polipeptídeo compreendendo um domínio C_H2 de uma imunoglobulina ou uma porção de um domínio C_H2 de uma imunoglobulina. Em
10 uma modalidade, o polipeptídeo RAGE compreende construções, tais como aquelas descritas aqui, tendo o ligante interdomínio RAGE ligado a um domínio da imunoglobulina RAGE tal que o aminoácido C-terminal do domínio da imunoglobulina RAGE está ligado ao aminoácido N-terminal do ligante-interdomínio, e o aminoácido C-terminal do ligante interdomínio RAGE está diretamente ligado ao aminoácido N-terminal de um polipeptídeo compreendendo
15 um domínio C_H2 de uma imunoglobulina, ou uma porção da mesma. Por exemplo, o vetor de expressão utilizado para transfectar as células pode compreender a seqüência de ácido nucléico de SEQ ID NO:30, ou um fragmento da mesma, SEQ ID NO:54, ou um fragmento da mesma, SEQ ID NO:31, ou um fragmento da mesma, ou SEQ ID NO:55 ou um fragmento da mesma.
20 O método pode ainda compreender o passo de transfectar uma célula com o vetor de expressão da presente invenção. Dessa forma, em uma modalidade, a presente invenção compreende uma célula transfetada com o vetor de expressão que expressa a proteína de fusão RAGE da presente invenção, tal que a célula expressa uma proteína de fusão RAGE compreendendo um polipeptídeo RAGE diretamente ligado a um polipeptídeo compreendendo um domínio C_H2 de uma imunoglobulina ou uma porção de um domínio C_H2 de
25 uma imunoglobulina. Em uma modalidade, o polipeptídeo RAGE compreende construções, tais como aquelas aqui descritas, tendo um ligante interdomínio RAGE ligado a um domínio de imunoglobulina RAGE tal que o aminoácido C-terminal do domínio de imunoglobulina RAGE está ligado ao aminoácido N-terminal do ligante interdomínio, e o aminoácido C-terminal do ligante interdomínio RAGE está diretamente ligado ao aminoácido N-terminal de
30 um polipeptídeo compreendendo um domínio C_H2 de uma imunoglobulina, ou uma porção do mesmo. Por exemplo, o vetor de expressão pode compreender a seqüência de ácido nucléico SEQ ID NO:30, ou um fragmento da mesma, SEQ ID NO:54, ou um fragmento da mesma, SEQ ID NO:31, ou um fragmento da mesma, ou SEQ ID NO:55, ou um fragmento da mesma.
35

Por exemplo, plasmídeos podem ser construídos para expressar as proteínas de fusão RAGE-IgG Fc por fusão de diferentes comprimentos de uma seqüência 5' de cDNA de

RAGE humana com uma seqüência 3' de cDNA da IgG1 Fc ($\gamma 1$) humana. A expressão de seqüências cassete pode ser inserida em um vetor de expressão tal como vetor de expressão pcDNA3.1 (Invitrogen, CA) utilizando técnicas recombinantes padrões.

Também, o método pode compreender transfecção do vetor de expressão em uma célula hospedeira. Proteínas de fusão RAGE podem ser expressas em sistemas de expressão de mamíferos, incluindo sistemas em que a expressão de construções são introduzidas em células mamíferas utilizando vírus tais como retrovírus ou adenovírus. Linhagens de células mamíferas disponíveis como hospedeiros para expressão são bem conhecidos na técnica e incluem muitas linhagens celulares imortalizadas disponíveis a partir da Coleção de Cultura do Tipo Americana (ATCC). Esses incluem, por exemplo, células de Ovário de Hamster Chinês (CHO), NS0, células SP2, células HeLa, células de rim de hamster bebê (BHK), células de rim de macaco (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por exemplo, Hep G2), células A549, e um número de outras linhagens celulares. Linhagens celulares podem ser selecionadas através de determinação das quais linhagens celulares têm altos níveis de expressão de uma proteína de fusão RAGE. Outras linhagens celulares que podem ser utilizadas são linhagens celulares de inseto, tais como células Sf9. Células hospedeiras de planta incluem, por exemplo, Nicotiana, Arabidopsis, Planta Flutuante, milho, trigo, batata etc. Células hospedeiras bacterianas incluem espécies de E. Coli e Streptomyces. Células hospedeiras de levedura incluem Schizosaccharomyces pombe, Saccharomyces cerevisiae e Pichia pastoris. Quando os vetores de expressão recombinante codificando genes de proteínas de fusão RAGE são introduzidos em células hospedeiras mamíferas, as proteínas de fusão de RAGE são produzidos por cultivar as células hospedeiras por um período de tempo suficiente para permitir a expressão da proteína de fusão RAGE nas células de hospedeiros ou secreção da proteína de fusão RAGE no meio de cultura em que as células hospedeiras são crescidas. Proteínas de fusão RAGE podem ser recuperadas a partir do meio de cultura utilizando métodos de purificação de proteína padrão.

Moléculas de ácidos nucléicos codificando as proteínas de fusão RAGE e vetores de expressão compreendendo essas moléculas de ácido nucléico podem ser utilizadas para transfecção de um células hospedeiras de mamífero adequado, planta, bacteriana ou levedura. Transformação pode ser feita por qualquer método conhecido para introdução de polinucleotídeos em uma célula hospedeira. Métodos para introdução de polinucleotídeos heterólogos em células mamíferas são bem conhecidos na técnica e incluem transfecção mediada por dextran, precipitação de fosfato de cálcio, transfecção mediada por polibreno, fusão de protoplasma, eletroporação, encapsulamento de polinucleotídeo(s) em lipossomas, e microinjeção direta do DNA no núcleo. Em adição, moléculas de ácido nucléico podem ser introduzidas em células mamíferas por vetores virais. Métodos de transformação de células de plantas são bem conhecidos na técnica, incluindo, por exemplo, transformação mediada

por Agrobacterium, transformação biolística, injeção direta, eletroporação e transformação viral. Métodos de transformação bacteriana e células de levedura são também bem conhecidos na técnica.

Um vetor de expressão pode também ser distribuído para um sistema de expressão 5 utilizando biolíticas de DNA, em que o plasmídio é precipitado em partículas microscópicas, preferivelmente de ouro, e as partículas são propulsionadas em uma célula alvo ou sistema de expressão. Técnicas de DNA biolíticos são bem conhecidas na técnica e dispositivos, por exemplo, "gene bala" são comercialmente disponíveis para distribuição das micropartículas em uma célula (por exemplo, Helio Gene Gun, Bio-Rad Labs., Hercules, CA) e na pele 10 (PMED Device, PowderMed LTD., Oxford, RU).

Expressão de proteínas de fusão RAGE a partir de produção de linhagens celulares pode ser aumentada utilizando um número de técnicas conhecidas. Por exemplo, sistema de expressão de gene glutamina sintetase (o sistema GS) e o sistema de resistência a neomicina codificada no plasma são abordagens comuns para expressão aumentada sob certas 15 condições.

Proteínas de fusão RAGE expressas por diferentes linhagens celulares podem ter modelos de glicosilação diferentes a partir de cada outra. Entretanto, todas as proteínas de fusão RAGE codificadas pelas moléculas de ácido nucléico providas aqui, ou compreendendo as sequências aminoácidas providas aqui são parte da instantânea invenção, sem levar em 20 consideração a glicosilação da proteína de fusão RAGE.

Em uma modalidade, um vetor de expressão recombinante pode ser transfectado em células de Ovário de Hamster Chinês (CHO) e a expressão otimizada. Em modalidades alternativas, as células podem produzir 0,1 a 20 gramas/litro ou 0,5 a 10 gramas/litro, ou cerca de 1-2 gramas/litro.

Como é conhecido na técnica, tais construções de ácido nucléico podem ser modificadas por mutação, como por exemplo, por amplificação por PCR de amostras de ácido nucléico com iniciadores comprendendo a mutação de interesse. Neste caminho, polipeptídeos comprendendo afinidade variada para ligantes RAGE pode ser desenhada. Em uma modalidade, as seqüências mutadas podem ser 90% ou mais idênticas ao DNA de partida. 25 Como tal, variantes podem incluir seqüências nucleotídicas que hibridizam sob condições rigorosas (isto é, equivalente a cerca de 20-27°C abaixo da temperatura de fusão (TF) do duplex de DNA em 1 molar de sal).

A seqüência codificante pode ser expressa por transfeção de vetor de expressão em um hospedeiro apropriado. Por exemplo, os vetores recombinantes podem ser estavelmente transfectados em células de Ovário de Hamster Chinês (CHO), células expressando a proteína de fusão RAGE selecionada e clonadas. Em uma modalidade, células expressando a construção recombinante são selecionadas por plasmídio codificando resistência a neomi-

cina por uso do antibiótico G418. Clones individuais podem ser selecionados e clones expressando altos níveis da proteína recombinante como detectado por análise de Western Blot do sobrenadante da célula pode ser expandido, e o produto gênico purificado por cromatografia de afinidade utilizando colunas de Proteína A.

- 5 Amostra de modalidades de ácidos nucléicos recombinantes que codificam as proteínas de fusão RAGE da presente invenção é mostrada nas FIGS. 2 e 3. Por exemplo, como descrito acima, a proteína de fusão RAGE produzida por construção de DNA recombinante pode compreender um polipeptídeo RAGE ligado a um segundo polipeptídeo não RAGE. A proteína de fusão RAGE pode compreender dois domínios derivados da proteína
10 RAGE e dois domínios derivados de uma imunoglobulina. Exemplo de construções de ácido nucléico codificando uma proteína de fusão RAGE, TTP-4000 (TT4), tendo este tipo de estrutura é mostrado na FIG. 2 (SEQ ID NO:30 e SEQ ID NO:54). Como mostrado para a SEQ ID NO:30 e SEQ ID NO:54, a seqüência codificadora 1-753 (realçada em negrito) codifica a seqüência da proteína N-terminal RAGE ao passo que a seqüência de 754-1386 codifica a seqüência da proteína IgG Fc sem a dobradiça.
15

Quando derivado da SEQ ID NO:30 ou SEQ ID NO:54, ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica da mesma, a proteína de fusão RAGE pode compreender um quarto domínio da seqüência aminoácida de SEQ ID NO:32, ou o polipeptídeo com a seqüência sinalizadora removida (ver, por exemplo, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34 ou SEQ ID NO: 56 na FIG. 4). Na SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34 ou SEQ ID NO:56 a seqüência aminoácida RAGE está realçada com fonte negrito. A seqüência de imunoglobulina são os domínios imunoglobulina C_H2 e C_H3 da IgG sem a região dobradiça.

FIG 6 mostra uma comparação do polipeptídeo domínio encontrado em RAGE e IgG (FIG 6A) e a estrutura domínio das proteínas fusão RAGE TTP-3000 e TTP-4000. Como mostrado na FIG. 6B, os 251 primeiros aminoácidos da proteína de fusão TTP-4000 RAGE de comprimento total contêm como a seqüência polipeptídica RAGE uma seqüência sinalizadora compreendendo aminoácidos 1-22/23, o domínio V imunoglobulina (incluindo o sítio de ligação ao ligante) compreendendo os aminoácidos 23/23-116, um ligante interdomínio compreendendo os aminoácidos 117 a 123, um segundo domínio de imunoglobulina (C1) compreendendo aminoácidos 124-221, e um ligante interdomínio "downstream" compreendendo os aminoácidos 222-251.

Em uma modalidade, a proteína de fusão RAGE pode não necessariamente compreender o segundo domínio da imunoglobulina RAGE. Por exemplo, a proteína de fusão RAGE pode compreender um domínio de imunoglobulina derivado de RAGE e dois domínios de imunoglobulina derivado do polipeptídeo Fc humano. Exemplo de ácido nucléico construídos codificando este tipo de proteína de fusão RAGE é mostrado na FIG. 3 (SEQ ID NO:31 e SEQ ID NO:55). Como mostrado na SEQ ID NO:31 e SEQ ID NO:55, a seqüência

codificadora de nucleotídeos 1 a 408 (realçada em negrito) codifica a seqüência protéica N-terminal de RAGE, ao passo que a seqüência de 409-1041 codifica a seqüência da proteína IgG1 Fc (γ 1).

Quando derivado da SEQ ID NO:31 ou SEQ ID NO:55, ou uma seqüência pela mesma 5 nos 90% idêntica a mesma, a proteína de fusão RAGE compreende o terceiro domínio do aminoácido de SEQ ID NO:35, ou o polipeptídeo com a seqüência sinalizadora removida (ver, por exemplo, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37 ou SEQ ID NO:57 na FIG. 5, a seqüência aminoácida RAGE é realçada com fonte negrita. Como mostrado na FIG. 6B, os primeiros 10 136 aminoácidos da proteína de fusão TTP-3000 de comprimento total contêm como o polipeptídeo RAGE uma seqüência sinalizadora de aminoácidos 1-22/23, o domínio V da imunoglobulina (incluindo o sítio de ligação do ligante) compreendendo os aminoácidos 23/24-116, e um ligante interdomínio compreendendo aminoácidos 117 a 136. A seqüência de 137 a 346 inclui os domínios de imunoglobulina C_H2 e C_H3 da IgG sem a região dobrada.

As proteínas de fusão RAGE da presente invenção podem compreender aumento 15 da estabilidade in vivo sobre polipeptídeos RAGE não compreendendo um segundo polipeptídeo. A proteína de fusão RAGE pode ser ainda modificada para aumentar a estabilidade, eficácia, potência e biodisponibilidade. Dessa forma, as proteínas de fusão RAGE da presente invenção podem ser modificadas por processos pós-tradução ou por modificação química. Por exemplo, a proteína de fusão RAGE pode ser sinteticamente preparada incluir 20 L-, D-, ou aminoácidos não naturais, aminoácidos alfa-substituído, ou aminoácidos N-alquil. Adicionalmente, proteínas podem ser modificadas por acetilação, acilação, ADP-ribosilação, amidação, ligação de lipídios tal como fosfatidilinositol, formação de pontes de dissulfeto, e semelhantes. Além disso, polietilenoglicol pode ser adicionado para aumentar a estabilidade biológica da proteína de fusão RAGE.

25 Ligação de Antagonistas da RAGE a proteínas de fusão RAGE

As proteínas de fusão RAGE da presente invenção podem compreender um número de aplicações. Por exemplo, a proteína de fusão RAGE da presente invenção pode ser utilizada em um ensaio de ligação para identificar ligantes RAGE, tais como agonistas RAGE, antagonistas, ou moduladores.

30 Por exemplo, em uma modalidade, a presente invenção provê um método para detecção de moduladores da RAGE compreendendo: (a) provimento de uma proteína de fusão RAGE compreendendo um polipeptídeo RAGE ligado a um segundo polipeptídeo não RAGE, onde o polipeptídeo RAGE compreende um sítio de ligação do ligante; (b) mistura de um composto de interesse e um ligante tendo uma afinidade de ligação conhecida para RAGE com a proteína de fusão RAGE; e (c) medida da ligação do ligante RAGE conhecido à proteína de fusão RAGE em presença do composto de interesse. Em uma modalidade, o sítio de ligação do ligante compreende o domínio mais N-terminal da proteína de fusão R-

GE.

As proteínas de fusão RAGE podem também prover "kits" para a detecção de moduladores RAGE. Por exemplo, em uma modalidade, um "kit" da presente invenção pode compreender (a) um composto tendo afinidade de ligação conhecida para RAGE como um controle positivo; (b) uma proteína de fusão RAGE compreendendo um polipeptídeo RAGE ligado a um segundo polipeptídeo não RAGE, em que o polipeptídeo RAGE compreende um sítio de ligação do ligante RAGE; e (c) instruções para uso. Em uma modalidade, o sítio de ligação do ligante compreende o domínio mais N-terminal da proteína de fusão RAGE.

Por exemplo, a proteína de fusão RAGE pode ser utilizada em um ensaio de ligação para identificar os potenciais ligantes RAGE. Em um exemplo de modalidade de tal ensaio de ligação, um ligante RAGE conhecido pode ser revestido em um substrato sólido (por exemplo, revestimento e Maxisorb) em uma concentração de cerca de 5 microgramas por poço, onde cada poço contém um volume total de cerca de 100 microlitros (μL). Os revestidos podem ser incubados a 4°C por uma noite para permitir que o ligante o absorva ou liga ao substrato. Alternativamente, períodos de incubação mais curtos em temperaturas mais altas (por exemplo, temperatura ambiente) podem ser utilizados. Após um período de tempo para permitir que o ligante se ligue ao substrato, o poços do ensaio podem ser aspirados e um tampão de bloqueio (por exemplo, BSA 1% em 50 mM de tampão imidazol, pH 7.2) pode ser adicionado para bloquear ligação não específica. Por exemplo, tampão de bloqueio pode ser adicionado aos poços por 1 hora em temperatura ambiente. Os poços podem ser então aspirados e/ou lavados com um tampão de lavagem. Em uma modalidade, um tampão compreendendo 20 mM de imidazol, 150 mM de NaCl, 0.05% de Tween-20, 5 mM de CaCl_2 e 5 mM de MgCl_2 , pH 7.2 pode ser utilizado como um tampão de lavagem. A proteína de fusão RAGE pode então ser adicionada em diluições aumentadas para os poços de ensaio. A proteína de fusão RAGE pode então ser deixada em incubação com o ligante imobilizado no ensaio do poço tal que o ligante pode alcançar equilíbrio. Em uma modalidade, a proteína de fusão RAGE é deixada incubar com o ligante imobilizado por cerca de uma hora a 37°C. Em modalidades alternativas, períodos de incubação em baixas temperaturas podem ser utilizados. Após a proteína de fusão RAGE e o ligante imobilizado terem sido incubados, o poço pode ser lavado para remover qualquer proteína de fusão RAGE não ligada. A proteína de fusão RAGE ligada ao ligante imobilizado pode ser detectada em uma variedade de formas. Em uma modalidade, a detecção empregada é um ELISA. Dessa forma, em uma modalidade, um complexo de imunodetectão contendo uma IgG1 anti-humana monoclonal de camundongo, IgG biotinilada de cabra anti-camundongo, e uma avidina ligada a fosfatase alcalina pode ser adicionada à proteína de fusão RAGE imobilizada no poço de ensaio. O complexo de imunodetectão pode ser deixado ligar à proteína de fusão RAGE imobilizada tal que a ligação entre a proteína de fusão RAGE e o complexo de imunodetectão alcance e-

quilíbrio. Por exemplo, o complexo por ser permitido se ligar à proteína de fusão por uma hora em temperatura ambiente. Neste ponto, qualquer complexo não ligado pode ser removido por lavagem do poço de ensaio com tampão de lavagem. O complexo ligado pode ser detectado por adição do substrato de fosfatase alcalina, para-nitrofenilfosfato (PNPP), e medindo a conversão de PNPP em para-nitrofenol (PNP) como um aumento na absorbância em 405 nm.

Em uma modalidade, ligante RAGE se liga à proteína de fusão RAGE com afinidade de nanomolar (nM) ou micromolar (μ M). Um experimento ilustrando a ligação de ligantes RAGE às proteínas de fusão RAGE da presente invenção é mostrado na FIG. 7. Soluções de TTP-3000 (TT3) e TTP-4000 (TT4) tendo concentrações iniciais de 1,082 mg/mL, e 370 μ g/mL, respectivamente, foram preparadas. Como mostrado na FIG. 7, em várias diluições, as proteínas de fusão TTP-3000 e TTp-4000 são capazes de se ligar aos ligantes RAGE imobilizados Amyloid-beta (Abeta) (Amyloid Beta (1-40) de Biosource), S100b (S100), e anfotericina (Anfo), resultando em um aumento da absorbância. Na ausência do ligante (isto é, revestindo somente com BSA) não houve aumento na absorbância.

O ensaio de ligação da presente invenção pode ser utilizado para quantificar a ligação do ligante à RAGE. Em modalidade alternativas, ligantes RAGE podem se ligar à proteína de fusão RAGE da presente invenção com afinidades de ligação variando de 0,1 a 1000 nanomolar (nM), ou de 1 a 500 nM, ou de 10 a 80 nM.

A proteína de fusão RAGE da presente invenção pode também ser utilizada para identificarem compostos tendo a habilidade de se ligar a RAGE. Como mostrado nas FGIs. 8 e 9, respectivamente, um ligante RAGE pode ser ensaiado para sua habilidade em competir com beta amilóide imobilizado para ligação ao TTP-4000 (TT4) ou TTP-3000 (TT3) das proteínas de fusão RAGE. Dessa forma, pode parecer que um ligante RAGE na concentração final do ensaio (FAC) de 10 μ M pode deslocar a ligação da proteína de fusão RAGE para a beta-amilóide em concentrações de 1:3, 1:10, 1:30, e 1:100 da solução inicial de TTP-4000 (FIG> 8) ou TTP-3000 (FIG. 9).

Modulação de Efetores Celulares

Modalidades das proteínas de fusão RAGE da presente invenção podem ser utilizadas para modular uma resposta biológica mediada por RAGE. Por exemplo, as proteínas de fusão RAGE podem ser designadas para modular os aumentos induzidos por RAGE na expressão gênica. Dessa forma, em uma modalidade, as proteínas de fusão RAGE da presente invenção podem ser utilizadas para modular a função das enzimas biológicas. Por exemplo, a interação entre RAGE e seus ligantes pode gerar estresse oxidativo e ativação de NF-kB, e genes regulados por NF-kB, tais como citocinas IL-1 β , TNF- α e semelhantes. Em adição, várias outras vias regulatórias, tais como aquelas envolvendo p21ras, MAP quinases, ERK1, e ERK2 tem sido mostradas serem ativadas pode ligação de AGEs e ou-

etros ligantes da RAGE.

Uso de uma proteína de fusão RAGE da presente invenção para modular a expressão do efetor celular TNF- α é mostrado na FIG.10. Células mieloides THP-1 podem ser cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB e induzido a secretar TNF- α via estimulação de RAGE com S100b. Quando tal estimulação ocorre em presença de uma proteína de fusão RAGE, indução de TNF- α por S100b se ligando à RAGE pode ser inibida. Dessa forma, como mostrado na FIG. 10, adição de 10 μ g de TTP-3000 (TT3) ou TTP-4000 (TT4) da proteína de fusão reduz a indução por S100b de TNF- α em cerca de 50% a 75%. A proteína de fusão RAGE TTP-4000 pode ser pelo menos efetiva em bloquear a indução por S100b de TNF- α como é RAGEs (FIG. 10). Especificidade da inibição para as seqüências RAGE de TTP-4000 e TTP-3000 é mostrada pelo experimento em que IgG sozinha foi adicionada às células estimuladas por S100b. Adição de IgG e S100b aos ensaios mostraram os mesmos níveis de TNF- α como S100b sozinho.

Em outro ensaio baseado em célula, a habilidade de TTP-4000 para prevenir o HMGB1 ligante RAGE a partir da interação com RAGE e outros receptores da HMGB1 foi avaliado. A menos anticorpos anti-RAGE que ligam ao RAGE e previnem a interação de um ligante RAGE com RAGE, TTP-4000 pode bloquear a interação de um ligante RAGE com RAGE por ligar ao ligante RAGE. HMGB1 tem sido reportado ser um ligante para RAGE e os Receptores do Tipo Toll 2 e 4 (Park et al, J Biol. Chem, 2004; 279 (9):7370-7). Todos os três receptores (RAGE, receptor do tipo Toll 2, e receptor do tipo Toll 4) são expressos em células THP-1 (Parker et al, J Immunol., 2004, 172 (8):4977-86).

Neste experimento, células THP-1 foram estimulados para produzir TNF- α por HMGB1 (50 mg/mL) em presença ou ausência de ou TTP-4000 ou anticorpos anti-RAGE. Sob as condições utilizadas no ensaio, HMGCI deve ser somente indutor de TNF- α . Os resultados na FIG. 11 demonstram que o anticorpo anti-RAGE e proteína de fusão RAGE TTP-4000 bloqueio HMGB1 a partir da interação com RAGE expressos nas células THP-1, e que TTP-4000 inibem produção de TNF- α induzido por HMGB1 para uma maior extensão que dá o anticorpo anti-RAGE. Então, os dados indicam que TTP-4000 pode inibir a atividade HMGB1 para uma maior extensão que o anticorpo anti-RAGE por inibir o HMGB1 a partir da interação com os receptores do tipo Toll 2 e 4, bem como a presente RAGE em células THP-1.

Características Fisiológicas das Proteínas de Fusão RAGE

Enquanto RAGEs podem ter um benefício terapêutico na modulação de doenças mediadas por RAGE, RAGEs humanas podem ter limitações como terapia única baseada na meia vida relativamente curta de RAGEs no plasma. Por exemplo, enquanto RAGEs de roedores tem uma meia vida em ratos normas e diabéticos de aproximadamente 20 horas, RAGEs humanas tem uma meia vida de menos que 2 horas quando ensaiadas por retenção de

imunoreatividade de RAGEs (Renard e colaboradores, J. Pharmacol. Exp. Ther., 290:1458-1466 (1999)).

Para gerar uma RAGE terapêutica que tem características de ligação similares como as RAGEs, mas uma perfil de farmacocinética mais estável, uma proteína de fusão RAGE compreendendo um sítio de ligação do ligante RAGE ligado a um ou mais domínios de imunoglobulina humana pode ser utilizada. Como é conhecido na técnica, os domínios de imunoglobulina podem incluir porção Fc da cadeia pesada da imunoglobulina.

A porção Fc da imunoglobulina pode conferir vários atributos para a proteína de fusão RAGE. Por exemplo, o Fc da proteína de fusão pode aumentar a meia vida no soro de talas proteínas de fusão, sempre de horas para vários dias. O aumento na estabilidade da farmacocinética é geralmente um resultado da interação do ligante entre regiões CH2 e CH3 do fragmento Fc com o receptor FcRn (Wines e colaboradores, J. Immunol., 164:5313-5318 (2000)).

Embora as proteínas de fusão compreendendo um polipeptídeo do Fc da imunoglobulina podem prover a vantagem de estabilidade aumentada, as imunoglobulinas de proteínas de fusão podem eliciar uma resposta inflamatória quando introduzidas em um hospedeiro. A resposta inflamatória pode ser devida, em grande parte, à porção Fc da imunoglobulina da proteína de fusão. A resposta pró-inflamatória pode ser uma característica neutra se o alvo é uma proteína solúvel, como a maioria das proteínas solúveis não ativa imunoglobulinas. Entretanto, a resposta pró-inflamatória pode ser uma característica negativa se o alvo está expresso em tipos de células cuja destruição leva os efeitos colaterais desagradáveis. Também, a resposta pró-inflamatória pode ser uma característica negativa se uma cascata inflamatória está estabelecida no sítio de uma proteína de fusão ligando a um tecido alvo, desde que muitos mediadores da inflamação podem ser danificar o tecido ao redor, e/ou podem causar efeitos sistêmicos.

O sítio pró-inflamatório primário nos fragmentos dos Fc da imunoglobulina reside na região dobradiça entre o C_H1 e C_H2. Esta região dobradiça interage com o FcR1-2 em vários leucócitos e inicia o processo nessas células de ataque ao alvo (Wines e colaboradores, J. Immunol., 164:5313-5318 (2000)).

Como terapêuticos para doenças mediadas por RAGE, às proteínas de fusão RAGE podem não requerer a geração de uma resposta inflamatória. Dessa forma, modalidades das proteínas de fusão RAGE da presente invenção podem compreender uma proteína de fusão RAGE compreendendo um polipeptídeo RAGE ligado a um(s) domínio(s) da imunoglobulina onde a região Fc dobradiça da imunoglobulina é removida e substituída com um polipeptídeo RAGE. Neste caminho, a interação entre a proteína de fusão RAGE e os receptores Fcs em células inflamatórias pode ser minimizada. Pode ser importante, entretanto, manter o empilhamento apropriado e outras interações estruturais tri-dimensionais entre os

vários domínios da imunoglobulina da proteína de fusão RAGE. Dessa forma, modalidades das proteínas de fusão RAGE da presente invenção podem substituir o ligante interdomínio RAGE biologicamente inerte, mas estruturalmente similar que separa os domínios V e C1 da RAGE, ou o ligante que separa os domínios C1 e C2 da RAGE, em lugar da região dobradiça normal da cadeia pesada da imunoglobulina. Dessa forma, o polipeptídeo RAGE da proteína de fusão RAGE pode compreender uma sequência do ligante interdomínio que é naturalmente encontrada "downstream" de um domínio da imunoglobulina RAGE para formar um domínio da imunoglobulina RAGE/fragmento ligante. Neste caminho, as interações tridimensionais entre os domínios da imunoglobulina contribuem para ou a RAGE ou a imunoglobulina serem mantidas.

Em uma modalidade, a proteína de fusão da presente invenção pode compreender um aumento substancial na estabilidade farmacocinética como comparado às RAGEs. Por exemplo, FIG. 11 mostra que uma vez que a proteína de fusão RAGE TTP-4000 tenha saturado seus ligantes, ela pode reter uma meia vida de mais que 300 horas. Isto pode ser contrastado com a meia vida para RAGEs de somente poucas horas no plasma humano.

Dessa forma, em uma modalidade, as proteínas de fusão RAGE da presente invenção podem ser utilizadas para antagonizar a ligação de ligantes fisiológicos à RAGE como um meio para tratar doenças mediadas por RAGE sem gerar uma quantidade inaceitável de inflamação. As proteínas de fusão RAGE da presente invenção podem exibir uma diminuição substancial na geração de uma resposta pré-inflamatória quando comparado com IgG. Por exemplo, como mostrado na FIG. 13, a proteína de fusão RAGE TTP-4000 não estimula a liberação de TBF- α de células sob condições onde a estimulação por IgG de TNF- α é detectada.

Tratamento da Doença com Proteínas de Fusão RAGE

A presente invenção pode também compreender métodos para o tratamento de doenças mediadas por RAGE em um paciente humano. Em uma modalidade, o método pode compreender a administração a um paciente de uma proteína de fusão RAGE compreendendo um polipeptídeo RAGE compreendendo um sítio de ligação do ligante RAGE ligado a um segundo polipeptídeo não RAGE.

Em certas modalidades, a formulação RAGE compreende uma proteína de fusão RAGE liofilizada. Em certas modalidades, a presente invenção pode compreender métodos de tratamento de um distúrbio mediado por RAGE em um paciente de quantidade terapeuticamente efetiva de uma formulação reconstituída compreendendo uma proteína de fusão RAGE, um lioprotetor, e um tampão.

Qualquer das modalidades das proteínas de fusão descritas aqui podem ser utilizadas para tratamento de doença nas composições terapêuticas e formulações da presente invenção. Então, a proteína de fusão RAGE pode compreender uma sequência derivada de

um sítio de ligação do ligador de RAGE ligado a um polipeptídeo de imunoglobulina. Modalidades da proteína de fusão RAGE pode compreender um polipeptídeo RAGE diretamente ligado a um polipeptídeo compreendendo um domínio CH2 de uma imunoglobulina ou uma porção de um domínio CH2 de uma imunoglobulina. Em certas modalidades, o polipeptídeo 5 RAGE pode compreender um ligador interdomínio RAGE ligado a um domínio imunoglobulina RAGE tal que o aminoácido C-terminal do domínio imunoglobulina RAGE é ligado ao aminoácido N-terminal do ligador interdomínio e o aminoácido C-terminal do ligador interdomínio RAGE é diretamente ligado ao aminoácido N-terminal de um polipeptídeo compreendendo um domínio CH2 de uma imunoglobulina, ou uma porção da mesma. Por exemplo, 10 certas modalidades da proteína e fusão pode compreender um primeiro domínio de imunoglobulina RAGE e um primeiro ligador interdomínio RAGE ligado a um segundo domínio imunoglobulina RAGE e um segundo ligador interdomínio RAGE, tal que o aminoácido N-terminal do primeiro ligador interdomínio do aminoácido C-terminal do primeiro domínio RAGE da imunoglobulina, o aminoácido N-terminal do primeiro domínio da imunoglobulina RAGE, o aminoácido N-terminal do segundo domínio da imunoglobulina RAGE é ligado ao C-terminal do aminoácido do primeiro ligador interdomínio, o aminoácido N-terminal do segundo ligador interdomínio está ligado ao aminoácido C-terminal do segundo domínio da imunoglobulina RAGE, e o aminoácido C-terminal do segundo ligador interdomínio RAGE é diretamente ligado ao aminoácido N-terminal do domínio da imunoglobulina CH2 ou uma porção 15 de um somínio CH2 de uma imuglobulina.

20

Em modalidades alternativas desta proteína de fusão multi-domínio, o polipeptídeo RAGE pode compreender a sequência aminoácida revelada na SEQ ID NO:10, ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a mesma, ou uma sequência aminoácida revelada na SEQ ID NO:47, ou uma sequência pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica a mesma. Em outras modalidades alternativas, a proteína de fusão RAGE pode compreender a sequência aminoácida como revelada em pelo menos uma das SEQ ID NOs: 32, 33, 34, 35, 36, 37, ou 57, ou uma sequência de pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica a mesma. Por exemplo, em certas modalidades, uma sequência pelo menos 90% idêntica a SEQ ID NOs: 32, 33, 34, 35, 36, 37, ou 57 sem a lisina C-terminal, ou outras modalidades como aqui descrito pode constituir 25 a proteína de fusão RAGE utilizada nas formulações da presente invenção.

30

Um variedade de lioprotetores pode ser utilizada na formulação de proteína de fusão RAGE liofilizada. Em algumas modalidades, o lioprotetor pode compreender um açúcar não redutor. Por exemplo, o açúcar não redutor pode compreender sacarose, manitol, ou trealose. Também, uma variedade de tampões pode ser utilizados na formulação da proteína de fusão rAGE liofilizada. Em certas modalidades, o tampão pode compreender histidina.

35

A proteína de fusão RAGE pode compreender componentes adicionais. Em certas

modalidades, a formulação de proteína de fusão RAGE pode ainda compreender pelo menos um tensoativo, um agente quelante ou agente de massa. Em uma modalidade, a formulação de proteína de fusão RAGE reconstituída compreende cerca de 40-100 mg/mL da proteína de fusão RAGE compreendendo a sequência como revelado na SEQ ID NOs: 32, 33, 5 34, 56, 35, 36, 37, ou 57; cerca de 2 mM a cerca de 50 mM de histidina; cerca de 60 mM a cerca de 65 mM de sacarose; cerca de 0,001% a cerca de 0,05% de Tween 80; e um pH de cerca de 6,0 a 6,5. Por exemplo, a formulação de proteína de fusão RAGE reconstituídam em certas modalidades, compreende cerca de 40-50 mg/mL da proteína de fusão RAGE compreendendo a sequência como revelado na SEQ ID NOs: 32, 33, 34, 56, 35, 36, 37, ou 10 57; cerca de 10 mM de histidina, cerca de 75 mM de sacarose, cerca de 0,01% de Tween 80, e em um pH de cerca de 6,0. Ou, outras concentrações da proteína de fusão RAGE podem ser utilizadas nas formulações para tratamento de distúrbios mediados por RAGE como é requerido.

A formulação de proteína de fusão RAGE pode compreender um agente terapêutico 15 estável que é formulado para uso em uma clínica ou como uma prescrição médica. Por exemplo, em certas modalidades, a formulação de proteína de fusão RAGE pode exibir menos de 10% ou menos que 5% ou menos que 3% de decomposição após uma semana a 40 graus centígrados.

A formulação da proteína de fusão RAGE reconstituída pode ser adequada para 20 administração por várias rotas e como é requerida para tratamento do distúrbio mediado por RAGE de interesse. Administração da proteína fusão RAGE da presente invenção podem empregar injeção intraperitoneal (IP). Alternativamente, a proteína de fusão RAGE pode ser administrada oralmente, intranasalmente, ou como um aerossol. Em outra modalidade, a administração é intravenosa (IV). A proteína de fusão RAGE pode também ser injetada subcutaneamente. Em outra modalidade, a administração da proteína de fusão RAGE é intraarterial. Em outra modalidade, a administração é sublingual. Também, a administração pode usar uma cápsula de liberação controlada. Em ainda outra modalidade, a administração pode ser transretal, como por um supositório ou semelhante. Por exemplo, a administração subcutânea pode ser útil para tratar doenças crônicas quando a auto-administração é deseável.

Como descrito em maiores detalhes aqui, RAGE tem sido implicada na patogênese de uma variedade de estados de doenças, e as proteínas de fusão RAGE da presente invenção têm sido encontradas serem efetivas em melhorar estados de doença. Então, as formulações de proteína de fusão RAGE da presente invenção podem ser utilizadas para 35 tratar uma variedade de distúrbios mediados por RAGE.

Em certas modalidades, uma formulação de proteína de fusão RAGE da presente invenção podem ser utilizadas para tratar um sintoma de diabetes ou um sintoma de compli-

cações diabéticas tardias. Por exemplo, o sintoma de diabetes ou complicações diabéticas tardias compreendem pelo menos uma nefropatia diabética, retinopatia diabética, úlcera do pé diabética, uma complicação cardiovascular, ou neuropatia diabética.

Em outras modalidades, uma formulação de proteína de fusão RAGE reconstituída da presente invenção pode ser utilizada para tratar pelo menos um de amiloidose, doença de Alzheimer, câncer, falência renal, ou inflamação associada com autoimunidade, doença inflamatória do intestino, artrite reumatóide, psoríase, esclerose múltipla, hipóxia, derrame, ataque cardíaco, choque hemorrágico, sepse, transplante de órgão, ou cicatrização de ferida impedida.

Ou, a formulação de proteína de fusão RAGE reconstituída pode ser utilizada para tratar osteroporose. Por exemplo, em certas modalidades, a administração de uma formulação de proteína de fusão RAGE da presente invenção aumenta a densidade óssea do paciente ou reduz a taxa de uma diminuição na densidade óssea de um paciente.

Em algumas modalidades, a autoimunidade tratada utilizando as formulações de proteína de fusão RAGE da presente invenção podem compreender rejeição de pelo menos uma das células da pele, células pancreáticas, células nervosas, células musculares células endoteliais, células cardíacas, células hepáticas, células renais, um coração, células da medula óssea, ossos, células sanguíneas, células arteriais, células venosas, células cartilaginosas, células da tireoide ou células tronco. Ou, a formulação de proteína de fusão RAGE reconstituída pode ser utilizada para tratar falência renal.

Em certas modalidades, a formulação de proteína de fusão RAGE reconstituída pode ser utilizada para tratar inflamação e/ou rejeição associada com transplante de pelo menos um órgão, um tecido, ou uma pluralidade de células a partir do primeiro sítio a um segundo sítio. Os primeiros e segundos sítios podem ou ser em pacientes diferentes, ou no mesmo paciente. Transplante de uma variedade de diferentes tipos de células pode ser melhorado utilizando as formulações da proteína de fusão RAGE da presente invenção. Por exemplo, células transplantadas, tecidos ou órgãos podem compreender uma célula, tecido ou órgão de um pâncreas, pele, fígado, rim, coração, medula óssea, sangue, ossos, músculo, artéria, veia, cartilagem, tireoide, sistema nervoso, ou células nervosas.

Exemplos de usos de proteínas de fusão RAGE da presente invenção no tratamento de tais doenças e distúrbios são reveladas aqui

Por exemplo, uma variedade de modelos animais tem sido utilizada para validar o uso dos compostos que modula RAGE como terapia. Exemplos desses modelos são como se segue:

a) formação de uma nova membrana interna inibida por RAGEs em um modelo de rato de restenose seguida de injúria arterial em ambos os ratos: diabético e normal, por inibição da ativação endotelial, do músculo liso e macrófago através da RAGE (Zhong e colabo-

radores, Circulation 107:2238-2243 (2003));

b) inibição das interações RAGE/ligante, utilizando ou RAGEs ou um anticorpo anti-RAGE, reduzido pela formação da placa amilóide em um modelo de camundongo de amiloidose sistêmica (Yan e colaboradores, Nat. Med., 6:643-651 (2000)). Acompanhando a redução nas placas amilóides foi uma redução nas citocinas inflamatórias, interleucina-6 (IL-6) e fator estimulante de colônia de macrófago (M-CSF) bem como ativação reduzida de NF- κ B nos animais tratados;

c) camundongos transgênicos para RAGE (super-expressão de RAGE e fenótipo dominante negativo RAGE) exibem formação da placa e déficit cognitivo em um modelo de camundongo de AD (Arancio e colaboradores, EMBO J., 23:4096-4105 (2004));

d) Tratamento de ratos diabéticos com permeabilidade vascular reduzida ao RAGEs (Bonnardel-Phu e colaboradores, Diabetes, 48:2052-2058 (1999));

e) Tratamento com RAGEs reduziu lesões ateroscleróticas em camundongos diabéticos sem apolipoproteína E e previu os índices funcionais e morfológicos indicam a nefropatia diabética em camundongos db/db (Hudson e colaboradores, Arch. Biochem. Biophys., 419:80-88 (2003)); e

f) RAGEs atenuou a severidade da inflamação em um modelo de camundongo de artrite induzida por colágeno (Hofmann e colaboradores, Genes Immunol., 3: 123-135 (2002)), um modelo de camundongo de encefalomielite alérgica experimental (Yan e colaboradores, Nat. Med. 9:28-293 (2003)) e modelo de camundongo de doença inflamatória do intestino (Hofmann e colaboradores, Cell, 97:889-901 (1999)).

Dessa forma, em uma modalidade, as proteínas de fusão RAGE da presente invenção podem ser utilizadas para tratar um sintoma de diabetes e/ou complicações resultantes da diabetes mediadas por RAGE. Em modalidades alternativas, o sintoma de diabetes ou complicações tardias da diabete pode compreender nefropatia diabética, retinopatia diabética, uma úlcera diabética no pé, uma complicação cardiovascular de diabetes, ou neuropatia diabética.

Originalmente identificado como um receptor para moléculas cuja expressão é associada com a patologia do diabetes, RAGE por si só é essencial para a patofisiologia das complicações diabéticas. In vivo, a inibição da interação RAGE com seu(s) ligante(s) tem sido mostrada ser terapêutica em múltiplos modelos de complicações diabéticas e inflamação (Hudson e colaboradores, Arch. Biochem. Biophys., 419:80-88 (2003)). Por exemplo, um tratamento de dois meses com anticorpos anti-RAGE normalizou a função renal e reduziu a histopatologia renal anormal no camundongo diabético (Flyvbjerg e colaboradores, Diabetes 53:166-172 (2004)). Além do mais, tratamento com uma forma solúvel de RAGE (RAGEs) que se liga aos ligantes de RAGE e inibe a interação RAGE/ligante, reduziu as lesões de aterosclerose em camundongos diabéticos sem apolipoproteína E e atenuou a patologia

69

funcional e morfológica da nefropatia diabética em camundongos db/db (Bucciareli e colaboradores, Circulation 106:2827-2835 (2002)).

Também, tem sido mostrado que glicoxidação não enzimática de macromoléculas ultimamente resultando na formação de produtos finais glicados avançados (AGEs) é aumentado em sítios de inflamação, em falência renal, na presença de hipoglicemias e outras condições associadas com estresse oxidativo sistêmico ou local (Dyer e colaboradores, J. Clin. Invest. 91:2463-3469 (1993); Reddy e colaboradores, Biochem, 34:10872-10878 (1995); Dyer e colaboradores, J. Biol. Chem., 266:11654-11660 (1991); Degehardt e colaboradores, Cell. Mol. Biol., 44:1139-1145 (1998)). O acúmulo de AGEs na vasculatura pode ocorrer focalmente, como na junta amilóide composto de AGE- β_2 -microglobulina encontrada em pacientes com amiloidose relacionada a diálise (Miyata e colaboradores, J. Clin. Invest., 92:1243-1252 (1993); Miyata e colaboradores, J. Clin. Invest., 98:1088-1094 (1996)), ou geralmente, como exemplificado pela vasculatura e tecidos de pacientes com diabetes (Schmidt e colaboradores, Nature Med., 1:1002-1004 (1995)). O acúmulo progressivo de AGEs ao longo do tempo em pacientes com diabetes sugere que mecanismos de depuração endógena não são capazes de funcionar efetivamente em sítios de deposição de AGE. Tais AGEs acumulados têm a capacidade de alterar as propriedades celulares por um número de mecanismos. Embora RAGE esteja expresso em baixos níveis em tecidos normais e vasculatura, em um meio ambiente onde o acúmulo de ligantes dos receptores, tem sido mostrado que RAGE se torna super-regulado (Li e colaboradores, J. Biol. Chem., 272:16498-16506 (1997); Li e colaboradores, J. Biol. Chem., 273:30870-30878 (1998); Tanaka e colaboradores, J. Biol. Chem., 275:25781-25790 (2000)). A expressão de RAGE está aumentada em células endoteliais e no músculo liso e fagócitos mononucleares infiltrados na vasculatura diabética. Também, estudos em cultura celular têm demonstrado que a interação AGE-RAGE causa mudanças nas propriedades celulares importantes na homeostase vascular.

O uso das proteínas de fusão RAGE no tratamento da patologia relacionada a diabetes é ilustrado na FIG. 14. A proteína de fusão RAGE TTP-4000 foi medida em um modelo de rato diabético de restenose que envolve medida da proliferação do músculo liso e expansão da membrana interna seguida de injúria vascular. Como ilustrado na FIG. 14, o tratamento com TTP-4000 pode significantemente reduzir a proporção membrana interna/meio (I/M) (FIG. 14A; Tabela 1) na restenose associada a diabetes em uma maneira dose-dependente. Também, o tratamento com TTP-4000 podem significantemente reduzir a proliferação de célula do músculo liso associada a restenose em uma maneira dose-dependente (FIG 14B)..

35 Tabela 1

Efeito do TTP-4000 em Modelo de Rato de Restenose

	IgG (n=9)	TTP-4000 (n=9) Baixa dose** (0,3 mg/animal qod x 4)	TTP-4000 (n=9) Alta dose** (1,0 mg/animal qod x 4)
Área Interna (mm ²)	0,2 ± 0,03	0,18 ± 0,04	0,16 ± 0,02
Área medial (mm ²)	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,01
Proporção I/M	1,71±0,27	1,61±0,26	1,44*±0,15

*P<0.05; ** Para ambas as doses, alta e baixa, uma carga de dose de 3 mg/animal

foi utilizada.

Em outras modalidades, as proteínas de fusão RAGE da presente invenção podem também ser utilizadas para tratar ou reverter amiloidoses e doença de Alzheimer. RAGE é um receptor para beta-amilóide ($A\beta$) bem como outras proteínas amiloidogênicas incluindo SAA e amilina (Yan e colaboradores, *Nature*, 382:685-691 (1996); Yan e colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci., EUA, 94:5296-5301 (1997); Yan e colaboradores, *Nat. Med.*, 6:643-651 (2000); Sousa e colaboradores, *Lab. Invest.*, 80:1101-1110 (2000)). Também, os ligantes RAGE, incluindo AGEs, S100b e proteínas $A\beta$, são encontradas no tecido ao redor da placa senil do homem (Luth e colaboradores, *Cereb. Cortex* 15:211-220 (2005); Petzold e colaboradores, *Neurosci. Lett.*, 336:167-170 (2003); Sasaki e colaboradores, *Brain Res.*, 12:256-262 (2001); Yan e colaboradores, *Restor. Neurol. Neurosci.*, 12:167-173 (1998)). Tem sido mostrado que RAGE se liga o material fibrilar de folha β independente da composição das subunidades (peptídeo β amilóide, amilina, soro amilóide A, peptídeo derivado de prón) (Yan e colaboradores, *Nature*, 382:685-691 (1996); Yan e colaboradores, *Nat. Med.*, 6:643-651 (2000)). Em adição, deposição de amilóide tem sido mostrada resultar em aumento da expressão de RAGE. Por exemplo, nos cérebros de pacientes com doença de Alzheimer (AD), a expressão de RAGE aumenta em neurônios e glia (Yan e colaboradores, *Nature* 382:685-691 (1996)). Concorrente com a expressão de ligantes RAGE, RAGE é super-regulada em astrócitos e células da microglia no hipocampo de indivíduos com AD, mas não é super-regulada em indivíduos que não têm AD (Lue e colaboradores, *Exp. Neurol.*, 171:29-45 (2001)). Esses achados sugerem que células expressando RAGE são ativadas através de interações RAGE/ligante RAGE ao lado na placa senil. Também, *in vitro*, ativação de células da microglia mediada por $A\beta$ pode ser bloqueada com anticorpos direcionados contra o domínio de ligação do ligante da RAGE (Yan e colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci., EUA, 94:5296-5301 (1997)). Isto tem sido também demonstrado que RAGE pode servir como um ponto focal para reunião fibrilar (Deane e colaboradores, *Nat. Med.* 9:907-913 (2003)).

Também, inibição in vivo das interações RAGE/ligante utilizando ou RAGEs ou um anticorpo anti-RAGE pode reduzir a formação da placa amilóide em um modelo de camundongo de amiloidose sistêmica (Yan e colaboradores, Nat. Med., 6:643-651 (2000)). Ca-

f1

mundongos duplo transgênicos que super-expressam a RAGE humana e a proteína precursora amilóide humana (APP) com as mutações Swedish e London (mutante hAPP) em neurônios desenvolvam defeitos de aprendizagem e anormalidades neuropatológicas mais cedo que o sua cópia única mutante hAPP transgênica. Em contraste, camundongos duplo transgênicos com capacidade de sinalização A β diminuída devido aos neurônios expressando uma forma dominante negativa de RAGE no antecedente mutante hAPP, mostra um atrasado no inicio das anormalidades neuropatológicas e de aprendizagem comparada a sua cópia APP transgênica única (Arancio e colaboradores, EMBO J., 23:4096-4105 (2004)).

Em adição, a inibição da interação RAGE-amilóide tem sido mostrada diminuir a expressão da RAGE celular e marcadores de estresse celular (bem como a ativação do NF-kB), e diminui a deposição de amilóide (Yan e colaboradores, Nat. Med., 6:643-651 (2000)) sugerindo um papel para a interação RAGE-amilóide em ambas as perturbações das propriedades celulares em um ambiente enriquecido para amilóide (até em estágios iniciais) bem como no acúmulo amilóide.

Dessa forma, as proteínas de fusão RAGE da presente invenção podem também ser utilizadas para tratar a redução da amiloidose e para reduzir placas e disfunção cognitiva associada com Doença de Alzheimer (AD). Como descrito acima, RAGEs tem sido descrita para redução da formação da placa amilóide no cérebro e subsequente aumento nos marcadores inflamatórios em um modelos animal de AD. FIGS. 15A e 15B mostram que camundongos que têm AD, e são tratados por 3 meses com ou TTP-4000 ou RAGEs de camundongo tiveram menos placas beta amilóide (A β) e menor disfunção cognitiva que os animais que receberam um veículo ou um controle negativo da IgG humana (IgG1). Como RAGEs, TTP-4000 pode também reduzir citocinas inflamatórias IL-1 e TNF- α (dados não mostrados) associados com AD.

Também, proteínas de fusão RAGE da presente invenção podem ser utilizadas para tratar aterosclerose e outras doenças cardiovasculares. Dessa forma, tem sido mostrado que doença isquêmica cardíaca é particularmente alta em pacientes com diabetes (Robertson e colaboradores, Lab. Invest., 18:538-551 (1968); Kannel e colaboradores, J. Am. Med. Assoc., 241:2035-2038 (1979); Kannel e colaboradores, Diab. Care, 2:120-136 (1979)). Em adição, estudos têm mostrado que aterosclerose em pacientes com diabetes é mais acelerada e extensiva tanto em pacientes que não sofrem de diabetes (ver, por exemplo, Waller e colaboradores, Am. J. Med., 69:498-506 (1980); Crall e colaboradores, Am. J. Med., 64:221-230 (1978); Hamby e colaboradores, Chest, 2:251-257 91976); e Pyorala e colaboradores, Diab. Metab. Rev., 3:463-524 (1978)). Embora as razões para aterosclerose acelerada no estabelecimento de diabetes são muitas, tem sido mostrado que a redução de AGEs pode reduzir a formação da placa.

Por exemplo, a proteína de fusão RAGE da presente invenção pode também ser

dfz

utilizada para tratar derrame. Quando TTP-4000 foi comparado com RAGEs em um modelo animal de doença relevante de derrame, TTP-4000 foi visto prover uma redução significativamente maior no volume de infarto. Neste modelo, a artéria carótida mediana de um camundongo é ligada e então reperfundida para formar um infarto. Para estimar a eficácia das 5 proteínas de fusão RAGE para tratar ou prevenir o derrame, camundongos foram tratados com RAGEs ou TTP-4000 ou imunoglobulina controle somente antes da reperfusão. Como pode ser visto na Tabela 2, TTP-4000 foi mais eficaz que o RAGEs em limitar a área de infarto nestes animais, sugerindo que TTP-4000, por causa de sua melhor meia vida no plasma, foi capaz de manter maior proteção que RAGEs.

10 Tabela 2
Redução do Infarto no Derrame

	% de Redução de Infarto**
RAGEs	15%*
TTP-4000 (300µg)	38%*
TTP-4000 (300µg)	21%*
TTP-4000 (300µg)	10%*
Controle do Isotipo IgG	4%*

Significante para $p < 0,001$; ** Comparado à salina.

Em outra modalidade, as proteínas de fusão RAGE da presente invenção podem ser utilizadas para tratar o câncer. Em uma modalidade, o câncer tratado utilizando as proteínas de fusão RAGE da presente invenção compreendendo células de câncer que expressam RAGE. Por exemplo, cânceres que pode ser tratado com a proteína de fusão RAGE da presente invenção incluem alguns cânceres de pulmão, alguns gliomas, alguns papilomas e semelhantes. Anfotericina é um grupo de alta mobilidade de proteína ligada ao DNA cromosomal não histona do tipo I (Rauvala e colaboradores, J. Biol. Chem., 266:16625-16635 (1987); Parkikinen e colaboradores, J. Biol. Chem. 268:19726-19738 (1993)) que tem sido mostrado interagir com RAGE. Tem sido mostrado que anfotericina promove crescimento de neurite, bem como servindo como uma superfície para reunião dos complexos de protease no sistema fibrinolítico (também conhecido para contribuir para a mobilidade celular). Em adição, um efeito inibitório do crescimento do tumor local de bloquear RAGE tem sido observado em um modelo de tumor primário (glioma C6), o modelo de metástase de pulmão de Lewis (Taguchi e colaboradores, Nature, 405:354-360 (2000)), e espontaneamente nascendo papilomas em camundongos expressando o transgene v-Ha-ras (Leder e colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. 87:9178-9182 (1990)).

Em ainda outra modalidade, as proteínas de fusão RAGE da presente invenção po-

dem ser utilizadas para tratar inflamação. Em modalidades alternativas, as proteínas de fusão RAGE da presente invenção podem ser utilizada para tratar inflamação associada com doença inflamatória do intestino, inflamação associada com artrite reumatóide, inflamação associada com psoríase, inflamação associada com esclerose múltipla, inflamação associada com hipóxia, inflamação associada com derrame, inflamação associada com ataque cardíaco, inflamação associada com choque hemorrágico, inflamação associada com sepse, inflamação associada com transplante de órgão, ou inflamação associada com cicatrização prejudicada de ferimentos, ou inflamação associada com rejeição de células, tecidos ou órgãos próprios (por exemplo, autoimune) ou não próprio (por exemplo, transplantado).

Por exemplo, seguindo o tratamento trombolítico, células inflamatórias tal como infiltrado granulocítico no tecido isquêmico e produção de radicais de oxigênio que podem des- troem mais células que foram mortas por hipóxia. Inibindo o receptor no neutrófilo responsá- vel para os neutrófilos sendo capazes de infiltrar o tecido com anticorpos ou outros antago- nistas da proteína tem sido mostrado melhorar a resposta. Desde que a RAGE esteja ligada ao seu receptor no neutrófilo, uma proteína de fusão RAGE contendo um fragmento de RA- GE pode atuar como um engodo e prevenir o neutrófilo de trafegar para o sítio reperfundido e dessa forma prevenir destruição tissular adicional. O papel da RAGE na prevenção da in- flamação pode ser indicado por estudos mostrando que RAGEs inibiram a expansão da no- va membrana interna em um modelo de rato de restenose seguido de injúria arterial em am- bos os ratos: diabético e normal, presumivelmente por inibição da proliferação endotelial, da célula do músculo liso e ativação de macrófago via RAGE (Zhou e colaboradores, Circulati- on, 107:2238-2243 (2003)). Em adição, modelos RAGEs de inflamação incluindo hipersen- sibilidade do tipo tardia, encefalite auto-imune experimental e doença inflamatória do intesti- no (Hofman e colaboradores, Cell, 97:889-901 (1999)).

Em uma modalidade, as proteínas de fusão RAGE da presente invenção podem ser utilizadas para tratar doenças baseadas em auto-imunidade. Por exemplo, em uma modalida- dade, as proteínas de fusão RAGE da presente invenção podem ser utilizadas para tratar falência renal. Dessa forma, as proteínas de fusão RAGE da presente invenção podem ser utilizadas para tratar nefrite lupus sistêmico ou nefrite lupus inflamatório. Por exemplo, a S100/calgranulina tem sido mostrada compreender uma família proximamente relacionada à polipeptídeos ligados à cálcio caracterizada por duas regiões hélice-giro-hélice ligadas por um peptídeo conector (Schafer e colaboradores, TIBS, 21:134-140 (1996); Zimmer e colabo- radores, Brain Res. Bull., 37:417-429 (1995); Rammes e colaboradores, J. Biol. Chem., 272:9496-9502 (1997); Kugering e colaboradores, Eur. J. Clin. Invest., 25:659-664 (1995)). Embora faltam peptídeos sinalizadores, tem sido conhecido que S100/calgranulinas ganham acesso ao espaço extracelular, especialmente em sítios das respostas imune crônico- inflamatórias, como na fibrose cística e artrite reumatóide. RAGE é um receptor para muitos

membros da família S100/calgranulina, mediando seus efeitos pró-inflamatórios em células tais como linfócitos e fagócitos mononucleares. Também, estudos da resposta de hipersensibilidade tardia, colite em camundongos sem IL-10, artrite induzida por colágeno, e modelos de encefalite auto-imune experimental que a interação ligante-RAGE (presumivelmente com S-100/calgranulinas) tem um papel proximal em uma cascata inflamatória.

Diabetes do tipo I é um distúrbio autoimune que pode ser prevenido ou melhorado pelo tratamento com proteínas de fusão RAGE da presente invenção. Por exemplo, tem sido mostrado que sRAGE permite para a transferência de esplenócitos a partir de camundongos diabéticos não obesos (NOD) para camundongos NOD com imunodeficiência combinada severa (camundongos NOD-scid). Camundongos NOD-scid não demonstram diabetes espontaneamente, mas requerem a presença de imunócitos capazes de destruir células da ilhota tal que a diabetes é então induzida. Foi encontrado que recipientes NOD-scid tratados com sRAGE demonstraram início reduzido de diabetes induzido por esplenócitos transferidos a partir de camundongo diabético (NOD) como comparado a recipientes NOD-scid não tratados com sRAGE (Publicação de Patente dos EUA 2002/0122799). Como atestado em EUA 2002/0122799, os resultados experimentais utilizando sRAGE neste modelo são relevantes para doença humana tal como configurações clínicas em que terapias imunes futuras e transplante de ilhotas pode ocorrer.

Então, em uma modalidade, uma proteína de fusão RAGE da presente invenção pode ser utilizada para tratar inflamação associada com transplante de pelo menos um de um órgão, um tecido ou uma pluralidade de células a partir do primeiro sítio a um segundo sítio. Os primeiro e segundo sítios podem ser em diferentes pacientes, ou no mesmo paciente. Em modalidades alternativas, as células transplantadas, tecidos ou órgãos compreendem células de um pâncreas, pele, fígado, rim, coração, pulmão, medula óssea, sangue, ossos, músculo, células endoteliais, artéria, veia, cartilagem, tireoide, sistema nervoso, ou células tronco. Por exemplo, administração das proteínas de fusão RAGE da presente invenção podem ser utilizadas para facilitar o transplante de células da ilhota a partir do primeiro paciente não diabético a um segundo paciente diabético.

Em outra modalidade, a presente invenção pode prover um método de tratamento da osteoporose por administração a um paciente de uma quantidade terapeuticamente efetiva de uma proteína de fusão da presente invenção (Zhou et al, J Exp. Med, 203: 1067-1080 (2006)). Em uma modalidade, o método de tratamento da osteoporose pode ainda compreender o passo de aumentar a densidade óssea do paciente ou reduzir taxa de diminuição da densidade óssea de um paciente.

Dessa forma, em várias modalidades selecionadas, a presente invenção pode prover um método para inibir a interação de um AGE com RAGE em um paciente por administração a um paciente de uma quantidade terapeuticamente efetiva de uma proteína de fusão

RAGE da presente invenção. O paciente tratado utilizando as proteínas de fusão RAGE da presente invenção pode ser um animal. Em uma modalidade, o paciente é um humano. O paciente pode estar sofrendo de uma doença relacionada com AGE tais como diabetes, complicações diabéticas tais como nefropatia, neuropatia, retinopatia, úlcera nos pés, amiloidoses, ou falência renal, e inflamação. Ou, o paciente pode ser um indivíduo com doença de Alzheimer. Em uma modalidade alternativa, o paciente pode ser um indivíduo com câncer. Em ainda outras modalidades, o paciente pode estar sofrendo de eritematose lupus sistêmica ou nefrite lupus inflamatória. Outras doenças podem ser mediadas por RAGE e então, podem ser tratadas utilizando as proteínas de fusão RAGE da presente invenção. Desse forma, modalidades alternativas adicionais da presente invenção, as proteínas de fusão RAGE podem ser utilizadas para tratamento de doença de Crohn, artrite, vasculite, nefropatias, retinopatias, e neuropatias em pacientes humanos ou animais. Em outras modalidades, inflamação envolvendo ambas, respostas auto-imunes (por exemplo, rejeição de próprio) e não auto-imune (por exemplo, rejeição de não próprio) pode ser mediada por RAGE e então, pode ser tratado utilizando as proteínas de fusão RAGE da presente invenção.

Uma quantidade terapeuticamente efetiva pode compreender uma quantidade que é capaz de prevenir a interação da RAGE com um AGE ou outros tipos de ligantes RAGE endógenos em um paciente. Consequentemente, a quantidade variará com o paciente sendo tratado. A administração do composto pode ser de hora em hora, diariamente, semanalmente, mensalmente, anualmente, ou como um evento único. Em várias modalidades alternativas, a quantidade efetiva da proteína de fusão RAGE pode variar de cerca de 1 ng/kg de peso corporal a cerca de 100 mg/kg de peso corporal, ou de cerca de 10 µg/kg de peso corporal a cerca de 50 mg/kg de peso corporal, ou de cerca de 100 µg/kg de peso corporal a cerca de 20 mg/kg de peso corporal. A quantidade efetiva atual pode ser estabelecida por ensaios de dose/resposta utilizando métodos padrões na técnica (Johnson e colaboradores, Diabetes, 42:1179, (1993)). Dessa forma, como é conhecido pelo versados na técnica, a quantidade efetiva pode depender da biodisponibilidade, bioatividade, e biodegradabilidade do composto.

Composições

A presente invenção pode compreender uma composição compreendendo uma proteína de fusão da presente invenção misturada com um veículo farmaceuticamente aceitável. A proteína de fusão pode compreender um polipeptídeo RAGE ligado a um segundo polipeptídeo não RAGE. Em uma modalidade, a proteína de fusão RAGE pode compreender um sítio de ligação do ligante RAGE. Em uma modalidade, o sítio de ligação do ligante compreende o domínio N-terminal da proteína de fusão RAGE. O sítio de ligação do ligante RAGE compreende o domínio V da RAGE, ou uma porção da mesma. Em uma modalidade, o sítio de ligação do ligante RAGE compreende a SEQ ID NO:9 ou uma seqüência pelo me-

nos 90% idêntica da mesma, ou a SEQ ID NO:47 ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica da mesma.

Em uma modalidade, o polipeptídeo RAGE pode ser ligado a um polipeptídeo compreendendo um domínio da imunoglobulina ou uma porção (por exemplo, um fragmento da mesma) de um domínio da imunoglobulina. Em uma modalidade, o polipeptídeo compreendendo um domínio de a imunoglobulina compreender pelo menos uma porção de pelo menos um dos domínios C_H2 ou C_H3 da IgG humana.

Em certas modalidades, a proteína de fusão RAGE compreende uma sequência aminoácida revelada na SEQ ID NO:56 ou SEQ ID NO:57, ou uma sequência de pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica a mesma. Por exemplo, em algumas modalidades, uma sequência de pelo menos 90% idêntica a SEQ ID NO:56 ou SEQ ID NO:57 compreende a sequência de SEQ ID NO:56 ou SEQ ID NO:57 sem o lisina C-terminal.

A proteína ou polipeptídeo RAGE pode compreender a RAGE humana de comprimento total (por exemplo, a SEQ ID NO:1), ou um fragmento da RAGE humana. Em uma modalidade, o polipeptídeo RAGE não inclui qualquer resíduo de seqüência sinalizadora. A seqüência sinalizadora da RAGE pode compreender os resíduos 1-22 ou os resíduos 1-23 da RAGE de comprimento total (SEQ ID NO:1). Em modalidades alternativas, o polipeptídeo RAGE pode compreender uma seqüência que é 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica à RAGE humana, ou um fragmento da mesma. Por exemplo, em uma modalidade, o polipeptídeo RAGE pode compreender a RAGE humana, ou um fragmento da mesma, com Glicina como o primeiro resíduo em vez de Metionina (ver, por exemplo, Neeper e colaboradores (1992)). Ou, a RAGE humana pode compreender a RAGE de comprimento total com a seqüência sinalizadora removida (por exemplo, SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:3) (FIGS. 1A e 1B) ou uma porção desta seqüência de aminoácidos.

As proteínas de fusão RAGE da presente invenção pode também compreender sRAGE (por exemplo, SEQ ID NO:4), um polipeptídeo pelo menos 90% idêntico a sRAGE, ou um fragmento da sRAGE. Por exemplo, o polipeptídeo RAGE pode compreender RAGEs humana, ou um fragmento da mesma, com Glicina como o primeiro resíduo em vez de uma Metionina (ver, por exemplo, Neeper e colaboradores (1992)). Ou, a RAGE humana pode compreender RAGEs com a seqüência sinalizadora removida (Ver, por exemplo, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 ou SEQ ID NO:45 na FIG. 1) ou uma porção desta seqüência de aminoácidos. Em outras modalidades, a proteína RAGE pode compreender um domínio V (Ver, por exemplo, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 ou SEQ ID NO:10 ou SEQ ID NO:46 na FIG. 1). Ou, uma sequência de pelo menos 90% idêntica para o domínio V ou um fragmento do mesmo pode ser utilizado. Ou, a proteína RAGE compreender um domfragmento de RAGE compreendendo uma porção do domínio V (Ver, por exemplo, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10

fl

ou SEQ ID NO:47 na FIG. 1). Em uma modalidade, o sítio de ligação do ligante pode compreender a SEQ ID NO:9, ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica a mesma, ou a SEQ ID NO:10, ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica a mesma, ou SEQ ID NO:47, ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica da mesma. Em ainda outra modalidade, o fragmento

5 RAGE é um peptídeo sintético.

Por exemplo, o polipeptídeo RAGE pode compreender aminoácidos 23-116 da RAGE humana (SEQ ID NO:7) ou uma seqüência 90% idêntica da mesma, ou os aminoácidos 24-116 da RAGE humana (SEQ ID NO:8) ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica da mesma, ou aminoácidos 24-116 da RAGE humana onde Q24 cicliza para formar pE (SEQ ID NO:46), ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a mesma, correspondendo ao domínio V da RAGE. Ou, o polipeptídeo RAGE pode compreender aminoácidos 124-221 da RAGE humana (SEQ ID NO:11) ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica a mesma, correspondendo ao domínio C1 da RAGE. Em outra modalidade, o polipeptídeo RAGE pode compreender os aminoácidos 227-317 da RAGE humana (SEQ ID NO:12) ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica da mesma, correspondendo ao domínio C2 da RAGE. Ou, o polipeptídeo RAGE pode compreender os aminoácidos 23-123 da RAGE humana (SEQ ID NO:13) ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica da mesma, ou aminoácidos 24-123 da RAGE humana (SEQ ID NO:14) ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica da mesma, correspondendo ao domínio V da RAGE e um ligante interdomínio "a jusante". Ou, o polipeptídeo RAGE pode compreender os aminoácidos 24-123 da RAGE humana onde Q24 cicliza para formar pE (SEQ ID NO:48), ou uma sequência pelo menos 90% idêntica do mesmo. Ou, o polipeptídeo RAGE pode compreender aminoácidos 23-226 da RAGE humana (SEQ ID NO:17) ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica a mesma, ou aminoácidos 24-226 da RAGE humana (SEQ ID NO:18) ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica a mesma, correspondendo ao domínio V, o domínio C1 e o ligante interdomínio ligando esses dois domínios. Ou, o polipeptídeo RAGE pode compreender aminoácidos 24-226 da RAGE humana onde Q24 cicliza para formar pE (SEQ ID NO:50), ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica a mesma. Ou, o polipeptídeo RAGE pode compreender aminoácidos 23-339 da RAGE humana (SEQ ID NO:5) ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a mesma, ou 24-339 da RAGE humana (SEQ ID NO:6) ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica a mesma, correspondendo a sRAGE (isto é, codificando os domínios V, C1 e C2 e ligantes interdomínios). Ou, o polipeptídeo RAGE pode compreender aminoácidos 24-339 da RAGE humana onde Q24 cicliza para formar pE (SEQ ID NO:45), ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a mesma. Ou, fragmentos de cada uma dessas seqüências podem ser utilizadas.

35 Em outra modalidade, o sítio de ligação do ligador pode compreender aminoácidos 25-51 de SEQ ID NO:1. Em outra modalidade, o sítio de ligação do ligador pode compreender aminoácido 23-51 da SEQ ID NO:1. Em outra modalidade, o sítio de ligação do ligador

pode compreender aminoácido 31-51 da SEQ ID NO:1. Em outra modalidade, o sítio de ligação do ligador pode compreender aminoácido 31-116 da SEQ ID NO:1. Por exemplo, o sítio de ligação do ligador pode compreender um domínio RAGE V ou uma porção do mesmo tal como o domínio de ligação do ligador RAGE (por exemplo, aminoácidos 1-118, 23-118, 24-118, 31-118, 1-116, 23-116, 24-116, 31-116, 1-54, 23-54, 24-54, 31-54, 1-53, 23-53, 24-53, ou 31,53, da SEQ ID NO:1, ou fragmentos dos mesmos) (FIG 1). Os fragmentos dos polipeptídeos que funcionalmente se ligam a um ligador RAGE podem ser utilizado. Ou fragmentos dos polipeptídeos que funcionalmente se ligam ao ligador RAGE podem ser utilizados. Ou, uma sequência pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao domínio RAGE V ou um fragmento do mesmo (por exemplo, como descrito acima) pode ser utilizado. Ainda, como é conhecido na técnica, em modalidades onde o N-terminal da proteína de fusão é glutamina, como por exemplo, sob remoção da sequência sinal compreendendo resíduos 1-23 da SEQ ID NO:1 (por exemplo, Q24 para um polipeptídeo compreendendo aminoácidos 24-118 ou SEQ ID NO:1), a glutamina pode ciclizar para formar ácido piroglutâmico (pE).

A proteína de fusão RAGE inclui vários tipos de peptídeos que não são derivados da RAGE ou um fragmento da mesma. O segundo polipeptídeo da proteína de fusão pode compreender um polipeptídeo derivado de uma imunoglobulina. A cadeia pesada (ou porção da mesma) pode ser derivada de um ou mais isotipos de cadeia pesada conhecidos: IgG (γ), IgM (μ), IgD (δ), IgE (ε), ou IgA (α). Em adição, a cadeia pesada (ou porção da mesma) pode ser derivada de qualquer um dos subtipos de cadeia pesada: IgG1 ($\gamma 1$), IgG2 ($\gamma 2$), IgG3 ($\gamma 3$), IgG4 ($\gamma 4$), IgA1 ($\alpha 1$), IgA2 ($\alpha 2$), ou mutações desses isotipos ou subtipos que alteram a atividade biológica. O segundo polipeptídeo pode compreender os domínios C_H2 e C_H3 de uma IgG1 humana ou uma porção de um ou ambos desses domínios. Como um exemplo de modalidades, o polipeptídeo compreendendo os domínios C_H2 e C_H3 da IgG1 humana ou uma porção da mesma pode compreender a SEQ ID NO:40 ou uma porção da mesma. Em uma modalidade, o polipeptídeo compreendendo os domínios CH2 e Ch3 de uma IgG1 humana ou uma porção da mesma pode compreender SEQ ID NO:38, ou uma porção da mesma. Por exemplo, o polipeptídeo compreendendo os domínios CH2 e CH3 de uma IgG1 humana ou uma porção da mesma pode compreender SEQ ID NO:38 ou SEQ ID NO:40 com a lisina terminal (K) removida. O peptídeo da imunoglobulina pode ser codificado pela seqüência de ácido nucléico da SEQ ID NO:39 ou SEQ ID NO:41. A seqüência da imunoglobulina na SEQ ID NO:38 ou SEQ ID NO:40 pode também ser codificada pela SEQ ID NO:52 ou SEQ IS NO:53, respectivamente.

A porção Fc da cadeia da imunoglobulina pode ser pró-inflamatória in vivo. Dessa forma, em uma modalidade, a proteína de fusão RAGE da presente invenção compreende um ligante interdomínio derivado da RAGE em vez da dobradiça de um polipeptídeo inter-

domínio derivado de uma imunoglobulina.

Dessa forma, em uma modalidade, a proteína de fusão RAGE pode ainda compreender um polipeptídeo RAGE diretamente ligado a um polipeptídeo compreendendo um domínio C_H2 de uma imunoglobulina, ou um fragmento da mesma compreende SEQ ID NO:42.

- 5 Em uma modalidade, o fragmento da SEQ ID NO:42 compreende a SEQ ID NO:42 com os primeiros 10 aminoácidos removidos.

Em uma modalidade, o polipeptídeo RAGE compreende um ligante interdomínio RAGE ligado a um domínio da imunoglobulina RAGE tal que o aminoácido C-terminal do domínio da imunoglobulina RAGE está ligado ao aminoácido N-terminal do ligante interdomínio, e o aminoácido C-terminal do ligante interdomínio RAGE está diretamente ligado ao aminoácido N-terminal de um polipeptídeo compreendendo um domínio C_H2 de uma imunoglobulina, ou um fragmento do mesmo. O polipeptídeo compreendendo um domínio C_H2 de uma imunoglobulina, ou uma porção do mesmo, pode compreender os domínios C_H2 e C_H3 de uma IgG1 humana, ou uma porção de ambos, ou um desses domínios. Como modalidades, o polipeptídeo compreendendo os domínios C_H2 e C_H3 de uma IgG1 humana, ou uma porção da mesma, pode compreender a SEQ ID NO:40 porção da mesma. Em uma modalidade, o polipeptídeo compreendendo os domínios C_H2 e C_H3 de uma IgG1 humana ou uma porção da mesma pode compreender a SEQ ID NO:38 ou uma porção da mesma. Por exemplo, o polipeptídeo compreendendo os domínios C_H2 e C_H3 de uma IgG1 humana ou uma porção da mesma pode compreender SEQ ID NO:38 ou SEQ ID NO:40 com o lisina (K) terminal removida.

A proteína de fusão RAGE da presente invenção pode compreender um domínio único ou múltiplo da RAGE. Também, o polipeptídeo RAGE compreendendo um ligante interdomínio ligado a um domínio da imunoglobulina RAGE pode compreender um fragmento de uma proteína RAGE de comprimento total. Por exemplo, em uma modalidade, a proteína de fusão RAGE pode compreender dois domínios da imunoglobulina derivados da proteína RAGE e dois domínios da imunoglobulina derivados de um polipeptídeo Fc humano. A proteína de fusão RAGE pode compreender um primeiro domínio da imunoglobulina RAGE e um segundo ligante interdomínio ligado a um segundo domínio da imunoglobulina RAGE e um segundo ligante interdomínio RAGE, tal que o aminoácido N-terminal do primeiro ligante interdomínio está ligado ao aminoácido C-terminal do primeiro domínio da imunoglobulina RAGE, o aminoácido N-terminal do segundo domínio da imunoglobulina RAGE está ligado ao aminoácido C-terminal do primeiro ligante interdomínio, o aminoácido N-terminal do segundo ligante interdomínio está ligado ao aminoácido C-terminal do segundo domínio da imunoglobulina RAGE, e o aminoácido C-terminal do segundo ligante interdomínio RAGE está diretamente ligado ao aminoácido N-terminal do polipeptídeo compreendendo um domínio C_H2 da imunoglobulina ou fragmento do mesmo. Por exemplo, o polipeptídeo RAGE

- pode compreender aminoácidos 23-251 da RAGE humana (SEQ ID NO:19) ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica a mesma, ou aminoácidos 24-251 da RAGE humana (SEQ ID NO:20) ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica a mesma, ou aminoácidos 24-251 da RAGE humana onde Q24 cicliza para formar pE, ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica a mesma (SEQ ID NO:51), correspondendo ao domínio V, o domínio C1, o ligante interdomínio ligante desses dois domínios, e um segundo ligante interdomínio "downstream" de C1. Em uma modalidade, um ácido nucléico construído compreendendo a SEQ ID NO:30 ou um fragmento da mesma pode codificar para um quarto domínio da proteína de fusão RAGE. Em outra modalidade, construção de ácido nucléico compreendendo SEQ ID NO:54 pode codificar para um quarto domínio da proteína de fusão RAGE, onde a base silenciadora muda para os códons que codificam para prolina (CCG a CCC) e glicina (GGT a GGG) no C-terminal da sequência são iniciadas para remover um sítio de splice de RNA críptico perto do códon terminal (isto é, nos nucleotideos 1375-1380 da SEQ ID NO:30 são modificados para gerar SEQ ID NO:54).
- Alternativamente, um terceiro domínio da proteína de fusão RAGE pode compreender um domínio da imunoglobulina derivada de RAGE e dois domínios da imunoglobulina derivados de um polipeptídeo Fc humano. Por exemplo, a proteína de fusão RAGE pode compreender um domínio da imunoglobulina RAGE única ligado a um ligante interdomínio RAGE ao aminoácido N-terminal do polipeptídeo compreendendo um domínio C_H2 da imunoglobulina ou um fragmento do mesmo. Por exemplo, o polipeptídeo RAGE pode pelo menos 90% idêntica a mesma ou aminoácidos 24-136 da RAGE humana (SEQ ID NO:16) ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica, ou aminoácidos 24-136 da RAGE humana onde Q24 cicliza para formar pE ou uma seqüência de pelo menos 90% idêntica da mesma (SEQ ID NO:49), correspondendo ao domínio V da RAGE e um ligante interdomínio "downstream".
- Em uma modalidade, um ácido nucléico construído compreendendo a SEQ ID NO:31 ou um fragmento do mesmo pode codificar um terceiro domínio RAGE da proteína de fusão. Em outra modalidade, construção de ácido nucléico compreendendo SEQ ID NO:55 pode codificar para um terceiro domínio da proteína de fusão RAGE, onde a base silenciadora muda para os códons que codificam para prolina (CCG a CCC) e glicina (GGT a GGG) no C-terminal da sequência são iniciadas para remover um sítio de splice de RNA críptico perto do códon terminal (isto é, nos nucleotideos 1030-1035 da SEQ ID NO:31 são modificados para gerar SEQ ID NO:55).

Um fragmento do ligante interdomínio RAGE pode compreender uma seqüência peptídica que é naturalmente "downstream" de, e então, ligada a um domínio da imunoglobulina RAGE. Por exemplo, o domínio V RAGE, o ligante interdomínio pode compreender seqüências aminoácidas que são naturalmente "downstream" do domínio V. Em uma modalidade, o ligante pode compreender a SEQ ID NO:21, correspondendo aos aminoácidos 117-

- 123 da RAGE de comprimento total. Ou, o ligante pode compreender um peptídeo tendo porções adicionais da seqüência RAGE natural. Por exemplo, um ligante interdomínio compreendendo vários aminoácidos "upstream" e "downstream" (por exemplo, aminoácidos 1-3, 1-5, ou 1-10, ou 1-15) de SEQ ID NO:21 podem ser utilizados. Dessa forma, em uma modalidade, o ligante interdomínio compreende a SEQ ID NO:23 compreendendo os aminoácidos 117-136 da RAGE de comprimento total. Ou, fragmentos de SEQ ID NO:21 suprimindo, por exemplo, 1, 2 ou 3 aminoácidos da terminação do ligante pode ser utilizado. Em modalidades alternativas, o ligante pode compreender uma seqüência que é pelo menos 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% idêntica a SEQ ID NO:21 ou SEQ ID NO:23.
- 10 Para o domínio RAGE C1, o ligante pode compreender a seqüência peptídica que é naturalmente "downstream" do domínio C1. Em uma modalidade, o ligante pode compreender a SEQ ID NO:22, correspondendo aos aminoácidos 222-251 da RAGE de comprimento total. Ou, o ligante pode compreender um peptídeo tendo porções adicionais da seqüência RAGE natural. Por exemplo, um ligante compreendendo vários aminoácidos "upstream" e "downstream" (aminoácidos 1-3, 1-5, ou 1-10, ou 1-15) da SEQ ID NO:22 pode ser utilizado. Ou, fragmentos da SEQ ID NO:22 pode ser utilizado, suprimindo por exemplo, aminoácidos 1-3, 1-5, ou 1-10, ou 1-15 da terminação do ligante. Por exemplo, em uma modalidade, o ligante interdomínio RAGE pode compreender a SEQ ID NO:24 correspondendo aos aminoácidos 222-226. Em modalidades alternativas, o ligador pode compreender uma sequência que é pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica a SEQ ID NO:22 ou SEQ ID NO:24.

Ou um ligador interdomínio pode compreender a SEQ ID NO:44, correspondendo a aminoácidos RAGE 318-342. Em modalidades alternativas, o ligador pode compreender uma seqüência que é pelo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica a SEQ ID NO:44.

Veículos farmacologicamente aceitáveis podem compreender qualquer dos veículos farmacologicamente aceitáveis padrões conhecidos na técnica. Em uma modalidade, o veículo farmacêutico pode ser um líquido e a proteína de fusão RAGE ou ácido nucléico construído podem ser na forma de uma solução. Em outra modalidade, o veículo farmacologicamente aceitável pode ser um sólido na forma de pó, um pó liofilizado, ou um comprimido. Ou, o veículo farmacêutico pode ser um gel, supositório, ou creme. Em modalidades alternativas, o veículo pode compreender um lipossoma, uma microcápsula, uma célula encapsulada em um polímero, ou um vírus. Dessa forma, o termo veículo farmacologicamente aceitável abrange, mas não é limitado a, qualquer dos veículos farmacologicamente aceitáveis padrões, tais como água, álcoois, solução salina com tampão fosfato, açúcares (por exemplo, sacarose e manitol), óleos ou emulsões tais como emulsões óleo/água ou emulsão de tri glicerídeo, vários tipos de agentes umidificantes, comprimidos, comprimidos revestidos e cápsulas.

Em certas modalidades, as proteínas de fusão RAGE podem estar presentes em uma forma neutral (incluindo formas iônicas anfóteras) ou como uma espécie positivamente ou negativamente carregada. Em algumas modalidades, as proteínas de fusão RAGE podem ser complexadas com um contra íons para formar um sal farmaceuticamente aceitável.

5 Os termos "saís farmaceuticamente aceitáveis" referem-se a um complexo compreendendo uma ou mais proteínas de fusão RAGE e um ou mais contra íons, onde o contraion são derivados a partir de ácidos e bases orgânicas e inorgânicas farmaceuticamente aceitáveis.

Bases inorgânicas farmaceuticamente aceitáveis incluem íons metálicos. Íons metálicos mais preferidos incluem, mas não são limitados a, sais de metais alcalinos apropriados, sais de metal alcalinos terrosos e outros íons metálicos fisiologicamente aceitáveis. Sais derivados de bases inorgânicas incluem alumínio, amônio, cálcio, cobalto, níquel, molibdênio, vanádio, manganês, crômio, selênio, estanho, cobre, sais férrico, ferroso, lítio, magnésio, mangânico, manganês, potássio, rubídio, sódio e zinco e suas valências usuais.

15 Sais de adição ácida farmaceuticamente aceitáveis das proteínas de fusão RAGE da presente invenção podem ser preparados a partir dos seguintes ácidos, incluindo, sem limitação ácido fórmico, acético, acetamidobenzoíco, adipíco, ascórbico, bórico, propiônico, benzólico, carnfórico, carbônico, ciclâmico, deidrocólico, malônico, edético, etilsulfúrico, fenazólico, metafosfórico, succínico, glicólico, glucônico, láctico, málico, tartárico, tânnico, cítrico, 20 nítrico, ascórbico, glucurônico, malélico, fólico, fumárico, propiônico, pirúvico, aspártico, glutâmico, benzólico, clorídrico, bromídrico, iodídrico, lisina isocítrico, trifluoracético, pamônico, propiônico, antranílico, mesílico, orótico, oxálico, oxalacético, oléico, esteárico, salicílico, aminosalicílico, silicato, p-hidroxibenzoíco, nicotínico, fenilacético, mandélico, embônico, sulfônico, metanossulfônico, fosfórico, fosfônico, etanossulfônico, etanodissulfônico, amônio, benzenossulfônico, pantotênico, naftalenossulfônico, toluenossulfônico, 2-hidroxietanossulfônico, sulfanílico, sulfúrico, nítrico, nitroso, monometil éster do ácido sulfúrico, cicloexilaminossulfônico, β -hidrobutírico, glicina, glicilglicina, glutâmico, cacodilato, diaminoexanólico, canforulfônico, glucônico, tiociânicos, oxoglutárico, piridoxal 5-fosfato, clorofenoxiacético, undecânico, N-acetil-L-asipártico, galactárico e galacturônico.

30 Bases orgânicas farmaceuticamente aceitáveis incluem trimetilamina, dietilamina, N,N'-dibenziletilenodiamina, cloroprocaína, colina, dibenzilamina, dietanolamina, etilenodiamina, meglamina (N-metilglucamina), procaína, aminas cíclicas, cátions amônios quaternários, arginina, betaina, cafeína, clemizol, 2-etilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanodiamina, butilamina, etanolamina, etilenodiamina, N-etilmorfolina, 35 N-etiopiperidina, etilglucamina, glucamina, glicosamina, histidina, hidrabamina, imidazol, isopropilamina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piridina, piridoxina, neodímio, piperdina, resinas poliamina, procaina, purinas, teobromina, trietilamina, tripropilamina, trietanolamina,

- trometamina, metilamina, taurina, colato, 6-amino-2-metil-2-heptanol, 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol, 2-amino-2-metil-1-propanol, ácidos mono e dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos fenil-substituídos, ácidos hidróxi alcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfônicos alifáticos e aromáticos, estrônio, tricina, hidrazina, fenilcicloexilamina, ácido 2-(N-morfolina) 5 etanossulfônico, bis (2-hidroxietil) amino-tris(hidroximetil) metano, ácido N-(2-acetamido)-3-amioetanossulfônico, ácido 1,4-piperazinadietanossulfônico, ácido 3-morfolino-2-hidroxipropanossulfônico, 1,3-bis[tris(hidroximetil) metilamino] propano, ácido 4-morfolinapropanossulfônico, ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-etanossulfônico, ácido 2-[2-hidróxi-1,1-bis (hidroximetil) etil] amino] etanossulfônico, ácido N,N-bis-(2-hidroxietil)-2-aminoetanossulfônico, ácido 4-(N-10 morfolino)butanossulfônico, ácido 3-(N,N-bis[2-hidroxietil]amino)-2-hidroxipropanossulfônico, ácido 2-hidróxi-3-[tris(hidroximetil)metilamino]-1-propanossulfônico, ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-(3-hidroxipropanossulfônico, ácido piperazina-1,4-bis(2-hidroxipropanossulfônico diidratado, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinapropanossulfônico, N,N-bis(2-hidroxietil)glicina, ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(4-butanossulfônico), ácido N-[tris(hidroximetil)metil]-3-15 aminopropanossulfônico, ácido N-tris(hidroximetil)metil-4-aminobutanossulfônico, ácido N-(1,1-dimetil-2-hidroxietil)-3-amino-2-hidroxipropanossulfônico, ácido 2-(cicloexilamino) etanossulfônico, ácido 3-(cicloexilamino)-2-hidróxi-1-propanossulfônico, ácido 3-(cicloexilamino)-1-1-propanossulfônico, ácido N-(2-acetamido) imidodiacético, ácido 4-(cicloexilamino)-1-butano-20 sulfônico, N-[tris(hidroximetil)metil]glicina, 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol, e trometamol.

A administração das proteínas de fusão RAGE da presente invenção pode empregar várias rotas. Dessa forma, a administração da proteína de fusão RAGE da presente invenção pode utilizar a injeção intraperitoneal (IP). Alternativamente, a proteína de fusão RAGE pode ser administrada oralmente, intranasalmente, ou como um aerossol. Em outra modalidade, a administração é intravenosa (IV). A proteína de fusão RAGE pode também ser injetada subcutaneamente. Em outra modalidade, a administração da proteína de fusão RAGE é intra-arterial. Em outra modalidade, a administração é sublingual. Também, a administração pode utilizar uma cápsula de liberação controlada. Por exemplo, a administração subcutânea pode ser útil para tratar doenças crônicas quando a auto-administração é desejável.

Em aspecto adicional da presente invenção, os proteínas de fusão RAGE da invenção podem ser utilizados em terapêutica adjuvante ou tratamentos terapêuticos em combinação com outros agentes terapêuticos. O seguinte é uma lista não exaurida de adjuvantes e agentes terapêuticos adicionais que podem ser utilizados em combinação com os moduladores da proteína de fusão RAGE da presente invenção:

Classificações farmacológicas dos agentes anti-câncer:

1- Agentes alquilantes: Ciclofosfamida, nitrosuréia, carboplatina, cisplatina, procar-

bazina

- 2- Antibióticos: Bleomicina, Daunorubicina, Doxorubicina
- 3- Antimetabólicos: Metotrexato, Citarabina, Fluoruracil, Azatioprina, 6-

Mercaptopurina, e agentes quimioterapêuticos citotóxicos de câncer

- 5 4- Alcalóides de plantas: Vinblastina, Vincristina, Etoposídeo, Paclitaxel,
- 5- Hormônios - Tamoxifeno, Acetato de Octreotide, Finasteride, Flutamida
- 6- Modificadores da resposta Biológica: Interferons, Interleucinas,

Classificações farmacológicas de tratamento para Artrite Reumatóide

- 1-Analgésicos: Aspirina

- 10 2- AINES (Fármacos antiinflamatórios não esteroidais): Ibuprofeno, Naproxeno, Diclofenaco

3- DMARDs (Fármacos Anti-reumáticos modificadores de doença) > Metotrexato, preparações de ouro, hidroxicloroquina, sulfasalazina

- 15 4- Modificadores da Resposta Biológica, DMARDs: Etanercept, Infliximab, Glicocorticóides, tais como beclometasona, metilprednisolona, betametasona, prednisona, dexametasona, e hidrocortisona.

Classificações farmacológicas de tratamento para Diabetes Mellitus

- 1- Sulfoniluréias: Tolbutamida, Tolazamida, Gliburida, GLipizida

- 2- Biguanidas: Metformida

- 20 3- Variados agentes orais: Acarbose, Troglitazona

- 4- Insulina

Classificações farmacológicas de tratamento para Doença de Alzheimer

- 1- Inibidor da Colinesterase: Tacrine, Donepezil

- 2- Anti-psicóticos: Haloperidol, Tiorodazina

- 3- Antidepressivos: Desipramina, Fluoxetina, Trazodona, Paroxetina

- 4- Anticonvulsivantes: Carbamazepina, Ácido valpróico

Em uma modalidade, as composições da presente invenção podem compreender uma quantidade terapeuticamente efetiva de uma proteína de fusão RAGE em combinação com um ou múltiplos agentes terapêuticos adicionais. Em adição aos agentes até aqui descritos, os seguintes agentes terapêuticos podem ser utilizados em combinação com as proteínas de fusão RAGE da presente invenção: imunossupressores, tais como ciclosporina, tacrolimus, rapamicina e outros imunossupressores tipo FK-506.

Em uma modalidade, a presente invenção pode, portanto prover um método de tratamento de doenças mediadas por RAGE, o método compreendendo a administração a um paciente em necessidade do mesmo, uma quantidade terapeuticamente efetiva da proteína de fusão RAGE em combinação com agentes terapêuticos selecionados a partir do grupo consistindo de agentes alquilantes, antimetabólicos, alcalóides de plantas, antibióticos, hor-

mônios, modificadores da resposta biológica, analgésicos, AINES, DMARDs, modificadores da resposta biológica (por exemplo, glicocorticóides), sulfoniluréias, biguanidas, insulina, inibidores da colinesterase, antipsicóticos, antidepressivos, anticonvulsivantes, e imunossupressores, tais como ciclosporina, tacrolimus, rapamicina, e outros imunossupressores tipo FK-506. Em uma modalidade adicional, a presente invenção provê a composição farmacêutica da invenção como aqui descrito, ainda compreendendo um ou mais agentes terapêuticos selecionados a partir do grupo consistindo de agentes alquilantes, antimetabólicos, alcaloides de plantas, antibióticos, hormônios, modificadores da resposta biológica, analgésicos, AINES, DMARDs, modificadores da resposta biológica (por exemplo, glicocorticóides), sulfoniluréias, biguanidas, insulina, inibidores da colinesterase, antipsicóticos, antidepressivos, anticonvulsivantes, e imunossupressores, tais como ciclosporina, tacrolimus, rapamicina, e outros imunossupressores do tipo FK-506.

Formulações Liofilizadas

Em outras modalidades, a presente invenção também provê formulações compreendendo uma proteína de fusão RAGE. Modalidades das formulações podem compreender uma mistura liofilizada de um lioprotetor, uma proteína de fusão RAGE, e tampão.

Uma variedade de lioprotetores pode ser utilizada nas formulações de proteína de fusão RAGE liofilizada da presente invenção. Em algumas modalidades, o lioprotetor pode compreender um açúcar não redutor. Por exemplo, o açúcar não redutor pode compreender sacarose, manitol ou trealose. Também, uma variedade de tampões podem ser utilizados na formulação da proteína de fusão RAGE liofilizada. Em certas modalidades o tampão pode compreender histidina.

A proteína de fusão RAGE liofilizada pode compreender componentes adicionais. Em certas modalidades, a formulação de proteína de fusão RAGE pode ainda compreender pelo menos um de um tensoativo, um agente quelante ou um agente de massa. Em uma modalidade, a formulação da proteína de fusão RAGE compreende cerca de 40-100 mg/mL RAGE 40-100 mg/mL da proteína de fusão RAGE compreendendo a sequência como revelado na SEQ ID NOs: 32, 33, 34, 56, 35, 36, 37, ou 57; cerca de 2 mM a cerca de 50 mM de histidina; cerca de 60 mM a cerca de 65 mM de sacarose; cerca de 0,001% a cerca de 0,05% de Tween 80; e um pH de cerca de 6,0 a 6,5. Por exemplo, a formulação de proteína de fusão RAGE reconstituída em certas modalidades, compreende cerca de 40-50 mg/mL da proteína de fusão RAGE compreendendo a sequência como revelado na SEQ ID NOs: 32, 33, 34, 56, 35, 36, 37, ou 57; cerca de 10 mM de histidina, cerca de 65 mM de sacarose, cerca de 0,01% de Tween 80, e em um pH de cerca de 6,0. Ou, outras concentrações da proteína de fusão RAGE podem ser utilizadas como ainda descrito aqui.

Em uma modalidade, a presente invenção compreende uma formulação compreendendo uma proteína de fusão RAGE liofilizada reconstituída em um diluente, em que a con-

centração da proteína de fusão RAGE na formulação reconstituída está dentro da variação de cerca de 1 mg/mL a cerca de 400 mg/mL. Ou, outras concentrações da proteína de fusão RAGE podem ser utilizadas como aqui descrito.

Em outras modalidades, a presente invenção pode também compreender métodos 5 para preparar formulação reconstituída estável de uma proteína de fusão RAGE. A formulação reconstituída pode compreender uma concentração que é adequada para uso direto (por exemplo, administração direta a um paciente) ou que pode ser ainda diluída e/ou misturada com um agente de distribuição.

Em certas modalidades, o método pode compreender reconstituição de uma mistura liofiliizada da proteína de fusão RAGE e um lioprotetor em um diluente tal que a concentração da proteína de fusão RAGE na formulação reconstituída está na variação de cerca de 10 1 mg/mL a cerca de 400 mg/mL. Ou, outras concentrações como descrito aqui podem ser utilizadas como aqui descrito.

Uma variedade de lioprotetores pode ser utilizada nas formulações de proteína de 15 fusão RAGE da presente invenção. Em algumas modalidades, o lioprotetor pode compreender um açúcar não redutor. Por exemplo, o açúcar não redutor pode compreender sacarose, manitol, ou trealose. Também, uma variedade de tampões podem ser utilizados na formulação da proteína de fusão RAGE liofilizada. Em certas modalidades, o tampão pode compreender histidina.

A proteína de fusão RAGE reconstituída pode compreender componentes adicionais. Em certas modalidades, a formulação de proteína de fusão RAGE pode ainda compreender pelo menos um de um tensoativo, um agente quelante ou um agente de massa. Em 20 uma modalidade, a formulação da proteína de fusão RAGE compreende cerca de 40-100 mg/mL RAGE 40-100 mg/mL da proteína de fusão RAGE compreendendo a sequência como revelado na SEQ ID NOs: 32, 33, 34, 56, 35, 36, 37, ou 57; cerca de 2 mM a cerca de 50 mM de histidina; cerca de 60 mM a cerca de 65 mM de sacarose; cerca de 0,001% a cerca de 0,05% de Tween 80; e um pH de cerca de 6,0 a 6,5. Por exemplo, a formulação de proteína de fusão RAGE reconstituída em certas modalidades, compreende cerca de 40-50 25 mg/mL da proteína de fusão RAGE compreendendo a sequência como revelado na SEQ ID NOs: 32, 33, 34, 56, 35, 36, 37, ou 57; cerca de 10 mM de histidina, cerca de 65 mM de sacarose, cerca de 0,01% de Tween 80, e em um pH de cerca de 6,0.

Uma variedade de diluentes adequados para farmacêuticos pode ser utilizada para 30 reconstituir a proteína de fusão RAGE liofilizada. Em uma modalidade, a proteína de fusão RAGE liofilizada é estéril. Também em uma modalidade, o diluente é estéril. Em uma modalidade, o diluente pode compreender água para injeção (API). Também, em certas modalidades, a quantidade de diluente adicionada é baseada na dose terapêutica e o no perfil farmacocinético da proteína de fusão RAGE, bem como a biocompatibilidade da formulação e veí-

culo sendo administrado. Em uma modalidade, a formulação é isotônica: A formulação de proteína de fusão RAGE pode compreender um agente terapêutico estável que é formulado para uso em uma clínica ou como uma prescrição médica. Por exemplo, em certas modalidades, a formulação da proteína de fusão RAGE reconstituída pode exibir menos que 10%, 5 ou menos que 5%, ou menos que 3% de decomposição após uma semana a 40 graus centígrados.

Também, a formulação de proteína de fusão RAGE pode ser estável sob reconstituição em um diluente. Em certas modalidades, menos que cerca de 10%, ou cerca de 5%, ou cerca de 4%, ou cerca de 3%, ou cerca de 2%, ou cerca de 1% da proteína de fusão RAGE 10 está presente como um agregado na formulação da proteína de fusão RAGE.

A formulação de proteína de fusão RAGE pode ser adequada para administração por várias vias e como é requerido para o tratamento do distúrbio mediado por RAGE de interesse. Em certas modalidades, a formulação de proteína de fusão RAGE reconstituída é adequada para pelo menos uma administração intravenosa, intraperitoneal, ou subcutânea 15 da formulação a um paciente.

Por exemplo, em certas modalidades, a presente invenção pode compreender uma formulação reconstituída estável compreendendo uma proteína de fusão RAGE em uma concentração de pelo menos 10 mg/mL, ou pelo menos 20 mg/mL, ou pelo menos 50 mg/mL e um diluente, onde a formulação reconstituída tem sido preparada a partir de uma mistura liofilizada da proteína de fusão RAGE na formulação reconstituída pode ser pelo menos 100 20 mg/mL, ou pelo menos 200 mg/mL, ou pelo menos 400 mg/mL. Em ainda modalidades alternadas, a concentração da proteína de fusão RAGE na formulação reconstituída está em uma quantidade dentro da variação de cerca de 0,5 mg/mL a cerca de 400 mg/mL, ou cerca de 1 mg/mL a cerca de 200 mg/mL, ou cerca de 40 mg/mL a cerca de 400 mg/mL, cerca de 25 40 a 100 mg/mL, ou cerca de 40-50 mg/mL. A formulação pode também compreender um tampão.

Em ainda outras modalidades, a presente invenção pode compreender artigos de fabricação que incluem proteínas de fusão RAGE. Por exemplo, em certas modalidades, o artigo de fabricação pode compreender um recipiente que envolve a proteína de fusão RAGE liofilizada, e instruções para reconstituir a formulação liofilizada com um diluente. Em 30 certas modalidades, os artigos de fabricação podem compreender um recipiente que envolve a formulação compreendendo uma mistura liofilizada de um lioprotetor, uma proteína de fusão RAGE, e tampão. O artigo de fabricação pode também compreender instruções para reconstituir a formulação liofilizada com um diluente.

35 Uma variedade de lioprotetores podem ser utilizados nos artigos de fabricação da presente invenção. Em algumas modalidades, o lioprotetor pode compreender uma açúcar não redutor. Por exemplo, o açúcar não redutor pode compreender sacarose, manito, ou

trealose. Também, uma variedade de tampões podem ser utilizados na formulação de proteína de fusão RAGE liofilizada. Em certas modalidades, o tampão pode compreender histidina.

A formulação de proteína de fusão RAGE dos artigos de fabricação da presente invenção pode compreender componentes adicionais. Em certas modalidades, a formulação de proteína de fusão RAGE liofilizada pode ainda compreender pelo menos um de tensoativo, um agente quelante ou um agente de massa. Em uma modalidade os artigos de fabricação da presente invenção, sob reconstituição de acordo com as instruções providas, a formulação de proteína de fusão RAGE compreende cerca de 40-100 mg/mL da proteína de fusão RAGE compreendendo a sequência como revelado na SEQ ID NOs: 32, 33, 34, 56, 35, 36, 37, ou 57; cerca de 2 mM a cerca de 50 mM de histidina; cerca de 60 mM a cerca de 65 mM de sacarose; cerca de 0,001% a cerca de 0,05% de Tween 80; e um pH de cerca de 6,0 a 6,5. Por exemplo, a formulação de proteína de fusão RAGE reconstituída em certas modalidades, compreende cerca de 40-50 mg/mL da proteína de fusão RAGE compreendendo a sequência como revelado na SEQ ID NOs: 32, 33, 34, 56, 35, 36, 37, ou 57; cerca de 10 mM de histidina, cerca de 65 mM de sacarose, cerca de 0,01% de Tween 80, e em um pH de cerca de 6,0. Ou, outras concentrações da proteína de fusão RAGE podem ser utilizadas como ainda descrito aqui.

Uma variedade de diluentes adequados para farmacêuticos pode ser provida para reconstituir a proteína de fusão RAGE liofilizada. Em uma modalidade, a formulação liofilizada é estéril. Alternativamente ou adicionalmente, o diluente pode ser estéril. Em uma modalidade, o diluente pode compreender água para injeção (API). Então, o artigo de fabricação pode ainda compreender um segundo recipiente que envolve um diluente para reconstituir a formulação liofilizada, em que o diluente é água para injeção (API). Em uma modalidade, a formulação reconstituída é isotônica.

Também, em certas modalidades, a quantidade de diluente adicionada é beada na dose terapêutica e o perfil farmacocinético da proteína de fusão RAGE, bem como a biocompatibilidade da formulação e veículo sendo administrada. Em modalidade alternativa, as instruções são para reconstituir a formulação liofilizada assim como ter as concentrações como aqui descritas. Por exemplo, em certas modalidades, as instruções são para reconstituir a formulação liofilizada tal que a concentração da proteína de fusão RAGE na formulação reconstituída está dentro da variação de cerca de 40 mg/mL a cerca de 100 mg/mL.

A formulação de proteína de fusão RAGE provida como o artigo de fabricação pode compreender um agente terapêutico estável que é formulado para uso em uma clínica ou como uma prescrição de medicamento. Por exemplo, em certas modalidades, quando reconstituído de acordo com as instruções providas, a proteína de fusão RAGE pode exibir menos que 10%, ou menos que 5%, ou menos 3% de decomposição após uma semana a 40 graus

centígrados. Também, a formulação de proteína de fusão RAGE pode ser estável sob reconstituição em um diluente. Em certas modalidades, menos que cerca de 10%, ou cerca de 5%, ou cerca de 4%, ou cerca de 3%, ou cerca de 2%, ou cerca de 1% da proteína de fusão RAGE está presente como um agregado na formulação de proteína de fusão RAGE.

5 Também, em certas modalidades, quando reconstituída de acordo com as instruções providas, a formulação de proteína de fusão RAGE reconstituída pode ser adequada administração por várias vias e como é requerido para o tratamento de distúrbio mediado por RAGE de interesse. Em certas modalidades, a formulação de proteína de fusão RAGE é adequada para pelo menos uma das administrações intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea da formulação ao paciente.

10 Em certas modalidades das formulações, artigos de fabricação, e métodos de fazer formulações compreendendo uma proteína de fusão RAGE, a concentração da proteína de fusão RAGE na formulação reconstituída pode ser pelo menos 10 mg, mL, ou pelo menos 20 mg/mL, ou pelo menos 50 mg/mL. Em modalidades alternadas, a concentração da proteína de fusão RAGE na formulação reconstituída pode ser pelo menos 100 mg/mL, ou 200 mg/mL ou 400 mg/mL. Por exemplo, em modalidades alternativas, a concentração da proteína de fusão RAGE na formulação reconstituída é pelo menos cerca de 0,5 a 400 mg/mL, ou cerca de 1 a 200 mg/mL, 40 a 400 mg/mL, 50 a 400 mg/mL, 40 a 100 mg/mL, 50 a 100 mg/mL, ou cerca de 40-50 mg/mL. Por exemplo, em uma modalidade, a proteína de fusão RAGE é administrada em uma formulação como uma solução aquosa estéril tendo um pH que varia de cerca de 5.0 a 6.5 e compreendendo cerca de 1 mg/mL a cerca de 200 mg/mL de proteína de fusão RAGE, a cerca de 1 milimolar a cerca de 100 milimolar do tampão de histidina; de cerca de 0,01 mg/mL a cerca de 10 mg/mL de polisorbato 80, a partir de 100 milimolar a cerca de 400 milimolar de trealose, e cerca de 0,01 milimolar a cerca de 1,0 milimolar de EDTA disódico diidratado.

15 Quaisquer modalidades descritas aqui podem ser utilizadas como a proteína de fusão RAGE nas formulações da presente invenção. Então, para cada uma das formulações liofilizadas, formulações liofilizadas reconstituídas, ou os métodos de fazer as formulações liofilizadas ou formulações liofilizadas reconstituídas, ou os artigos de fabricação compreendendo ou as formulações liofilizadas ou as formulações liofilizadas reconstituídas da presente invenção, a proteína de fusão RAGE pode compreender uma sequência derivada a partir de um sítio de ligação do ligador RAGE ligado a um polipeptídeo de imunoglobulina.

20 Então, modalidades da proteína de fusão RAGE podem compreender um polipeptídeo RAGE diretamente ligado a um polipeptídeo compreendendo um domínio CH2 de uma imunoglobulina ou uma porção de um domínio CH2 de uma imunoglobulina com o aqui descrito. Em certas modalidades, o polipeptídeo RAGE pode compreender um ligador interdomínio RAGE ligado a um domínio de imunoglobulina RAGE tal que o aminoácido C-terminal

- do domínio da imunoglobulina RAGE está ligado ao aminoácido N-terminal do ligador interdomínio, e o aminoácido C-terminal do ligador interdomínio RAGE é diretamente ligado ao aminoácido N-terminal de um polipeptídeo compreendendo um domínio CH2 de uma imunoglobulina, ou uma porção do mesmo. Por exemplo, certas modalidades da proteína de fusão
- 5 pode compreender um primeiro domínio de imunoglobulina RAGE e um primeiro ligador interdomínio RAGE ligado a um segundo domínio de imunoglobulina RAGE e um segundo ligador do interdomínio RAGE, tal que o aminoácido N-terminal do primeiro ligador interdomínio está ligado ao aminoácido C-terminal do primeiro domínio da imunoglobulina RAGE, o aminoácido N-terminal do segundo domínio da imunoglobulina RAGE está ligado ao amino-
- 10 ácido C-terminal do primeiro ligador interdomínio, o aminoácido N-terminal do segundo ligador interdomínio está ligado ao aminoácido C-terminal do segundo domínio da imunoglobulina RAGE, e o aminoácido C-terminal do segundo ligador interdomínio RAGE é diretamente ligado ao aminoácido N-terminal do domínio da imunoglobulina CH2 ou uma porção de um domínio de uma imunoglobulina.
- 15 Por exemplo, em modalidades alternativas da proteína de fusão RAGE, o polipeptídeo RAGE pode compreender a sequência aminoácida como revelado na SEQ ID NO:10, ou uma sequência pelo menos 90% idêntica a mesma, ou a sequência aminoácida como revelada na SEQ ID NO:47, ou uma sequência 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica a mesma. Em outras modalidades alternativas, a proteína de fusão RAGE pode compreender a sequência aminoácida como revelado em pelo uma das SEQ ID NOs: 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica a mesma. Por exemplo, em certas modalidades, uma sequência pelo menos 90% idêntica a SEQ ID NOs: 32, 33, 34, 56, 35, 36, 37, ou 57 compreende o polipeptídeo de SEQ ID NOs: 32, 33, 34, 56, 35, 36, 37, ou 57 sem a lisina C-terminal.
- 20
- 25

Preparação das Formulações Liofilizadas

Em outra modalidade, a presente invenção provê uma formulação pré-liofilizada, uma formulação liofilizada, uma formulação reconstituída, e métodos para preparação dos mesmos.

Após preparação de uma proteína de fusão RAGE de interesse como descrito acima, uma "formulação pré-liofilizada" pode ser produzida. A quantidade de proteína de fusão RAGE presente na formulação pré-liofilizada pode ser determinada tomando em consideração que volumes de doses desejados, modo(s) de administração etc. Em uma modalidade, a quantidade de proteína de fusão na formulação pré-liofilizada pode ser maior que 1 mg/mL. Também em certas modalidades, a quantidade de proteína de fusão na formulação pré-liofilizada pode ser menor que cerca de 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL, ou 200 mg/mL.

Em uma modalidade adicional, a formulação pré-liofilizada pode ser uma solução

de pH tamponado em um pH de cerca de 4-8. Em outra modalidade, formulação pré-liofilizada pode ser uma solução de pH tamponado de cerca de 5-7. Em outra modalidade, formulação pré-liofilizada pode ser uma solução de pH tamponado de menos que 6.7. Em outra modalidade, formulação pré-liofilizada pode ser uma solução de pH tamponado de cerca de 6.0. Tampões exemplares incluem histidina, fosfato, Tris, citrato, succinato e outros ácidos orgânicos como aqui descritos. A concentração do tampão pode ser de cerca de 1 mM a 100 mM, ou menos que 50 mM, ou de cerca de 2 mM a cerca de 50 mM, ou menos que 15 mM, ou de cerca de 3 mM a cerca de 15 mM dependendo, por exemplo, do tampão e da isotonicidade desejada da formulação (por exemplo, da formulação reconstituída). Em uma modalidade, o tampão é histidina.

O lioprotetor pode ser adicionado para a formulação pré-liofilizada. Em uma modalidade, o lioprotetor compreende um açúcar. Em outra modalidade, o lioprotetor compreende um açúcar não redutor. Em outra modalidade, o lioprotetor compreende o açúcar não redutor sacarose. Ou, o açúcar não redutor pode compreender manitol, ou, o açúcar não redutor pode compreender trealose. A quantidade de lioprotetor na formulação pré-liofilizada é geralmente tal que sob reconstituição, a formulação resultante será isotônica. Entretanto, uma formulação reconstituída hipertônica pode também ser adequada, por exemplo, em formulações para administração parenteral periférica. Em adição, a quantidade de lioprotetor não deve ser tão baixa tal que uma quantidade inaceitável de degradação e/ou agregação da proteína ocorre sob liofiliação. Em modalidades alternativas, uma quantidade inaceitável de agregação pode ser onde 20%, ou 10%, ou 5% ou mais da proteína e fusão RAGE está presente como agregado em uma formulação. Uma variação exemplar de concentração de lioprotetor na formulação pré-liofilizada pode ser menos que cerca de 400 mM. Em outra modalidade, a variação de concentração do lioprotetor na formulação pré-liofilizada é menor que cerca de 100 mM. Em modalidades alternativas, a variação de concentração de lioprotetor na formulação pré-liofilizada pode assim variar de cerca de 0,5 mM, ou de cerca de 60-65 mM. Também, em algumas modalidades, o lioprotetor é adicionado em uma quantidade para produzir a formulação isotônica reconstituída.

A proporção da proteína de fusão RAGE para o lioprotetor na formulação pré-liofilizada é selecionada para proteína de fusão RAGE e combinação lioprotetora. Em uma modalidade de uma formulação reconstituída isotônica com uma alta concentração de fusão RAGE por exemplo, maior que ou igual a cerca de 50 mg/mL), a proporção molar de lioprotetor para a proteína de fusão RAGE pode ser de cerca de 50 a cerca de 1500 moles de lioprotetor para 1 mol de proteína de fusão RAGE. Em outra modalidade, a proporção molar de lioprotetor para a proteína de fusão RAGE pode ser de cerca de 150 a cerca de 1000 moles de lioprotetor para 1 mol de proteína de fusão RAGE. Em outra modalidade, a proporção molar de lioprotetor para a proteína de fusão RAGE pode ser de cerca de 150 a cerca de

300 moles de lioprotetor para 1 mol de proteína de fusão RAGE. Por exemplo, essas variações podem se adequadas onde o lioprotetor é um açúcar não redutor, tal como sacarose, trealose ou manitol.

Em outra modalidade da invenção, um tensoativo pode ser adicionado à formulação pré-liofilizada. Alternativamente, ou em adição, o tensoativo pode ser adicionado à formulação liofilizada e/ou a formulação reconstituída. Tensoativos exemplares incluem tensoativos não iônicos tais como polisorbatos (por exemplo, polisorbato 20 ou 80) (Twenn 20® ou Twenn 80®); poloxâmeros (por exemplo, poloxâmero 188). A quantidade de tensoativo adicionada é tal que ele reduz agregação da proteína reconstituída e minimiza a formação de particulatos após a reconstituição. Por exemplo, o tensoativo pode estar presente na formulação pré-liofilizada em uma quantidade de cerca de 0,001% a 0,5%. Por exemplo, em uma modalidade onde o tensoativo compreende polisorbato 80, o tensoativo pode estar presente na formulação pré-liofilizada em uma quantidade de cerca de 0,005% a 0,05%, ou cerca de 0,008% a cerca de 0,012%, ou a cerca de 0,01%. Alternativamente, o tensoativo pode estar presente nas formulações de forma a compreender uma concentração final variando de 0,001 mg/mL a cerca de 100 mg/mL, ou cerca de 0,01 mg/mL a cerca e 10 mg/mL.

Em certas modalidades da invenção, uma mistura de lioprotetor (tal como sacarose ou histidina) e um agente de massa (por exemplo, manitol ou glicina) pode ser utilizado na preparação da formulação pré-liofilização. O agente de massa pode permitir para a produção de um bolo liofilizado uniforme sem bolsos excessivos no mesmo etc.

Outros veículos farmaceuticamente aceitáveis, excipientes ou estabilizadores tais como aqueles descritos em Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a Edição, Osol, A. Ed. (1980) pode ser incluído na formulação pré-liofilizada (e/ou a formulação liofilizada e/ou a formulação reconstituída) proveu que eles não afetassem adversariamente as características desejadas da formulação. Veículos aceitáveis, excipientes ou estabilizadores são não tóxicos para recipientes nas dosagens e concentrações empregadas e incluir agentes tamponantes adicionais; conservantes; co-solventes; antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; agentes quelantes tal como EDTA:complexo metal (por exemplo, complexo Zn-proteína); polímeros biodegradáveis tal como poliésteres; e/ou contra íons formadores de sal tal como sódio.

As formulações de proteína de fusão RAGE da presente invenção posem também conter protéinas adicionais como necessário para indicação particular sendo tratada. As proteínas adicionais podem ser selecionadas tal que as proteínas têm atividade complementares que não adversamente afetam cada outra ou a proteína de fusão RAGE. Tais proteínas são adequadamente presentes na combinação em quantidades que são eféticas para o propósito da invenção.

As formulações de proteína de fusão RAGE da presente invenção podem ser esté-

reis para administração in vivo. Esta pode se realizada por filtração através de membranas de filtração, antes de, ou seguido de liofilização e reconstituição.

Após a protéina de fusão RAGE, lioprotetor e outros componentes opcionais são misturados juntos, a formulação pode ser liofilizada. Muitos liofolizadores diferentes estão 5 disponíveis para este propósito tal como liofilizadores ®Hull50 (Hull, EUA) ou GT20® (Leybold-Heraeus, Alemanha). Liofilização é realizada por congelamento da formulação e subsequente sublimação do gelo a partir do conteúdo congelado em uma temperatura adequada para secagem primária. Sob esta condição, a temperatira produto é abaixo do ponto eutético ou temperatura de colapso da formulação. Tipicamente, a temperatura de prateleira 10 para a secagem primária variará de cerca de -50°C a 250°C (provado o produto permanece congelado durante a secagem primária) em uma pressão adequada, variando tipicamente de cerca de 50 a 250 mTorr. Em uma modalidade, a pressão é de cerca de 10 mTorr e a amostra pode ser liofilizada entre cerca de -30 e 25 °C. A formulação, tamanho e tipo de recipiente contendo a amostra (por exemplo, frasco de vidro) e o volume do líquido podem 15 ditar o tempo requerido para secagem, que pode variar de umas poucas horas a vários dias (por exemplo, 40-60 horas). Condições de liofilização podem ser variadas dependendo da formulação e tamanho do frasco.

Em alguns exemplos, pode ser desejável liofilizar a formulação de proteína no recipiente em que a reconstituição da proteína é para ser realizada a fim de evitar um passo de 20 transferência. O recipiente neste exemplo pode, por exemplo, ser um frasco de 2, 3, 5, 10, 20, 50, 100 ou 250 cc. Em uma modalidade, o recipiente é qualquer recipiente adequado para preparar uma formulação reconstituída tendo um volume de menos que ou igual a 100 mL.

Como uma proposição geral, liofilização resultará em uma formulação liofilizada 25 em que o conteúdo da mistura do mesmo é menos que cerca de 5%. Em uma modalidade, o conteúdo de mistura da formulação liofilizada é menor que cerca de 3%. Em outra modalidade, o conteúdo de mistura da formulação liofilizada é menor que cerca de 1%.

Reconstituição da Formulação Liofilizada

No estágio desejado, tipicamente quando é hora de administrar a proteína de fusão 30 RAGE ao paciente ou indivíduo, a formulação liofilizada pode ser reconstituída com um diluente tal que a concentração da proteína de fusão RAGE na formulação reconstituída é cerca de mais de 10 mg/mL, maior que 20 mg/mL, ou maior que 50 mg/mL, ou cerca de 30-50 mg/mL. Em modalidades alternativas, a concentração de proteína de fusão RAGE na formulação reconstituída pode ser pelo menos 100 mg/mL, ou 200 mg/mL, ou 400 mg/mL. Por 35 exemplo, em modalidades alternativas, a concentração de proteína de fusão RAGE na formulação reconstituída pode ser na variação de cerca de 1 mg/mL a cerca de 600 mg/mL, ou 1 mg/mL a cerca de 500 mg/mL, ou de cerca de 1 mg/mL a cerca de 400 mg/mL, ou de cer-

ca de 1 mg/mL a cerca de 200 mg/mL, ou de cerca de 10 mg/mL a cerca de 400 mg/mL, ou de cerca de 10 mg/mL a cerca de 200 mg/mL, ou de cerca de 40 mg/mL a cerca de 400 mg/mL, ou de cerca de 40 mg/mL a cerca de 200 mg/mL, ou de cerca de 50 mg/mL a cerca de 400 mg/mL, ou de cerca de 50 mg/mL a cerca de 200 mg/mL. Em outras modalidades, a 5 concentração da proteína de fusão RAGE na formulação reconstituída é de cerca de 40 mg/mL a cerca de 100 mg/mL, ou de cerca de 50 mg/mL a cerca de 100 mg/mL, ou de cerca de 40 mg/mL a cerca de 50 mg/mL. Tais concentrações de protéina de fusão RAGE na formulação reconstituída são consideradas serem particularmente úteis onde a distribuição subcutânea da formulação reconstituída é tencionda. Entretanto, para outras vias de administração, tais como administração intravenosa, concentrações inferiores de proteína na 10 formulação reconstituída podem ser desejadas (por exemplo, de cerca de 5-50 mg/mL, ou de cerca de 10-40 mg/mL de proteína de fusão RAGE na formulação reconstituída). Então, em algumas modalidades, a concentração de proteína de fusão na formulação reconstituída pode ser a mesma ou menor que 2 vezes a concentração da proteína de fusão da formulação pré-liofilizada.

15 Em certas modalidades, a concentração de proteína de fusão na formulação reconstituída é significantemente maior que aquela na formulação pré-liofilizada. Por exemplo, a concentração de proteína de fusão na formulação pré-liofilizada pode, em certas modalidades, ser cerca de 2-40, ou 2-10 ou 3-8 vezes que a formulação pré-liofilizada. Em uma 20 modalidade, a concentração de proteína de fusão RAGE na formulação reconstituída pode ser de cerca de 3-6 vezes que a formulação pré-liofilizada. Em outra modalidade onde a concentração da proteína de fusão RAGE na formulação pré-liofilizada é cerca de 15 mg/mL, a concentração da proteína de fusão RAGE na formulação reconstituída é maior que ou igual a cerca de 50 mg/mL (por exemplo, pelo menos três vezes ou pelo menos quatro 25 vezes maior).

A distribuição de uma concentração de proteína é sempre vantajosa ou requerida para administração subcutânea devido às limitações de volume (menos que ou igual a 1,5 mL) e requerimentos de doses (maiores que ou igual a 100 mg). Entretanto, concentrações de proteína (maiores que ou igual a 50 mg/mL) pode ser difíceis de alcançar no processo de 30 fabricação desde que em altas concentrações, uma proteína pode ter uma tendência a agregar durante o processamento e se tornar difícil de manipular (por exemplo, aspirar) e esterilizar por filtração. Alternativamente, o processo de liofilização pode prover um método para permitir a concentração de uma proteína. Por exemplo, uma protéina de fusão RAGE pode ser depositada em frascos em um volume (V_f) e então liofilizada. A proteína de fusão 35 RAGE liofilizada é então reconstituída com um volume menor (V_r) de água ou conservante (por exemplo, ABPI) que o volume original (por exemplo, $V_r = 0,25 V_f$) resultando em uma concentração de proteína de fusão RAGE maior na solução reconstituída. Este processo

também resulta na concentração dos tampões e excipientes. Para administração subcutânea, a solução é desejavelmente isotônica.

Geralmente a reconstituição toma lugar em uma temperatura de cerca de 25°C para garantir completa hidratação, embora outras temperaturas possam ser empregadas como desejado. O tempo requerido para reconstituição dependerá, por exemplo, do tipo de diluente, quantidade de exciente(s) e proteína. Diluentes exemplares incluem água estéril, água bacteriostática para injeção (ABPI), uma solução com pH tamponado (por exemplo, solução salina tamponada com fosfato), solução salina estéril, solução de Ringer ou solução de dextrose. Em uma modalidade, o diluente provê uma formulação reconstituída adequada para injeção, o diluente compreende água para injeção (API). O diluente opcionalmente contém um conservante. A quantidade de conservante empregada pode ser determinada por estimar diferentes concentrações de conservantes para compatibilidade com a proteína e teste de eficácia do conservante.

Em modalidades alternativas, a formulação reconstituída pode ter menor que 8000 ou menos que 6000, ou menos que 4000, ou menos que 2000, ou menos que 1000 ou menos que 600, ou menos que 400, ou menos que 200, ou menos que 100, ou menos que 50 partículas que são iguais ou maiores que 10 µm em tamanho por 50 mL do recipiente. Em outras modalidades, a formulação reconstituída pode ter menor que 8000 ou menos que 6000, ou menos que 4000, ou menos que 2000, ou menos que 1000 ou menos que 600, ou menos que 400, ou menos que 200, ou menos que 100, ou menos que 50 partículas que são iguais ou maiores que 25 µm em tamanho por 50 mL do recipiente.

Administração da Formulação Reconstituída

A formulação reconstituída pode ser administrada a um mamífero em necessidade do tratamento com a proteína de fusão RAGE, tal como um humano, em acordo com métodos conhecidos, tais como administração intravenosa, como uma administração única ou por infusão contínua por um período de tempo, por vias intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutânea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral tópica, ou vias de inalação.

Em modalidades, a formulação reconstituída por ser administrada ao mamífero por administração subcutânea (isto é, debaixo da pele). Para tais propósitos, a formulação reconstituída pode ser injetada utilizando uma seringa. Entretanto, outros dispositivos para administração da formulação são disponíveis tais como dispositivos de injeção (por exemplo, dispositivos Inject-ease® e Genject®); canetas injetoras (tal como a GenPen®); dispositivos sem agulhas (por exemplo, MediJector® e BioJector®); e sistemas de distribuição de adesivos subcutâneos.

A dose apropriada ou quantidade terapeuticamente efetiva da proteína de fusão RAGE dependerá, por exemplo, da condição a ser tratada, a severidade e curso da condi-

ção, se a proteína de fusão RAGE é administrada para prevenção ou para propósitos terapêuticos, terapia prévia, a história clínica do paciente e resposta para a proteína de fusão RAGE, e a ponderação do médico atendente. A proteína de fusão RAGE pode ser administrada ao indivíduo (por exemplo, paciente) em uma vez ou por uma séries de tratamentos ou 5 pode ser administrada ao paciente em qualquer tempo de progresso diagnóstico. A proteína de fusão pode ser administrada como um tratamento único ou em conjunto com outros fármacos ou terapias úteis no tratamento da condição em questão. Em uma modalidade, uma dose de cerca de 0,1 -20 mg/kg é uma dose candidata inicial para administração ao paciente, se, por exemplo, por um ou mais administrações separadas. Como descrito acima, outros regimes de dosagens podem ser úteis.

Artigos de Fabricação

Em outra modalidade da invenção, um artigo de fabricação é provido que contém a formulação liofilizada da presente invenção e provê instruções para sua reconstituição e/ou uso. O artigo de fabricação pode compreender um recipiente. Recipientes adequados incluem, por exemplo garrafas, frascos (por exemplo, frascos de duas câmaras), seringas (tal com seringas de duas câmaraeas) e tubos testes. O recipiente pode ser formado a partir de uma variedade de materiais tais com ovidro ou plástico. O recipiente deve conter a formulação liofilizada. Em certas modalidades, deve ter uma etiqueta afixada a ou associada com o recipiente. A etiqueta pode indicar intruções para reconstituição e/ou uso. Por exemplo, em certas modalidades, a etiqueta pode indicar que a formulação liofilizada é reconstituída para concentrações de proteína como descrito acima. A etiqueta pode contar indicação que a formulação é útil ou tencionada para administração subcutânea.

O recipiente contendo a formulação pode ser um frasco multi-uso, que permite repetidas administrações (por exemplo, de 2-6, ou 2-10 ou 2-50 administrações) da formulação reconstituída. O artigo de fabricação pode ainda compreender um segundo recipiente compreendendo um dilunete adequado (por exemplo API). Sob mistura do diluente e formulação liofilizada, a concentração da proteína de fusão RAGE na formulação reconstituída geralmente será pelo menos 10 mg/mL. Em uma modalidade, a concentração de proteína de fusão RAGE na formulação reconstituída é pelo menos cerca de 20 mg/mL. Em outra modalidade, a concentração da proteína de fusão RAGE final na formulação reconstituída é pelo menos 50 mg/mL. Em modalidades alternativas, a concentração da proteína de fusão RAGE final na formulação reconstituída pode ser pelo menos 100 mg/mL, ou 200 mg/mL ou 400 mg/mL. Em outras modalidades, a concentração da proteína de fusão RAGE final na formulação reconstituída está entre cerca de 1-400 mg/mL, ou 1-200 mg/mL, ou 1-100 mg/mL, ou 10-400 mg/mL, ou 10-200 mg/mL, ou 10-100 mg/mL, ou de 40-400 mg/mL, ou de 40-200 mg/mL, ou de 40-100 mg/mL, ou de 50-400 mg/mL, ou de 50-200 mg/mL, ou de 50-100 mg/mL, ou de 40-50 mg/mL. O artigo de fabricação incluir outros materiais desejáveis

a partir de um ponto de vista comercial e usuário, incluindo tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas, e pacotes de inserção com instruções para uso.

Exemplos

Características e vantagens do conceito inventivo abrangida pela presente invenção 5 são ainda ilustrados nos exemplos que seguem.

Exemplo 1A: Produção das Proteínas de Fusão RAGE

Dois plasmídios foram construídos para expressar as proteínas de fusão RAGE-IgG Ambos os plasmídios foram construídos por ligações diferentes comprimentos de uma seqüência de cDNA 5' a partir da RAGE humana com a mesma seqüência cDNA 3' a partir da 10 IgG Fc ($\gamma 1$) humana. Essas seqüências de expressões (isto é, produtos de ligação) foram então inseridas no vetor de expressão pcDNA3.1 (Invitrogen, CA). As seqüências de ácido nucléico que codificam a região codificante da proteína de fusão RAGE são mostradas nas FIGS. 2 e 3. Para a proteína de fusão RAGE TTP-4000, a seqüência de ácido nucléico de 1 a 753 (realçada em negrito) codifica a seqüência protéica N-terminal RAGE, enquanto a seqüência de ácido nucléico de 754 a 1386 codifica a seqüência protéica IgG Fc sem a dobradiça (FIG. 2). Para TTP-3000, a seqüência de ácido nucléico de 1 a 408 (realçada em negrito) codifica a seqüência protéica N-terminal RAGE, enquanto a seqüência de ácido nucléico de 409 a 1041 codifica a seqüência protéica de IgG Fc sem a dobradiça (FIG. 3).

Para produzir as proteínas de fusão RAGE, os vetores de expressão compreendendo as seqüências de ácido nucléicos ou da SEQ ID NO:30 ou SEQ IDNO:31 foram estavelmente transfectadas em células CHO. Transformantes positivos foram selecionados por resistência a neomicina conferida pelo plasmídeo e clonado. Alta produção de clones é detectada por análise de Western Blot de sobrenadante foram expandidos e o produto final foi purificado por cromatografia de afinidade, utilizando colunas de Proteína A. A expressão foi otimizada de modo que as células foram produzindo TTP-4000 recombinante em níveis de cerca de 1,3 gramas por litro.

Exemplo 1B: Produção alternativa de Quatro Domínios de Proteínas de Fusão RAGE

Um plasmídeo foi contruído para expressar proteínas de fusão RAGE-IgG. O plasmídeo foi contruído por ligar uma sequência 5'c-DNA de RAGE humana com uma sequência 3'cDNA RAGE humana a partir de uma IgG-Fc humana ($\gamma 1$) sem a região dobradiça de Fc. PCR foi utilizado para amplificar o cDNA. Além disso, na terminação 5', o iniciador do PCR e o sítio da enzima de restrição foram clonados e uma sequência de iniciação de tradução consenso Kozak. Na terminação 3', o iniciador do PCR adicionado a restrição Xho somente passa o códon terminal. Na terminação 3', o iniciador PCR também incluiu duas mudanças de bases silenciadoras que removem o sítio de splice do RNA críptico na porção da imunoglobulina perto do códon terminal. O códon codificando para prolina (resíduo 459

baseado no número de sequência de proteína na SEQ ID NO:32) foi mudando de CCG para CCC, e o códon codificando para glicina (resíduo 460 baseado no n'nero de sequência de proteína em SEQ ID NO:32) foi mudado de GGT a GGG. O fragmento de PCR foi digerido com Eco RJ e Xho I and então inserido em plasmídeo retrovetor (pCNS-newMSC-WPRE 5 (novo ori), disponível de Gala, Inc.) que tem sido digerido com Mfe (para formar uma terminação compatível com eco RI) e digerido com Xho I. A porção inserida do plasmídeo clonado e junções clonadas foram sequenciadas para garantir que nenhuma mutação ocorreu durante a clonagem.

Para produzir a proteína de fusão RAGE-IgG o vetor de expressão compreendendo 10 a sequência de ácido nucléico SEQ ID NO:54 foi estavelmente transfectada em células CHO.

A sequência da proteína de fusão RAGE TTP-4000 isolada expressa pelas células transfectadas foi confirmada por vários estudos de caracterização como ou na SEQ ID NO:34 ou SEQ ID NO:56, ou ambos SEQ ID NO:34 e SEQ ID NO:56. Então, a sequência 15 sinal codificada pelos primeiros 23 aminoácidos da SEQ ID NO:32 foi clivada e o resíduo N-terminal foi glutamina (Q) ou ácido piroglutâmico (pE) ou uma mistura de ambos. Estudos de caracterização também mostraram sítios de glicosilação em N2 e N188 (baseados no número de SEQ ID NO:34 ou SEQ ID NO:56) e mostraram que a região CH3 da proteína de fusão RAGE pode ter um resíduo C-terminal clivado através da modificação pós-traducional quando expressa neste sistema de recombinação.

Exemplo 1C: Produção Alternada de Três Domínios de Proteínas de Fusão RAGE

Um plasmídeo foi contruído para expressar proteínas de fusão RAGE-IgG (por exemplo, um domínio RAGE e dois domínios IgG) tal como TTP-3000 na maneira descrita acima para TTP-4000. O plasmídeo foi contruído por ligar uma sequência 5'c-DNA de RAGE 25 humana codificando aminoácidos 1-136 da RAGE humana com uma sequência 3'cDNA de RAGE humana a partir de uma IgG-Fc humano (γ I) sem a região dobradiça de Fc. PCR pode ser utilizado para amplificar o cDNA. Na terminação 5', o iniciador do PCR pode adicionar um sítio de restrição (por exemplo, um sítio de enzima de restrição Eco RI como utilizado para TTP-4000) para clonagem e uma sequência de iniciação de tradução consenso Kozak. 30 Na terminação 3', o iniciador do PCR adicionar um sótio de restrição por exemplo, um sítio de restrição Xho I) somente passa o códon terminal. Os iniciadores de PCR pode também incluir mudanças nas bases silenciadoras como pode ser necessário remover qualquer sítio de splice de RNA críptico, tal como os sítios de splice de RNA críptico nos sítios localizados 35 na terminação 3' do domínio CH2 da imunoglobulina com o descreve no Exemplo 1B. Para remover esses sítios de splice crípticos, o códon codificando para prolina 344 da SEQ ID NO:35 (isto é, resíduos 1030-1032 baseados no número de sequência de DNA na SEQ ID NO:31) pode ser mudado de CCG para CCC, e o códon codificando para glicina 345 da

SEQ ID NO:35 (resíduos 1033-1035 baseados no número de sequência de DNA na SEQ ID NO:31) pode ser mudado para GGT a GGG. O fragmento de PCR foi digerido com enzimas de restrição apropriadas (por exemplo, Eco RI e Xho I) e então inserido em plasmídeo retroveto pCNS-newMSC-WPRE (novo ori: disponível de Gala, Inc.). O vetor pode ser digerido com Mfe I para formar uma terminação compatível com Eco RI, e também digerido com Xho I. A porção inserida do plasmídeo clonado e junções clonadas foram sequenciadas para garantir que nenhuma mutação ocorreu durante a clonagem.

Para produzir a proteína de fusão RAGE-IgG o vetor de expressão compreendendo a sequência de ácido nucléico SEQ ID NO:55 (isto é, compreendendo a mudança na sequência de DNA para remover os sítios de splice crípticos) pode ser estavelmente transfectada em células CHO no Exemplo 1A e 1B.

A sequência da proteína de fusão RAGE TTP-3000 isolada expressa pelas células transfectadas pode ser ou SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37 ou SEQ ID NO:57, ou a combinação de SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37 e/ou SEQ ID NO:57. Então, a sequência sinal codificada pelos primeiros 22 e/ou 23 aminoácidos da SEQ ID NO:35 foi clivada e o resíduo N-terminal foi glutamina (Q) ou ácido piroglutâmico (pE) ou uma mistura de ambos. Glicosilação pode ocorrer nos locais em N2 e N174 (baseados no número dEstudos de caracterização também mostraram sítios de glicosilação em N2 e N188 (baseados no número da SEQ ID NO:37 ou SEQ ID NO:57) e/ou outros sítios de glicosilação que podem estar presentes. A região CH3 da proteína de fusão RAGE pode ter um resíduo C-terminal clivado através da modificação pós-traducional quando expressa neste sistema de recombinação.

Exemplo 2: Método para testar a atividade de uma proteína de fusão RAGE-IgG1

A. Ligação do ligante in vitro

Ligantes de RAGE conhecidos foram revestidos em uma superfície de placas Maxisorb em uma concentração de 5 microgramas por poço. Placas foram incubadas a 4°C por uma noite. Seguindo a incubação do ligante, placas foram aspiradas e um tampão de bloqueio de 1% de BSA em tampão de imidazol a 50 mM (pH 7.2) foi adicionado as placas por 1 hora em temperatura ambiente. As placas foram então aspiradas e/ou lavadas com tampão de lavagem (20 mM de Imidazol, 150 mM de NaCl, 0,05% de Tween-20, 5 mM de CaCl₂ e 5 mM de MgCl₂, pH 7.2). Uma solução de TTP-3000 (TT3) em uma concentração inicial de 1,082 mg/mL e uma solução de TTP-4000 (TT4) em uma concentração inicial de 370 µg/mL foram preparados. A proteína de fusão RAGE foi adicionada em diluições aumentadas da amostra inicial. A proteína de fusão RAGE foi deixada em incubação com o ligante imobilizado a 37°C por uma hora após que a placa foi lavada e ensaiada para a ligação da proteína de fusão RAGE. A ligação foi detectada pela adição de um complexo de imunodetecção contendo uma IgG1 monoclonal anti-humano de camundongo diluída 1:11.000 para uma concentração final de ensaio (FAC) de 21 ng/100µL, uma IgG biotinilada anti-camundongo de

Joo

- cabra diluída 1:500, para um FAC de 500 ng/ μ L, e uma fosfatase alcalina ligada a avidina. O complexo foi incubado com a proteína de fusão RAGE imobilizada por uma hora em temperatura ambiente após o que a placa foi lavada e o substrato da fosfatase alcalina para-nitrofenilfosfato (PNPP) foi adicionado. A ligação do complexo para a proteína de fusão RA-GE imobilizada foi quantificada por medida de conversão de PNPP para para-nitrofenol (PNP) que foi medida espectrofotometricamente a 405 nm.

Como ilustrada em FIG. 7, as proteínas de fusão RAGE TTP-4000 (TT4) e TTP-3000 (TT3) especificamente interagem com ligantes RAGE conhecidos beta-amilóide (Abeita), S100b (S100), e anfotericina (Anfo). Em ausência de ligante, isto é, revestimento de BSA sozinho (BSA ou BSA + água) não houve aumento em absorbância sobre níveis atribuídos a ligação não específica do complexo de imunodetecção. Onde o beta-amilóide é utilizado como o ligante marcado pode ser necessário pré-incubar o beta-amilóide antes do ensaio. A pré-incubação pode permitir que o beta-amilóide se auto-agregue em forma de folha pregueada, como um beta-amilóide pode preferencialmente se ligar à RAGE na forma de uma folha pregueada.

Evidências adicionais para uma interação específica entre as proteínas de fusão RAGE TTP-4000 e TTP-3000 com ligantes RAGE é exemplificado em estudos mostrando que um ligante RAGE é capaz de efetivamente competir com um ligante RAGE conhecido para ligar às proteínas de fusão RAGE. Nestes estudos, beta-amilóide (A-beta) foi imobilizado em uma placa de Maxisorb e a proteína de fusão RAGE adicionada como descrito acima. Em adição, um ligante RAGE foi adicionado a alguns poços na mesma hora que a proteína de fusão RAGE.

Foi encontrado que o ligante RAGE pode bloquear a ligação da TTP-4000 (TT4) por cerca de 25% a 30% onde TTP-4000 esteve presente a 123 μ g/mL (diluição 1:3, FIG. 8). Quando a solução inicial de TTP-4000 foi diluída por um fator de 10 ou 30 (1:10 ou 1:30), ligando da proteína de fusão RAGE ao ligante imobilizado foi completamente inibido por ligante RAGE. Similarmente, o ligante RAGE bloqueou a ligação do TTP-3000 (TT3) por cerca de 50% onde o TTP-3000 estava presente a 360 μ g/mL (diluição 1:3, FIG. 9). Quando a solução inicial de TTP-3000 foi diluída por um fator de 10 (1:10), ligando da proteína de fusão RAGE ao ligante imobilizado foi completamente inibido por ligante RAGE. Dessa forma, a especificidade da ligação da proteína de fusão RAGE ao ligante RAGE foi dose dependente. Também, como mostrado nas FIGS. 8 e 9, não tem essencialmente nenhum ligante detectado em ausência da proteína de fusão RAGE, isto é, utilizando somente o complexo de imunodetecção ("Complexo sozinho").

- B. Efeito das proteínas de fusão RAGE em ensaios baseado em célula
 Trabalhos prévios têm mostrado que as células THP-1 mieloides pode secretar TNF- α em resposta aos ligantes RAGE. Neste ensaio, células THP-1 foram cultiva-

101

das em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB utilizando um protocolo provido pela ATCC. As células foram incubadas para secretar TNF- α através da estimulação da RAGE com 0,1 mg/mL de S100b, ambas em ausência e presença das proteínas de fusão RAGE TTP-3000 (TT3) ou TTP-4000 (TT4) (10 μ g), RAGEs (10 μ g), e uma IgG humana (10 μ g) (isto é, como um controle negativo). A quantidade de TNF- α secretada pelas células THP-1 foi medida 24 horas após a adição das proteínas à cultura celular utilizando um "kit" ELISA comercialmente disponível para TNF- α (R&D Systems, Mineápolis, MN). Os resultados na FIG. 10 demonstram que as proteínas de fusão RAGE inibem a produção de TNF- α induzida por S100b/RAGE nestas células. Como mostrado na FIG. 10, sob adição de 10 μ g de proteína de fusão TTP-3000 ou TTP-4000, a indução de TNF- α por S100b (0,1 mg/mL FAC) foi reduzida por cerca de 45% a 70%, respectivamente. A proteína de fusão TTP-4000 pode ser pelo menos efetiva em bloquear a indução de TNF- α por S100b como é a RAGEs (FIG. 10). Especificidade da inibição para as seqüências RAGE de TTP-4000 e TTP-3000 é mostrada pelo experimento em que IgG sozinha foi adicionada às células estimuladas com S100b. A adição de IgG e S100b aos ensaios mostram os mesmos níveis de TNF- α como S100b sozinho. Especificidade da inibição da indução de TNF- α por TTP-4000 e TTP-3000 por seqüências RAGE da proteína de fusão RAGE é mostrada por um experimento em que IgG sozinha foi adicionada às células S100b estimuladas. Pode ser visto que a adição de IgG, isto é, IgG humana sem a seqüência RAGE (IgG humana da Sigma adicionada a 10 μ g/poço), e S100b para o ensaio mostra os mesmos níveis de TNF- α como S100b sozinho.

Em outro ensaio baseado em célula, a habilidade de TTP-4000 em prevenir o HMGB1 ligador de RAGE de interagir com RAGE e outros receptores de HMGB1 foi avaliado. A menos que anticorpos anti-RAGE que ligam a RAGE e previnem a interação de um ligador RAGE com RAGE, TTP-4000 pode bloquear a interação de um ligador RAGE com RAGE por se ligar ao ligador RAGE. HMGB1 tem sido reportado ser um ligador para RAGE e os Receptores do Tipo Toll 2 e 4 (Park et al, J Biol Chem, 2004; 279 (9):7370-7). Todos os três receptores 9RAGE, Receptor do Tipo Toll 2 e Receptor do Tipo Toll 4) são expressos em células THP-1 (Parker et al, J Immunol 2004, 172 (8) 4977-86).

Neste experimento, células THP-1 foram estimuladas para produzir TNF α por 30 HMGB1 (50 mg/mL) em presença ou ausência de ou TTP-4000 ou anticorpos anti-RAGI. Sob as condições utilizadas no ensaio, HMGB1 deve ser o único indutor de TNF- α . A quantidade de TNF- α secretada por células THP-1 foi medida 24 horas após a adição de proteínas à cultura celular utilizando um kit ELISA comercialmente disponível para TNF- α (R&S Systems, Minneapolis, MN). Os resultados na FIG. 11 demonstraram que o anticorpo anti-RAGE 35 e proteína de fusão TTP-4000 bloqueiam HMGB1 de interagir com RAGE expresso nas células THP-1, mas que TTP-4000 inibe a produção de TNF- α induzido por HMGB1 para uma maior extensão que faz o anticorpo anti-RAGE. Então, os dados indicam que TTP-4000 po-

de inibir a atividade de HMGB1 em uma maior extensão que o anticorpo anti-RAGE por inibir HMGB1 de interagir com receptores do tipo Toll 2 e 4, bem como o RAGE apresenta nas células THP-1.

Exemplo 3: Perfil de Farmacocinética do TTP-4000

5 Para determinar se TTP-4000 pode ter um perfil de farmacocinética superior quando comparada à RAGEs humana, ratos e primatas não humanos tiveram injetados intravenosamente (IV) TTP-4000 (5 mg/kg) e então o plasma foi analisado para a presença de TTP-4000. Neste experimento, dois macacos machos selvagens receberam uma única injeção IV da dose de TTP-4000 (5 mg/kg) em uma veia periférica seguido por um fluxo de salino aproximado de 1,0 mililitro (mL). Amostras de sangue (aproximadamente 1,0 mL) foram coletadas na pré-dose (isto é, antes da injeção de TTP-4000), ou em 0,083, 0,25, 0,5, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 240, 288, e 336 horas após a dose em tubos contendo (heparina lítio). Seguindo a coleta, os tubos foram colocados em gelo úmido (máximo 30 minutos) até a centrifugação sob refrigeração (de 2 a 8°C) a 1500 x g por 15 minutos. Cada amostra de plasma coletada foi então estocada congelada (-70°C ± 10°C) até o ensaio para o polipeptídeo RAGE utilizando um ELISA em vários pontos de tempo seguido da injeção, como descrito no Exemplo 6.

20 O perfil cinético mostrado na FIG. 12 revela que uma vez que TTP-4000 tenha saturado seus ligantes como evidenciado pela justa grande inclinação da fase alfa nos 2 primeiros dias, ela retém uma meia vida de mais que 300 horas. Esta meia vida é significantemente maior que uma meia vida de RAGEs humanas no plasma (geralmente cerca de 2 horas) e provê uma oportunidade para injeções únicas para indicações agudas e semi-crônicas. Na FIG. 12 cada curva representa um animal diferente sob as mesmas condições experimentais.

25 Exemplo 4: Ativação do TTP-4000 Fc

Experimentos foram feitos para medir a ativação do receptor Fc pela proteína de fusão RAFFE TTP-4000 como comparado com a IgG humana. A ativação do receptor Fc foi medida por medir a secreção de TNF- α de células THP-1 que expressam o receptor Fc. Nestes experimentos, uma placa de 96 poços foi revestida com 10 μ g/poço de TTP-4000 ou IgG humana. Estimulação de Fc resulta em secreção de TNF- α . A quantidade de TNF- α foi medida por um Ensaio Imunoabsorvente Ligado a Enzima (ELISA).

30 Dessa forma, neste ensaio, a linhagem celular mielóide, THP-1 (ATTC # TIB-202) foi mantida em meio RMPI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino por instruções da ATCC. Tipicamente, 40.000-80.000 células foram induzidas a secretar TNF- α via estimulação do receptor Fc por pré-revestimento do poço com 10 μ g/poço ou de TTP-4000 aquecida (63°C por 30min.) ou IgG humana. A quantidade de TNF- α secretada pelas células TNF- α as THP-1 foi medida em sobrenadantes coletados de 24 horas de cultura de

células nos poços tratados utilizando um "kit" de TNF ELISA comercialmente disponível (R&D Systems, Mineápolis, MN # DTA00C) por instruções.

Os resultados mostrados na FIG. 13 onde se pode ver que TTP-4000 gera menos que 2 ng/poço de TNF e IgG gera mais de 40 ng/poço.

5 Exemplo 5: Atividade in vivo da TTP-4000

A atividade de TTP-4000 foi comparada à RAGEs em vários modelos de doença humana.

A. TTP-4000 em um modelo animal de restenose

A proteína de fusão RAGE TTP-4000 foi avaliada em um modelo de rato diabético de restenose que envolve medida da proliferação do músculo liso e expansão da membrana interna 21 dias seguidos à injúria vascular. Nestes experimentos, a injúria balão da artéria carótida esquerda comum foi feita em ratos Zucker diabéticos e não diabéticos utilizando o procedimento padrão. Uma carga de dose (3 mg/rato) de IgG, TTP-4000 ou salina tamponada com fosfato (PBS) foi administrada intraperitonealmente (IP) um dia antes da injúria. Uma dose mantida foi distribuída cada dia até o dia 7 após a injúria (isto é, nos dias 1, 3, 5 e 7 após a injúria). A manutenção da dose foi alta = 1 mg/animal para um grupo, ou baixa = 0,3 mg/animal para o segundo grupo. Para medir a proliferação celular do músculo liso vascular (VSMC), animais foram sacrificados 4 dias e 21 dias após a injúria.

Para a medida da proliferação celular, no dia 4 animais receberam injeção intraperitoneal de bromodeoxiuridina (BrDdU) 50 mg/kg nas 18, 12 e 2 horas antes da eutanásia. Após o sacrifício, as todas as artérias carótidas esquerda de direita foram coletadas. Espécimes foram estocados em "Histochoice" por pelo menos 24 horas antes de incrustarem. Análise da proliferação VSMC foi feita utilizando anticorpo monoclonal de camundongo anti-BrDU. Um anticorpo secundário de cabra anti-camundongo marcado com fluorescência foi aplicado. O número de núcleos BrDU positivos por seção foram contados por dois observadores cegos aos regimes de tratamento.

Os ratos remanescentes foram sacrificados no dia 21 para análise morfométrica. Análises morfométricas foram feitas por um observador cego aos grupos de estudo, utilizando planimetria microscopia digital computadorizada e programa Image-Pro Plus em seções seriadas, (5 mm de distância) artérias carótidas por corante Van Gieson. Todos os dados foram expressos como média \pm DP. Análise estatística foi feita utilizando o programa SPSS. Variáveis contínuas foram comparadas utilizando testes t não pareados. Um valor de $P \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significante.

Como visto nas FIGS. 13A e 13B, tratamento com TTP-4000 significantemente reduziu a proporção membrana interna/meio e proliferação do músculo liso vascular em uma maneira dose-resposta. Na FIG. 13B, o eixo X representa o número de células BrDU proliferando.

104

B. TTP-4000 em um modelo animal de AD

Experiments foram feitos para avaliar se TTP-4000 pode afetar a formação amilóide e disfunção cognitiva em um modelo de camundongo de AD. Os experimentos utilizaram camundongos transgênicos expressando a proteína precursora amilóide mutante Swedish humana (APP) sob o controle do promotor da cadeia PDGF-B. Ao longo do tempo, esses camundongos geraram altos níveis de ligante RAGE, beta amilóide ($A\beta$). Previamente, tratamento com RAGEs por 3 meses tem mostrado reduzir a formação de plaque amilóide o cérebro e o aumento associado dos marcadores inflamatórios neste modelo.

Os camundongos APP (macho) utilizados neste experimento foram projetados por microinjeção do gene APP humano (com as mutações Swedish e London) em ovos de camundongos sob o controle do promotor do gene da cadeia do fator de crescimento derivado de plaqueta B (PDGF-B). Estes camundongos foram gerados na linhagem C57BL/6 e foram desenvolvidos por Molecular Therapeutics Inc. Os animais foram alimentados à vontade e mantidos por acasalamento de irmão-irmã. Os camundongos gerados desta construção desenvolvem depósitos amilóides começando em 6 meses de idade. Animais cresceram até os 6 meses e então mantidos por 90 dias e sacrificados por quantificação amilóide.

Camundongos APP transgênicos foram administrados com veículo ou TTP-4000 todos os dias [qd (i.p.)] por 90 dias, começando com 6 meses de idade. No final do experimento, animais foram sacrificados e examinados para a placa $A\beta$ no cérebro (isto é, numero de placas). Um controle de 6 meses do grupo APP foi utilizado para determinar a linha base dos depósitos amilóides. Em adição, ao fim do estudo, os animais foram sujeitos a análise de comportamento (labirinto de água Morris). Os investigadores foram cegos para os compostos do estudo. Amostras foram dadas para os camundongos a 0,25 mL/camundongo/cada outro dia. Em adição, um grupo de camundongos foram dados 200 μ g/dia da RAGEs humana.

1- Deposição Beta Amilóide

Para exame histológico, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal (IP) do pentobarbital de sódio (50 mg/kg). Os animais foram transcardialmente perfundidos com 4°C de salina tamponada com fosfato (PBS) seguida por 4% de paraformaldeído. Os cérebros foram removidos e colocados em paraformaldeído 4% por uma noite. Os cérebros foram processados por parafina e embebidos. Dez seções seriadas grossas de 30 μ m através do cérebro foram obtidas. Seções foram sujeitas ao anticorpo primário por uma noite a 4°C (peptídeo anticorpo $A\beta$) a fim de detectar os depósitos amilóides no cérebro de animais transgênicos (Guo e colaboradores, J. Neurosci., 22:5900-5909 (2002)). Seções foram lavadas em salina tamponada com Tris (TBS) e anticorpo secundário foi adicionado e incubado por 1 hora em temperatura ambiente. Após lavagem, as seções foram incubadas como instruído no "kit Vector ABC Elite" (Vector Laboratories) e corado com ácido diaminobenzólico

(DAB). As reações foram paradas em água e lamínula após tratamento com xileno. A área amilóide de cada seção foi determinada com um sistema de imagem assistida por computador, consistindo de um computador Power Macintosh equipado com um cartão regulado Quick Capture, câmera Hitachi CCd mostrada em um microscópio Olympus e uma câmera parada NIH Image Analysis Software, v. 155 foi utilizada. As imagens foram capturadas e a área total da amilóide foi determinada por dez seções. Um único operador cego para a condição do tratamento feito fez todas as medidas. Somando os volumes das seções amilóides e dividindo pelo número total de seções foi feito um cálculo do volume amilóide.

Para análise quantitativa, um ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) foi utilizado para medir os níveis de A β , A β_{total} e A β_{1-42} nos cérebros dos camundongos APP transgênicos (Biosource International, Camarillo, CA). A β_{total} e A β_{1-42} foram extraídas dos cérebros de camundongos por hidrocloreto de guanidina e quantificadas pelo fabricante. Este ensaio extrai o peptídeo A β total do cérebro (ambos os solúveis e agregados).

2- Função Cognitiva

O teste labirinto água Morris foi feito como segue. Todos os camundongos foram testados uma vez no teste labirinto água Morris no final do experimento. Camundongos foram treinados em um labirinto de água de campo aberto de 1,2 m. A piscina foi cheia a uma profundidade de 30 cm com água e mantida a 25°C. A plataforma de escape (10 cm quadrados) foi colocada 1 cm abaixo da superfície da água. Durante as provas, a plataforma foi removida da piscina. O teste indireto foi realizado em uma piscina cercada com cortina branca para esconder qualquer labirinto indireto extra. Todos os animais passam por pré-tratamento não espacial (NSP) por três dias consecutivos. Essas provas são para preparar os animais para o teste de comportamento final para determinar a retenção da memória para achar a plataforma. Essas provas não foram gravadas, mas foram para propósitos de treinamento somente. Para os estudos de treinamento e aprendizagem, as cortinas foram removidas para labirinto indireto extra (isto permitiu a identificação dos animais com os impedimentos da piscina). No dia 1, os camundongos foram colocados na plataforma oculta por 20 segundos (prova 1), para provas 2-3, animais foram liberados em água em uma distância de 10 cm da plataforma indireta ou plataforma escondida (prova 4) e permitidos nadar para a plataforma. No segundo dia de provas, a plataforma escondida foi movida aleatoriamente entre o centro da piscina e o centro de cada quadrante. Os animais foram liberados na piscina aleatoriamente revestindo a parede e foram deixados por 60 segundos para alcançar a plataforma (prova 3). Na terceira prova, animais foram dados três provas, dois com uma plataforma escondida e um com a plataforma indireta. Dois dias seguindo o NSP, animais foram sujeitos aos testes de comportamento final (teste do labirinto água Morris). Para essas provas (3 por animal, a plataforma foi colocada no centro de um quadrante da piscina e os animais liberados para o revestimento da parede em uma maneira aleatória. O animal foi dei-

xado para encontrar a plataforma ou nadar por 60 segundo (período de latência, o tempo é tomado para achar a plataforma). Todos os animais foram testados dentro de 4-6 horas de dosagem e foram aleatoriamente selecionados para teste por um operador cego ao grupo do teste.

5 Os resultados são expressos como a média ± desvio padrão (DP). As diferenças de significância nos estudos amilóide e comportamental foram analisadas utilizando teste t. Comparações foram feitas entre o grupo controle APP de 6 meses de idade e os animais tratados com TTP-4000, bem como, o grupo tratado com o veículo APP de 9 meses de idade e os animais tratados com TTP-4000. Diferenças abaixo de 0,05 foram consideradas significantes. Mudanças na porcentagem amilóide e de comportamento foram determinadas pela soma dos dados em casa grupos e dividindo pela comparação (isso é, 1, i.p./6 meses controle = % mudança).

10 As FIGS. 15A e 15B mostram que camundongos tratados por 3 meses com ou TTP-4000 ou RAGEs de camundongo tiveram menos placas de A β e menos disfunção cognitiva 15 que animais tratados com veículo e IgG1 humana (IgG1) como controle negativo. Esses dados indicam que TTP-4000 é efetivo em reduzir a patologia AD em um modelo de camundongo transgênico. É também encontrado que como RAGEs, TTP-4000 pode reduzir as citocinas inflamatórias IL-1 e TNF- α (dados não mostrados).

C. Eficácia de TTP-4000 em um modelo animal de derrame

20 A TTP-4000 foi também comparada ao RAGEs em uma modelo de doença relevante animal, o derrame. Neste modelo, a artéria carótida mediana de um camundongo foi ligada por 1 hora seguida por 23 horas de reperfusão no ponto que os camundongos foram sacrificados e a área do infarto no cérebro foi avaliada. Camundongos tratados com RAGEs e TTP-4000 ou imunoglobulina controle bem antes da reperfusão.

25 Nestes experimentos, machos C57BL/6 foram injetados com veículo a 250 μ L/camundongo ou artigos TTP teste (TTP-3000, TTP-4000 a 250 μ L/camundongo). Camundongos foram injetados intraperitonealmente, 1 hora após o início da isquemia. Camundongos foram sujeitos a uma hora de isquemia cerebral seguido por 24 horas de reperfusão. Para induzir isquemia, cada camundongo foi anestesiado e a temperatura corporal foi mantida em 36-37°C por aquecimento externo. A artéria carótida comum esquerda (CCA) foi exposta através de uma incisão central no pescoço. Um clipe microcirúrgico foi colocado ao redor da origem da artéria carótida interna (ICA). O fim distal da ECA foi ligado com seda e cortado transversalmente. Uma seda 6-0 foi amarrada frouxamente ao redor da ponta da ECA. A extremidade polida com fogo de uma sutura de náilon foi gentilmente inserida na ponta da ECA. A alça da seda 6-0 foi frouxamente colocada ao redor da extremidade e a sutura de náilon foi avançada dentro e através a artéria carótida interna (ICA), até ela desencansar na artéria cerebral anterior, assim obstruindo a comunicação anterior e média das

JOF

artérias cerebrais. Após a sutura de náilon ter sido feita há 1 hora, o animal foi reanestesiado, a temperatura retal foi gravada e a sutura foi removida e a incisão fechada.

O volume do infarto foi determinado por anestesia do animal com uma injeção de pentobarbital de sódio (50 mg/kg) e então removendo os cérebros. Os cérebros foram então 5 seccionados em quatro seções de 2 mm através da região enfardada e colocado cloreto de trifeniltetrazólio 2% (TTC) por 30 minutos. Após, as seções foram colocadas em paraformaldeído 4% por uma noite. A área do infarto na cada seção foi determinada com um sistema de análise assistido por computadores, consistindo de um computador Power Macintosh equipado com um cartão regulado Quick Capture, câmera Hitachi CCD montada em uma câmera parada NIH Image Analysis Software, v. 1.55 foi utilizada. Essas imagens foram capturadas e a área total do infarto foi determinada sobre as seções. Um único operador cego para a condição de tratamento feita fez todas as medidas. Somando os volumes dos infartos das seções calculou-se o volume total do infarto. Esses resultados são expressos como a média ± desvio padrão (DP). A significância ou diferença no volume dos dados do infarto foi analisada utilizando o teste t.

Como ilustrado pelos dados na Tabela 2, TTP-4000 foi mais eficaz que RAGEs em limitar a área de infarto nesses animais, sugerindo que TTP-4000, por causa de sua melhor meia vida plasmática, foi capaz de manter maior proteção nestes camundongos.

Exemplo 6: Detecção da Proteína de Fusão RAGE por ELISA

20 Inicialmente, 50 µL de anticorpo monoclonal específico para RAGE 1HB1011 em uma concentração de 10 µg/mL em PBS 1x pH 7.3 é revestido em placas por incubação por uma noite. Quando pronto para uso, as placas são lavadas três vezes com 300 µL de tampão de lavagem Imidazol-Tween 1x e bloqueadas com BSA1%. As amostras (diluídas) e diluições padrões de diluições de TTP-4000 conhecidas são adicionadas a 100 µL de volume final. As amostras são deixadas em incubação em temperatura ambiente por uma hora. 25 Após a incubação, as placas são lavadas três vezes. Um IgG1 de cabra anti-humano (Digamma A3312) AP conjugado em PBS 1x com BSA 1% é adicionado e deixado incubar em temperatura ambiente por 1 hora. As placas são lavadas três vezes. A cor elucidaada com paranitrofenilfosfato.

Exemplo 7: Quantificação de Ligante para Ligação RAGE para Proteína de Fusão RAGE

A Figura 16 mostra curvas de ligação-saturação com TTP-4000 para vários ligantes RAGE imobilizados conhecidos. Os ligantes são imobilizados em um placa de microtítulo e incubados presençade concentrações aumentadas da proteína de fusão RAGE de 0 a 360 35 nM. A interação ligante e proteína de fusão RAGE são detectadas utilizando um anticorpo policlonal conjugado com fosfatase alcalina que é específica para a porção IgG da quimera de fusão. Kds relativos foram calculados utilizando o programa Graphpad Prizm e compara-

dos com valores estabelecidos na literatura de valores de RAGE-ligante RAGE. HMG1B = Anfotericina, CML = Carboximetil Lisena, A beta = Beta amilóide 1-40.

Exemplo 8: Uso de Proteína de Fusão RAGE para Prevenir Rejeição de Transplante Alogenêico

5 Bloqueio de RAGE pode ser esperado para bloquear a rejeição de transplanta alogenêico. Esses experimentos exploraram se o bloqueio das interações ligador-RAGE utilizando uma proteína de fusão RAGE pode atenuar a rejeição de células da ilhota que tinham sido transplantadas de um doador saudável em um animal diabético com o medido pelo comprimento do tempo que os animais transplantados mantiveram o nível de glicose sanguínea abaixo da concentração alvo. Como discutido aqui, foi visto que a administração de 10 proteína de fusão RAGE (por exemplo, TTP-4000) aos animais diabéticos que tinham recebido transplantes de células da ilhota significantemente retardaram a recorrência de hiper-glicemina e então rejeição de células da ilhota transplantadas em ambos modelos animais (alogenêico e singenêico) de transplante.

15 A. Transplante da Ilhota Alogenêica em Camundongos

Os primeiros experimentos testaram se a administração de uma fusão da proteína RAGE (TTP-4000) pode modular a rejeição alogenêica de células da ilhota transplantadas e a recorrência de diabetes em modelo de camundongos C57Bl/6J de diabetes.

Modelo Animal de Diabetes

20 Camundongos C57Bl/6J (6-8 semanas de idades) (B6) foram feitos diabéticos por uma injeção única intravenosa de estreptozotocina (STZ) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) a 200 mg/kg. Camundongos BALB/c (6-8 semanas de idade) serviram como doadores para o transplante das ilhotas, então provendo um transplante alo-divergente para células da ilhota.

25 Isolamento da Ilhota

Camundongos (BALB/c) foram anestesiados com solução cetamina HCl/xHCl xilazina (Sigma, St Louis , MO). Após injeção intraductal de 3 mL de solução salina balanceada de Hanks (HBSS, Gibco, Grand Island NY) contendo 1,5 mg/mL de colagenase P (Riche Diagnostics, Branchburg, NJ), pâncreas foram retirados cirurgicamente e digeridos a 37°C 30 por 20 minutos. Ilhotas foram lavadas com HBSS e purificadas por centrifugação em gradiente descontínuo utilizando Polisacarose 400 (Cellgro, Herdrom VA) tendo quatro diferentes densidades (26%, 23%, 20% e 11%). Os fragmentos tissulares na interface das camadas 20% a 23% foram coletados, lavados e ressuspendidos em HBSS. Ilhotas individuais, livres de tecidos acinar, vascular e ductal ligados foram escolhidos sob um microscópio invertido, 35 produzindo ilhotas altamente purificadas para transplante.

Transplante das Ilhotas

Camundongos C57Bl/6 (B6) diabéticos induzidos por estreptozotocina receberam

109

enxertos de ilhotas dentro de 2 dias do diagnóstico de diabetes. Camundongos BALB/cJ (6-8 semanas de idade) (BALB) serviram como doadores para transplante de ilhotas alogenêicas. Para transplante, 500-600 ilhotas recentemente isoladas (isto é, aproximadamente 550 ilhotas equivalentes) de camundongos doadores foram escolhidas com uma infusão e transplantadas no espaço subcapular do rim direito de um receptor.

Tratamento com Compostos Testes

Os compostos testes foram administrados tão logo as ilhotas foram transplantadas; a administração continuada de cerca de 60 dias, dependendo de como o animal controle foi de adaptou. Camundongos foram injetados com 0,25 mL de ou solução salina transplantada com fosfato (PBS), TTP-4000 em PBS, ou IgG em PBS de acordo com o regime abaixo (Tabela 3).

Administração dos Compostos Teste e/ou Veículos

Grupo Teste	Número de Camundongos	Dose de Carnegamento	Dose de Manutenção	Regime
Controle não tratado	8			
Veículo Controle (PBS)	8	0,25 ml/ dose / camundongo no dia 1	0,25 ml/ dose / camundongo no dia 2	Uma vez em dia alternado (QDO) x 60 dias IP
IgG	8	(300µg) 0,25 ml/ dose / camundongo no dia 1	(100µg) 0,25 ml/ dose / camundongo no dia 2	(100µg) Uma vez em dia alternado (QDO) x 60 dias IP
TTP-4000	8	(300µg) 0,25 ml/ dose / camundongo no dia 1	(100µg) 0,25 ml/ dose / camundongo no dia 2	(100µg) Uma vez em dia alternado (QDO) x 60 dias IP
TTP-4000	8	(300µg) 0,25 ml/ dose / camundongo no dia 1	(30µg) 0,25 ml/ dose / camundongo no dia 2	(100µg) Uma vez em dia alternado (QDO) x 60 dias IP

Monitorando a Função do Enxerto da Ilhota

Função do enxerto da ilhora foi monitorada por medidas de glicose sanguínea seriada diariamente pelas primeiras 2 semanas após o transplante das ilhotas, seguido por cada

dia após. Reversão da diabeter foi definida como nível de glicose sanguínea menor que 200 mg/dL em duas medidas consecutivas. Perda de enxerto foi determinada quando a glicose sanguínea excedeu 250 mg/dL em duas medidas consecutivas. Os resultados são mostrados na Tabela 4.

5

Efeitos de TTP-4000 Em Transplante Alográfico de Ilhotas

	TTP-4000 300µg LD + 100µg qod ip (Grupo1)	PBS (Grupo2)	TTP-4000 300µg LD + 30µg qod ip (Grupo3)	TTP-4000 300µg LD + 100µg qod ip (Grupo4)	Controle não tratado
	14	9	13	8	9
	16	8	14	9	8
	13	10	12	10	9
	13	8	12	8	10
	12	11	11	8	9
	16	8	11	8	8
	15	8	8	9	11
	14	8	8	11	9
					7
					9
					8
					9
Média	14,125	8,75	11,125	8,875	8,833333
DP	1,457738	1,164965	2,167124	1,125992	1,029857
N	8	8	8	8	12

* valores na Tabela 4 refletem o dia da perda do exerto para cada animal como definido por recorrência de níveis de glicose sanguínea aumentados

Os efeitos de administração de TTP-4000 em rejeição alográfica para ilhotas de BALB/c em camundongos B6 são mostrados como Gráfico de Sobrevida Cumulativa de Kaplan-Meier na Fig. 17. Nela pode ser visto que existe um aumento no tempo antes da detecção da falência do enxerto para animais tratados com TTP-4000 (Grupos 1 e 3) como o posto aos animais que não são tratados de forma alguma (Controle) ou animais tratados com o veículo (PBS) ou (IgG humana). Utilizando uma variedade de análises estatísticas (Mantel-Cox Logrank, Breslow-Gehan-Wilcoxon; Tarone-Ware, Peto-Peto-Wilcoxin; e Harrington-Fleming) as diferenças entre o Controle e TTP-4000 (Grupos 1 e 3) foram significantes (Tabela 5).

J11
wTabela 5

Método Estatístico	Controle vs Grupo 1 (TTP 4000)			Controle vs Grupo 1 (TTP 4000)		
	Qui-Quadrado	DF*	Valor de P	Qui-Quadrado	DF	Valor de P
Logrank (Mantel-Cox)	18,777	1	<0,0001	7,662	1	0,0056
Breslow-Gehan-Wilcoxon	15,092	1	0,0001	4,904	1	0,0268
Tarone – Ware	16,830	1	<0,0001	6,212	1	0,0127
Peto – Peto – Wilcoxon	14,359	1	0,0002	4,315	1	0,0378
Harrington – Fleming (rho = 0,5)	16,830	1	<0,0001	6,212	1	0,0127

*Graus de Liberdade

5 B. Transplantes de Ilhotas em Camundongos NOD como um Modelo de Doença Autoimune

O segundo grupo de experimentos testaram se a administração da proteína de fúnsio RAGE (isto é, TTP-4000 ou TTP-3000) pode modular o curso da diabetes recorrente em camundongos NOS, utilizando o modelo de transplante NOD.

10 Modelo Animal de Diabetes

Camundongos diabéticos não obesos autoimunes espontâneos (NOD/LtJ) (12-25 semanas de idade) seviram com receptores para as células da ilhota, enquanto camundongos NOD/LtJ pré-diabéticos novos (6-7 semanas de idade) serviram como doadores no transplante de ilhota singenêica. Ilhotas para transplantes foram isoladas como descrito acima na Seção A (Transplante de Ilhota Alogenêica).

Transplante das Ilhotas

Camundongos NOD/LtJ diabéticos receberam enxertos de ilhotas dentro de 2 dias do diagnóstico de diabetes. 500-600 ilhotas recentemente isoladas (isto é, aproximadamente 550 ilhotas equivalentes) de camundongos doadores foram escolhidas com uma infusão e transplantadas no espaço subcapular do rim direito de um receptor.

Tratamento com Compostos Testes

Os compostos testes foram administrados tão logo as ilhotas foram transplantadas e continuados por aproximadamente 8 semanas. Camundongos foram injetados com 0,25 mL de ou solução salina transplantada com fosfato (PBS), TTP-4000 em PBS, ou TTP-3000 em PBS de acordo com o regime abaixo (Tabela 6).

5

Tabela 6

Grupo	Nº de camundongos	Volume de Dose de Carregamento	Dose de Manutenção volume	Regime
TTP-4000	8	(300µg) 0,25 mL dose / camundongo no dia 1	(100µg) 0,25 mL dose / camundongo no dia 2	(100µg) Uma vez em dia alternado (QDO) x 8 semanas; IP
TTP-3000	8	(300µg) 0,25 mL dose / camundongo no dia 1	(100µg) 0,25 mL dose / camundongo no dia 2	(100µg) Uma vez em dia alternado (QDO) x 8 semanas; IP
PBS	8	0,25 mL dose / camundongo no dia 1	0,25 mL dose / camundongo no dia 2	Uma vez em dia alternado (QDO) x 8 semanas; IP

Monitorando a Função do Enxerto da Ilhota

Função do enxerto da ilhora foi monitorada por medidas de glicose sanguínea seriada diariamente pelas primeiras 2 semanas após o transplante das ilhotas, seguido por cada dia após. Reversão da diabetes foi definida como nível de glicose sanguínea menor que 200 mg/dL em duas medidas consecutivas. Perda de enxerto foi determinada quando a glicose sanguínea excedeu 250 mg/dL em duas medidas consecutivas. Os resultados são mostrados na Tabela 7.

10

Tabela 7

Efeitos de TTP-4000 e TTP-3000 em Diabetes Recorrente Em Transplante de Ilhotas Singênicas em Camundongo NOD*

15

	TTP-4000 300µg LD + 100µg qod ip (Grupo1)	TTP-3000 300µg LD + 100µg qod ip (Grupo2)	Controle
	35	44	23
	38	46	25

	40	42	26
	43	41	22
	36	34	22
	45	32	24
	44	30	21
	38		20
			22
			21
			24
Média	39,875	38,42857	22,727273
DP	3,758324	6,32079	1,8488326
N	8	7	11

*Valores refletem o dia da perda do enxerto para cada animal como definido por recorrência de níveis de glicose sanguínea aumentados

Os efeitos da administração de TTP-4000 na rejeição de ilhotas singenêicas transplantadas em camundongos NOD diabéticos são mostrados como Gráfico de Sobrevida Cumulativa de Kaplan-Meier na FIG 18. Como mostrado nos dados da Tabela 7, existe um aumento no tempo antes da detecção da falência para animais tratados com TTP-4000 (Grupo 1) e TTP-3000 (Grupo 2) como oposto aos animais que não são tratados de forma alguma (Controle). FIG. 18 mostra o aumento em tempo antes da detecção da falência do enxerto para animais tratados com TTP-4000 (Grupo 1) e animais que são tratados de forma alguma. Utilizando uma variedade de análises estatísticas (Mantel-Cox Logrank, Breslow-Gehan-Wilcoxon; Tarone-Ware, Peto-Peto-Wilcoxin; e Harrington-Fleming) as diferenças entre o Controle e TTP-4000 (Grupos 1) e o Controle e TTP-3000 (Grupo 2) foram significantes (Tabela 8).

Tabela 8

Método Estatístico	Controle vs Grupo 1 (TTP 4000)			Controle vs Grupo 1 (TTP 4000)		
	Qui-Quadrado	DF*	Valor de P	Qui-Quadrado	DF	Valor de P
Logrank (Mantel-Cox)	18,410	1	<0,0001	16,480	1	<0,0001
Breslow-Gehan-Wilcoxon	14,690	1	0,0001	12,927	1	0,0001

114

Tarone – Ware	16,529	1	<0,0001	14,686	1	0,0001
Peto – Peto – Wilcoxon	14,812	1	0,0001	13,027	1	0,0003
Harrington – Fleming (rho = 0,5)	16,529	1	<0,0001	14,686	1	0,0001

* Graus de Liberdade

Exemplo 9- Formulação Liofilizada de Proteína de Fusão RAGE

No desenvolvimento de uma formulação liofilizada utilizando a proteína de fusão RAGE TTP-4000, lioprotetores e tampões foram inicialmente selecionados por medida da estabilidade da proteína após a liofilização e reconstituição. A proteína liofilizada em cada formulação foi também sujeita a estudos de estabilidade acelerada para determinar a potencial estabilidade da proteína ao longo de sua vida de estoque.

Em estudos de seleção iniciais, experimentos foram desenhados para avaliar as condições de formulação que podem prover solubilidade apropriada e estabilidade de TTP-4000 formuladas como uma massa congelada e prover formulações reconstituídas tendo concentrações de proteína de fusão RAGE a cerca de 50 mg/mL ou mais alta. Formulações contendo acetato de sódio, citrato de sódio, fosfato de sódio, succinato de sódio, histidina, e clóreto de sódio foram testadas ao longo com sacarose e manitol. Vários pHs entre 5.5 e 7.0 foram também avaliados.

A estabilidade biofísica e química de TTP-4000 foi avaliada utilizando cromatografia por exclusão de tamanho (SEC), SDS-Page, Espectroscopia Infra-vermelho Transformador Fourier (FTIR), dicroísmo circular (CD), mapeamento de peptídeo, e absorbância visível em ultra violeta (UV-Vis).

Baseados na solubilidade da proteína de fusão RAGE nas formulações contendo um ou mais de citrato de sódio, histidina, sacarose, manitol e Tween 80, a um pH de 7.0 ou menos, formulações contendo um ou mais desses tampões, lioprotetores, ou tensoativos foram selecionados para estudo adicional.

Exemplo 10 – Formulação Liofilizada de Proteína de Fusão RAGE

Baseado na informação coletada no Exemplo 9, formulações adicionais de TTP-4000 foram estudadas. Os estudos focaram na identificação de tampões e/ou lioprotetores úteis para manter o produto estável ao longo do processo de liofilização e potencialmente alcançar a alta concentração de TTP-4000 sob reconstituição (isto é, cerca de ou acima de 50 mg/mL). Seis formulações foram estudadas durante um estudo de estabilidade acelerada de 2 semanas. As formulações são resumidas na Tabela 9. Estudos também focaram no de-

senvolvimento de um ciclo de congelamento-secagem para doses maiores de TTP-4000 (250 mg) como descrito abaixo.

Segundo o congelamento-secagem, os desenvolvimentos dos frascos da amostra de formulação foram corrugados e colocados em uma câmara de 40°C por 2 semanas. Os 5 passos de desenvolvimento das amostras foram estocados a 2-8°C até os testes serem feitos.

Métodos de Análises de Amostras:

A concentração de TTP-4000 em amostras foi medida por espectroscopia de UV-Vis. Um Aglient UV-Vis foi utilizado para obter espectro de proteína bem como espectro do tampão branco. Uma vez adquirido, valores de absorbância foram corrigidos para qualquer 10 luz dispersa que possa ocorrer como um resultado de qualquer agregação protéica.

Mistura residual foi analisada utilizando um método de titulação de Karl Fisher. Amostras desenvolvidas pela formulação congelamento-secagem foram reconstituídas com 15 quantidade apropriada de API. O tempo para reconstituição foi considerado ser o tempo de quando a água foi adicionada ao tempo quando não existiam sólidos visíveis. O pH de cada amostra foi medido após reconstituição utilizando um padrão semi-micro propriamente calibrado.

Cromatografia de Exclusão por Tamanho (SEC) foi feita utilizando uma coluna TSK gel Super SW2000 para analisar a estabilidade física (degradação e formação de agregado 20 solúvel) de TTP-4000 durante o congelamento-secagem e estocagem nas condições de aceleramento. Amostras foram injetadas em um Aglient 1100 série LC com dois TSK gel Super SW2000, 4,6x300, coluna 4 µm (Tosoh Bioscience, 18674).

Para medir o quantidade de partícula, um 1 mL de amostra foi diluído 20 vezes em 25 20 mL. Da amostra foi retirado os gases por sonificação por cerca de 30 segundos, e gentilmente agitada por giro manual sem introduzir bolhas. Três aliquotas, cada uma com 5 mL em volume, foram retiradas na luz escura do sensor de contagem. Com o instrumento preparado para acumular arquivos, partículas foram coletadas em preparações de mais ou igual a 10 µm e maiores ou iguais a 25 µm.

Resultados:

30 Baseados nos estudos de pré-formulação no Exemplo 9, dois tampões foram iniciamente investigados: citrato de sódio e L-histidina. As formulações concentradas 1-6 (Tabela 9) foram preparadas utilizando concentração por centrifugação. A concentração final nas formulações 1-6 na Tabela 9 foram em uma variação entre cerca de 4-15 mg/mL.

Tabela 9. Formulações de TTP-4000

	Citrato de Sódio (mM)	Histidina (mM)	Sacarose (mM)	Manitol (mM)	Tween 80%	pH

M6

1	10		60			6,0
2	10		30	50		6,0
3	10		60		0,01	6,0
4		10	60			6,0
5		10	30	50		6,0
6		10	60		0,01	6,0

Utilizando formulações 1-6 na Tabela 9, frascos (2 mL) foram utilizados com 0,7 mL de volumes. O espaço superior do frasco foi enchido com ar. Antes de secar, as amostras foram congeladas em uma temperatura de estoque de entre -50°C a -20°C por aproximadamente 12 horas. As amostras foram secas em uma pressão reduzida de 100 mTorr e uma temperatura de estoque de entre -20°C e -10°C por aproximadamente 36 horas, seguida por uma temperatura de estoque de 20°C por aproximadamente 12 horas. Seguindo congelamento e secagem, os frascos foram parados e dobrados em cima. Massas ásperas foram produzidas a partir de cada formulação 1-6.

Os produtos liofilizados foram sujeitos a estudo de estabilidade acelerada a fim de 10 acessar a estabilidade química das formulações. Os produtos liofilizados foram colocados em estocagem a 40°C e 75% de umidade relativa por 2 semanas.

Os produtos liofilizados foram reconstituídos com 0,206 mL de API. Todos os produtos liofilizados foram reconstituídos dentro de 20 segundos por menos. O pH permaneceu consistente em todas as formulações através de um período de estocagem de 2 semanas. 15 Valores de msitura residual determinados nos tempos 0 e 2 semanas para os produtos liofilizados foram entre 3,0% e 0,8% e mostraram que o ciclo de congelemento e secagem foi capaz de suficientemente secar as formulações pré-liofilizadas. A osmolalidade de todas as formulações reconstituídas foidentro de uma variação isotônica desejável entre 250 Osm/kg e 400 mOsm/kg (Ver Tabela 10). A viscosidade de cada formulação reconstituída foi abaixo 20 de 3,7 cP (centiPoise).

Tabela 10. Formulações Reconstituídas de TTP-4000 e Osmolalidade

	Citrato de Sódio (mM)	Histidina (mM)	Sacarose (mM)	Manitol (mM)	Tween 80%	pH
1	10		60			322
2	10		30	50		385
3	10		60		0,01	324
4		10	60			264
5		10	30	50		336
6		10	60		0,01	262

Análise SEC foi feita em amostras de formulação 5 na Tabela 10 tomadas em vários passos do processo de congelamento-descongelamento e indicados nessas formulações. TTP-4000 não foi particularmente sensível para qualquer os passos de processo de congelamento-secagem baseados em baixos níveis consistentes de agregados e espécies de diminuição.

5 Análise SEC foi também feita nas formulações pré-liofilizadas antes de congelar-se bem como as formulações reconstituídas no tempo zero e após um estudo de estabilidade acelerada de 2 semanas. A quantidade de impurezas (produto agregado ou diminuído) foram consistentemente baixas (isto é, abaixo de 4%) (Tabela 11).

10 Tabela 11. Formulações Reconstituídas de TTP-4000 e % de proteína intacta

	Citrato de Sódio (mM)	Histidina (mM)	Sacarose (mM)	Manitol (mM)	Tween 80%	pH
1	10		60		96,2	97,3
2	10		30	50	96,8	97,3
3	10		60		96,3	97,2
4		10	60		97,4	97,0
5		10	30	50	97,9	96,9
6		10	60		97,7	96,9

Mapeamento de peptídeo não revelou oxidação ou deamidação de TTP-4000 devendo as condições de congelamento-secagem e aceleração sob estocagem.

SDS-PAGE foi corrida nas formulações 1, 3, 4 e 6 e mostrou que TTP-4000 manteve a estabilidade física através do processo de liofilização e estocagem nessas formulações.

15 Para o processo de passos de liofilização para uso com frascos 50 mL de lyoe uma dose de 350 mg de TTP-4000, amostras foram preparadas por concentração da solução a 15 mg/mL de TTP-4000 utilizando ultrafiltração e então dialfiltrando a solução contra 10 mM de histidina e 65 mM de sacarose a pH 6.0. Tween 80 foi adicionado para uma quantidade final de 0,01% (vol/vol).

20 A formulação pré-liofilizada (16,67mL) foi adicionada a cada 50 mM do frasco. As amostras foram expostas a um ciclo de liofilização onde as amostras arrefecidas em temperatura de estoque de entre 5oC e -5oC por 30 minutos, seguida por arrefecimento em uma temperatura de estoque de -50oC por aproximadamente 3 horas. As amostras foram secas em uma pressão reduzida de 100 mTorr e uma temperatura de estoque de entre -20oC e -10oC por aproximadamente 34 horas, seguido por uma temperatura de estoque entre 5oC e 20oC por aproximadamente 11 horas. Segundo liofilização, os frascos foram parados, e do-

118

brados na parte superior. Uma massa branca, farmaceuticamente elegante foi produzida. A massa pareceu enrugada e não perdeu sua estrutura durante o manuseamento e estocagem.

A concentração da amostra reconstituída como determinado por absorbância a 280 nm foi 40,5 mg/mL de TTP-4000. Em estudos adicionais sob condições similares, a concentração de TTP-4000 em amostra reconstituída foi consistentemente cerca de 50 mg/mL.

A amostra reconstituída foi medida por conteúdo de particulato a 0, 2 e 6 horas de estocagem em temperatura ambiente. Os resultados na Tabela 12 mostram que a amostra reconstituída teve uma quantidade baixa de conteúdo particulado.

10

Tabela 12

Número de partículas detectadas em na amostra reconstituída durante a estocagem

	tamanho da partícula	Tempo= 0	Tempo= 2 horas	Tempo= 6 horas
partículas por mL	>10	562	368	948
	>25	8	16	20
Partículas por recipiente	>10	2753	1803	4645
	>25	39	78	98

Em resumo, TTP-4000 foi formulado em tampões citrato e histidina contendo um ou mais de sacarose, manitol e Tween 80. Testes mostraram que formulações contendo citrato de sódio ou histidina tiveram características de desempenho similares e que TTP-4000 podem ser maus solúveis nas formulações contendo histidina.

Formulações contendo histidina foram focadas sob estudos passo a passo adicionais. Segundo o ciclo de liofilização, a estabilidade química e física de TTP-4000 foi avaliada, e nenhuma diferença significante entre as formulações de histidina foram detectadas. Também, manitol foi eliminado para a formulação. A formulação final escolhida para o desenvolvimento do estudo da formulação continha 10 mM de histidina, 60 mM de sacarose, e 0,01% de Tween 80 a cerca de pH 6.0. Esta formulação demonstrou uma habilidade superior para manter o TTP-4000 estável durante a liofilização e estocagem, e também proveu a mais alta concentração de TTP-4000 estável durante o estudo. No estudo passo a passo, o nível de sacarose foi aumentado a 65 mM para ajustar a osmolalidade da formulação mais perto da isotonicidade. Durante o estudo de passo a passo, também foi encontrado que mantendo o pH da formulação TTP-4000 pré-liofilizada e formulação reconstituída em ou perto de 6.0 e menor que 6.7 foi útil para o pH reduzir a precipitação ou agregação.

O anterior é considerado como ilustrativo somente do principal da invenção. Desde que numerosas modificações e mudanças serão facilmente feitas pelos versados na técnica,

não se entende limitar a invenção às modalidades exatas mostradas e descritas, e todas as modificações e equivalentes dentro do objetivo das reivindicações em anexo são supostas dentro do conceito da presente invenção.

166

REIVINDICAÇÕES

1. Formulação, **CARACTERIZADA** pelo fato de compreender uma mistura liofilizada de um açúcar não redutor lioprotetor, uma proteína de fusão RAGE, e um tampão, em que a proteína de fusão RAGE compreende um polipeptídeo RAGE diretamente ligado a um polipeptídeo compreendendo um domínio CH2 de uma imunoglobulina ou uma porção de um domínio CH2 de uma imunoglobulina, e em que o polipeptídeo RAGE compreende um sítio de ligação do ligador RAGE.

2. Formulação, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que:

(a) a proteína de fusão RAGE compreende um ligador interdomínio derivado de RAGE ao invés de um polipeptídeo da dobradiça interdomínio derivado de uma imunoglobulina; ou

(b) a proteína de fusão RAGE compreende (i) um ligador interdomínio RAGE que separa os domínios V e C1 de RAGE, ou (ii) um ligador que separa os domínios C1 e C2 de RAGE, em vez da região dobradiça da cadeia pesada da imunoglobulina; ou

(c) a proteína de fusão RAGE é obtível por remoção da região dobradiça Fc da imunoglobulina e a substituindo com o polipeptídeo.

3. Formulação, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína de fusão RAGE é codificável por uma molécula de DNA compreendendo a seqüência com revelada na SEQ ID NO:30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO:54 ou SEQ ID NO:55.

4. Formulação, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que ainda compreende pelo menos um de um tensoativo, um agente quelante, ou um agente massa.

5. Formulação, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o açúcar não redutor compreende pelo menos um de sacarose, manitol ou trealose.

6. Formulação, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o tampão compreende histidina.

7. Formulação, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o polipeptídeo RAGE compreende um sítio de ligação do ligador RAGE compreendendo a seqüência aminoácida como revelado na SEQ IDNO:10 ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica do mesmo, ou a seqüência aminoácida como revelado na SEQ ID NO:47, ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica a mesma.

8. Formulação, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína de fusão RAGE compreende a seqüência de aminoácido como revelado em pelo menos uma das SEQ ID NOs: 32, 33, 34, 35, 36, 37, 56, ou 57, ou uma seqüência pelo menor 90% idêntica as mesmas.

167

9. Formulação, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADA** pelo fato de que uma seqüência pelo menos 90% idêntica as SEQ ID NOS: 32, 33, 34, 35, 36, 37, 56, ou 57 compreende o polipeptídeo das SEQ ID NOS: 32, 33, 34, 35, 36, 37, 56, ou 57 respectivamente sem a lisina C-terminal.

10. Formulação reconstituída **CARACTERIZADA** pelo fato de compreender uma proteína de fusão RAGE liofilizada reconstituída em um diluente, em que a concentração da proteína de fusão RAGE na formulação reconstituída está dentro da variação de 1 mg/mL a 400 mg/mL, em que a proteína de fusão RAGE liofilizada compreende um açúcar não redutor lioprotetor, a proteína de fusão RAGE, e um tampão, e em que a proteína de fusão RAGE compreende um polipeptídeo RAGE diretamente ligado a um polipeptídeo compreendendo um domínio CH2 de uma imunoglobulina ou uma porção de um domínio CH2 de uma imunoglobulina, e em que o polipeptídeo RAGE compreende um sítio de ligação do ligador RAGE.

11. Formulação reconstituída, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a concentração da proteína de fusão RAGE na formulação reconstituída de 40 mg/mL a 100 mg/mL.

12. Formulação reconstituída, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADA** pelo fato de que:

(a) a proteína de fusão RAGE compreende um ligador interdomínio derivado a partir de RAGE ao invés de um polipeptídeo na dobradiça interdomínio derivado a partir de imunoglobulina; ou

(b) a proteína de fusão RAGE compreende (i) um ligador interdomínio RAGE que separa os domínios V e C1 de RAGE, ou (ii) um ligador que separa os domínios C1 e C2 de RAGE, em vez da região dobradiça da cadeia pesada da imunoglobulina; ou

(c) a proteína de fusão RAGE é obtível por remoção da região dobradiça Fc da imunoglobulina e a substituindo com o polipeptídeo.

13. Formulação reconstituída, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína de fusão RAGE é codificável por uma molécula de DNA compreendendo a seqüência com revelada na SEQ ID NO:30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO:54 ou SEQ ID NO:55.

14. Formulação reconstituída, de acordo com reivindicação 10, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o polipeptídeo RAGE compreende um sítio de ligação do ligador RAGE compreendendo a seqüência aminoácida como revelado na SEQ ID NO: 10 ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica da mesma, ou a seqüência aminoácida como revelado na SEQ ID NO:47, ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica da mesma.

15. Formulação reconstituída, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína de fusão RAGE compreende a seqüência de

168

aminoácido como revelado em pelo menos uma das SEQ ID NOs: 32; 33, 34, 35, 36, 37, 56, ou 57, ou uma seqüência pelo menor 90% idêntica as mesmas.

16. Formulação reconstituída, de acordo com a reivindicação 15, **CARACTERIZADA** pelo fato de que uma seqüência pelo menos 90% idêntica as SEQ ID NOs: 32, 33, 34, 35, 36, 37, 56, ou 57 comprehende o polipeptídeo das SEQ ID NOS: 32, 33, 34, 35, 36, 37, 56, ou 57 respectivamente sem a lisina C-terminal.

17. Formulação reconstituída, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a formulação comprehende 1-400 mg/mL da proteína de fusão RAGE comprendendo a seqüência revelada na SEQ ID NOs: 32, 33, 34, 35, 36, 37, 56, ou 57, ou uma seqüência pelo menos 90% idêntica do mesmo; 1 mM a 100 mM de tampão de histidina; 60 mM a 65 mM de sacarose; 0,001% a 0,05% de Tween 80; e pH de 6.0 a 6.5.

18. Formulação reconstituída, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a formulação exibe menos que 5% de decomposição após 1 semana a 40 graus centígrados.

19. Formulação reconstituída, de acordo com reivindicação 10, **CARACTERIZADA** pelo fato de que cerca de 10% da proteína de fusão RAGE está presente como uma agregado na formulação sob reconstituição.

20. Formulação reconstituída, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o açúcar comprehende pelo menos um de sacarose, manitol ou trealose.

21. Formulação reconstituída, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a formulação liofilizada da proteína de fusão RAGE comprehende pelo menos um de um tampão, um tensoativo, um agente quelante ou um agente de massa.

22. Formulação reconstituída, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a formulação reconstituída é adequada para administração subcutânea ou intramuscular.

23. Artigo de fabricação **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender um recipiente que contém a formulação liofilizada de conforme descrito nas reivindicações de 1 a 9, e instruções para reconstituir a formulação liofilizada com um diluente tal que a concentração de proteína de fusão RAGE na formulação reconstituída está dentro da variação de 1 mg/mL a 400 mg/mL.

24. Artigo de fabricação, de acordo com a reivindicação 23, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a proteína de fusão RAGE na formulação reconstituída é de 40 mg/mL a cerca de 100 mg/mL.

25. Artigo de fabricação, de acordo com a reivindicação 23, **CARACTERIZADO**

pelo fato de compreender um segundo recipiente que contém um diluente para reconstituir a formulação liofilizada.

26. Método para preparar uma formulação estável reconstituída de uma proteína de fusão RAGE **CARACTERIZADO** pelo fato compreender uma mistura liofilizada da proteína de fusão RAGE e um açúcar não redutor lioprotetor em um diluente tal que a concentração da proteína de fusão RAGE na formulação reconstituída está em uma variação de 1 mg/mL a 400 mg/mL, em que a proteína de fusão RAGE compreende um polipeptídeo RAGE diretamente ligado a um polipeptídeo compreendendo um domínio CH2 de uma imunoglobulina ou uma porção de um domínio CH2 de uma imunoglobulina, e em que o polipeptídeo RAGE compreende um sítio de ligação do ligador RAGE.

27. Método, de acordo com a reivindicação 26, **CARACTERIZADO** pelo fato de que:

(a) a proteína de fusão RAGE compreende um ligador interdomínio derivado a partir de RAGE ao invés de um polipeptídeo na dobradiça interdomínio derivado a partir de imunoglobulina; ou

(b) a proteína de fusão RAGE compreende (i) um ligador interdomínio RAGE que separa os domínios V e C1 de RAGE, ou (ii) um ligador que separa os domínios C1 e C2 de RAGE, em vez da região dobradiça da cadeia pesada da imunoglobulina; ou

(c) a proteína de fusão RAGE é obtível por remoção da região dobradiça Fc da imunoglobulina e a substituindo com o polipeptídeo.

28. Método, de acordo com a reivindicação 26, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o lioprotetor compreende pelo menos um de sacarose, manitol ou trealose.

29. Método, de acordo com a reivindicação 26, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a mistura liofilizada ainda compreende pelo menos um de um tampão, um tensoativo, um agente quelante ou um agente de massa.

30. Método, de acordo com a reivindicação 26, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a proteína de fusão RAGE compreende a seqüência de aminoácido como revelado em pelo menos uma das SEQ ID NOs: 32, 33, 34, 35, 36, 37, 56, ou 57, ou uma seqüência pelo menor 90% idêntica as mesmas.

31. Uso de uma formulação, de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de ser para a preparação de um medicamento para o tratamento de um distúrbio mediado por RAGE em um paciente.

32. Uso, de acordo com a reivindicação 31, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o medicamento é tencionado tratar pelo menos uma de complicações diabéticas tardias, amiloidose, doença de Alzheimer, câncer, falência renal, ou inflamação associada com autoimunidade, doença inflamatória interstinal, artrite reumatóide, psoríase, esclerose múltipla, hipóxia, derrame, ataque cardíaco, choque hemorrágico, sepse, transplante de

órgão, osteoporose, cicatrização impedida de ferida, ou inflamação e/ou rejeição associada com transplante de pelo menos um de um órgão, um tecido, ou uma pluralidade de células a partir do primeiro sítio para o segundo sítio.



FIG. 1A**SEQ ID NO: 1**

MAAGTAVGAW VLVLSLWGAV VGAQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE
 WKLNTRTEA WKVLSPQGGG PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGI FRCQ
 AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
 PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVT PARGG
 DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
 PGGTVTLTCE VPAQPSPQIH WMKDGVPLPL PPSPVLLP E IGPQDQGTYS
 CVATHSSHGP QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGLGT LALALGILGG
 LGTAALLIGV ILWQRRQRRG EERKAPENQE EEEERAELNQ SEEPEAGESS
 TGGP

SEQ ID NO: 2

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE
 WKLNTRTEA WKVLSPQGGG PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGI FRCQ
 AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
 PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVT PARGG
 DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
 PGGTVTLTCE VPAQPSPQIH WMKDGVPLPL PPSPVLLP E IGPQDQGTYS
 CVATHSSHGP QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGLGT LALALGILGG
 LGTAALLIGV ILWQRRQRRG EERKAPENQE EEEERAELNQ SEEPEAGESS
 TGGP

FIG. 1B**SEQ ID NO: 3**

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE
 WKLNTRTEA WKVLSPQGGG PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGI FRCQ
 AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
 PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVT PARGG
 DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
 PGGTVTLTCE VPAQPSPQIH WMKDGVPLPL PPSPVLLP E IGPQDQGTYS
 CVATHSSHGP QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGLGT LALALGILGG
 LGTAALLIGV ILWQRRQRRG EERKAPENQE EEEERAELNQ SEEPEAGESS
 TGGP

FIG. 1C**SEQ ID NO: 4**

MAAGTAVGAW VLVLSLWGAV VGAQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE
 WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ
 AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
 PAGTLSWHL D GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
 DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
 PGGTVTLTCE VPAQPSPQIH WMKDGVPLPL PPSPVLILPE IGPQDQGTYS
 CVATHSSHGP QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGLG

SEQ ID NO: 5

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE
 WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ
 AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
 PAGTLSWHL D GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
 DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
 PGGTVTLTCE VPAQPSPQIH WMKDGVPLPL PPSPVLILPE IGPQDQGTYS
 CVATHSSHGP QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGLG

SEQ ID NO: 6

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE
 WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ
 AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
 PAGTLSWHL D GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
 DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
 PGGTVTLTCE VPAQPSPQIH WMKDGVPLPL PPSPVLILPE IGPQDQGTYS
 CVATHSSHGP QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGLG

FIG. 1D

SEQ ID NO: 7

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVR

SEQ ID NO: 8

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVR

SEQ ID NO: 9

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE WK

SEQ ID NO: 10

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE WK

SEQ ID NO: 11

PEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL R

SEQ ID NO: 12

PRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
PGGTVTLTCE VPAQPSPQIH WMKDGVPLPL PPSPVILPE IGPQDQGTYS
CVATHSSHGP QESRAVS

SEQ ID NO: 13

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRYQI
PGK

FIG. 1 E

SEQ ID NO: 14

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE WKLNTGRTEA WKVLSPOQGGG
PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRYQI
PGK

SEQ ID NO: 15

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE WKLNTGRTEA WKVLSPOQGGG
PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRYQI
PGKPEIVDSA SELTAG

SEQ ID NO: 16

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE WKLNTGRTEA WKVLSPOQGGG
PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRYQI
PGKPEIVDSA SELTAG

SEQ ID NO: 17

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE WKLNTGRTEA WKVLSPOQGGG
PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRYQI
PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHLG GKPLVPNEKG
VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRL
RTAPIQ

SEQ ID NO: 18

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE WKLNTGRTEA WKVLSPOQGGG
PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRYQI
PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHLG GKPLVPNEKG
VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRL
RTAPIQ

FIG. 1F

SEQ ID NO: 19

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHL DGPLVPNEKG
VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRL
RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA P

SEQ ID NO: 20

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHL DGPLVPNEKG
VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRL
RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA P

SEQ ID NO: 21

VYQIPGK

SEQ ID NO: 22

TAPIQPRVWE PVPLEEVQLV VEPEGGAVAP

SEQ ID NO: 23

VYQIPGKPEI VDSASELTAG

SEQ ID NO: 24

TAPIQ

FIG. 1G**SEQ ID NO: 25**

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GTGCTGGTCC TCAGTCTGTG
 GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCAGGATT GGCGAGGCCAC
 TGGTGTGAA GTGTAAGGGG GCCCCCCAAGA AACCAACCCA GCAGCTGGAA
 TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAAGGTCC TGTCTCCCCA
 GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
 TCTTCCTTCC GGCTGTGGGG ATCCAGGATG AGGGGATTT CCGGTGCCAG
 GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAACCTACC GAGTCCGTGT
 CTAC

SEQ ID NO: 26

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GTGCTGGTCC TCAGTCTGTG
 GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCAGGATT GGCGAGGCCAC
 TGGTGTGAA GTGTAAGGGG GCCCCCCAAGA AACCAACCCA GCAGCTGGAA
 TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAAGGTCC TGTCTCCCCA
 GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
 TCTTCCTTCC GGCTGTGGGG ATCCAGGATG AGGGGATTT CCGGTGCCAG
 GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAACCTACC GAGTCCGTGT
 CTACCAAGATT CCTGGGAAG

SEQ ID NO: 27

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GTGCTGGTCC TCAGTCTGTG
 GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCAGGATT GGCGAGGCCAC
 TGGTGTGAA GTGTAAGGGG GCCCCCCAAGA AACCAACCCA GCAGCTGGAA
 TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAAGGTCC TGTCTCCCCA
 GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
 TCTTCCTTCC GGCTGTGGGG ATCCAGGATG AGGGGATTT CCGGTGCCAG
 GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAACCTACC GAGTCCGTGT
 CTACCAAGATT CCTGGGAAGC CAGAAATTGT AGATTCTGCC TCTGAACCTCA
 CGGCTGGT

FIG. 1H**SEQ ID NO:28**

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GTGCTGGTCC TCAGTCTGTG
 GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCCGGATT GGCGAGCCAC
 TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCCCAAGA AACCACCCCA GC GGCTGGAA
 TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAGGTCC TGTCTCCCCA
 GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
 TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTT CCGGTGCCAG
 GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCA ACTACC GAGTCCGTGT
 CTACCAGATT CCTGGGAAGC CAGAAATTGT AGATTCTGCC TCTGAACCTCA
 CGGCTGGTGT TCCAATAAG GTGGGGACAT GTGTGTCAGA GGGGAGCTAC
 CCTGCAGGGG CTCTTAGCTG GCACTTGGAT GGGAAAGCCCC TGGTGCTCAA
 TGAGAAGGGG GTATCTGTGA AGGAACAGAC CAGGAGACAC CCTGAGACAG
 GGCTCTTCAC ACTGCAGTCG GAGCTAATGG TGACCCCCAGC CCGGGGAGGA
 GATCCCCGTC CCACCTTCTC CTGTAGCTTC AGCCCAGGCC TTCCCCGACA
 CCGGGCCTTG CGCACAGCCC CCATCCAGCC CCGTGTCTGG

SEQ ID NO:29

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GTGCTGGTCC TCAGTCTGTG
 GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCCGGATT GGCGAGCCAC
 TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCCCAAGA AACCACCCCA GC GGCTGGAA
 TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAGGTCC TGTCTCCCCA
 GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
 TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTT CCGGTGCCAG
 GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCA ACTACC GAGTCCGTGT
 CTACCAGATT CCTGGGAAGC CAGAAATTGT AGATTCTGCC TCTGAACCTCA
 CGGCTGGTGT TCCAATAAG GTGGGGACAT GTGTGTCAGA GGGGAGCTAC
 CCTGCAGGGG CTCTTAGCTG GCACTTGGAT GGGAAAGCCCC TGGTGCTCAA
 TGAGAAGGGG GTATCTGTGA AGGAACAGAC CAGGAGACAC CCTGAGACAG
 GGCTCTTCAC ACTGCAGTCG GAGCTAATGG TGACCCCCAGC CCGGGGAGGA
 GATCCCCGTC CCACCTTCTC CTGTAGCTTC AGCCCAGGCC TTCCCCGACA
 CCGGGCCTTG CGCACAGCCC CCATCCAGCC CCGTGTCTGG GAGCCTGTGC
 CTCTGGAGGA GGTCCAATTG GTGGTGGAGC CAGAAGGTGG AGCAGTAGCT
 CCT

FIG. 1I**SEQ ID NO: 38**

PSVF LFPPPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG
 VEVHNNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP
 IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW
 ESNGQPENNY KTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA
 LHNHYTQKSL SLSPGK

SEQ ID NO: 39

CCGTCAG TCTTCCTCTT CCCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT
 CTCCCGGACC CCTGAGGTCA CATCGTGTT GGTGGACGTG AGCCACGAAG
 ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG ACAGCGTGG A GTGCATAAT
 GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT ACCGTGTGGT
 CAGCGTCCTC ACCGTCCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
 AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCCAG CCCCCATCGA GAAAACCATC
 TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCC
 ATCCCGGGAT GAGCTGACCA AGAACCCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA
 AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG
 CCGGAGAACCA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC
 CTTCTTCCTC TACAGCAAGC TCACCGTGG A CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG
 GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCAC
 ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAATGA

SEQ ID NO: 40

PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA
 LPAPIEKTI S KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI
 AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV
 MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

FIG. 1J**SEQ ID NO: 41**

CCGTGCCAG CACCTGAAC T CCTGGGGGA CCGTCAGTCT TCCTCTCCC
 CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTACACAT
 GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG
 TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA
 GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC
 AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC
 CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG
 AGAACACACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCGGGATGAG CTGACCAAGA
 ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC
 GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAACT ACAAGACCAC
 GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCCCTCTAC AGCAAGCTCA
 CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG
 ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC
 TCCGGGTAAA TGA

SEQ ID NO: 42

PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA
 LPAPIEKTI S KAK

SEQ ID NO: 43

GQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI
 AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV
 MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 44

ISI IEPGEEGPTA GSVGGSGLGT LA

FIG. 1K

SEQ ID NO: 45

PENITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE
WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ
AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
PAGTLSWHLD GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
PGGTVTLTCE VPAQPSPQIH WMKDGVLPL PPSPVILPE IGPQDQGTYS
CVATHSSHGP QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGLG

SEQ ID NO: 46

pENITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVR

SEQ ID NO: 47

pENITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE WK

SEQ ID NO: 48

pENITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGK

FIG. 1L**SEQ ID NO: 49**

PENITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGKPEIVDSA SELTAG

SEQ ID NO: 50

PENITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHL D GKPLVPNEKG
VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRL
RTAPIQ

SEQ ID NO: 51

PENITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG
PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRVYQI
PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHL D GKPLVPNEKG
VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRL
RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA P

FIG. 1M**SEQ ID NO: 52**

CCGTCAG TCTTCCTCTT CCCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT
 CTCCCAGGACC CCTGAGGTCA CATCGTGTT GGTGGACGTG AGCCACGAAG
 ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG ACCGGCGTGG A GTGCATAAT
 GCCAAAGACAA AGCCCGGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT ACCGTGTGGT
 CAGCGTCCTC ACCGTCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
 AGTGAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCCAG CCCCCATCGA GAAAACCATC
 TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCC
 ATCCCGGGAT GAGCTGACCA AGAACCCAGGT CAGCCTGACC TGCGCTGGTCA
 AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG
 CCGGAGAACCA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC
 CTTCTTCCTC TACAGCAAGC TCACCGTGG A CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG
 GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC
 ACGCAGAACAGA GCCTCTCCCT GTCTCCCGGG AAATGA

SEQ ID NO: 53

CCGTGCCAG CACCTGAAC T CCTGGGGGA CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC
 CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTACACAT
 GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG
 TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA
 GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC
 AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC
 CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG
 AGAACCAACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCGGGATGAG CTGACCAAGA
 ACCAGGTCAAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC
 GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAACT ACAAGACCAC
 GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCTCTAC AGCAAGCTCA
 CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGTCTCTC ATGCTCCGTG
 ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC
 TCCCCGGAAA TGA

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GTGCTGGTCC TCAGTCTGTG
 GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCCGGATT GGCGAGCCAC
 TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCCCAAGA AACCACCCCA GC GGCTGGAA
 TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAAGGTCC TGTCTCCCCA
 GGGAGGGAGGC CCCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
 TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CCGGTGCCAG
 GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCA ACTACC GAGTCCGTGT
 CTACCA GATT CCTGGGAAGC CAGAAATTGT AGATTCTGCC TCTGAACCTCA
 CGGCTGGTGT TCCAATAAG GTGGGGACAT GTGTGT CAGA GGGGAGCTAC
 CCTGCAGGGA CTCTTAGCTG GCACTTGGAT GGGAAAGCCCC TG GTGCCTAA
 TGAGAAGGGG GTATCTGTGA AGGAACAGAC CAGGAGACAC CCTGAGACAG
 GGCTCTTCAC ACTGCAGTCG GAGCTAATGG TGACCCCCAGC CGGGGGAGGA
 GATCCCCGTC CCACCTTCTC CTGTAGCTTC AGCCCAGGCC TTCCCCGACA
 CCGGGCCTTG CGCACAGCCC CCATCCAGCC CCGTGTCTGG GAGCCTGTGC
 CTCTGGAGGA GGTCCAATTG GTGGTGGAGC CAGAAGGTGG AGCAGTAGCT
 CCTCCGTCA G TCTCCTCTT CCCCCAAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT
 CTCCCGGACC CCTGAGGTCA CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG
 ACCCTGAGGT CAA GTTCAAC TGGTACGTGG ACGGCGTGG A GGTGCATAAT
 GCCAAGACAA AGCCGCGGG A GGAGCAGTAC AACAGCACGT ACCGTGTGGT
 CAGCGTCCTC ACCGTCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
 AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCAG CCCCCATCGA GAAAACCATC
 TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGGCCCC
 ATCCCAGGAT GAGCTGACCA AGAACCCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA
 AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGAG
 CCGGAGAACCA ACTACAAGAC CACGCCCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC
 CTTCTTCCTC TACAGCAAGC TCACCGTGG A CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG
 GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCAC TAC
 ACGCAGAACGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAATGA

(SEQ ID NO: 30)

FIG. 2A

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GTGCTGGTCC TCAGTCTGTG
 GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCCGGATT GGCGAGCCAC
 TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCCCAAGA AACCAACCCA GC GGCTGGAA
 TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAAGGTCC TGTCTCCCCA
 GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
 TCTTCCTTCC GGCTGTGGG ATCCAGGATG AGGGGATTTT CGGGTGCCAG
 GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCA ACTACC GAGTCCGTGT
 CTACCAGATT CCTGGGAAGC CAGAAATTGT AGATTCTGCC TCTGAACCTCA
 CGGCTGGTGT TCCAATAAG GTGGGGACAT GTGTGT CAGA GGGGAGCTAC
 CCTGCAGGGG CTCTTAGCTG GCAC TTGGAT GGGAAAGCCCC TGGTGCCTAA
 TGAGAAGGGG GTATCTGTGA AGGAACACAGAC CAGGAGACAC CCTGAGACAG
 GGCTCTTCAC ACTGCAGTCG GAGCTAATGG TGACCCCCAGC CGGGGGAGGA
 GATCCCCGTC CCACCTTCTC CTGTAGCTC AGCCCAGGCC TTCCCCGACA
 CCGGGCTTG CGCACAGCCC CCATCCAGCC CCGTGTCTGG GAGCCTGTGC
 CTCTGGAGGA GGTCCAATTG GTGGTGGAGC CAGAAGGTGG AGCAGTAGCT
 CCTCCGTCA G TCTCCTCTT CCCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT
 CTCCCGGACC CCTGAGGTCA CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG
 ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG ACGGCGTGG A GTGCATAAT
 GCCAAGACAA AGCCGCGGGG GGAGCAGTAC AACAGCACGT ACCGTGTGGT
 CAGCGTCCTC ACCGTCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA
 AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCAG CCCCCATCGA GAAAACCATC
 TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCTC
 ATCCCAGGAT GAGCTGACCA AGAACCCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA
 AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG
 CCGGAGAACCA ACTACAAGAC CACGCCCTCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC
 CTTCTTCCTC TACAGCAAGC TCACCGTGG A CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG
 GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC
 ACGCAGAACGA GCCTCTCCCT GTCTCCCCGG AAATGA

(SEQ ID NO: 54)

FIG. 2B

ATGGCAGCCG GAACAGCAGT TGGAGCCTGG GTGCTGGTCC TCAGTCTGTG
GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCGGATT GGCGAGCCAC
TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCAAGA AACCACCCCA GCGGCTGGAA
TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAGGTCC TGTCTCCCCA
GGGAGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCTTCCC AACGGCTCCC
TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTT CCGGTGCCAG
GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAG TCCAACCTACC GAGTCCGTGT
CTACCAAGATT CCTGGGAAGC CAGAAATTGT AGATTCTGCC TCTGAACCTCA
CGGCTGGTCC GTCAGTCTTC CTCTTCCCC CAAAACCAA GGACACCCCTC
ATGATCTCCC GGACCCCTGA GGTCACATGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA
CGAAGACCCCT GAGGTCAAGT TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC
ATAATGCCAA GACAAAGCCG CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT
GTGGTCAGCG TCCTCACCGT CCTGCACCAAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA
GTACAAGTGC AAGGTCTCCA ACAAAAGCCCT CCCAGCCCCC ATCGAGAAAAA
CCATCTCCAA AGCCAAAGGG CAGCCCCGAG AACCCACAGGT GTACACCCCTG
CCCCCATCCC GGGATGAGCT GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT
GGTCAAAGGC TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG
GGCAGCCGGA GAACAACTAC AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGACTCCGAC
GGCTCTTCT TCCTCTACAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA
GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAAACC
ACTACACGCA GAAGAGCCTC TCCCTGTCTC CGGGTAAATG A

(SEQ ID NO: 31)

FIG. 3A

ATGGCAGCCG GAACAGCACT TGGAGCCTGG GTGCTGGTCC TCAGTCGTG
 GGGGGCAGTA GTAGGTGCTC AAAACATCAC AGCCCCGATT GGCGAGCCAC
 TGGTGCTGAA GTGTAAGGGG GCCCCCCAAGA AACCAACCCA GC GGCTGGAA
 TGGAAACTGA ACACAGGCCG GACAGAAGCT TGGAAAGGTCC TGTCTCCCCA
 GGGAGGGAGGC CCCTGGGACA GTGTGGCTCG TGTCCTTCCC AACGGCTCCC
 TCTTCCTTCC GGCTGTCGGG ATCCAGGATG AGGGGATTT CCGGTGCCAG
 GCAATGAACA GGAATGGAAA GGAGACCAAAG TCCA ACTACC GAGTCCGTGT
 CTACCA GATT CCTGGGAAGC CAGAAATTGT AGATTCTGCC TCTGAACCTCA
 CGGCTGGTCC GTCAGTCTTC CTCTTCCCCC CAAAACCAA GGACACCCCTC
 ATGATCTCCC GGACCCCTGA GGTACATGC GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA
 CGAAGACCCCT GAGGTCAAGT TCAACTGGTA CGTGGACGGC GTGGAGGTGC
 ATAATGCCAA GACAAAGCCG CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT
 GTGGTCAGCG TCCTCACCGT CCTGCACCAAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA
 GTACAAGTGC AAGGTCTCCA ACAAAAGCCCT CCCAGCCCCC ATCGAGAAAA
 CCATCTCCAA AGCCAAAGGG CAGCCCCGAG AACCAACAGGT GTACACCCCTG
 CCCCCATCCC GGGATGAGCT GACCAAGAAC CAGGTCAAGCC TGACCTGCCT
 GGTCAAAGGC TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG
 GGCAGCCGGA GAACAACTAC AAGACCAACGC CTCCCGTGCT GGACTCCGAC
 GGCTCCTTCT TCCCTACAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA
 GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC
 ACTACACGCA GAAGAGCCTC TCCCTGTCTC CCGGGAAATG A

(SEQ ID NO: 55).

FIG. 3B

SEQ ID NO: 32

MAAGTAVGAW VLVLSLWGAV VGAQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE
 WKLNTRTEA WKVLSPOGGG PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ
 AMNRNGKETK SNYRVRYVQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY
 PAGTLSWHLG GKPLVPNEKG VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG
 DPRPTFSCSF SPGLPRHRL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA
 PPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN
 AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI
 SKAKGQPREP QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSPD IAVEWESNGQ
 PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY
 TQKSLSLSPG K

SEQ ID NO: 33

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE WKLNTRTEA WKVLSPOGGG
 PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRYVQI
 PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHLG GKPLVPNEKG
 VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRL
 RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA PPSVFLFPPK PKDTLMISRT
 PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL
 TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLT CLVKGFYPSPD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

SEQ ID NO: 34

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE WKLNTRTEA WKVLSPOGGG
 PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRYVQI
 PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHLG GKPLVPNEKG
 VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRL
 RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA PPSVFLFPPK PKDTLMISRT
 PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL
 TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLT CLVKGFYPSPD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

SEQ ID NO: 56

PENITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE WKLNTRTEA WKVLSPOGGG
 PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRYVQI
 PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHLG GKPLVPNEKG
 VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRL
 RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL VVEPEGGAVA PPSVFLFPPK PKDTLMISRT
 PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL
 TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRD
 ELTKNQVSLT CLVKGFYPSPD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

FIG. 4

SEQ ID NO: 35

MAAGTAVGAW VLVLSLGAV VGAQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE
 WKLNTRTEA WKVLSPOGGG PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ
 AMNRNGKETK SNYRVRYQI PGKPEIVDSA SELTAGPSVF LFPPPKDYL
 MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTP REEQYNSTYR
 VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG QPREPVYTL
 PPSRDELTN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTPPVLDSD
 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

SEQ ID NO: 36

AQNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE WKLNTRTEA WKVLSPOGGG
 PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRYQI
 PGKPEIVDSA SELTAGPSVF LFPPPKDYL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
 EVKFNWYVDG VEVHNAKTP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC
 KVSNKALPAP IEKTISKAKG QPREPVYTL PPSRDELTN QVSLTCLVKG
 FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

SEQ ID NO: 37

QNITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE WKLNTRTEA WKVLSPOGGG
 PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRYQI
 PGKPEIVDSA SELTAGPSVF LFPPPKDYL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
 EVKFNWYVDG VEVHNAKTP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC
 KVSNKALPAP IEKTISKAKG QPREPVYTL PPSRDELTN QVSLTCLVKG
 FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

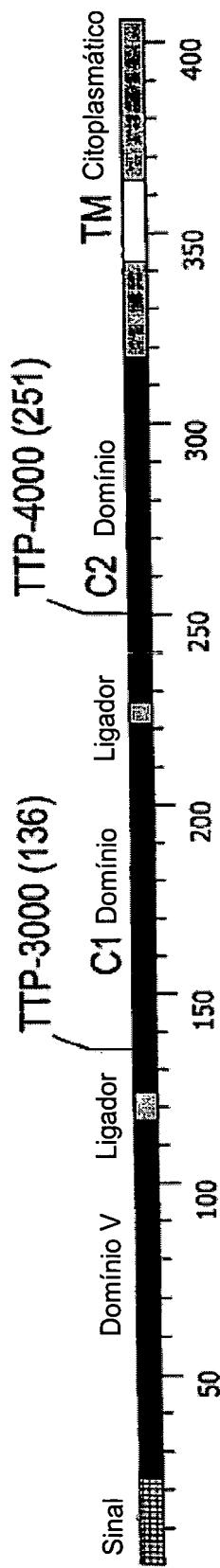
SEQ ID NO: 57

PENITARI GEPLVLKCKG APKKPPQRLE WKLNTRTEA WKVLSPOGGG
 PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ AMNRNGKETK SNYRVRYQI
 PGKPEIVDSA SELTAGPSVF LFPPPKDYL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
 EVKFNWYVDG VEVHNAKTP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC
 KVSNKALPAP IEKTISKAKG QPREPVYTL PPSRDELTN QVSLTCLVKG
 FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

FIG. 5

FIG. 6A

Estrutura do Domínio hRAGE



Estrutura do Domínio hRAGE

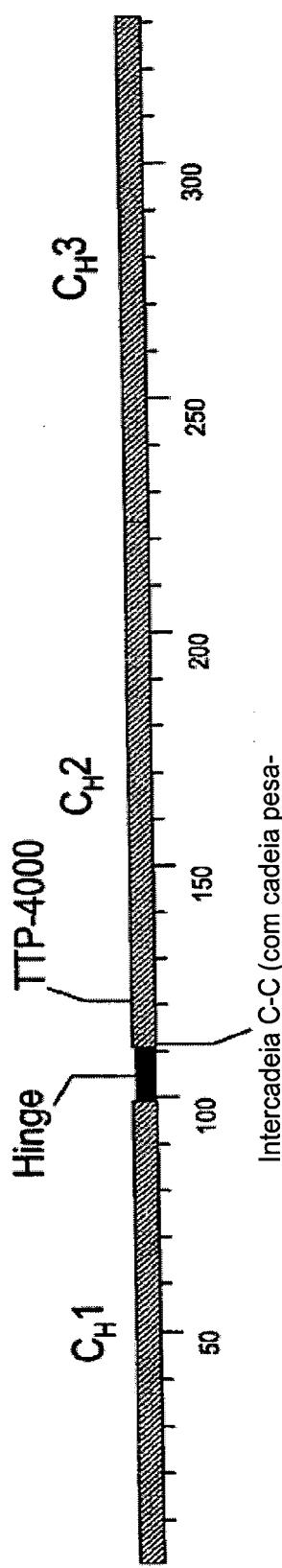


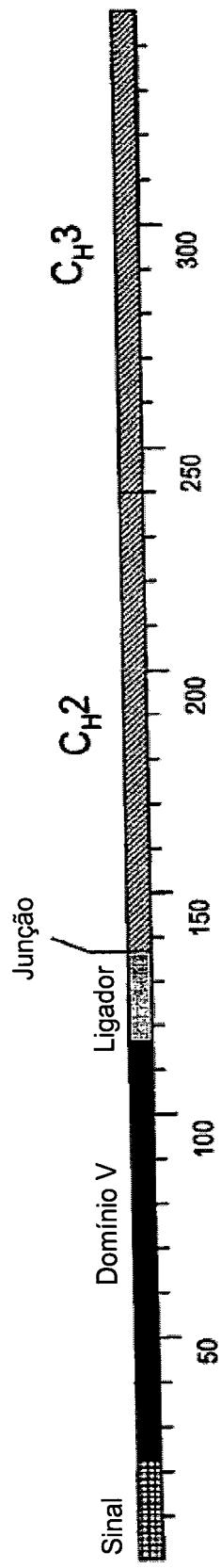
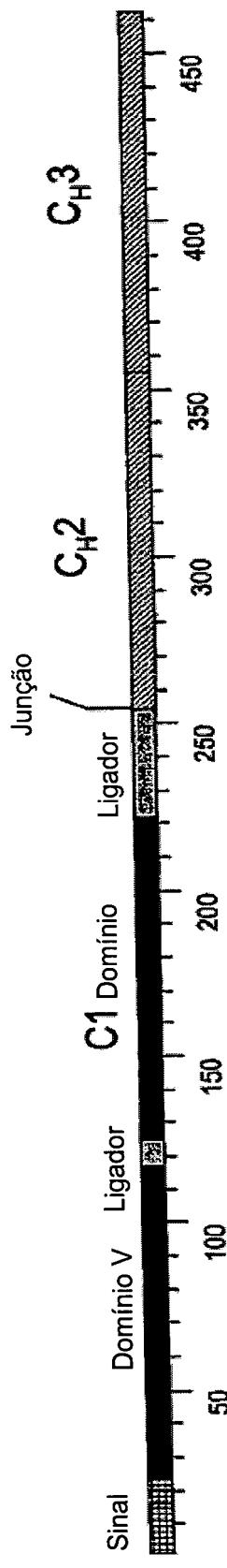
FIG. 6B**TTP-3000****TTP-4000**

FIG. 7

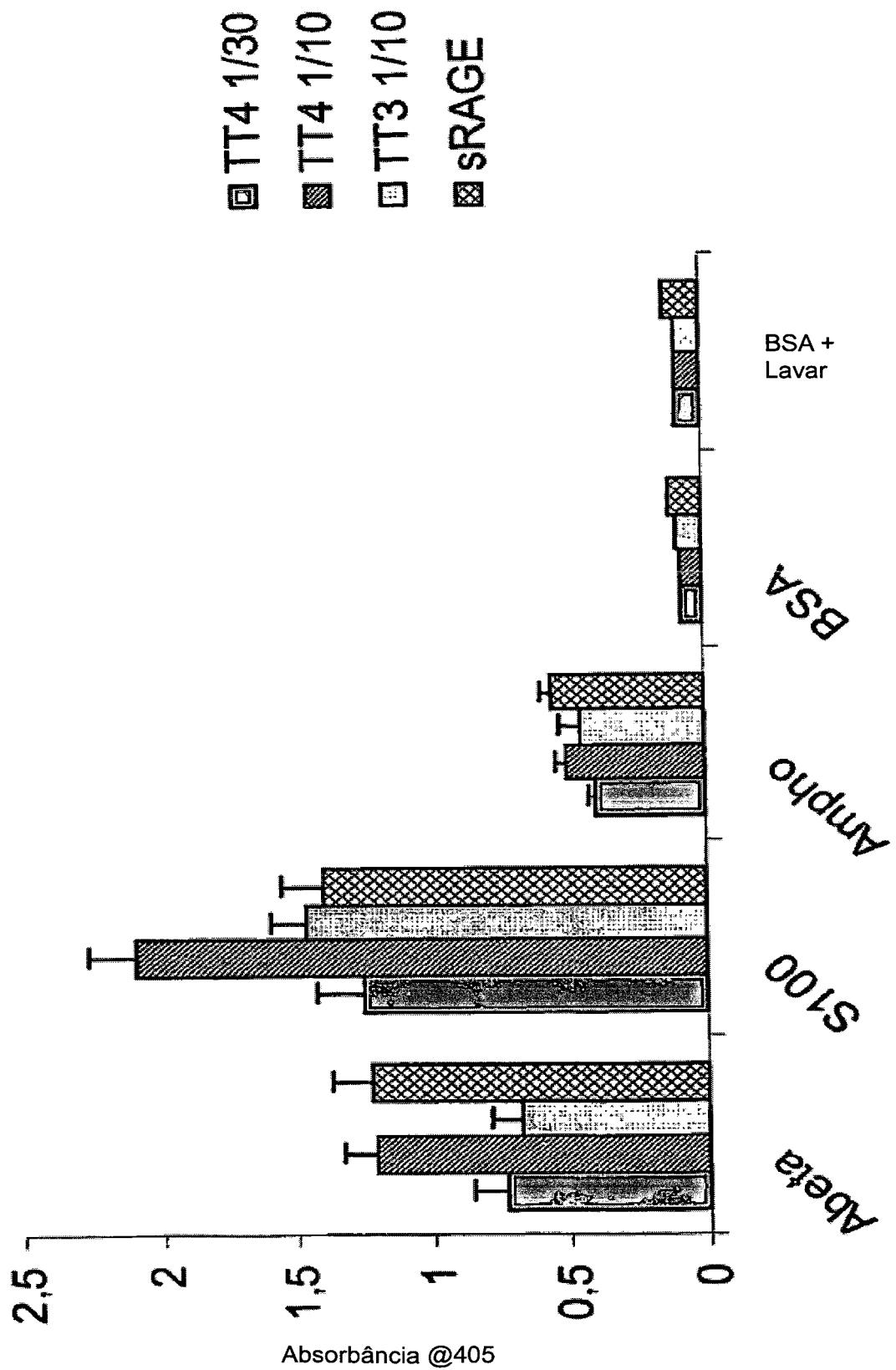


FIG. 8

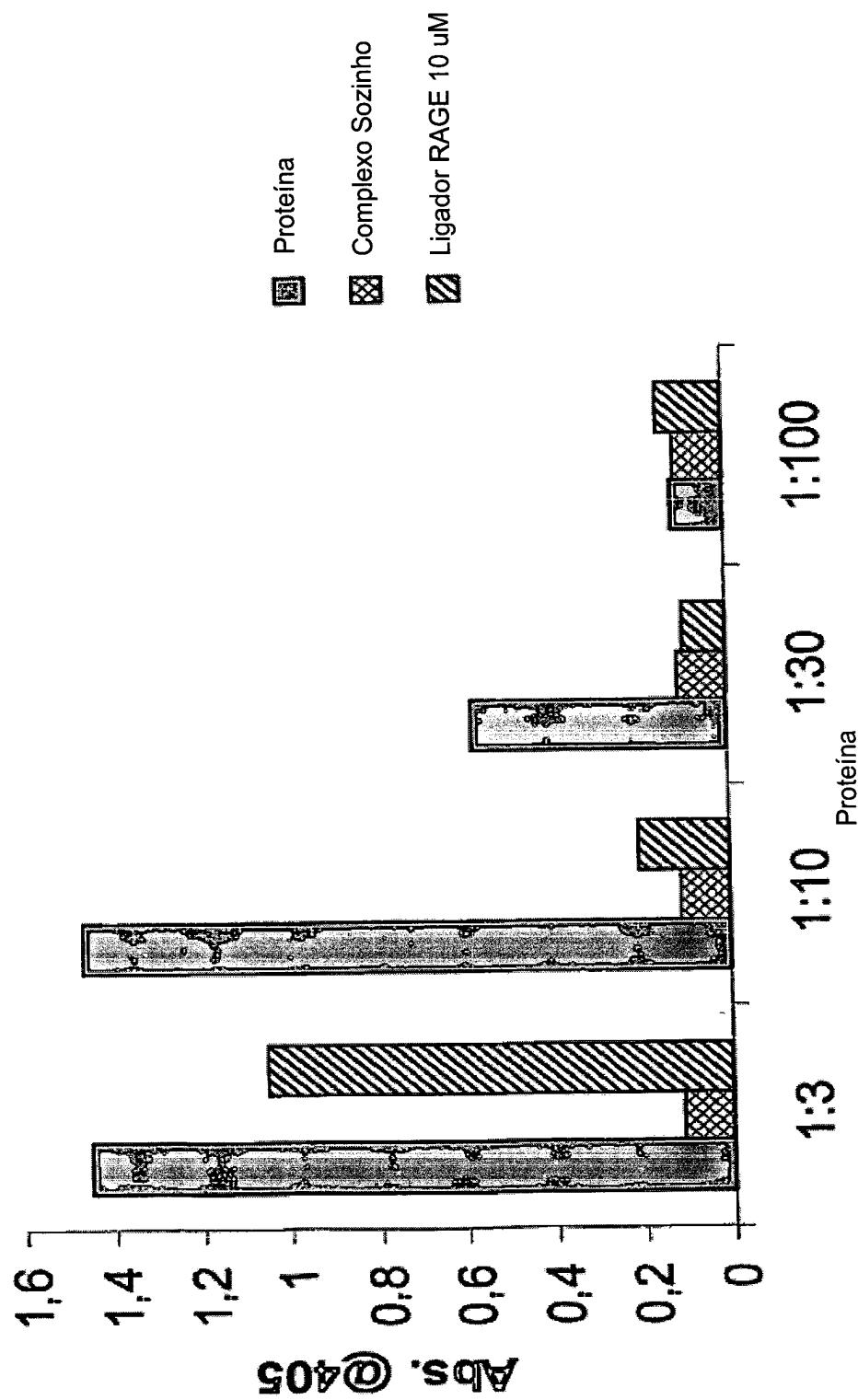


FIG. 9

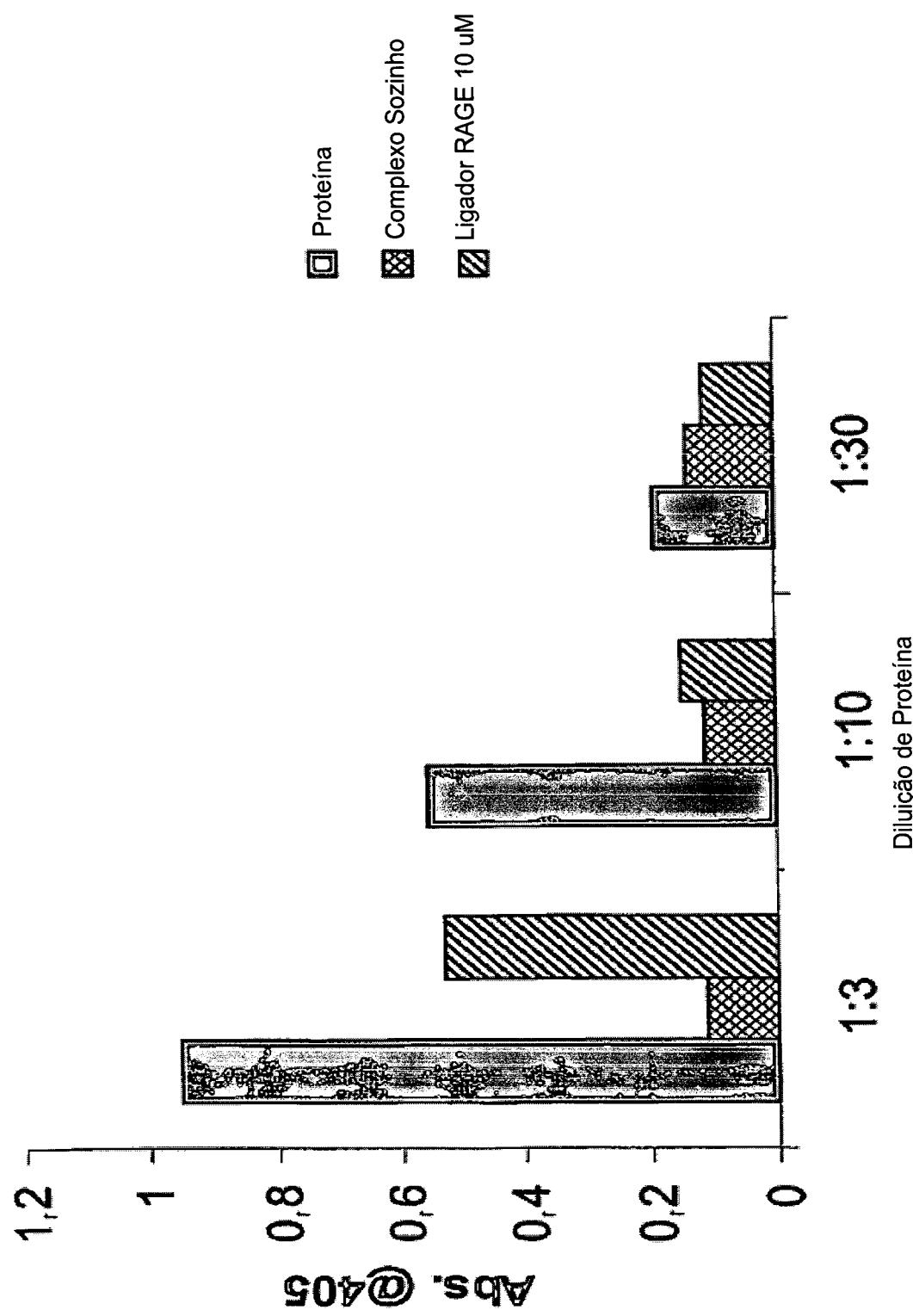


FIG. 10

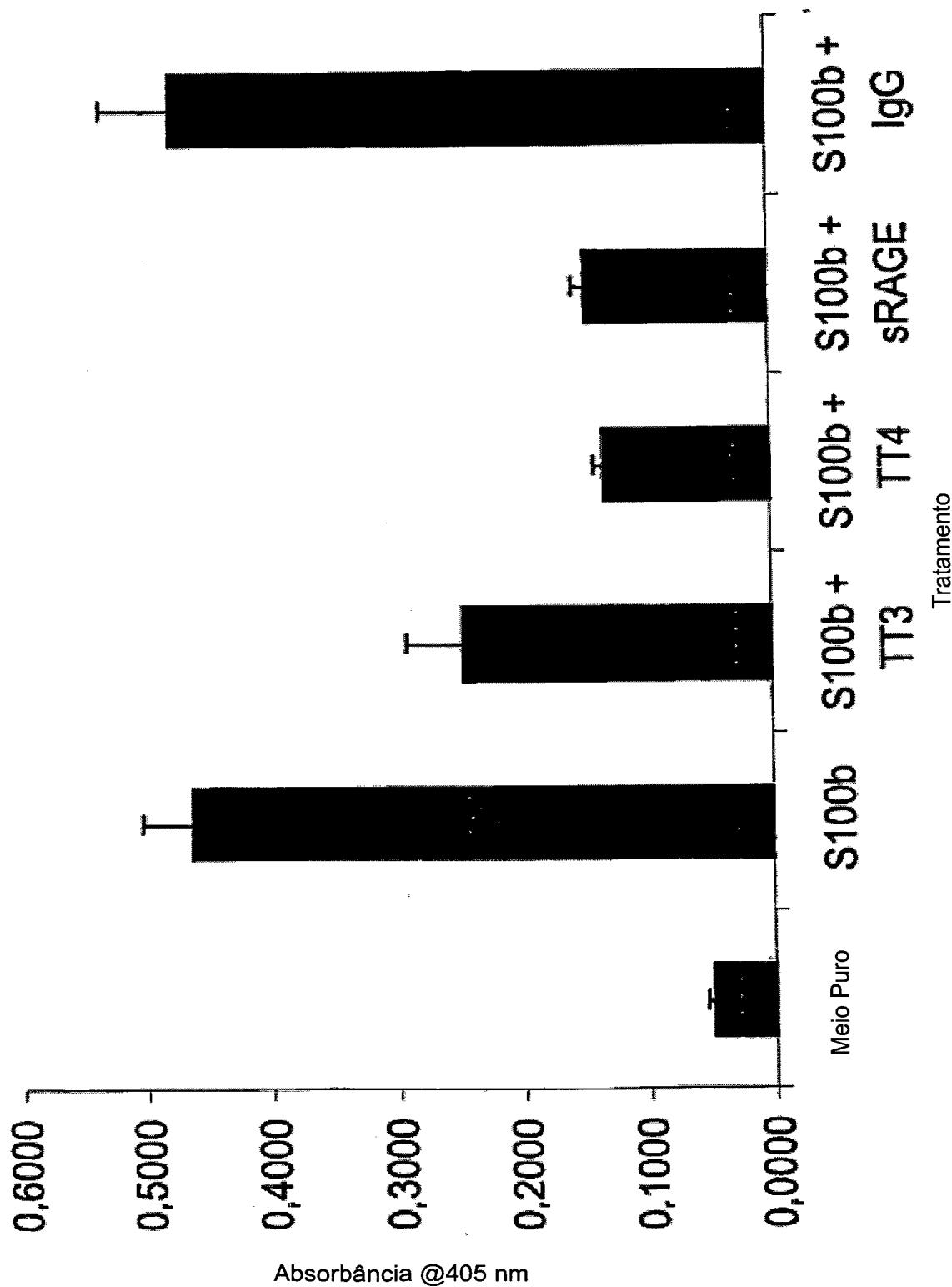


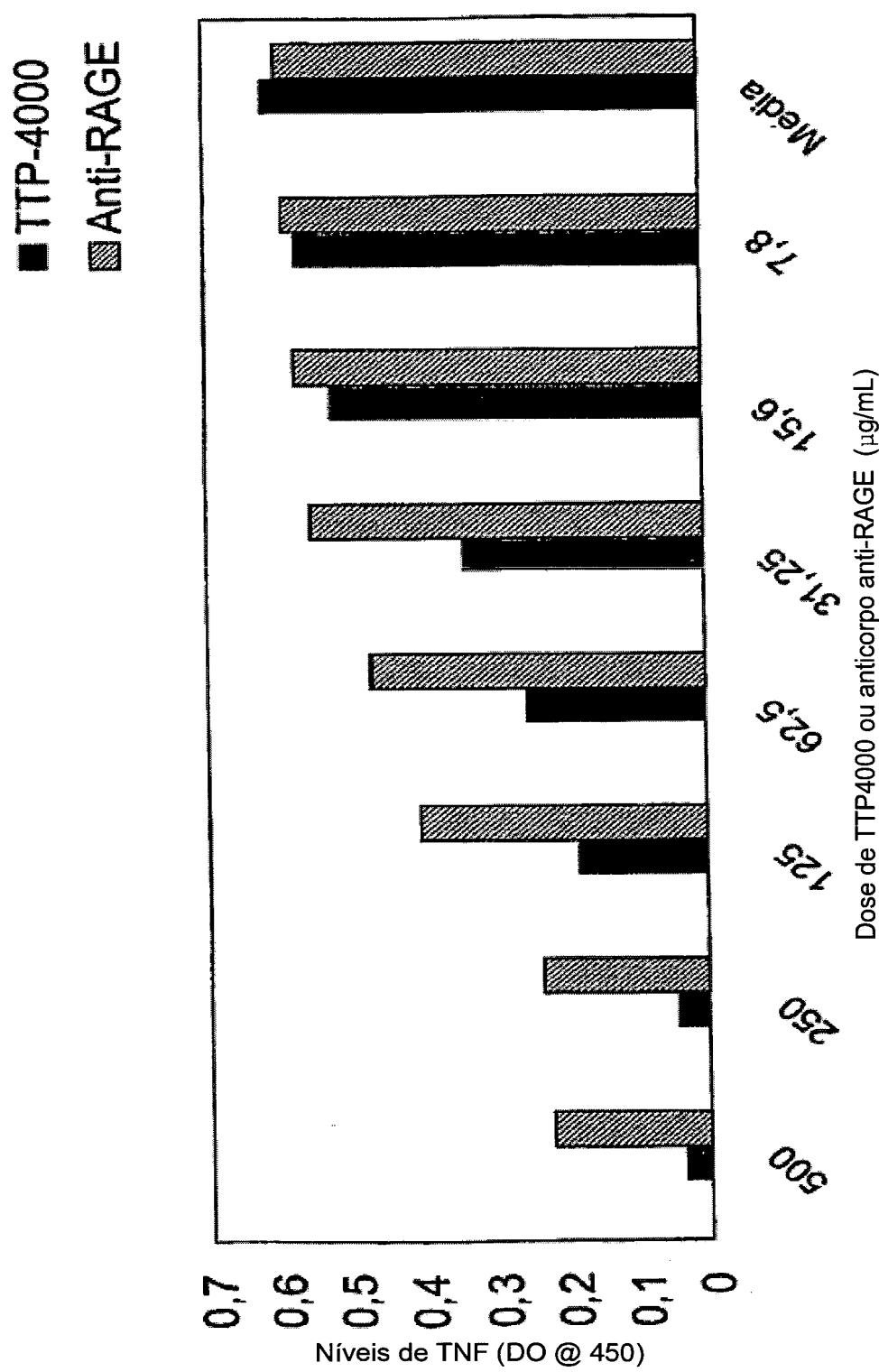
FIG. 11

FIG. 12

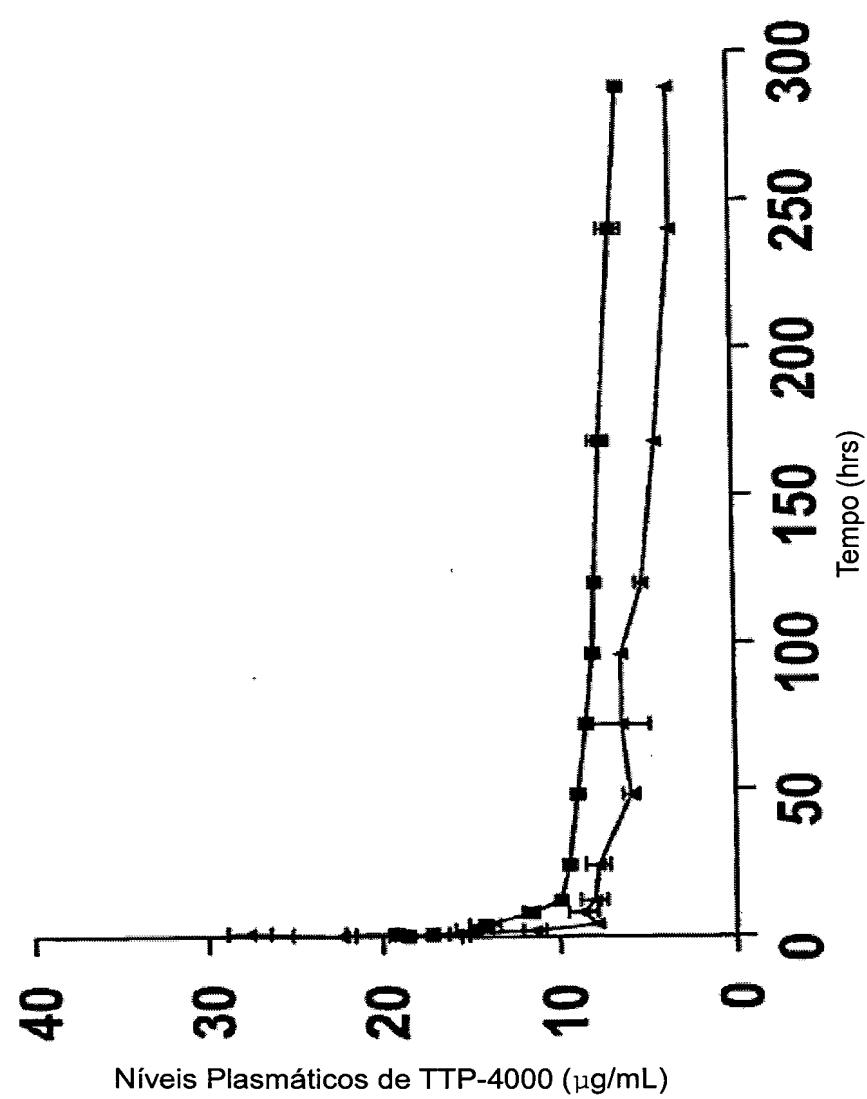


FIG. 13

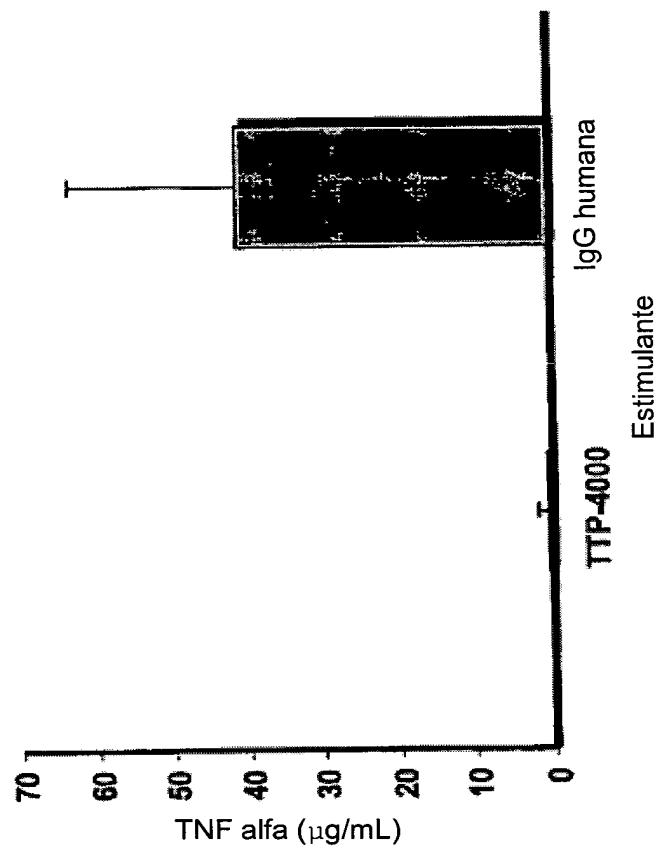


FIG. 14A

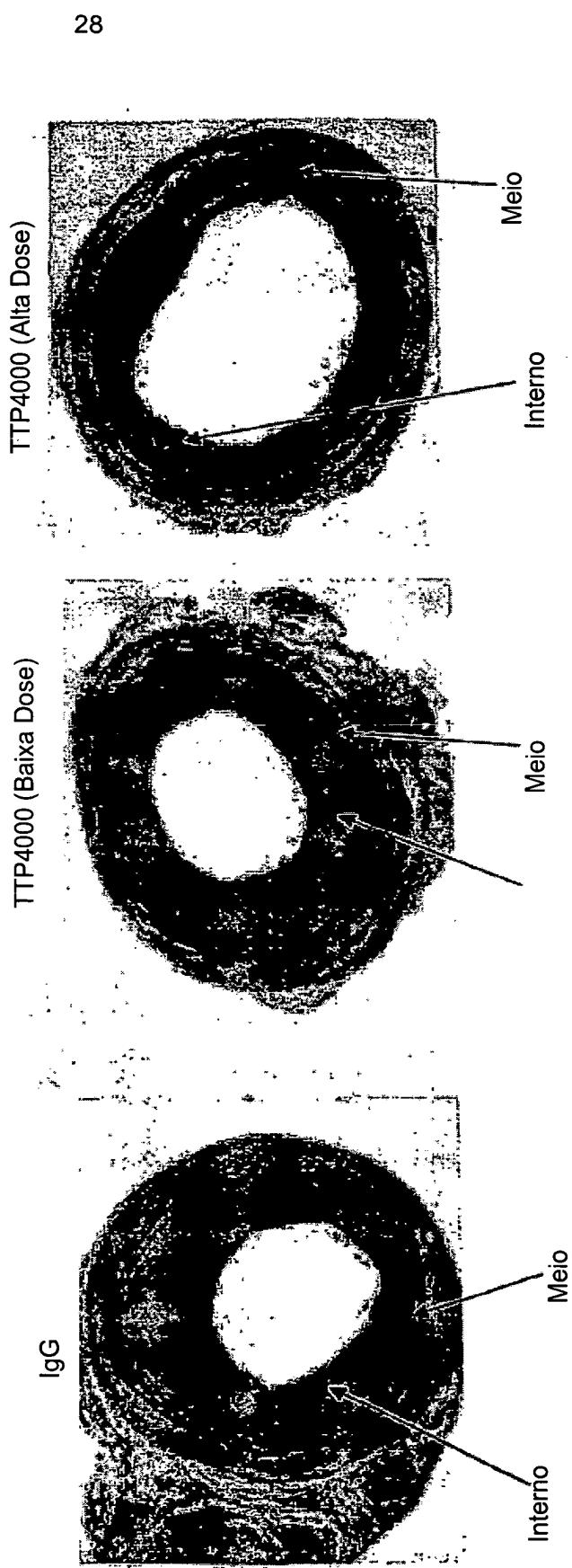


FIG. 14B

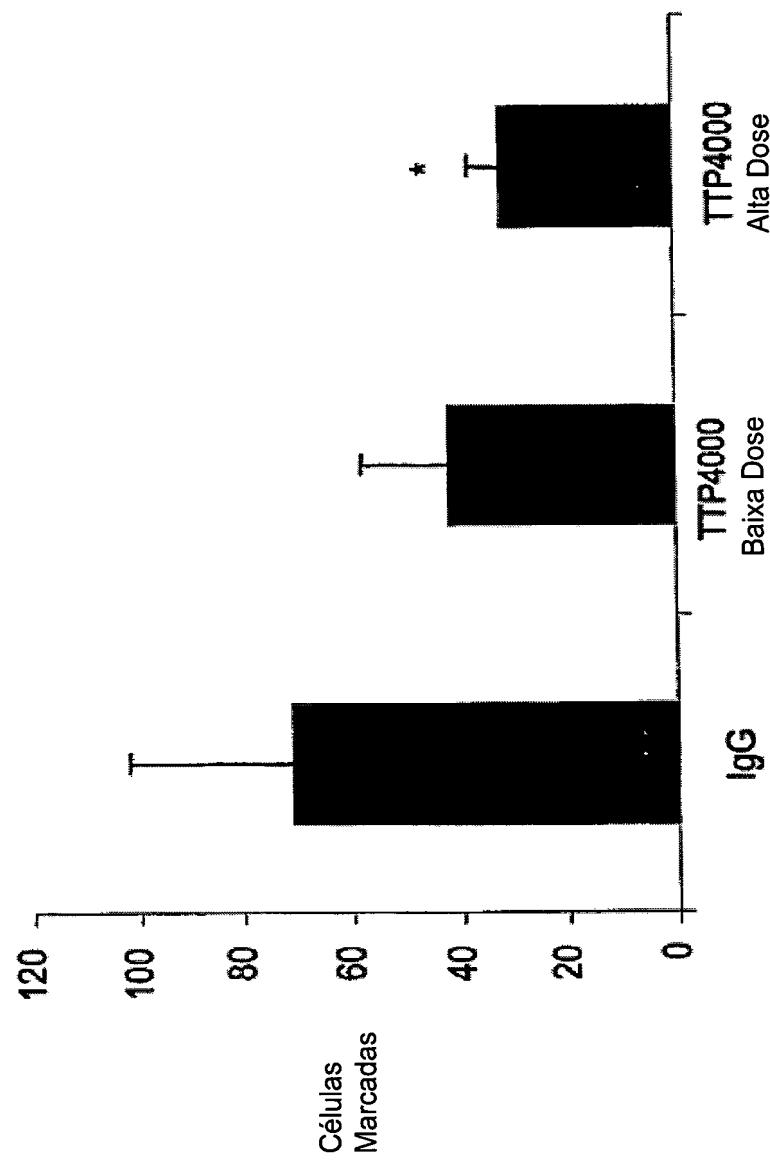


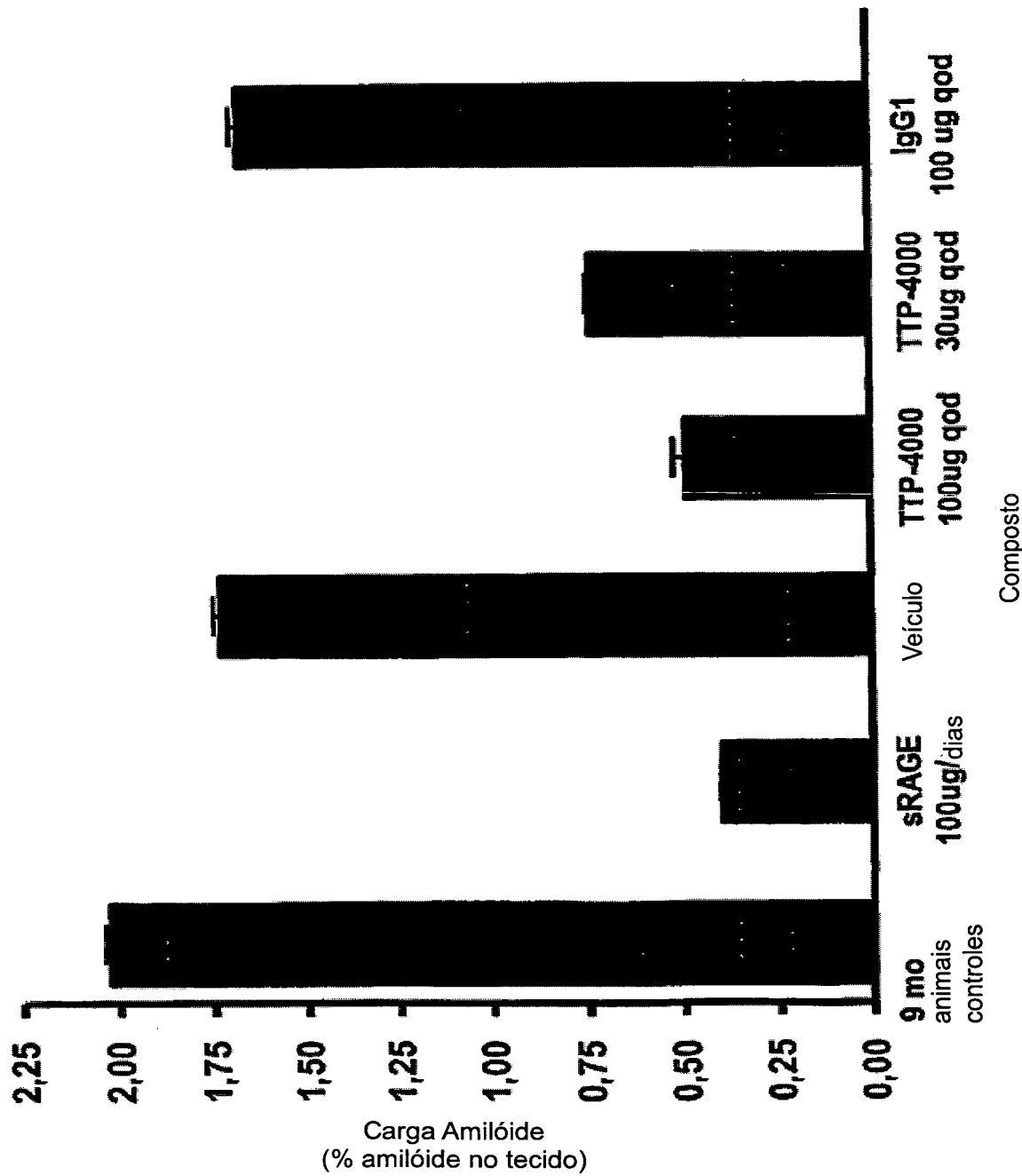
FIG. 15A

FIG. 15B

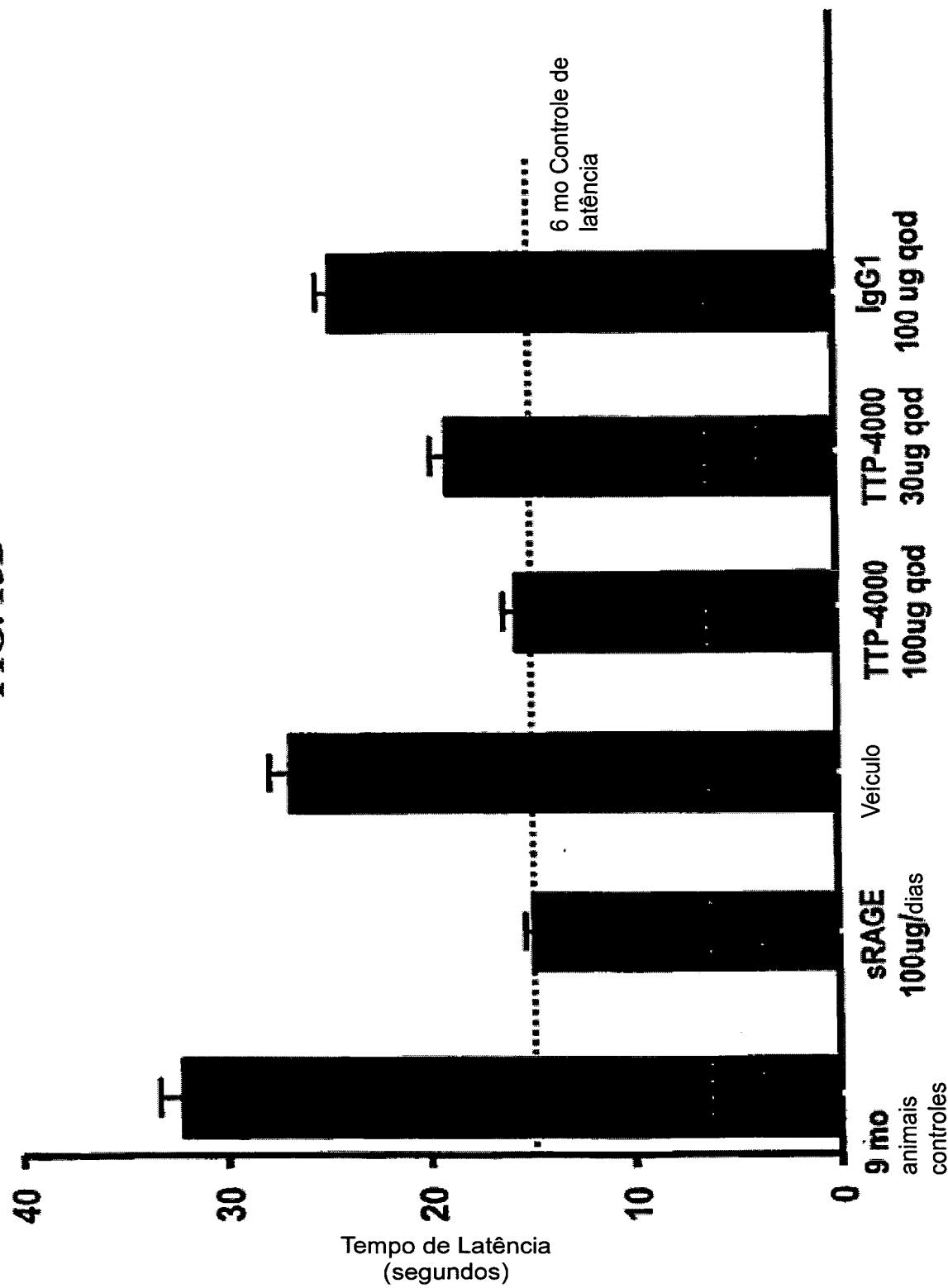
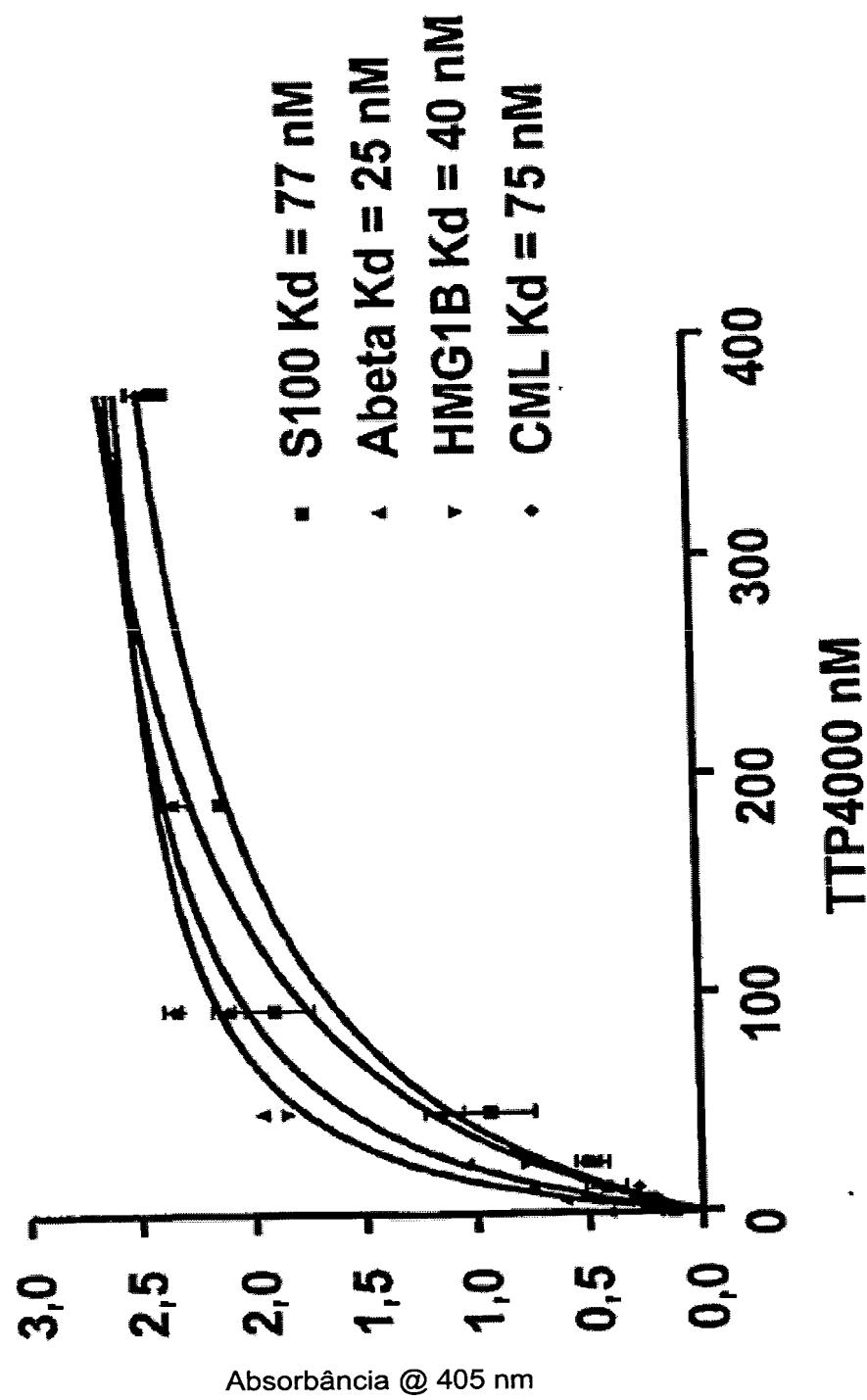


FIG. 16



Efeitos de TPP400 na Rejeição de Ilhotas Alográficas (BALB/c em B6)

Cum. Kaplan-Meier – Gráfico de Sobrevida para o Dia de Falência
Censor Variável = Censor
Grupo Variável = Grupo

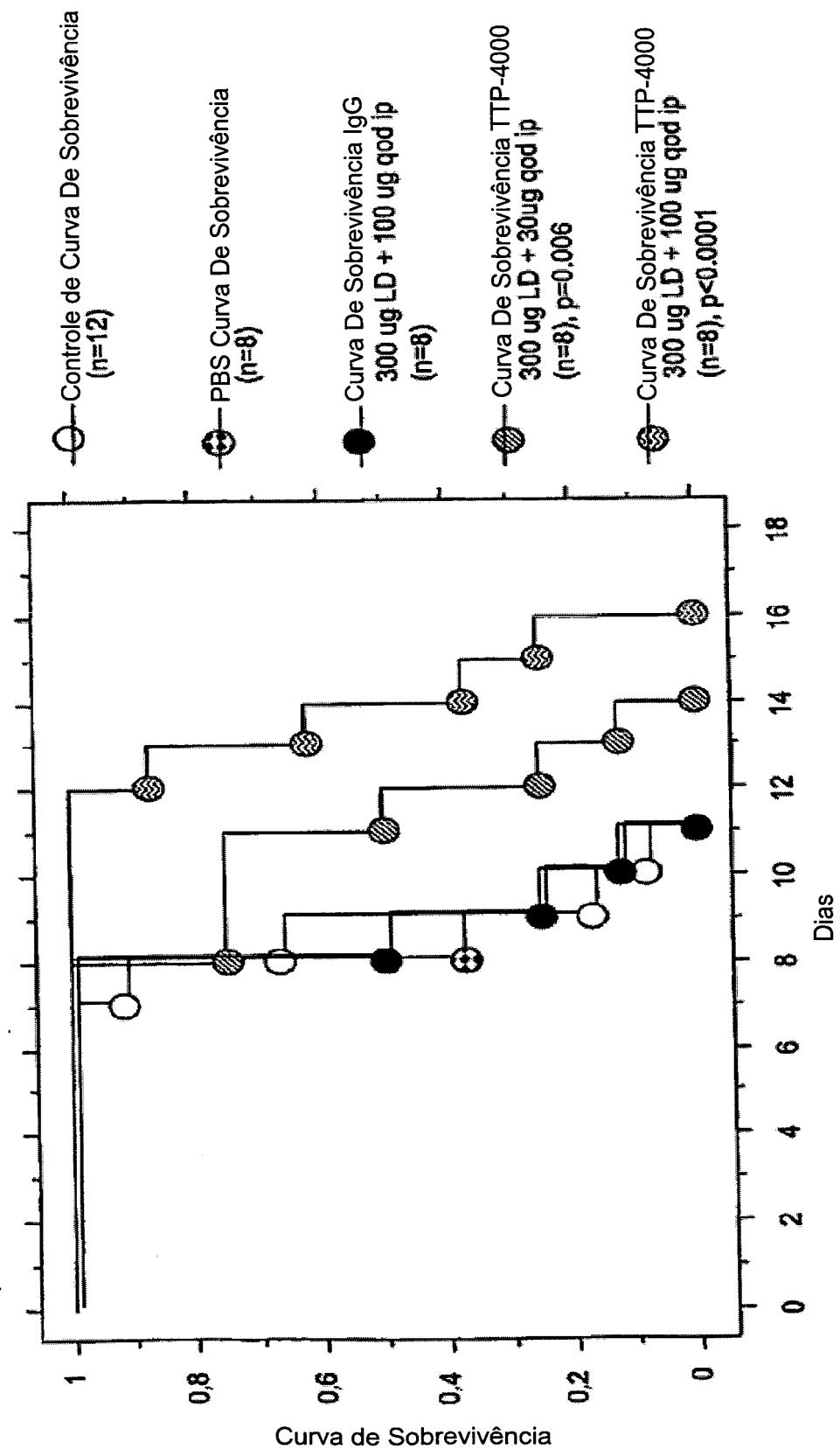


FIG. 17

Efeitos de Tratamento de TTP-4000 na Diabetes Recorrente em Ilhotas Transplantadas em Camundongos NOD Diabéticos

Cum. Kaplan-Meier – Gráfico de Sobrevida para o Dia de Falência

Censor Variável = Censor

Grupo Variável = Grupo

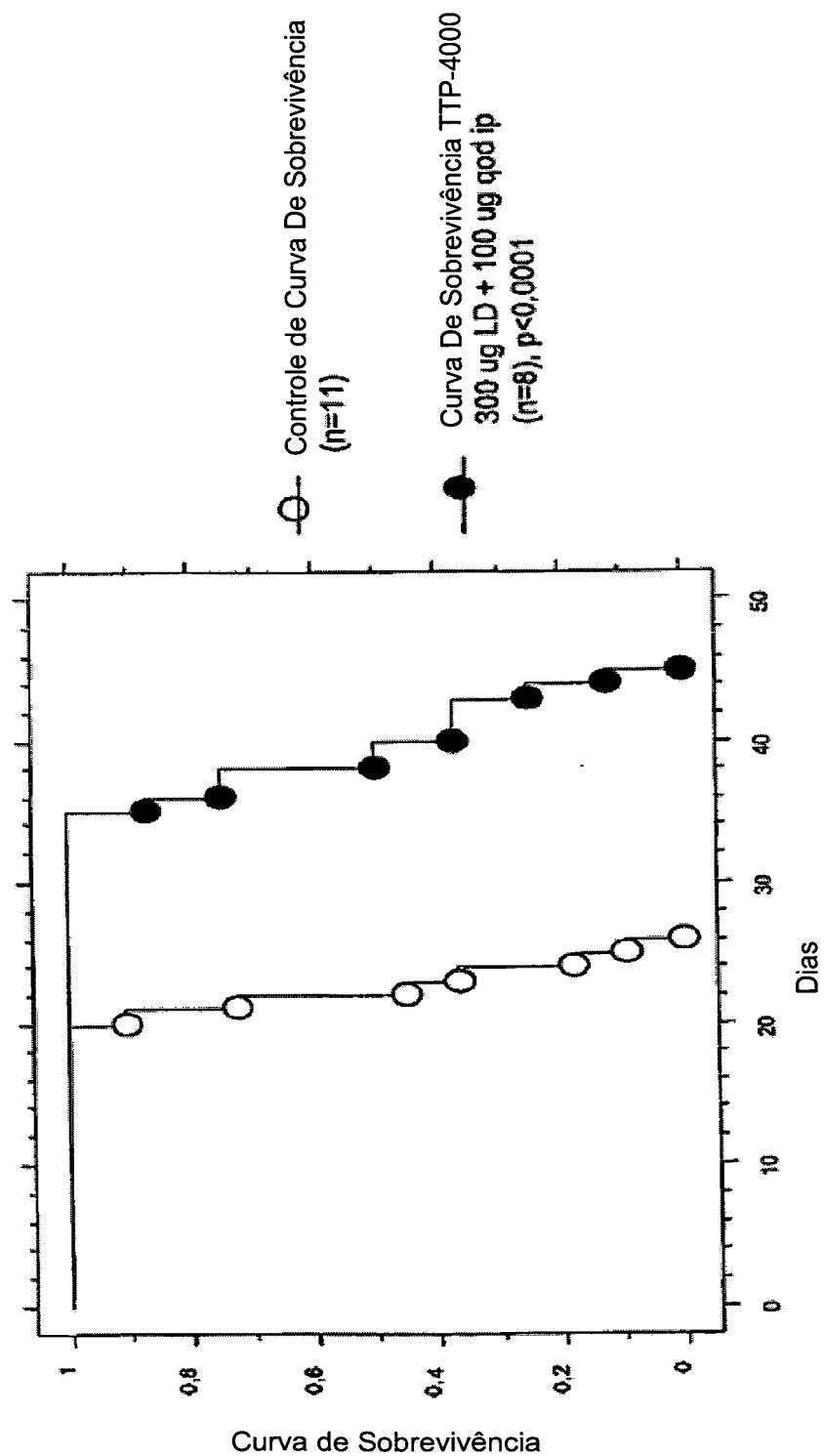


FIG. 18

164

RESUMO

"PROTEÍNAS DE FUSÃO RAGE, FORMULAÇÕES, E MÉTODOS DE USO DOS MESMOS"

São reveladas proteínas de fusão RAGE compreendendo seqüências polipeptídicas de RAGE ligadas a um segundo peptídeo não RAGE. A proteína de fusão RAGE pode utilizar um domínio polipeptídeo RAGE compreendendo um sítio de ligação do ligante RAGE e ligante interdomínio diretamente ligado a um N-terminal de um domínio da C_H2 da imunoglobulina. Também revelado são formulações de proteínas de fusão RAGE e o uso das proteínas de fusão RAGE e formulações de proteína de fusão RAGE como terapia para patologias mediadas por RAGE.