



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0314038-5 B1



(22) Data do Depósito: 05/09/2003

(45) Data de Concessão: 29/10/2019

(54) Título: ANTICORPO HUMANO ISOLADO, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, VETOR, USO DE UM ANTICORPO, E, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(51) Int.Cl.: C07K 16/28; A61K 39/395.

(30) Prioridade Unionista: 06/09/2002 US 60/408,719.

(73) Titular(es): AMGEN INC.; E. R. SQUIBB & SONS L.L.C..

(72) Inventor(es): BRIAN VARNUM; CHRIS VEZINA; ALISON WITTE; XUEMING QIAN; FRANK MARTIN; HAICHUN HUANG; GARY ELLIOTT.

(86) Pedido PCT: PCT US2003027978 de 05/09/2003

(87) Publicação PCT: WO 2004/022718 de 18/03/2004

(85) Data do Início da Fase Nacional: 04/03/2005

(57) Resumo: "ANTICORPO HUMANO ISOLADO, MÉTODO DE TRATAR UMA DOENÇA MEDIADA COM IL-1 EM UM PACIENTE, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, CADEIAS PESADA E LEVE, E, MÉTODO DE MAPEAMENTO DE EPITOPO DE UM ANTÍGENO SELECIONADO". Descreve-se anticorpos que interagem com receptor de tipo 1 de interleucina-1 (IL-1R1). Descreve-se métodos de tratar doenças mediadas com IL-1 mediante administração de uma quantidade farmacologicamente eficaz de anticorpos para IL-1R1. Métodos de detectar a quantidade de IL-1R1 em uma amostra utilizando-se anticorpos para IL-1R1.

“ANTICORPO HUMANO ISOLADO, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, VETOR, USO DE UM ANTICORPO, E, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA”

Este pedido faz referência, e reivindica prioridade, relativamente ao pedido provisional U.S. com número de série 60/408,719 depositado em 6 de setembro de 2002, cuja divulgação é incorporada aqui por referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção refere-se a anticorpos que se ligam à proteína de receptor tipo 1 de interleucina (IL-1R1). Proporciona-se também composições, particularmente composições farmacêuticas e métodos de tratar doenças mediadas com IL-1, como artrite reumatóide, osteoartrite, e outras condições inflamatórias.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Desenvolvimento de Anticorpo

Inflamação é a resposta do corpo a lesões resultantes de dano mecânico, infecção, ou estimulação antigénica. Reações inflamatórias expressam-se frequentemente de forma patológica. Referidas condições ocorrem quando a inflamação é expressa de uma maneira exagerada, quando é estimulada de maneira inapropriada, ou persiste mesmo após a remoção do agente lesionador.

A resposta inflamatória é mediada, *inter alia*, por citocinas. Uma das citocinas inflamatórias mais potentes já verificada é a interleucina-1 (IL-1). Um incremento na sinalização de IL-1 causa inflamação persistente associada com diversas doenças, e considera-se que IL-1 é um mediador-chave em muitas doenças e condições clínicas. Esta citocina é produzida primariamente (embora não exclusivamente) por células da linhagem dos macrófagos/monócitos e pode ser produzida de duas maneiras: IL-1 alfa (IL-1

α) e IL-1 beta (IL-1 β).

IL-1 estimula respostas celulares mediante interação com um complexo de receptor heterodimérico constituído de duas proteínas de transmembrana, receptor tipo 1 de IL-1 (IL-1 R1) e proteína acessória de receptor de IL-1 (IL-1RAcP). IL-1 liga-se primeiramente a IL-1R1; IL-1RAcP é então recrutada para este complexo (Greenfeder *et al.*, 1995, J. Biol. Chem. 270:13757-13765; Yoon and Dinarello, 1998, J. Immunology 160:3170-3179; Cullinan *et al.*, 1998, J. Immunology 161:5614-5620), seguido de transdução de sinal resultando na indução de uma resposta celular.

Estudos de ligação baseados em células sugerem que IL-1RAcP estabiliza o complexo de sinalização de IL-1R mediante diminuição da taxa de desligamento do ligando (Wesche *et al.*, 1998, FEBS Letters 429:303-306). Embora a interação da IL-1 com o IL-1R tenha sido meticulosamente caracterizada, a interação da IL-1RAcP com receptor ligado a ligando permanece mal definida. Como a IL-1RAcP não apresenta afinidade significativa por IL-1 ou IL-1R1 sozinhos, porém apresenta alta afinidade pelo complexo, conclui-se que sítios de ligação inéditos para IL-1RAcP são criados pelo evento de ligação de IL-1/IL-1R, que podem até mesmo incluir contribuições de radicais de IL-1 (Ettorre *et al.*, 1997, Eur. Cytokine Netw. 8:161-171). Outra molécula, antagonista de receptor de IL-1 (IL-1ra) compete com IL-1 α e IL-1 β pela ligação com o receptor, porém não consegue recrutar IL-1RAcP, resultando em um receptor ocupado porém não-sinalizador. A atividade de IL-1 pode ser neutralizada adicionalmente por IL-1R tipo II, um receptor-isca que liga ligando, mas que não participa da sinalização devido a um domínio intracelular truncado. IL-1ra e IL-1R de tipo II atuam reduzindo a gravidade e a duração de eventos inflamatórios mediados por IL-1 (Wesche *et al.*, 1998, FEBS Letters 429:303-306; Dripps *et al.*, 1991, J Biol. Chem. 266:10331-10336; Dripps *et al.*, 1991, J. Biol. Chem. 266:20331-20335).

É possível produzir inibidores de interleucina-1 a partir de

qualquer proteína capaz de prevenir especificamente a ativação de receptores celulares para IL-1, o que pode resultar de diversos mecanismos. Referidos mecanismos incluem regulação-para-baixo da produção de IL-1, ligação de IL-1 livre, interferência com ligação de IL-1 a IL-1R, interferência na formação do complexo IL-1R-IL-1RAcP, ou interferência na modulação da sinalização da IL-1 após ligação a seu receptor. Classes de inibidores de IL-1 incluem:

- antagonistas de receptor de interleucina-1, como IL-1ra, como descrito abaixo;
- anticorpos monoclonais anti-IL-1R (por exemplo, como divulgado no Pedido de Patente Européia publicado nº EP 623674, cuja divulgação é incorporada aqui por referência);
- proteínas de ligação de IL-1, como receptores de IL-1 solúveis (por exemplo, como divulgado nas patentes dos E.U.A. nums. 5,492,888; 5,488,032; 5,464,937; 5,319,071; e 5,180,812; sendo que as divulgações destas são incorporadas aqui por referência);
- anticorpos monoclonais anti-IL-1 (por exemplo, como divulgado na publicação de Pedido de Patente Internacional nums. WO 9501997, WO 9402627, WO 9006371, U.S. Pat. No. 4,935,343, EP 364778, EP 267611 e EP 220063, sendo que as divulgações destas são incorporadas aqui por referência);
- proteínas acessórias de receptor de IL-1 e anticorpos para as mesmas (por exemplo, como divulgado na Publicação de Pedido de Patente Internacional nums. WO 96/23067 e WO 99/37773, cuja divulgação é incorporada aqui por referência); e
- inibidores de enzima convertedora de interleucina-1 β (ICE) ou caspase I (por exemplo, como divulgado na Publicação de Pedido de Patente Internacional nums. WO 99/46248, WO 99/47545, e WO 99/47154, sendo que as divulgações destas são incorporadas aqui

por referência), que podem ser usadas para inibir produção e secreção de IL-1 β ;

- inibidores de protease de interleucina-1 β ; e
- outros compostos e proteínas que bloqueiam a síntese *in vivo* ou a liberação extracelular de IL-1.

Iniciadores de IL-1 exemplares encontram-se descritos nas referências a seguir: patentes dos E.U.A. num. 5,747,444; 5,359,032; 5,608,035; 5,843,905; 5,359,032; 5,866,576; 5,869,660; 5,869,315; 5,872,095; 5,955,480; e 5,965,564; Publicação de Pedido de Patente Internacional num. WO98/21957; WO96/09323; WO91/17184; WO96/40907; WO98/32733; WO98/4232;5, WO98/44940; WO98/47892; WO98/56377; WO99/03837; WO99/06426; WO99/0604;2, WO91/17249; WO98/32733; WO98/17661; WO97/08174; WO95/34326; WO99/3642;6, e WO99/36415; Publicação de pedidos de Patentes Européias num. EP534978 e EP89479; e pedido de Patente Francesa nº FR 2762514. As divulgações de todas as referências previamente indicadas são incorporadas aqui por referência.

Antagonista de receptor de interleucina-1 (IL-1ra) é uma proteína humana que atua como um inibidor natural de interleucina-1 e é um membro da família de IL-1, que inclui IL-1 α e IL-1 β . Antagonistas de receptor preferidos (incluindo IL-1ra e variantes e derivados dos mesmos), e também métodos de preparar e utilizar os mesmos, encontram-se descritos na Patente U.S. 5,075,222; Publicação de Pedido de Patente Internacional num. WO 91/08285; WO 91/17184; WO92116221; WO93121946; WO 94/06457; WO 94/21275; WO 94/21235; DE 4219626, WO 94/20517; WO 96/22793; WO 97/28828; e WO 99/36541, Pedido de Patente Australiana nº AU9173636; e Pedido de Patente Francesa nº FR2706772; cujas divulgações são incorporadas aqui por referência. As proteínas incluem formas glicosiladas e também não-glicosiladas de antagonistas de receptor de IL-1.

Especificamente, três formas úteis de IL-1ra e variantes das mesmas encontram-se divulgadas e descritas na Patente U.S. 5,075,222 ("a patente '222"). IL-1ra α é caracterizada por SDS-PAGE como uma molécula de 22-23 kD apresentando um ponto isoelétrico aproximado de 4,8, eluindo de uma coluna Mono Q FPLC a aproximadamente 52 mM de NaCl em tamponante Tris, pH 7,6. IL-1ra β é caracterizado como uma proteína de 22-23 kD, eluindo de uma coluna Mono Q a 48 mM de NaCl. Ambos, IL-1ra α e IL-1ra β são glicosilados. IL-1rax é caracterizado como uma proteína de 20 kD, eluindo de uma coluna Mono Q a 48 mM de NaCl, e não é glicosilada. A patente '222 também divulga métodos de isolar os genes responsáveis por codificarem os inibidores, clonar o gene em vetores e tipos de células vantajosos, e expressar o gene de forma a produzir os inibidores. Embora efetivo, IL-1ra apresenta uma meia-vida relativamente curta. No uso corrente, IL-1ra é administrado uma vez ao dia. Assim, a técnica poderia beneficiar-se de um antagonista do receptor de IL-1 com uma meia-vida consideravelmente mais longa.

A prevenção da sinalização de IL-1 inibindo-se IL-1 de ligar-se ao receptor de IL-1 constitui uma abordagem terapêutica atraente para tratar doenças mediadas com IL-1. Existe na técnica uma necessidade de iniciadores clinicamente efetivos da via de sinalização de IL-1 que possam melhorar os efeitos de doenças mediadas com IL-1 e que e que também sejam capazes de fornecimento em pacientes humanos. Um anticorpo humano que bloqueia a sinalização de IL-1 poderia ser particularmente vantajoso no atendimento desta necessidade e poderia proporcionar uma meia-vida mais longa do que terapia correntemente disponível.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A invenção proporciona anticorpos monoclonais que se ligam ao receptor tipo 1 de interleucina-1 (IL-1R1). De preferência, os anticorpos inibem a sinalização de IL-1 ao competirem com a ligação de IL-1 β e IL-1 α a

IL-1R1. Esta invenção também proporciona linhas de células de hibridoma que produzem e, da forma mais preferível, secretam os anticorpos monoclonais da invenção no meio de cultura de células. Os anticorpos da invenção bloqueiam com sucesso a sinalização de IL-1 em células humanas e, portanto, também são úteis para tratar pacientes com doenças mediadas com IL-1. A invenção proporciona adicionalmente proteínas de fusão que compreendem a seqüência de uma região de anticorpo Fc e uma ou mais seqüências selecionadas do grupo que consiste de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, e SEQ ID NO: 40. Referidas moléculas podem ser preparadas utilizando-se métodos como descritos, por exemplo, no WO 00/24782, que é incorporado por referência. Referidas moléculas podem ser expressas, por exemplo, em células mamíferas (por exemplo células de ovários de hamster chinês) ou células bacterianas (por exemplo células de *E. coli*).

Em determinados aspectos, a invenção proporciona anticorpos, preferivelmente anticorpos monoclonais, sendo o mais preferível anticorpos humanos, compreendendo uma cadeia pesada e uma cadeia leve, sendo que a cadeia pesada compreende uma seqüência de aminoácidos como apresentada em qualquer uma de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, ou SEQ ID NO: 8, ou um seu fragmento de imunoglobulina imunologicamente funcional ou ligador de antígeno.

A invenção também proporciona anticorpos, preferivelmente anticorpos monoclonais, sendo o mais preferível anticorpos humanos, compreendendo uma cadeia pesada e uma cadeia leve, sendo que a cadeia leve compreende uma seqüência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 4 ou um seu fragmento de imunoglobulina imunologicamente funcional ou de ligação a antígeno.

Em determinados aspectos, anticorpos da invenção compreendem uma cadeia pesada e uma cadeia leve, sendo que a região variável da cadeia pesada compreende uma seqüência de aminoácidos como apresentada em qualquer uma de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, ou SEQ ID NO: 16 ou um seu fragmento de imunoglobulina imunologicamente funcional ou de ligação a antígeno. Em outros aspectos, a região variável de cadeia leve compreende uma seqüência de aminoácidos como apresentada em qualquer uma de SEQ ID NO: 12 ou SEQ ID NO: 18, ou um seu fragmento de imunoglobulina imunologicamente funcional ou de ligação a antígeno. Em aspectos adicionais, a cadeia pesada compreende uma seqüência de aminoácidos como apresentada em qualquer uma de SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, ou SEQ ID NO: 36, ou um seu fragmento de imunoglobulina imunologicamente funcional ou de ligação a antígeno. Em outros aspectos adicionais, a cadeia leve compreende uma seqüência de aminoácidos como apresentada em qualquer uma de SEQ ID NO: 38 ou SEQ ID NO: 40, ou um seu fragmento de imunoglobulina imunologicamente funcional ou de ligação a antígeno. Referidas cadeias de anticorpos são úteis na preparação de anticorpos que se ligam especificamente a IL-1R1 e também na preparação de anticorpos biespecíficos em que a molécula resultante se liga a IL-1R1 e/ou a outra molécula-alvo (por exemplo, TNF ou um receptor de TNF).

A invenção também proporciona anticorpos que se ligam especificamente a IL-1R1, sendo que a cadeia pesada compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma seqüência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 10, ou um seu fragmento de imunoglobulina imunologicamente funcional ou de ligação a antígeno, e a cadeia leve compreende uma região variável de cadeia leve compreendendo uma seqüência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 12, ou um

seu fragmento de imunoglobulina imunologicamente funcional ou de ligação a antígeno.

Em determinados aspectos, a invenção também proporciona anticorpos, compreendendo uma cadeia pesada e uma cadeia leve, sendo que a cadeia pesada compreende uma primeira região variável, e sendo que a primeira região variável compreende uma sequência que apresenta pelo menos 90 %, mais preferivelmente pelo menos 95 %, e, da forma mais preferível, cerca de 99 % de identidade com a sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 10, e sendo que a cadeia leve compreende uma segunda região variável, e sendo que a segunda região variável compreende uma sequência que apresenta pelo menos 90 %, mais preferivelmente pelo menos 95 %, e, da forma mais preferível, cerca de 99 %, de identidade com a sequência de aminoácidos como apresentado na SEQ ID NO: 12, sendo que o anticorpo interage com IL-1R1.

A invenção proporciona adicionalmente anticorpos que se ligam especificamente a IL-1R1, sendo que a cadeia pesada compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 14, ou um seu fragmento de imunoglobulina imunologicamente funcional ou de ligação a antígeno, e a cadeia leve compreende uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 12, ou um seu fragmento de imunoglobulina imunologicamente funcional ou de ligação a antígeno.

Em determinados aspectos, a invenção proporciona anticorpos, compreendendo uma cadeia pesada e uma cadeia leve, sendo que a cadeia pesada compreende uma primeira região variável, e sendo que a primeira região variável compreende uma sequência que apresenta pelo menos 90 %, mais preferivelmente pelo menos 95 %, e, da forma mais preferível, cerca de 99 %, de identidade com a sequência de aminoácidos como apresentada na

SEQ ID NO: 14, e sendo que a cadeia leve compreende uma segunda região variável, e sendo que a segunda região variável compreende uma sequência que apresenta pelo menos 90 %, mais preferivelmente pelo menos 95 %, e, da forma mais preferível, cerca de 99 %, de identidade com a sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 12, sendo que o anticorpo interage com IL-1R1.

A invenção também proporciona anticorpos que se ligam especificamente a IL-1R1, sendo que a cadeia pesada compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 16, ou um seu fragmento de imunoglobulina imunologicamente funcional ou de ligação a antígeno, e a cadeia leve compreende uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 18, ou um seu fragmento de imunoglobulina imunologicamente funcional ou de ligação a antígeno.

Em determinados aspectos, a invenção proporciona anticorpos, compreendendo uma cadeia pesada e uma cadeia leve, sendo que a cadeia pesada compreende uma primeira região variável, e sendo que a primeira região variável compreende uma sequência que apresenta pelo menos 90 %, mais preferivelmente pelo menos 95 %, e, da forma mais preferível, cerca de 99 %, de identidade com a sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 16, e sendo que a cadeia leve compreende uma segunda região variável, e sendo que a segunda região variável compreende uma sequência de aminoácidos que apresenta pelo menos 90 %, mais preferivelmente pelo menos 95 %, e, da forma mais preferível, cerca de 99 %, de identidade com a sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 18, sendo que o anticorpo interage com IL-1R1.

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

seqüência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, ou SEQ ID NO: 30, ou um seu fragmento de imunoglobulina imunologicamente funcional ou de ligação a antígeno, e a cadeia leve compreende uma seqüência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 38, ou um seu fragmento de imunoglobulina imunologicamente funcional ou de ligação a antígeno.

A invenção proporciona adicionalmente anticorpos que se ligam especificamente a IL-1R1, sendo que a cadeia pesada compreende uma seqüência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, ou SEQ ID NO: 36, ou um seu fragmento de imunoglobulina imunologicamente funcional ou de ligação a antígeno, e a cadeia leve compreende uma seqüência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 40, ou um seu fragmento de imunoglobulina imunologicamente funcional ou de ligação a antígeno.

A invenção também proporciona concretizações de todos os previamente indicados que são anticorpos de cadeia simples, anticorpos Fv de cadeia simples, anticorpos Fab anticorpos, anticorpos Fab' e anticorpos (Fab')₂.

Em aspectos particulares, a invenção proporciona uma cadeia leve compreendendo uma seqüência de aminoácidos como apresentada em qualquer uma de SEQ ID NO: 38 ou SEQ ID NO: 40, ou um seu fragmento de imunoglobulina imunologicamente funcional ou de ligação a antígeno.

Adicionalmente, a invenção proporciona uma cadeia pesada compreendendo uma seqüência de aminoácidos como apresentada em qualquer uma de SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 ou SEQ ID NO: 36, ou um seu fragmento de imunoglobulina imunologicamente funcional ou de ligação a antígeno.

A invenção também refere-se a anticorpos humanos isolados

que se ligam especificamente a IL-1R1, sendo que o anticorpo compreende:

(a) regiões de estrutura de cadeia pesada humana, uma região de CDR1 de cadeia pesada humana, uma região de CDR2 de cadeia pesada humana, e uma região de CDR3 de cadeia pesada humana; e (b) regiões de estrutura de cadeia

leve humana, uma região de CDR1 de cadeia leve humana, uma região de CDR2 de cadeia leve humana, e uma região de CDR3 de cadeia leve humana.

Em determinados aspectos, a região de CDR1 de cadeia pesada humana pode ser a região de CDR1 de cadeia pesada de 26F5, 27F2, ou 15C4 como mostrado na Figura 10 e a região de CDR1 de cadeia leve humana pode ser a

região de CDR1 de cadeia leve de 26F5, 27F2, ou 15C4 como mostrado na Figura 11. Em outros aspectos, a região de CDR2 de cadeia leve humana pode ser a região de CDR2 de cadeia pesada de 26F5, 27F2, ou 15C4 como

mostrado na Figura 10 e a região de CDR2 de cadeia leve humana pode ser a região de CDR2 de cadeia leve de 26F5, 27F2, ou 15C4 como mostrado na

Figura 11. Em outros aspectos adicionais, a região de CDR3 de cadeia leve humana é a região de CDR3 de cadeia pesada de 26F5, 27F2, ou 15C4 como mostrado na Figura 10, e a região de CDR3 de cadeia leve humana é a região de CDR3 de cadeia leve de 26F5, 27F2, ou 15C4 como mostrado na Figura 11.

Adicionalmente, a invenção proporciona um anticorpo humano isolado que se liga especificamente a receptor tipo 1 de interleucina-1 (IL-1R1), compreendendo: uma região de CDR1 de cadeia pesada humana, sendo que o CDR1 de cadeia pesada apresenta a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, ou SEQ ID NO: 63; uma região de CDR2 de cadeia pesada humana, sendo que o CDR2 de cadeia pesada apresenta a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, ou SEQ ID NO: 66; e/ou uma região de CDR3 de cadeia pesada humana, sendo que o CDR3 de cadeia pesada apresenta a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, ou SEQ ID NO: 69.

A invenção também proporciona um anticorpo humano isolado que se liga especificamente a receptor tipo 1 de interleucina-1 (IL-1R1), compreendendo: uma região de CDR1 de cadeia leve humana, sendo que o CDR1 de cadeia leve apresenta a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 70 ou SEQ ID NO: 71; uma região de CDR2 de cadeia pesada humana, sendo que o CDR2 de cadeia pesada apresenta a aminoácidos de SEQ ID NO: 72 ou SEQ ID NO: 73; e/ou uma região de CDR3 de cadeia pesada humana, sendo que o CDR3 de cadeia pesada apresenta a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 74 ou SEQ ID NO: 75.

Em determinadas concretizações, os anticorpos da invenção ligam-se ao terceiro domínio de IL-1R1, que é mostrado na Figura 17. De preferência, o epítipo para um anticorpo da invenção consiste da seqüência de aminoácidos YSV, que é referida aqui como Epítipo 4 e mostrada na Figura 24. A invenção refere-se a proteínas de fusão e outras moléculas capazes de ligar-se ao Epítipo 4 (juntamente com os anticorpos previamente indicados, referidos coletivamente aqui como "parceiros de ligação específica"), como podem ser preparadas utilizando-se métodos como descritos, por exemplo, no WO 00/24782, que é incorporado por referência. Referidas moléculas podem ser expressas, por exemplo, em células mamíferas (por exemplo células de ovários de hamster chinês [CHO]) ou células bacterianas (por exemplo células de *E. coli*).

Além disso, a invenção proporciona um método de mapeamento de epítipo de um antígeno selecionado. Em um aspecto, o método compreende as etapas de (a) gerando um conjunto de proteínas de fusão, sendo que cada proteína de fusão compreende (i) avidina e (ii) um fragmento do antígeno; (b) selecionar o conjunto de proteínas de fusão para ligação a um ou mais parceiros de ligação específica para o antígeno; (c) isolar as proteínas de fusão em um meio compreendendo biotina, sendo que desta forma a avidina liga-se à biotina; e (d) analisar as proteínas de fusão

ligadas por meio do parceiro ou dos parceiros de ligação específica de forma a analisar sítios de ligação no antígeno para o parceiro ou parceiros de ligação específica. Em um aspecto particular, os parceiros de ligação específica são anticorpos.

Em concretizações adicionais, a invenção proporciona métodos de tratar um distúrbio, condição ou doença mediada com IL-1, compreendendo a etapa de administrar, a um indivíduo que disto necessita, uma quantidade farmacologicamente eficaz de um ou de uma pluralidade de anticorpos monoclonais da invenção ou um seu fragmento de imunoglobulina imunologicamente funcional ou de ligação a antígeno.

A invenção também proporciona métodos de detectar o nível de IL-1R1 em uma amostra biológica, compreendendo a etapa de contactar a amostra com um seu anticorpo monoclonal da invenção ou fragmento de ligação de antígeno. Os anticorpos anti-IL-1R da invenção podem ser empregados em qualquer método de ensaio conhecido, como ensaios de ligação competitiva, ensaios de *sandwich* direto e indireto, ensaios de imunoprecipitação e ensaios imunoabsorventes ligados a enzima (ELISA) (ver, Sola, 1987, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158, CRC Press, Inc.) para a detecção e quantificação de IL-1R. Os anticorpos podem ligar-se a IL-1R com uma afinidade que é apropriada para o método de ensaio empregado.

Concretizações específicas preferidas da invenção tornar-se-ão evidentes a partir da descrição mais detalhada de determinadas concretizações preferidas, apresentadas a seguir, e das reivindicações.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figuras 1A-1B ilustram uma sequência de cDNA (Fig. 1A) codificando uma região constante de IgG1 de cadeia pesada do anticorpo anti-IL-1R1 humano (SEQ ID NO: 1) e a sequência de aminoácidos (Fig. 1B) de uma região constante de IgG1 de cadeia pesada do anticorpo anti-IL-1R1

humano (SEQ ID NO: 2).

Figuras 2A-2B ilustram uma sequência de cDNA (Fig. 2A) codificando uma região constante de cadeia kappa do anticorpo anti-IL-1R1 humano (SEQ ID NO: 3) e a sequência de aminoácidos (Fig. 2B) de uma região constante de cadeia kappa do anticorpo anti-IL-1R1 humano (SEQ ID NO: 4).

Figuras 3A-3B ilustram uma sequência de cDNA (Fig. 3A) codificando uma região constante de IgG2 de cadeia pesada do anticorpo anti-IL-1R1 humano (SEQ ID NO: 5) e a sequência de aminoácidos (Fig. 3B) de uma região constante de IgG2 de cadeia pesada do anticorpo anti-IL-1R1 humano (SEQ ID NO: 6).

Figuras 4A-4B ilustram uma sequência de cDNA (Fig. 4A) codificando uma região constante de IgG4 de cadeia pesada do anticorpo anti-IL-1R1 humano (SEQ ID NO: 7) e a sequência de aminoácidos (Fig. 4B) de uma região constante de IgG4 de cadeia pesada do anticorpo anti-IL-1R1 humano (SEQ ID NO: 8).

Figuras 5A-5B ilustram uma sequência de cDNA (Fig. 5A) codificando a região variável de cadeia pesada do anticorpo anti-IL-1R1 de 26F5 (SEQ ID NO: 9) e a sequência de aminoácidos (Fig. 5B) da região variável de cadeia pesada do anticorpo anti-IL-1R1 de 26F5 (SEQ ID NO: 10).

Figuras 6A-6B ilustram uma sequência de cDNA (Fig. 6A) codificando a região variável de cadeia kappa do anticorpo anti-IL-1R1 de 26F5 (SEQ ID NO: 11) e a sequência de aminoácidos (Fig. 6B) de uma região variável de cadeia kappa do anticorpo anti-IL-1R1 de 26F5 (SEQ ID NO: 12).

Figuras 7A-7B ilustram uma sequência de cDNA (Fig. 7A) codificando a região variável de cadeia pesada do anticorpo anti-IL-1R1 de 27F2 (SEQ ID NO: 13) e a sequência de aminoácidos (Fig. 7B) de uma região variável de cadeia pesada do anticorpo anti-IL-1R1 de 27F2 (SEQ ID NO:

14).

Figuras 8A-8B ilustram uma sequência de cDNA (Fig. 8A) codificando a região variável de cadeia pesada do anticorpo anti-IL-1R1 de 15C4 (SEQ ID NO: 15) e a sequência de aminoácidos (Fig. 8B) de uma região variável de cadeia pesada do anticorpo anti-IL-1R1 de 15C4 (SEQ ID NO: 16).

Figuras 9A-9B ilustram uma sequência de cDNA (Fig. 9A) codificando a região variável de cadeia kappa do anticorpo anti-IL-1R1 de 15C4 (SEQ ID NO: 17) e a sequência de aminoácidos (Fig. 9B) de uma região variável de cadeia kappa do anticorpo anti-IL-1R1 de 15C4 (SEQ ID NO: 18).

Figura 10 mostra um alinhamento de sequências de aminoácidos de cadeias pesadas de anticorpos anti-IL-1R1 denominados 15C4 (SEQ ID NO: 80), 27F2 (SEQ ID NO: 82), e 26F5 (SEQ ID NO: 84). As regiões determinadoras de complementaridade (CDRs) encontram-se sublinhadas. CDR1 para 26F5 é denominada SEQ ID NO: 61; para 27F2 é denominada SEQ ID NO: 62; para 15C4 é denominada SEQ ID NO: 63, CDR2 para 26F5 é denominada SEQ ID NO: 64; para 27F2 é denominada SEQ ID NO: 65; para 15C4 é denominada SEQ ID NO: 66. CDR1 para 26F5 é denominada SEQ ID NO: 67; para 27F2 é denominada SEQ ID NO: 68; para 15C4 é denominada SEQ ID NO: 69.

Figura 11 mostra um alinhamento de sequências de aminoácidos de cadeias pesadas de anticorpos anti-H, R1- γ denominados 15C4 (SEQ ID NO: 81), 27F2 (SEQ ID NO: 83), e 26F5 (SEQ ID NO: 84). CDR1 para 26F5/27F2 é denominada SEQ ID NO: 70; para 15C4 é denominada SEQ ID NO: 71, CDR2 para 26F5/27F2 é denominada SEQ ID NO: 72; para 15C4 é denominada SEQ ID NO: 73, CDR1 para 26F5/27F2 é denominada SEQ ID NO: 74; para 15C4 é denominada SEQ ID NO: 75.

Figura 12 é um gráfico que ilustra o efeito inibidor de anticorpos anti-IL-1R1 sobre a formação de complexo IL-1R/IL-1 β /IL-

1RAcP.

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

Figura 14 é um gráfico que representa a capacidade de anticorpos anti-IL-1R1 bloquearem a ligação de IL-1 β embora sem interferirem significativamente com a ligação de IL-1ra em comparação com IgG de controle.

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

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

Figura 16 é um gráfico que mostra inibição da produção de IL-6 em sangue integral humano por meio de anticorpos monoclonais anti-IL-1R1 denominados 15C4, 26F5, e 27F2 em comparação com IL-1ra.

Figura 17 ilustra seqüências de aminoácidos (SEQ ID NO: 76) e nucleotídeos (SEQ ID NO: 77) humanos e seqüências de nucleotídeos de rato (SEQ ID NO: 78) e seqüências de aminoácidos (SEQ ID NO: 79) do 3º domínio de IL-1R1. As barras numeradas acima da seqüência humana indicam os 15 sítios diferentes mutados para construção das 15 diferentes proteínas mutadas. Os radicais de rato introduzidos por mutação encontram-se listados abaixo da seqüência de ácido nucleico de rato.

Figura 18 mostra análise de *Western blot* demonstrando reconhecimento de anticorpos monoclonais anti-IL-1R1 de mutantes de IL-1R1.

Figura 19 é um desenho que representa (I) ativação da sinalização da via IL-1, que inicia com ligação de IL-1 β a IL-1R1, e recrutamento de IL-1RacP, e três classes de anticorpos anti-IL-1R1: (II) bloqueadores de IL-1 de epitopo de 3º domínio, (III) bloqueadores de RAcP de epitopo de 3º domínio, e (IV) bloqueadores de IL-1 de epitopo de 1º/2º domínio.

Figura 20 ilustra a estrutura cristalina de 15C4 e 27F2 com mutação 10 como descrito aqui. Os radicais cinzas indicam os epítopos de 15C4 e 27F2.

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

Figura 22 ilustra epítopos de 24E12 no terceiro domínio de IL-1R1 extracelular.

Figura 23 ilustra a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 59) da proteína quimérica avidina-IL-1R1 humano-FLAG da invenção.

Figura 24 ilustra a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 60) de uma proteína avidina-IL-1R1 *cynomolgus*-FLAG. A avidina de galinha recombinante (italizada) é conjugada ao domínio extracelular maduro de IL-1R1 *cynomolgus* (sublinhado, com marcador FLA C-terminal em negrito) por um ligando de 6 aminoácidos. Quatro aminoácidos de IL-1R1 humano que foram introduzidos sozinhos e em combinação na sequência *cynomolgus* encontram-se em negrito sob a sequência *cynomolgus*. Epitopo 4 está em negrito, italizado e sublinhado.

Figura 25A mostra uma análise de *Western blot* de ligação de anticorpo anti-IL1-R1 humano (anti-huIL1-R1) a IL-1R1. O * indica que se utilizou anticorpos a 5 μ g/ml, enquanto que no restante se utilizou anticorpos a 1 μ g/ml.

Figura 25B mostra um sumário da análise densitométrica de um conjunto em duplicata de experimentos de *Western blot*.

Figura 26 mostra gráficos representando a ligação de anticorpos anti-huIL1R1 a proteínas de avidina IL-1R1-FLAG em um ensaio de ligação baseado em pérolas multiplexadas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DE DETERMINADAS CONCRETIZAÇÕES PREFERIDAS

Os cabeçalhos de seções aqui utilizados são apenas para fins organizacionais e não devem ser interpretados como limitando o objeto em pauta descrito. Todas as referências indicadas neste pedido são incorporadas aqui expressamente por referência, para qualquer fins.

Definições

Uma doença ou condição clínica é considerada como sendo uma "doença mediada com interleucina-1 (IL-1)" se a condição médica ou doença naturalmente ocorrente ou induzida experimentalmente estiver associada com níveis elevados de IL-1 em tecidos ou fluidos corporais ou se células ou tecidos coletados do corpo produzirem níveis elevados de IL-1 em cultura. Níveis elevados de IL-1 podem incluir, por exemplo, níveis que excedem aqueles normalmente encontrados em uma célula ou tecido particular, ou podem ser qualquer nível detectável de IL-1 em uma célula ou tecido que normalmente não expressa IL-1. Em muitos casos, doenças mediadas com IL-1 também são reconhecidas pelas duas condições adicionais a seguir: (1) verificações patológicas associadas com a doença ou condição clínica podem ser emuladas experimentalmente em animais por meio de administração de IL-1 ou regulação-para-cima da expressão de IL-1; e (2) uma patologia induzida em modelos animais experimentais da doença ou condição clínica pode ser inibida ou eliminada por meio de tratamento com agentes que inibem a ação da IL-1. Na maior parte das doenças mediadas com IL-1 pelo menos duas das três condições são atendidas, e em muitas doenças mediadas com IL-1 todas as condições são atendidas.

Uma lista não-exclusiva de doenças agudas e crônicas

mediadas com IL-1 inclui, embora sem limitação, as seguintes: pancreatite aguda; amielolaterosclerose (ALS); doença de Alzheimer; caquexia/anorexia, incluindo caquexia induzida por AIDS; asma e outras doenças pulmonares; aterosclerose; vasculite autoimune; síndrome da fadiga crônica; doenças associadas com *Clostridium*, incluindo diarreia associada com *Clostridium*; condições coronárias e indicações, incluindo falha cardíaca congestiva, restenose coronária, infarto do miocárdio, disfunção do miocárdio (por exemplo, relacionada com sepse), e enxerto de desvio da artéria coronária; câncer, como mieloma múltiplo e mielógeno (por exemplo, AML ou CML) e outras leucemias, e também metástase de tumor; diabetes (por exemplo, diabetes dependente de insulina); endometriose; febre; fibromialgia; glomerulonefrite; doença do enxerto *versus* hospedeiro/rejeição de transplante; choque hemorrágico; hiperalgesia; doença do intestino inflamatório; condições inflamatórias de uma junta, incluindo osteoartrite, artrite psoriática e artrite reumatóide; doença inflamatória do olho, como a que pode estar associada com, por exemplo, transplante da córnea; isquemia, incluindo isquemia cerebral (por exemplo, lesão do cérebro como um resultado de trauma, epilepsia, hemorragia ou ataque [AVC], sendo que cada um destes pode levar a neurodegeneração); doença de Kawasaki; dificuldade de aprendizado; doenças do pulmão (por exemplo, ARDS); esclerose múltipla; miopatias (por exemplo, metabolismo da proteína muscular, particularmente na sepse); neurotoxicidade (por exemplo, como induzida por HIV); osteoporose; dor, incluindo dor relacionada com câncer; doença de Parkinson; doença periodontal; trabalho de pré-parto; psoríase; lesão de reperfusão; choque séptico; efeitos secundários de terapia de radiação; doença da junta mandibular temporal; distúrbio do sono; uveíte; ou uma condição inflamatória resultante de esforço excessivo, distensão, dano à cartilagem, trauma, cirurgia ortopédica, infecção ou outros processos de doenças. Métodos da invenção de tratar estas doenças agudas e crônicas mediadas com

IL-1, e também outras doenças e condições mediadas com IL-1 encontram-se descritas abaixo.

É possível utilizar técnicas convencionais para preparar DNA recombinante, realizar síntese de oligonucleotídeos, e praticar cultura e transformação de tecido (por exemplo, eletroporação, transfecção ou lipofecção). É possível realizar reações enzimáticas e técnicas de purificação de acordo com as instruções dos fabricantes ou como usualmente realizado na técnica, ou como descrito aqui. As técnicas e procedimentos previamente indicados podem ser realizados geralmente de acordo com métodos convencionais bem conhecidos na técnica e como descrito em várias referências gerais e mais específicas que são indicadas e discutidas na presente descrição. Ver, por exemplo, Sambrook *et al.*, 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., que é incorporada aqui por referência para qualquer finalidade. A não ser que sejam proporcionadas definições específicas, a nomenclatura utilizada em conexão com, e os procedimentos e técnicas de laboratório de, a química analítica, química orgânica sintética, e química medicinal e farmacêutica aqui descritas são aquelas bem conhecidas e comumente usadas na técnica. É possível empregar técnicas convencionais para sínteses químicas, análises químicas, preparação farmacêutica, formulação e fornecimento, e tratamento de pacientes.

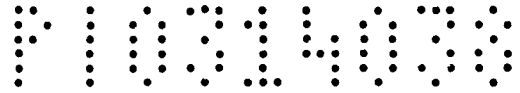
Como utilizados de acordo com a presente descrição, e exceto se indicado de outra forma, os termos a seguir devem ser compreendidos como apresentando os significados a seguir:

O termo "polinucleotídeo isolado" significa que o polinucleotídeo em pauta, (1) não está associado (covalentemente ou não-covalentemente) com todos ou com uma porção de outros polinucleotídeos com os quais o polinucleotídeo em pauta está associado na natureza, (2) está associado com uma molécula com a qual não está associada na natureza, ou

(3) não ocorre na natureza de forma associada com quaisquer outros polinucleotídeos. Um polinucleotídeo isolado do tipo referido pode ser DNA genômico, cDNA, mRNA ou outro RNA, de origem sintética, ou qualquer combinação dos mesmos.

5 O termo "proteína isolada" referido aqui significa que uma proteína em pauta (1) está isenta de pelo menos algumas outras proteínas com as quais normalmente seria encontrada, (2) está essencialmente isenta de outras proteínas da mesma fonte, por exemplo, da mesma espécie, (3) é expressa por uma célula de uma espécie diferente, (4) foi separada de pelo menos cerca de 50 por cento de polinucleotídeos, lipídeos, carboidratos, ou outros materiais com os quais está associada na natureza, (5) não está associada (por meio de interação covalente ou não-covalente) com porções de uma proteína com as quais a "proteína isolada" está associada na natureza, (6) está associada de forma operacional (por meio de interação covalente ou não-covalente) com um polipeptídeo com o qual não está associada na natureza, 15 ou (7) não ocorre na natureza. DNA genômico, cDNA, mRNA ou outro RNA, de origem sintética, ou qualquer combinação dos mesmos pode codificar uma proteína isolada do tipo referido. De preferência, a proteína isolada é substancialmente isenta de proteínas ou polipeptídeos ou outros 20 contaminantes que são encontrados em seu ambiente natural que poderiam interferir com sua pesquisa terapêutica, diagnóstica, profilática, ou outra utilização.

25 Os termos "polipeptídeo" ou "proteína" significam uma ou mais cadeias de aminoácidos, sendo que cada cadeia compreende aminoácidos ligados covalentemente por ligações de peptídeos, e sendo que referido polipeptídeo ou proteína pode compreender uma pluralidade de cadeias ligadas não-covalentemente e/ou covalentemente em conjunto por meio de ligações de peptídeos, apresentando a sequência de proteínas nativas, ou seja, proteínas produzidas por células naturalmente ocorrentes e



especificamente não-recombinantes, ou células recombinantes ou geneticamente modificadas, e compreendem moléculas apresentando a seqüência de aminoácidos da proteína nativa, ou moléculas apresentando deleções, adições, e/ou substituições de um ou mais aminoácidos da seqüência nativa. Os termos "polipeptídeo" e "proteína" abrangem especificamente anticorpos anti-IL1-R1, ou seqüências que apresentam deleções, adições, e/ou substituições de um ou mais aminoácidos de um anticorpo anti-ILR-1R1. Assim, um "polipeptídeo" ou uma "proteína" pode compreender uma cadeia de aminoácidos (denominado "um monômero") ou uma pluralidade (denominado "um multímero").

O termo "fragmento de polipeptídeo" refere-se a um polipeptídeo, que pode ser monomérico ou multimérico, que apresenta uma deleção amino-terminal, uma deleção carbóxi-terminal, e/ou uma deleção interna ou substituição de um polipeptídeo naturalmente ocorrente ou produzido recombinantemente. Em determinadas concretizações, um fragmento de polipeptídeo pode compreender uma cadeia de aminoácidos com um comprimento de pelo menos de 5 a cerca de 500 aminoácidos. Deve-se considerar que em determinadas concretizações, fragmentos têm comprimentos de pelo menos 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400, ou 450 aminoácidos. Fragmentos de polipeptídeo particularmente úteis incluem domínios funcionais, incluindo domínios de ligação. No caso de um anticorpo anti-IL1-R1, fragmentos úteis incluem, embora sem limitação: uma região de CDR, particularmente uma região de CDR3 da cadeia pesada ou leve; um domínio variável de uma cadeia pesada ou leve; uma porção de uma cadeia de anticorpo ou apenas sua região variável incluindo duas CDRs; e análogos.

O termo "fragmento de imunoglobulina imunologicamente funcional" como usado aqui refere-se a um fragmento de polipeptídeo que contém pelo menos os domínios variáveis das cadeias pesada e leve de

imunoglobulina. Um fragmento de imunoglobulina imunologicamente funcional da invenção é capaz de ligar-se a um ligando, prevenindo a ligação do ligando a seu receptor, interrompendo a resposta biológica resultante da ligação do ligando com o receptor, ou qualquer combinação dos mesmos. De preferência, um fragmento de imunoglobulina imunologicamente funcional da invenção liga-se particularmente a IL-1R1.

Os termos "naturalmente ocorrente" e "nativo" significam que os materiais biológicos (moléculas, seqüências, complexos de proteína, células, e análogos) aos quais os termos são aplicados podem ser encontrados na natureza e não são manipulados pelo Homem. Por exemplo, um polipeptídeo ou seqüência de polinucleotídeos que está presente em um organismo (incluindo vírus) que pode ser isolado de uma fonte na natureza e que não foi modificado intencionalmente pelo Homem é naturalmente ocorrente. Da mesma forma, os termos "não-naturalmente ocorrente" ou "não-nativo" referem-se a um material que não é encontrado na natureza ou que foi modificado estruturalmente ou sintetizado pelo Homem.

O termo "ligado operacionalmente" significa que os componentes aos quais o termo é aplicado encontram-se numa relação que permite aos mesmos realizarem suas funções inerentes em condições adequadas. Por exemplo, uma seqüência de controle "ligada operacionalmente" a uma seqüência que codifica proteína é ligada à mesma de tal forma que a expressão da seqüência codificante de proteína é obtida em condições compatíveis com a atividade transcricional das seqüências de controle.

O termo "seqüência de controle" significa que a seqüência de polinucleotídeo em pauta pode efetuar expressão e processamento de seqüências codificantes às quais é ligada. A natureza de referidas seqüências de controle podem depender do organismo hospedeiro. Em concretizações particulares, seqüências de controle para procariontes podem incluir um



promotor, sítio de ligação ribossômica, e sequência de terminação de transcrição. Em outras concretizações particulares, seqüências de controle para eucariontes podem incluir promotores compreendendo um ou vários sítios de reconhecimento para fatores de transcrição, seqüências acentuadoras de transcrição, e sequência de terminação de transcrição. Em determinadas concretizações, "seqüências de controle" podem incluir seqüências líder e/ou seqüências de parceiro de fusão.

O termo "polinucleotídeo" significa polímeros de ácido nucleico de filamento simples ou de filamento duplo com comprimento de pelo menos 10 bases. Em determinadas concretizações, os nucleotídeos compreendendo o polinucleotídeo podem ser ribonucleotídeos ou desoxirribonucleotídeos ou uma forma modificada de qualquer destes tipos de nucleotídeo. Referidas modificações incluem modificações de base, como derivados de bromouridina e inosina, modificações de ribose, como 2',3'-didesoxirribose, e modificações de ligação inter-nucleotídeo, como fosforotioato, fosforoditioato, fosforosselenoato, fosforodisselenoato, fosforoanilotioato, fosforaniladato e fosforoamidato. O termo inclui formas de DNA de filamento simples e duplo.

O termo "oligonucleotídeo" significa um polinucleotídeo compreendendo um comprimento de 200 bases ou menos. Em concretizações preferidas, oligonucleotídeos têm comprimentos de 10 um 60 bases. Em concretizações mais preferidas, oligonucleotídeos têm comprimentos de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou de 20 a 40 bases. Oligonucleotídeos podem ser de filamento simples ou de filamento duplo, por exemplo, para uso na construção de um gene mutante. Oligonucleotídeos da invenção podem ser oligonucleotídeos senso ou anti-senso.

O termo "nucleotídeos naturalmente ocorrentes" inclui desoxirribonucleotídeos e ribonucleotídeos. O termo "nucleotídeos modificados" inclui nucleotídeos com grupos açúcar modificados ou

substituídos ou bases modificadas ou substituídas. O termo "ligações de oligonucleotídeos" inclui ligações, como fosforotioato, fosforoditioato, fosforosselenoato, fosforodisselenoato, fosforoanilotioato, fosforoanilidato, fosforoamidato, e análogos. Ver, por exemplo, LaPlanche *et al.* (1986), Nucl. Acids Res. 14:9081; Stec *et al.* (1984), J. Am. Chem. Soc. 106:6077; Stein *et al.* (1988), Nucl. Acids Res. 16:3209; Zon *et al.* (1991), Anti-Cancer Drug Design 6:539; Zon *et al.* (1991), Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, ed.), Oxford University Press, Oxford England; Stec *et al.*, U.S. Pat. No. 5,151,510; Uhlmann e Peyman - (1990), Chemical Reviews 90:543, sendo que as respectivas divulgações são incorporadas aqui por referência para qualquer fim. Um oligonucleotídeo da invenção pode incluir um marcador, incluindo um rádio-marcador, um marcador fluorescente, um hapteno ou um marcador antigênico, para ensaios de detecção.

O termo "vetor" significa qualquer molécula (por exemplo, ácido nucleico, plasmídeo, ou vírus) usada para transferir informação codificante para uma célula hospedeira.

O termo "vetor de expressão" ou "vetor de expressão" refere-se a um vetor que é adequado para transformação de uma célula hospedeira e que contém seqüências de ácido nucleico que dirigem e/ou controlam (em conjunto com a célula hospedeira) a expressão de uma ou mais regiões codificantes heterólogas ligadas operacionalmente a isto. Uma construção de expressão pode incluir, embora sem limitação, seqüências que afetam ou controlam transcrição, tradução, e recomposição de RNA, caso estejam presentes íntrons, de uma região codificante ligada operacionalmente a isto.

O termo "célula hospedeira" significa uma célula que foi transformada, ou que pode de ser transformada, com uma seqüência de ácido nucleico e, com isso, expressa um gene de interesse selecionado. O termo inclui a progênie da célula parental, quer a progênie seja idêntica, no que se

refere à morfologia ou à constituição genética, à célula parental original, desde que o gene selecionado esteja presente.

O termo "transdução" significa a transferência de genes de uma bactéria para outra, usualmente por fago. "Transdução" refere-se também à aquisição e transferência de seqüências celulares eucarióticas por retrovírus.

O termo "transfecção" significa a captação de DNA estranho ou exógeno por uma célula, e diz-se que uma célula foi "transfectada" quando o DNA exógeno foi introduzido no interior da membrana da célula. Diversas técnicas de transfecção são bem conhecidas na técnica e são divulgadas aqui. Ver, por exemplo, Graham *et al.*, 1973, *Virology* 52:456; Sambrook *et al.*, 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Id.; Davis *et al.*, 1986, *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier; e Chu *et al.*, 1981, *Gene* 13:197. É possível utilizar técnicas do tipo referido para introduzir uma ou mais porções de DNA exógenas em células hospedeiras adequadas.

O termo "transformação" refere-se a uma alteração das características genéticas da célula, e [diz-se que] uma célula foi transformada quando foi modificada de forma a conter DNA novo. Por exemplo, [diz-se que] uma célula é transformada quando é modificada geneticamente de seu estado nativo por meio de transfecção, transdução, ou outras técnicas. Após transfecção ou transdução, o DNA de transformação pode recombinar com aquele da célula por meio de integração física em um cromossoma da célula, ou pode ser mantido transientemente como um elemento epissômico sem ser replicado, ou pode replicar-se independentemente como um plasmídeo. Considera-se que uma célula foi "transformada de forma estável" quando o DNA de transformação é replicado com a divisão da célula.

O termo "antígeno" refere-se a uma molécula ou a uma porção de uma molécula capaz de ligar-se por meio de um agente de ligação seletiva, como um anticorpo, e que também pode ser usada em um animal para produzir anticorpos capazes de ligarem-se a um epitopo daquele antígeno. Um

antígeno pode apresentar um ou mais epitopos.

O termo "epitopo" inclui qualquer determinante, preferivelmente um determinante de polipeptídeo, capaz de ligação específica com uma imunoglobulina ou receptor de célula T. Em determinadas concretizações, determinantes de epitopos incluem grupamentos de moléculas com superfície quimicamente ativa, como aminoácidos, cadeias laterais de açúcar, fosforila, ou sulfonila, e, em determinadas concretizações, podem apresentar características estruturais tridimensionais específicas, e/ou características de carga específicas. Um epitopo é uma região de um antígeno que é ligada por um anticorpo. Em determinadas concretizações, diz-se que um anticorpo liga-se especificamente a um antígeno quando o mesmo reconhece, de forma preferível, seu antígeno-alvo em uma mistura complexa de proteínas e/ou macromoléculas. Em concretizações preferidas, diz-se que um anticorpo liga-se especificamente a um antígeno quando a constante de dissociação é inferior ou igual a cerca de 10 nM, mais preferivelmente quando a constante de dissociação é inferior ou igual a cerca de 100 pM, e, da forma mais preferível, quando a constante de dissociação é inferior ou igual a cerca de 10 PM.

O termo "identidade" refere-se a uma relação entre as seqüências de duas ou mais moléculas de polipeptídeo ou duas ou mais moléculas de ácido nucleico, conforme determinado comparando-se as seqüências dos mesmos. Na técnica, "identidade" também significa o grau de parentesco de seqüências entre polipeptídeos ou moléculas de ácido nucleico, conforme o caso, conforme determinado pela equiparação entre seqüências de dois ou mais nucleotídeos ou dois ou mais aminoácidos. "Identidade" mede o percentual de equiparações idênticas entre as menores de duas ou mais seqüências com alinhamentos de *gap* (se houver) tratado com um modelo matemático programa de computador particular (isto é, "algoritmos").

O termo "similaridade" é usado na técnica com relação a um

conceito relacionado; no entanto, em contraste com "identidade", "similaridade" refere-se a uma medida de parentesco que inclui equiparações idênticas e também equiparações conservativas. Se duas seqüências de polipeptídeos apresentarem, por exemplo, 10/20 aminoácidos idênticos, e o restante constituir-se de substituições não-conservativas, então os percentuais de identidade e de similaridade seriam, ambos, de 50 %. Se, no mesmo exemplo, houver cinco posições adicionais onde há substituições conservativas, então o percentual de identidade permanece em 50 %, porém o percentual de similaridade seria de 75 % (15/20). Portanto, em casos em que há substituições conservativas, o percentual de similaridade entre dois polipeptídeos será maior do que o percentual de identidade entre aqueles dois polipeptídeos.

Identidade e similaridade de polipeptídeos e ácidos nucleicos relacionados podem ser facilmente calculados por meio de métodos conhecidos. Referidos métodos incluem, embora sem limitação, aqueles descritos em Computational Molecular Biology, (Lesk, A.M., ed.), 1988, Oxford University Press, New York; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, (Smith, D.W., ed.), 1993, Academic Press, New York; Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, (Griffin, A.M., e Griffin, H.G., eds.), 1994, Humana Press, New Jersey; von Heinje, G., Sequence Analysis in Molecular Biology, 1987, Academic Press; Sequence Analysis Iniciador, (Gribskov, M. e Devereux, J., eds.), 1991, M. Stockton Press, New York; Carillo *et al.*, 1988, SIAM J. Applied Math. 48:1073; e Durbin *et al.*, 1998, Biological Sequence Analysis, Cambridge University Press.

Métodos preferidos para determinar identidade são projetados para proporcionar a maior equiparação entre as seqüências testadas. Métodos para determinar identidade encontram-se descritos em programas de computador publicamente disponíveis. Métodos preferidos de programa de computador para determinar identidade entre duas seqüências incluem,

embora sem limitação, o pacote de programas GCG, que inclui GAP (Devereux *et al.*, 1984, Nucl. Acid. Res. 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), BLASTP, BLASTN, e FASTA (Altschul *et al.*, 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410). O programa BLASTX é publicamente obténível junto ao National Center for Biotechnology Information (NCBI) e outras fontes (BLAST Manual, Altschul *et al.* NCB/NIL/NM Bethesda, MD 20894; Altschul *et al.*, 1990, *supra*). O bem conhecido algoritmo de Smith Waterman também pode ser usado para determinar identidade.

Determinados esquemas de alinhamento para alinhar duas seqüências de aminoácidos podem resultar em equiparação de apenas uma pequena região das duas seqüências, e esta pequena região alinhada pode apresentar identidade de seqüência muito acentuada embora não haja relação significativa entre as duas seqüências de comprimento pleno. Assim, em determinadas concretizações, o método de alinhamento selecionado (programa GAP) resultará em um alinhamento que abrange pelo menos 50 aminoácidos contíguos do polipeptídeo-alvo.

Por exemplo, utilizando o algoritmo de computador GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), dois polipeptídeos para os quais se pretende determinar o percentual de identidade de seqüências são alinhados para a equiparação ótima de seus aminoácidos respectivos (a "abrangência equiparada", conforme determinada pelo algoritmo). Em determinadas concretizações, uma penalidade de abertura de *gap* (que é calculada como três vezes a diagonal média; sendo que a "diagonal média" é a média da diagonal da matriz de comparação que está sendo utilizada; a "diagonal" é a classificação ou o número designado para cada equiparação perfeita de aminoácidos por meio de uma matriz de comparação particular) e a penalidade de extensão de *gap* (que usualmente é de um décimo da penalidade de abertura de *gap*), e também uma matriz de

comparação, como PAM250 ou BLOSUM 62, são usadas em conjunto com o algoritmo. Em determinadas concretizações, uma matriz de comparação convencional (ver Dayhoff *et al.*, 1978, Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352 para a matriz de comparação de PAM 250; Henikoff *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci USA 89:10915-10919 para a matriz de comparação de BLOSUM 62) também é usada pelo algoritmo.

Em determinadas concretizações, os parâmetros para a comparação de seqüências de polipeptídeos incluem os seguintes:

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

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

Penalidade de *Gap*: 12

Penalidade de Comprimento de *Gap*: 4

Patamar de similaridade: 0

O programa GAP pode ser útil com os parâmetros acima. Em determinadas concretizações, os parâmetros previamente indicados são os parâmetros padrão para comparações de polipeptídeos (juntamente com sem penalidade para *gaps* de extremidade) utilizando-se o algoritmo GAP.

O termo "naturalmente ocorrente" como usado para referir-se a aminoácidos refere-se a vinte aminoácidos convencionais. Ver Immunology--A Synthesis, 2ª edição, (E. S. Golub e D. R. Gren, eds.), Sinauer Associates: Sunderland, MA (1991), incorporado aqui por referência para qualquer fim.

Análogos de peptídeos são comumente utilizados na indústria farmacêutica como drogas não-peptídicas com propriedades análogas àquelas do peptídeo padrão. Estes tipos de compostos não-peptídicos são denominados "miméticos de peptídeos" ou "peptidomiméticos". Ver Fauchere (1986), Adv. Drug Res. 15:29; Veber & Freidinger, 1985, TINS p.392; e Evans *et al.* (1987), J. Med. Chem. 30:1229, que são incorporados aqui por referência para qualquer fim. Referidos compostos são freqüentemente

desenvolvidos com o auxílio de modelagem molecular computadorizada. Miméticos peptídicos que são estruturalmente semelhantes a peptídeos terapeuticamente úteis podem ser utilizados para produzir um efeito profilático ou terapêutico semelhante. Geralmente, peptidomiméticos são estruturalmente semelhantes a um polipeptídeo ou peptídeo de paradigma (isto é, um peptídeo ou polipeptídeo que apresenta uma propriedade bioquímica ou atividade farmacológica), como anticorpo humano, porém apresentam uma ou mais ligações peptídicas substituídas opcionalmente por uma ligação selecionada de: $-\text{CH}_2\text{-NH-}$, $-\text{CH}_2\text{-S-}$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $-\text{CH=CH-}$ (cis e trans), $-\text{COCH}_2\text{-}$, $-\text{CH(OH)CH}_2\text{-}$, e $-\text{CH}_2\text{SO-}$, por meio de métodos bem conhecidos na técnica. Substituição sistemática de um ou mais aminoácidos de uma seqüência de *consensus* com um D-aminoácido do mesmo tipo (por exemplo, D-lisina em lugar de L-lisina) pode ser utilizada em determinadas concretizações para gerar peptídeos mais estáveis. Adicionalmente, peptídeos restritos compreendendo uma seqüência *consensus* ou uma variação de seqüência *consensus* substancialmente idêntica podem ser gerados por meio de métodos conhecidos na técnica (Rizo & Gierasch, 1992, Ann. Rev. Biochem. 61:387, incorporado aqui por referência para qualquer fim); por exemplo, por meio da adição de radicais cisteína internos capazes de formar pontes dissulfeto intramoleculares que ciclizam o peptídeo.

"Anticorpo" ou "peptídeo(s) de anticorpo" refere-se a um anticorpo intacto, ou um fragmento de ligação do mesmo que compete com o anticorpo intacto pela ligação específica e inclui anticorpos quiméricos, humanizados, totalmente humanos, e bi-específicos. Em determinadas concretizações, produz-se fragmentos de ligação por meio de técnicas de DNA recombinante. Em concretizações adicionais, produz-se fragmentos de ligação por meio de clivagem enzimática ou química de anticorpos intactos. Fragmentos de ligação incluem, embora sem limitação, anticorpos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, e de cadeia simples.

O termo "cadeia pesada" inclui uma cadeia pesada de comprimento pleno e fragmentos da mesma apresentando suficiente seqüência de região variável para conferir especificidade para IL-1R1. Uma cadeia pesada de comprimento pleno inclui um domínio de região variável, V_H , e três domínios de região constante, C_{H1} , C_{H2} , e C_{H3} . O domínio de V_H encontra-se na ponta amino do polipeptídeo, e o domínio de C_{H3} encontra-se na ponta carboxila.

O termo "cadeia leve" inclui uma cadeia leve de comprimento pleno e fragmentos da mesma apresentando suficiente seqüência de região variável para conferir especificidade para IL-1R1. Uma cadeia leve de comprimento pleno inclui um domínio de região variável, V_L , e um domínio de região constante, C_L . Como a cadeia pesada, o domínio de região variável da cadeia leve encontra-se na ponta amino do polipeptídeo.

Um "fragmento Fab" constitui-se de uma cadeia leve e o C_{H1} e regiões variáveis de uma cadeia pesada. A cadeia pesada de uma molécula Fab não pode formar uma ligação dissulfeto com outra molécula de cadeia pesada.

Um "fragmento 'Fab'" contém uma cadeia leve e uma cadeia pesada que contém mais da região constante, entre os domínios C_{H1} e C_{H2} , de tal forma que é possível formar uma ligação dissulfeto inter-cadeia entre duas cadeias pesadas para formar uma molécula $F(ab')_2$.

Um "fragmento $F(ab')_2$ " contém duas cadeias leves e duas cadeias pesadas contendo uma porção da região constante entre os domínios C_{H1} e C_{H2} , de modo que forma-se uma ligação dissulfeto inter-cadeia entre duas cadeia pesadas.

A "região F_v " compreende as regiões variáveis das cadeias pesada e leve, porém não apresenta as regiões constantes.

"Anticorpos de cadeia simples" são moléculas F_v em que as regiões variáveis de cadeia pesada e leve foram conectadas por um ligando

flexível para formar uma cadeia de polipeptídeo simples, que forma uma região de ligação de antígeno. Anticorpos de cadeia simples são discutidos em detalhe na Publicação de Pedido de Patente Internacional nº WO 88/01649 e patentes dos E.U.A. num. 4,946,778 e 5,260,203, cujas divulgações são incorporadas por referência para qualquer fim.

Compreende-se que um "anticorpo divalente", diferentemente de um anticorpo "multiespecífico" ou "multifuncional", em determinadas concretizações abrange sítios de ligação apresentando especificidade antigênica idêntica.

Um anticorpo "biespecífico" ou "bifuncional" é um anticorpo híbrido apresentando dois pares diferentes de cadeia pesada/leve e dois sítios de ligação diferentes. Anticorpos biespecíficos podem ser produzidos por meio de diversos métodos incluindo, embora sem limitação, fusão de hibridomas ou ligação de fragmentos Fab'. Ver, por exemplo, Songvilai & Lachmann (1990), Clin. Exp. Immunol. 79:315-321; Kostelny *et al.* (1992), J. Immunol. 148:1547-1553.

Na avaliação da ligação e especificidade de anticorpo de acordo com a invenção, diz-se que um anticorpo "inibe substancialmente" a adesão de um ligando a um receptor quando um excesso de anticorpo reduz a quantidade de receptor ligada ao contra-receptor em pelo menos cerca de 20%, 40%, 60%, 80%, 85%, ou mais (conforme medido em um ensaio de ligação competitiva *in vitro*).

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

Os termos "marcador" ou "marcado" referem-se à incorporação de um marcador detectável, por exemplo, por meio de incorporação de um aminoácido rádio-marcado ou de ligação, a um polipeptídeo, de porções de biotina que podem ser detectadas por avidina

marcada (por exemplo, estreptavidina compreendendo, de preferência, um marcador detectável, como um marcador fluorescente, um marcador quimioluminescente ou uma atividade enzimática que pode ser detectada por meio de métodos ópticos ou colorimétricos). Em determinadas concretizações, o marcador também pode ser terapêutico. Diversos métodos de marcar polipeptídeos e glicoproteínas são conhecidos na técnica e podem ser usados vantajosamente nos métodos aqui divulgados. Exemplos de marcadores para polipeptídeos incluem, embora sem limitação, os seguintes: radioisótopos ou radionuclídeos (por exemplo, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), marcadores fluorescentes (por exemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina, ou fósforos de lantanídeo), marcadores enzimáticos (por exemplo, peroxidase de rabanete, (3-galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina), marcadores quimioluminescentes, marcadores de hapteno, como grupos biotinila, e epitopos de polipeptídeo predeterminados reconhecidos por um repórter secundário (por exemplo, seqüências de par em zíper de leucina, sítios de ligação para anticorpos secundários, domínios de ligação de metal, marcadores de epitopo). Em determinadas concretizações, marcadores são ligados por braços espaçadores (como $(\text{CH}_2)_n$, em que $n < \text{cerca de } 20$) com comprimentos diversos para reduzir potencial obstrução estérica.

O termo "amostra biológica" inclui, embora sem limitação, qualquer quantidade de uma substância de um ser vivo ou de um ser que já viveu. Referidos seres vivos incluem, embora sem limitação, humanos, camundongos, macacos, ratos, coelhos, e outros animais. Referidas substâncias incluem, embora sem limitação, sangue, soro, urina, células, órgãos, tecidos, osso, medula óssea, linfa, nódulos linfáticos, tecido sinovial, condrócitos, macrófagos sinoviais, células endoteliais, tecido vascular (particularmente tecido vascular inflamado), e pele. Os termos "agente farmacêutico" e "droga" referem-se a um composto ou composição química

capaz de induzir um efeito terapêutico desejado quando administrado apropriadamente a um paciente.

O termo "paciente" inclui sujeitos humanos e animais.

A não ser que exigido de outra forma pelo contexto, termos singulares devem incluir pluralidades e termos plurais devem incluir o singular.

Aminoácidos

Os vinte aminoácidos naturalmente ocorrentes e suas abreviaturas seguem a utilização convencional. Ver Immunology--A Synthesis, 2ª edição, (E. S. Golub e D. R. Gren, eds.), Sinauer Associates: Sunderland, MA (1991), incorporado aqui por referência para qualquer fim. Estereoisômeros (por exemplo, D-aminoácidos) dos vinte aminoácidos convencionais, aminoácidos não-naturais, como aminoácidos α -, α -dissubstituídos, aminoácidos de N-alquila, e outros aminoácidos não-convencionais também podem ser componentes vantajosos para polipeptídeos da invenção. Exemplos de aminoácidos não-convencionais incluem: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetil-lisina, ϵ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metil-histidina, 5-hidróxi-lisina, σ -N-metilarginina, e outros aminoácidos e iminoácidos similares (por exemplo, 4-hidroxiprolina). Na indicação de polipeptídeo aqui utilizada, a direção no sentido à esquerda é a direção amino-terminal, e a direção à direita é a direção carbóxi-terminal, de acordo com a convenção e o uso convencionais.

De forma semelhante, a não ser que especificado de outra forma, a ponta esquerda de seqüências de polinucleotídeos de filamento simples é a ponta 5'; a direção à esquerda de seqüências de polinucleotídeos de filamento duplo é referida como a direção a 5'. A direção de adição de 5' a 3' de transcrições de RNA nascente é referida como a direção de transcrição; regiões de seqüência no filamento de DNA apresentando a mesma seqüência



que a transcrição de RNA que se encontram a 5' relativamente à ponta 5' da transcrição de RNA são referidas como "seqüências a montante"; regiões de seqüência no filamento de DNA apresentando a mesma seqüência que a transcrição de RNA que se encontram a 3' relativamente à ponta 3' da transcrição de RNA são referidas como "seqüências a jusante".

Radicais de aminoácidos naturalmente ocorrentes podem ser divididos em classes com base em propriedades de cadeias simples comuns:

1) hidrofóbicos: norleucina (Nor ou Nle), Met, Ala, Val, Leu, Ile;

2) hidrofílicos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

3) ácidos: Asp, Glu;

4) básicos: His, Lys, Arg;

5) radicais que influenciam a orientação da cadeia: Gly, Pro; e

6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Substituições conservativas de aminoácidos podem envolver troca de um membro de uma destas classes por outro membro da mesma classe. Substituições conservativas de aminoácidos podem abranger radicais de aminoácidos não-naturalmente ocorrentes, que são incorporadas tipicamente por meio de síntese química, ao invés de por meio de síntese em sistemas biológicos. Estes incluem peptidomiméticos e outras formas revertidas ou invertidas de porções de aminoácidos.

Substituições não-conservativas podem envolver a troca de um membro de uma destas classes por um membro de outra classe. Referidos radicais substituídos podem ser introduzidos, por exemplo, em regiões de um anticorpo humano que são homólogas com anticorpos não-humanos, ou nas regiões não-homólogas da molécula.

Na preparação dessas alterações, de acordo com determinadas concretizações, pode-se considerar o índice hidropático de aminoácidos. Cada aminoácido recebeu um índice hidropático com base em suas características

de hidrofobicidade e de carga. São eles: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptofano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); e arginina (-4,5).

A importância do índice de aminoácido hidropático na determinação da função biológica interativa em uma proteína é compreendido na técnica (ver, por exemplo, Kyte *et al.*, 1982, J. Mol. Biol. 157:105-131). É sabido que determinados aminoácidos podem ser substituídos por outros aminoácidos apresentando uma classificação ou índice hidropático similar e ainda conservam uma atividade biológica semelhante. Na preparação de alterações baseadas no índice hidropático, em determinadas concretizações, inclui-se a substituição de aminoácidos cujos índices hidropáticos se situam em ± 2 . Em determinadas concretizações, inclui-se aqueles que se situam em ± 1 , e em determinadas concretizações, inclui-se aqueles que se situam em $\pm 0,5$.

Compreende-se também na técnica que a substituição de aminoácidos similares pode ser realizada efetivamente com base na hidrofiliabilidade, particularmente onde o peptídeo ou proteína biologicamente funcional criada desta forma destina-se ao uso em concretizações imunológicas, como divulgado aqui. Em determinadas concretizações, a maior hidrofiliabilidade média local de uma proteína, conforme determinado pela hidrofiliabilidade de seus aminoácidos adjacentes, correlaciona-se com sua imunogenicidade e antigenicidade, isto é, com uma propriedade biológica da proteína.

Os valores de hidrofiliabilidade a seguir foram atribuídos a estes radicais de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 ± 1); glutamato (+3,0 ± 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 ± 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5);

cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5) e triptofano (-3,4). Na realização de alterações baseadas em valores similares de hidrofiliçidade, em determinadas concretizações, inclui-se a substituição de aminoácidos cujos valores de hidrofiliçidade encontram-se em ± 2 , em determinadas concretizações, inclui-se aqueles que se encontram em ± 1 , e em determinadas concretizações, inclui-se aqueles em $\pm 0,5$. Também é possível identificar epitopos de seqüências de aminoácidos primários com base na hidrofiliçidade. Estas regiões também são referidas como "regiões de núcleo epitópicas".

Substituições de aminoácidos exemplares são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1
Substituições de aminoácidos

Radicais originais	Substituições exemplares	Substituições preferidas
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, ácido 1,4 diamino-butírico, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina	Leu

Uma pessoa versada na técnica será capaz de determinar variantes vantajosas de polipeptídeos como apresentadas aqui utilizando-se técnicas bem conhecidas. Em determinadas concretizações, alguém com



prática na técnica poderá identificar áreas vantajosas da molécula que podem ser alteradas sem destruir a atividade por meio de regiões de objetivação que se acredita não serem importantes para a atividade. Em outras concretizações, a pessoa versada na técnica poderá identificar radicais e porções das moléculas que são conservadas entre polipeptídeos semelhantes. Em concretizações adicionais, mesmo áreas que podem ser importantes para atividade biológica ou para estrutura podem ser sujeitas a substituições conservativas de aminoácidos sem destruir a atividade biológica ou sem afetar adversamente a estrutura do polipeptídeo.

10 Adicionalmente, alguém versado na técnica pode rever estudos de estrutura-função identificando radicais em polipeptídeos semelhantes que são importantes para atividade ou estrutura. Considerando uma comparação do tipo referido, a pessoa versada na técnica pode prever a importância de radicais de aminoácidos em uma proteína e que correspondem a radicais de aminoácidos importantes para atividade ou estrutura em proteínas similares.

15 Alguém versado na técnica pode optar por substituições de aminoácidos quimicamente semelhantes para referidos radicais de aminoácidos importantes preditos.

20 Alguém versado na técnica também pode analisar a estrutura tridimensional e sequência de aminoácidos com relação à estrutura em polipeptídeos semelhantes. Considerando referida informação, alguém versado na técnica pode prever o alinhamento de radicais de aminoácidos de um anticorpo com relação a sua estrutura tridimensional. Em determinadas concretizações, alguém versado na técnica pode optar por não realizar

25 alterações radicais em radicais de aminoácidos preditos sobre a superfície da proteína, porque referidos radicais podem estar envolvidos em interações importantes com outras moléculas. Além disso, alguém versado na técnica pode gerar variantes de teste contendo uma substituição de aminoácidos simples em cada radical de aminoácido desejado. Em seguida, as variantes

podem ser selecionadas utilizando-se ensaios de atividade conhecidos por aqueles versados na técnica. Referidas variantes poderiam ser usadas para recolher informação acerca de variantes vantajosas. Por exemplo, caso se verificasse que uma alteração para um radical de aminoácido particular resulta em atividade destruída, indesejavelmente reduzida, ou inadequada, seria possível evitar variantes com uma alteração do tipo referido. Em outras palavras, com base em informação coletada de experimentos de rotina do tipo referido, alguém versado na técnica pode determinar facilmente os aminoácidos onde fosse possível evitar substituições, quer sozinhas ou em combinação com outras mutações.

Diversas publicações científicas foram dedicadas à predição de estrutura secundária. Ver Moulton, 1996, *Curr. Op. in Biotech.* 7:422-427; Chou *et al.*, 1974, *Biochemistry* 13:222-245; Chou *et al.*, 1974, *Biochemistry* 113:211-222; Chou *et al.*, 1978, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47:45-148; Chou *et al.*, 1979, *Ann. Rev. Biochem.* 47:251-276; e Chou *et al.*, 1979, *Biophys. J.* 26:367-384. Além disso, presentemente estão disponíveis programas de computador para assistir a predição de estrutura secundária. Um método de predizer estrutura secundária baseia-se em modelagem de homologia. Por exemplo, dois polipeptídeos ou proteínas que apresentam uma identidade de seqüências superior a 30 %, ou similaridade superior a 40 % freqüentemente apresentam topologias estruturais similares. A recente ampliação de bancos de dados de estruturas de proteínas (PDB) proporciona maior predizibilidade de estrutura secundária, incluindo o número potencial de dobras na estrutura de um polipeptídeo ou proteína. Ver Holm *et al.*, 1999, *Nucl. Acid. Res.* 27:244-247. Sugeriu-se (Brenner *et al.*, 1997, *Curr. Op. Struct. Biol.* 7:369-376) que há um número limitado de dobras em um dado polipeptídeo ou proteína e que, uma vez que se tenha diferenciado uma quantidade de estruturas, a predição estrutural tornou-se drasticamente mais precisa.

Métodos adicionais de predizer estrutura secundária incluem "costura" (Jones, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:377-87; Sippl *et al.*, 1996, *Structure* 4:15-19), "análise de perfil" (Bowie *et al.*, 1991, *Science* 253:164-170; Gribskov *et al.*, 1990, *Meth. Enzym.* 183:146-159; Gribskov *et al.*, 1987, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 84:4355-4358), e "ligação evolucionária" (ver Holm, 1999, *supra*; e Brenner, 1997, *supra*).

Em determinadas concretizações, variantes de anticorpo incluem variantes de glicosilação em que o número e/ou o tipo de sítio de glicosilação foi alterado em comparação com as seqüências de aminoácidos do polipeptídeo parental. Em determinadas concretizações, variantes de proteína compreendem um maior ou menor número de sítios de glicosilação ligados a N do que a proteína nativa. Um sítio de glicosilação ligado a N é caracterizado pela seqüência: Asn-X-Ser ou Asn-X-Thr, sendo que o radical de aminoácido denominado X pode ser qualquer radical de aminoácido exceto prolina. A substituição de radicais de aminoácidos para criar esta seqüência proporciona um sítio novo potencial para a adição de uma cadeia de carboidrato ligada com N. Alternativamente, substituições que eliminam esta seqüência removerão uma cadeia de carboidrato ligada com N existente. Proporciona-se também uma redistribuição das cadeias de carboidrato ligadas com N em que um ou mais sítios de glicosilação ligados com N (tipicamente aqueles que são naturalmente ocorrentes) são eliminados e um ou mais novos sítios ligados com N são criados. Variantes de anticorpos adicionais preferidas incluem variantes de cisteína em que um ou mais radicais cisteína são deletados, ou substituídos por outro aminoácido (por exemplo, serina) em comparação com a seqüência de aminoácido parental. Variantes de cisteína podem ser úteis quando é necessário redobrar anticorpos a uma conformação biologicamente ativa, como após o isolamento de corpos de inclusão insolúveis. Variantes de cisteína apresentam geralmente menos radicais cisteína do que proteína nativa, e, tipicamente, apresentam um

número par de forma a minimizar interações resultantes de cisteínas não-pareadas.

De acordo com determinadas concretizações, substituições de aminoácidos são aquelas que: (1) reduzem suscetibilidade à proteólise, (2) reduzem suscetibilidade à oxidação, (3) alteram a afinidade de ligação para formar complexos de proteína, (4) alteram afinidades de ligação, e/ou (5) conferem ou modificam propriedades físicoquímicas ou funcionais nos referidos polipeptídeos. De acordo com determinadas concretizações, é possível preparar substituições de aminoácidos simples ou múltiplas (em determinadas concretizações, substituições conservativas de aminoácidos) na seqüência naturalmente ocorrente (em determinadas concretizações, na porção do polipeptídeo fora do(s) domínio/domínios que forma(m) contatos intermoleculares). Em concretizações preferidas, uma substituição conservativa de aminoácidos não altera tipicamente de forma substancial as características estruturais da seqüência parental (por exemplo, uma substituição de aminoácidos não deveria tender a quebrar uma hélice que ocorre na seqüência parental, ou romper outros tipos de estrutura secundária que caracterizam a seqüência parental). Exemplos de estruturas secundárias e terciárias de polipeptídeos reconhecidas na técnica encontram-se descritas em Proteins, Structures and Molecular Principles, (Creighton, ed.), 1984, W. H. Freeman e Company, New York; Introduction to Protein Structure (C. Branden e J. Tooze, eds.), 1991, Garland Publishing, New York, N.Y.; e Thornton *et al.* (1991), Nature 354:105, sendo cada uma destas é incorporada aqui integralmente por referência.

Preparação de Anticorpos

Tipicamente, unidades estruturais de anticorpos naturalmente ocorrentes compreendem um tetrâmero. Cada tetrâmero do tipo referido constitui-se tipicamente de dois pares idênticos de cadeias de polipeptídeos, sendo que cada par apresenta uma cadeia "leve" de comprimento pleno

(apresentando tipicamente um peso molecular de cerca de 25 kDa) e uma cadeia "pesada" de comprimento pleno (apresentando tipicamente um peso molecular de cerca de 50-70 kDa). A porção amino-terminal de cada cadeia inclui tipicamente uma região variável com cerca de 100 to 110 ou mais aminoácidos que, tipicamente, é responsável pelo reconhecimento de antígenos. A porção carbóxi-terminal de cada cadeia define tipicamente uma região constante responsável pela função efetora. Cadeias leves humanas são classificadas tipicamente como cadeias leve kappa e lambda. Cadeias pesadas são classificadas tipicamente como mu, delta, gama, alfa, ou épsilon, e definem o isótipo do anticorpo como IgM, IgD, IgG, IgA, e IgE, respectivamente. IgG possui várias subclasses, incluindo, embora sem limitação, IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, IgM possui subclasses incluindo, incluindo, embora sem limitação, IgM1 e IgM2. IgA também é dividida de maneira semelhante em subclasses incluindo, embora sem limitação, IgA1 e IgA2. Nas cadeias leve e pesada de comprimento pleno, tipicamente, uma região "J" de cerca de 12 ou mais aminoácidos junta-se à região variável e regiões constantes, sendo que a cadeia pesada também inclui uma região "D" com cerca de 10 aminoácidos adicionais. Ver, por exemplo, Fundamental Immunology, capítulo 7, 2ª ed., (Paul, W., ed.), 1989, Raven Press, N.Y. (incorporada aqui integralmente por referência para todos os fins). A combinação das regiões variáveis de cada par de cadeia leve/cadeia pesada forma tipicamente o sítio de ligação de antígeno.

As regiões variáveis de cada uma das cadeias pesadas e cadeias leves apresenta tipicamente a mesma estrutura geral compreendendo quatro regiões de estrutura relativamente conservadas (FR) por três regiões hiper-variáveis, também denominadas regiões determinadoras de complementaridade ou CDRs. As CDRs das duas cadeias de cada par são tipicamente alinhadas pelas regiões de estrutura, cujo alinhamento pode permitir ligação com um epítipo específico. Da ponta N até a ponta C, as

regiões variáveis de cadeia pesada e de cadeia leve compreendem tipicamente os domínios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4. A designação de aminoácidos para cada domínio encontra-se tipicamente de acordo com as definições de Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (1987 e 1991, National Institutes of Health, Bethesda, Md.), Chothia & Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917, ou Chothia *et al.*, 1989, Nature 342:878-883).

Anticorpos tornaram-se úteis e interessantes como agentes farmacêuticos com o desenvolvimento de anticorpos monoclonais. Anticorpos monoclonais são produzidos utilizando-se qualquer método que produz moléculas de anticorpos por meio de linhas de células contínuas em cultura. Exemplos de métodos vantajosos para preparar anticorpos monoclonais incluem os métodos do hibridoma de Kohler *et al.* (1975, Nature 256:495-497) e o método do hibridoma de células B humanas (Kozbor, 1984, J. Immunol. 133:3001; e Brodeur *et al.*, 1987, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, (Marcel Dekker, Inc., New York), pp. 51-63).

Anticorpos monoclonais podem ser modificados para uso como terapêuticos. Um exemplo é um anticorpo "quimérico" em que uma porção da cadeia pesada e/ou cadeia leve é idêntica ou homóloga a uma sequência correspondente em anticorpos derivados de uma espécie particular ou pertencente a uma classe ou subclasse de anticorpo particular, enquanto que o restante da cadeia(s) é idêntico ou homólogo a uma sequência correspondente em anticorpos derivados de outra espécie ou pertencente a outra classe ou subclasse de anticorpos. Outros exemplos são fragmentos de referidos anticorpos, desde que apresentem a atividade biológica desejada. Ver, Patente U.S. 4,816,567; e Morrison *et al.* (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855. Um desenvolvimento relacionado é o anticorpo "enxertado com CDR", sendo que o anticorpo compreende uma ou mais regiões determinadoras de complementaridade (CDRs) de uma espécie particular ou pertencente a uma classe ou subclasse particular de anticorpo,



enquanto que o restante da cadeia(s) de anticorpo é idêntico ou homólogo a uma sequência correspondente em anticorpos derivados de outra espécie ou pertencente a outra classe ou subclasse de anticorpo.

Outro desenvolvimento é o anticorpo "humanizado". Métodos de humanizar anticorpos não-humanos são bem conhecidos na técnica. (Ver patentes dos E.U.A. num. 5,585,089, e 5,693,762). Geralmente, um anticorpo humanizado é produzido por um animal não-humano, e, então, determinados radicais de aminoácidos, tipicamente de porções do anticorpo não-reconhecidas de antígeno, são modificadas de forma a se tornarem homólogas aos referidos radicais em um anticorpo humano de isótipo correspondente. A humanização pode ser realizada, por exemplo, utilizando-se métodos descritos na técnica (Jones *et al.*, 1986, Nature 321:522-525; Riechmann *et al.*, 1988, Nature 332:323-327; Verhoeyen *et al.*, 1988, Science 239:1534-1536), mediante substituição de pelo menos uma porção de uma região variável de roedor para as regiões correspondentes de um anticorpo humano.

É mais recente, e afigura-se mais promissor, o desenvolvimento de anticorpos humanos sem exposição do antígeno a seres humanos ("anticorpos totalmente humanos"). Utilizando-se animais transgênicos (por exemplo, camundongos) que são capazes de produzir um repertório de anticorpos humanos na ausência de produção endógena de imunoglobulina de camundongo, referidos anticorpos são produzidos por meio de imunização com um antígeno (apresentando tipicamente pelo menos 6 aminoácidos contíguos), opcionalmente conjugado a um veículo. Ver, por exemplo, Jakobovits *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551-2555; Jakobovits *et al.*, 1993, Nature 362:255-258; e Bruggermann *et al.*, 1993, Year in Immunol. 7:33. Em um exemplo destes métodos, animais transgênicos são produzidos incapacitando-se os *loci* de imunoglobulina de camundongo endógena codificando ali as cadeias de imunoglobulina pesada e



leve de mouse, e inserindo no seu genoma *loci* codificando proteínas de cadeia pesada e de cadeia leve humanas. Animais parcialmente modificados, que apresentam menos do que o complemento total de modificações, são então inter-cruzados para se obter um animal apresentando todas as modificações desejadas no sistema imunológico. Quando recebem administração de um imunógeno, estes animais transgênicos produzem anticorpos que são imuno-específicos para estes antígenos apresentando seqüências de aminoácidos humanas (ao invés de murinas), incluindo regiões variáveis. Ver publicações PCT nums. WO96/33735 e WO94/02602, incorporadas por referência. Métodos adicionais encontram-se descritos na Patente U.S. 5,545,807, publicações PCT nums. WO91/10741, WO90/04036, e na EP 546073B1 e EP 546073A1, incorporados por referência. Também é possível produzir anticorpos humanos por meio de expressão de DNA recombinante em células hospedeiras ou por meio de expressão em células de hibridoma como descrito aqui.

Anticorpos totalmente humanos também podem ser produzidos a partir de bibliotecas de apresentação de fago (como divulgado em Hoogenboom *et al.*, 1991, J. Mol. Biol. 227:381; e Marks *et al.*, 1991, J. Mol. Biol. 222:581). Estes processos emulam a seleção imunológica por meio da apresentação de repertórios de anticorpos sobre a superfície de bacteriófagos filamentosos, e a subsequente seleção de fago por meio de sua ligação a um antígeno de escol. Uma técnica do tipo referido encontra-se descrita na Publicação PCT num. WO99/10494, incorporada por referência, que descreve o isolamento de anticorpos agonistas funcionais e com alta afinidade para receptores de MPL- e msk- com o uso de uma abordagem do tipo referido.

Uma vez determinadas as seqüências de nucleotídeos que codificam referidos anticorpos, também é possível produzir anticorpos quiméricos, enxertados com CDR, humanizados e totalmente humanos, por

meio de métodos recombinantes. Ácidos nucleicos que codificam os anticorpos são introduzidos nas células hospedeiras e expressos utilizando-se materiais e procedimentos geralmente conhecidos na técnica.

A invenção proporciona um ou vários anticorpos monoclonais totalmente humanos contra IL-1R1 humano. De preferência, os anticorpos ligam-se ao terceiro domínio de IL-1R1. Em concretizações preferidas, a invenção proporciona seqüências de nucleotídeos que codificam, e seqüências de aminoácidos que compreendem, moléculas de imunoglobulina de cadeia pesada e de cadeia leve, particularmente seqüências correspondentes a suas regiões variáveis. Em concretizações preferidas proporciona-se seqüências correspondentes a regiões determinadoras de complementaridade (CDR's), especificamente de CDR1 até CDR3. Em concretizações preferidas adicionais, a invenção proporciona linhas de células de hibridoma que expressam referidas moléculas de imunoglobulina e anticorpos monoclonais produzidos a partir das mesmas, sendo o mais preferível anticorpos monoclonais humanos purificados contra human IL-1R1.

A capacidade de clonar e reconstruir *loci* humanos com dimensão de megabase em cromossomas artificiais de levedura (YACs) e introduzir os mesmos na linha germinal de camundongo proporciona uma abordagem vantajosa para elucidar os componentes funcionais de *loci* muito grandes ou grosseiramente mapeados e também gerar modelos úteis de doença humana. Adicionalmente, a utilização de tecnologia do tipo referido para substituição de *loci* de camundongo com seus equivalentes humanos proporciona compreensões únicas da expressão e regulação de produtos de genes humanos durante o desenvolvimento, sua comunicação com outros sistemas, e seu envolvimento na indução e progressão de doença.

Uma aplicação prática importante de uma estratégia do tipo referido é a "humanização" do sistema imunológico humoral do camundongo. A introdução de *loci* de imunoglobulina (Ig) humana em camundongos em



que os genes de Ig endógena foram inativados proporciona a oportunidade de estudar os mecanismos subjacentes à expressão programada e montagem de anticorpos e também seu papel no desenvolvimento de células B. Adicionalmente, uma estratégia do tipo referido proporciona uma fonte para
5 produção de anticorpos monoclonais (MAbs) totalmente humanos, particularmente para uso como agentes terapêuticos. Espera-se que anticorpos totalmente humanos minimizem as respostas imunogênica e alérgica intrínsecas a Mabs de camundongo ou derivados de camundongo, e, com isto, incrementem a eficácia e segurança de anticorpos administrados em
10 aplicações terapêuticas. É possível utilizar anticorpos totalmente humanos no tratamento de doenças humanas crônicas e recorrentes, como osteoartrite, artrite reumatóide, e outras condições inflamatórias, sendo que seu tratamento requer administração repetida de anticorpos.

Alguém versado na técnica pode manipular cepas de mouse
15 com deficiência na produção de anticorpos de camundongo com grandes fragmentos dos *loci* de Ig humana de tal forma que referidos camundongos produzam anticorpos humanos na ausência de anticorpos de camundongo. Fragmentos de Ig humana grandes podem preservar a grande diversidade de genes variáveis e também a regulação apropriada da produção e expressão de
20 anticorpos. Explorando-se o maquinário do camundongo para diversificação e seleção de anticorpos e a falta de tolerância imunológica a proteínas humanas, o repertório de anticorpos humanos reproduzidos nestas cepas de camundongo proporciona anticorpos com alta afinidade contra qualquer antígeno de interesse, incluindo antígenos humanos. Utilizando a tecnologia
25 do hibridoma, é possível produzir e selecionar MAbs humanos específicos para antígeno, com a especificidade desejada.

Em determinadas concretizações, a pessoa versada na técnica pode utilizar regiões constantes de espécies diferentes da humana juntamente com região/regiões variáveis humanas em camundongos do tipo referido para



produzir anticorpos quiméricos. Os anticorpos da invenção podem ser produzidos imunizando-se referidos animais com IL-1R1 de comprimento pleno, formas solúveis de IL-1R1, ou um fragmento disso. Ver, por exemplo, Pedido de Patente Internacional, Publicação WO 93/12227).

5 As CDRs das regiões variáveis de cadeia leve e de cadeia pesada de anticorpos anti-IL-1R1 da invenção podem ser enxertadas em regiões de estrutura (FRs) da mesma ou de outra espécie. Em determinadas concretizações, as CDRs das regiões variáveis de cadeia leve e de cadeia pesada do anticorpo anti-IL-1R1 podem ser enxertadas em FRs humanas *consensus*. Para criar FRS humanas *consensus*, FRs de várias seqüências de aminoácidos humanos de cadeia leve ou de cadeia pesada são alinhadas de forma a se identificar uma seqüência de aminoácidos *consensus*. As FRs da cadeia leve ou da cadeia pesada de anticorpo anti-IL-1R1 podem ser substituídas pelas FRs de uma cadeia pesada ou cadeia leve diferente.

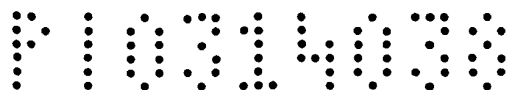
10 Aminoácidos raros nas FRs das cadeias pesada e leve de anticorpo anti-IL-1R1 tipicamente não são substituídos, embora seja possível substituir os aminoácidos de FR. Aminoácidos raros são aminoácidos específicos que se encontram em posições em que eles não são usualmente encontrados em FRs.

15 As regiões variáveis enxertadas de anticorpos anti-IL-1R1 da invenção podem ser usadas com uma região constante que é diferente da região constante de anticorpo anti-IL-1R1. Alternativamente, as regiões variáveis enxertadas são parte de um anticorpo Fv de cadeia simples. O enxerto de CDR encontra-se descrito, por exemplo, nas patentes dos E.U.A. nums. 6,180,370, 5,693,762, 5,693,761, 5,585,089, e 5,530,101, incorporadas aqui por referência para

20 qualquer fim.

25

Em determinadas concretizações, a invenção proporciona anticorpos anti-IL1-R1 que compreendem uma região de CDR1 de cadeia pesada humana apresentando uma seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, ou SEQ ID NO: 63; uma região de CDR2 de cadeia



pesada humana apresentando uma seqüência de aminoácidos of SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, ou SEQ ID NO: 66; e/ou uma região de CDR3 de cadeia pesada humana apresentando uma seqüência de aminoácidos of SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, ou SEQ ID NO: 69.

5 Em outras concretizações, a invenção proporciona anticorpos anti-IL1-R1 que compreendem uma região de CDR1 de cadeia leve humana apresentando uma seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 70 ou SEQ ID NO: 71; uma região de CDR2 de cadeia pesada humana apresentando uma seqüência de aminoácidos of SEQ ID NO: 72 ou SEQ ID NO: 73; e/ou uma
10 região de CDR3 de cadeia pesada humana apresentando uma seqüência de aminoácidos of SEQ ID NO: 74 ou SEQ ID NO: 75.

Anticorpos da invenção são preparados, de preferência, utilizando-se camundongos transgênicos que apresentam uma porção substancial do locus de produção de anticorpo humano inserida em células de
15 produção de anticorpos dos camundongos, e que são manipulados adicionalmente para serem deficientes na produção de anticorpos murinos endógenos. Referidos camundongos são capazes de produzir anticorpos e moléculas de imunoglobulina humana e não produzem, ou produzem quantidades substancialmente reduzidas de anticorpos e moléculas de
20 imunoglobulina murina. Tecnologias utilizadas para se obter este resultado são descritas nas patentes, pedidos e referências divulgadas nesta descrição. Em concretizações preferidas, a pessoa versada na técnica pode empregar métodos como divulgados na Publicação de Pedido de Patente Internacional No. WO 98/24893, incorporada aqui por referência para qualquer fim. Ver
25 também Mendez *et al.*, 1997, Nature Genetics 15:146-156, incorporada aqui por referência para qualquer fim.

Os anticorpos monoclonais (MAbs) da invenção podem ser produzidos por meio de diversas técnicas, incluindo metodologia convencional de anticorpos monoclonais, por exemplo, a técnica de

hibridação convencional de células somáticas de Kohler e Milstein, 1975, Nature 256:495. Embora se prefira procedimentos de hibridação de células somáticas, em princípio é possível empregar outras técnicas para produzir anticorpos monoclonais, por exemplo transformação viral ou oncogênica de linfócitos B.

Em um concretização preferida, anticorpos monoclonais humanos dirigidos contra IL-1 R1 podem ser gerados utilizando-se camundongos referidos como camundongos "HuMab", contêm um mini-lócus de gene de imunoglobulina humana que codifica seqüências de imunoglobulina de cadeia pesada (μ e γ) e cadeia leve κ não-rearrumadas, em conjunto com mutações objetivadas que inativam os *loci* de cadeias μ e κ endógenas. Lonberg *et al.*, 1994, Nature 368:856-859. Assim, os camundongos apresentam expressão reduzida de IgM ou κ de camundongo e, em resposta à imunização, os transgenes de cadeia leve ou de cadeia pesada humanos introduzidos sofrem troca de classe e mutação somática para gerar anticorpos monoclonais de IgG κ humanos com alta afinidade. Lonberg *et al.*, supra; Lonberg e Huszar, 1995, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93; Harding e Lonberg, 1995, Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:536-546. A preparação de camundongos HuMab encontra-se descrita em detalhe em Taylor *et al.*, 1992, Nucleic Acids Res. 20:6287-6295; Chen *et al.*, 1993, International Immunology 5:647-656; Tuailon *et al.*, 1994, J. Immunol. 152:2912-2920; Lonberg *et al.*, 1994, Nature 368:856-859; Lonberg, 1994, Handbook of Exp. Pharmacology 113:49-101; Taylor *et al.*, 1994, International Immunology 6:579-591; Lonberg & Huszar, 1995, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93; Harding & Lonberg, 1995, Ann. N.Y. Acad. Sci 764:536-546; Fishwild *et al.*, 1996, Nature Biotechnology 14:845-851, sendo que os teores de todas estas referências são incorporados aqui integralmente por referência. Ver adicionalmente patentes dos E.U.A. num. 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; e



5,770,429; todas para Lonberg e Kay, e também Patente U.S. 5,545,807 para Surani *et al.*; Publicação de Pedido de Patente Internacional nº WO 93/1227, publicada em 24 de junho de 1993; WO 92/22646, publicada em 23 de dezembro de 1992; e WO 92/03918, publicada em 19 de março de 1992, sendo que as divulgações de todas estas referências são incorporadas aqui integralmente por referência. Alternativamente, cepas de camundongos transgênicos HCo7 e HCo12 descritas nos Exemplos abaixo podem ser usadas para gerar anticorpos anti-IL-1R1 humanos.

De maneira vantajosa, anticorpos monoclonais totalmente humanos específicos para IL-1R1 são produzidos como a seguir. Camundongos transgênicos contendo genes de imunoglobulina humana são imunizados com o antígeno relacionado com IL-1R1 que é de interesse. Obtém-se células linfáticas (como células B) dos camundongos que expressam anticorpos. Células recuperadas do tipo referido são fundidas com uma linha de células de tipo mielóide para preparar linhas de células de hibridoma imortais, e referidas linhas de células de hibridoma são triadas e selecionadas para identificar linhas de células de hibridoma que produzem anticorpos específicos para o antígeno de interesse. Em determinadas concretizações, proporciona-se a produção de uma linha de células de hibridoma que produz anticorpos específicos para IL-1R1.

Em concretizações preferidas, anticorpos da invenção são produzidas por linhas de hibridoma. Nestas concretizações, os anticorpos da invenção ligam-se a IL-1R1 com uma constante de dissociação (K_d) entre aproximadamente 4 pM e 100 pM. Em determinadas concretizações da invenção, os anticorpos ligam-se a IL-1R1 com uma K_d inferior a cerca de 20 pM. Em outras concretizações, os anticorpos da invenção ligam-se ao terceiro domínio de IL-1R1. As seqüências de nucleotídeos e aminoácidos do terceiro domínio de IL-1R1 humana e de rato são mostradas na Figura 17.

Em concretizações preferidas, os anticorpos da invenção são



de isótipo IgG1, IgG2, ou IgG4, sendo que o isótipo IgG2 é o mais preferido. Em concretizações preferidas da invenção, os anticorpos compreendem uma cadeia leve kappa humana e uma cadeia pesada IgG1, IgG2, ou IgG4 humana. Em concretizações particulares, as regiões variáveis dos anticorpos são alinhadas com uma região constante diferente da região constante para o isótipo IgG1, IgG2, ou IgG4. Em determinadas concretizações, os anticorpos da invenção foram clonados para expressão em células mamíferas.

Em determinadas concretizações, substituições conservativas de aminoácidos nas cadeias pesada e leve de anticorpo anti-IL-1R1 (e correspondentes modificações dos nucleotídeos codificantes) produzirão anticorpos anti-IL-1R1 apresentando características funcionais e químicas semelhantes às daquelas de anticorpo anti-IL-1R1. Em contraste, é possível realizar modificações substanciais das características funcionais e/ou químicas de anticorpo anti-IL-1R1 mediante a seleção de substituições na sequência de aminoácidos das cadeias pesada e leve que diferem significativamente no que se refere ao seu efeito de conservar (a) a estrutura da espinha dorsal molecular na área da substituição, por exemplo, como uma conformação em forma de lâmina ou helicoidal, (b) a carga ou hidrofobicidade da molécula no sítio-alvo, ou (c) o volume da cadeia lateral.

Por exemplo, uma "substituição conservativa de aminoácidos" pode envolver uma substituição de um radical de aminoácido nativo por um radical não-nativo de tal forma que haja pouco ou nenhum efeito sobre a polaridade ou a carga do radical de aminoácido naquela posição. Adicionalmente, qualquer radical nativo no polipeptídeo também pode ser substituído por alanina, como já se descreveu previamente com respeito a "mutagênese de varredura de alanina" (Wells, 1991, Métodos Enzymol. 202:390 (ed. J.J. Langone), Academic Press, London).

Substituições de aminoácidos desejadas (que conservativas ou não-conservativas) podem ser determinadas por aqueles com prática na

técnica no momento em que referidas substituições são desejadas. Em determinadas concretizações, é possível utilizar substituições de aminoácidos para identificar radicais importantes de anticorpo anti-IL-1R1, ou para incrementar ou diminuir a afinidade dos anticorpos anti-IL-1R1 aqui descritos.

Em concretizações alternativas, anticorpos da invenção podem ser expressos em linhas de células diferentes de linhas de células de hibridoma. Nestas concretizações, seqüências que codificam anticorpos particulares podem ser usadas para transformação de uma célula hospedeira mamífera apropriada. De acordo com estas concretizações, é possível obter transformação com o uso de qualquer método conhecido para introduzir polinucleotídeos numa célula hospedeira, incluindo, por exemplo empacotamento do polinucleotídeo em um vírus (ou em um vetor viral) e transdução de uma célula hospedeira como o vírus (ou vetor) ou por meio de procedimentos de transfecção conhecidos na técnica. Referidos procedimentos são exemplificados pelas patentes dos E.U.A. nums. 4,399,216, 4,912,040, 4,740,461, e 4,959,455 (todas incorporadas aqui por referência para qualquer fim). Geralmente, o procedimento de transformação usado pode depender do hospedeiro a ser transformado. Métodos de introduzir polinucleotídeos heterólogos em células mamíferas são bem conhecidos na técnica e incluem, embora sem limitação, transfecção mediada com dextrano, precipitação com fosfato de cálcio, transfecção mediada com polibreno, fusão de protoplasto, eletroporação, encapsulação do polinucleotídeo(s) em liposomas, e microinjeção direta do DNA nos núcleos.

De acordo com determinadas concretizações dos métodos da invenção, uma molécula de ácido nucleico codificando a seqüência de aminoácidos de uma região constante de cadeia pesada, uma região variável de cadeia pesada, uma região constante de cadeia leve, ou uma região variável de cadeia leve de um anticorpo IL-1R1 da invenção, é inserida em um vetor

de expressão apropriado utilizando-se técnicas convencionais de ligação. Em um concretização preferida, a região constante de cadeia pesada ou de cadeia leve de IL-1R1 é anexada na ponta C da região variável apropriada e é ligada em um vetor de expressão. O vetor é selecionado tipicamente para ser funcional na célula hospedeira particular empregada (isto é, o vetor é compatível com o maquinário da célula hospedeira de tal forma que possa ocorrer amplificação do gene e/ou da expressão do gene). Para uma revisão de vetores de expressão, ver, Goeddel (ed.), 1990, Meth. Enzymol. Vol. 185, Academic Press. N.Y.

Tipicamente, vetores de expressão utilizados em qualquer das células hospedeiras conterão seqüências para manutenção de plasmídeo e para clonagem e expressão de seqüências de nucleotídeos exógenas. Estas seqüências, referidas coletivamente como "seqüências de flanqueamento" em determinadas concretizações incluirão tipicamente uma ou mais das seqüências de nucleotídeos a seguir: um promotor, uma ou mais seqüências acentuadoras, uma origem de replicação, uma seqüência de terminação transcricional, uma seqüência de íntron completa contendo um sítio de recomposição doador e receptor, uma seqüência que codifica uma seqüência líder para secreção de polipeptídeo, um sítio de ligação de ribossoma, uma seqüência de poliadenilação, uma região de poliligando para inserir o ácido nucleico que codifica o polipeptídeo a ser expresso, e um elemento marcador selecionável. Cada uma destas seqüências encontra-se discutida abaixo.

Opcionalmente, o vetor pode conter uma seqüência codificante "etiqueta", isto é, uma molécula de oligonucleotídeo localizada na ponta 5' ou 3' da seqüência codificante de polipeptídeo de IL-1R1; a seqüência de oligonucleotídeo codifica polyHis (como hexaHis), ou outra "etiqueta", como FLAG, HA (vírus da influenza de hemaglutinina), ou *myc* para o qual existem anticorpos comercialmente obteníveis. Tipicamente, esta etiqueta é fundida ao polipeptídeo mediante expressão do polipeptídeo, e pode servir como um

meio para purificação por afinidade ou detecção do anticorpo IL-1R1 da célula hospedeira. A purificação por afinidade pode ser realizada, por exemplo, por meio de cromatografia de coluna utilizando-se anticorpos contra a etiqueta como uma matriz de afinidade. Opcionalmente, a etiqueta pode ser removida subsequentemente do polipeptídeo de IL-1R1 purificado por diversos meios, como com a utilização de determinadas peptidases para clivagem.

Seqüências de flanqueamento podem ser homólogas (isto é, da mesma espécie e/ou cepa que a célula hospedeira), heterólogas (isto é, de uma espécie diferente da cepa ou espécie de célula hospedeira), híbridas (isto é, uma combinação de seqüências de flanqueamento de mais de uma fonte), sintéticas ou nativas. Assim, a fonte de uma seqüência de flanqueamento pode ser qualquer organismo procariótico ou eucariótico, qualquer organismo vertebrado ou invertebrado, ou qualquer planta, desde que a seqüência de flanqueamento seja funcional no maquinário da célula hospedeira, e possa ser ativada ali.

Seqüências de flanqueamento úteis nos vetores desta invenção podem ser obtidas por meio de qualquer um de vários métodos bem conhecidos na técnica. Tipicamente, seqüências de flanqueamento úteis aqui terão sido previamente identificadas por meio de mapeamento e/ou por meio de digestão com endonuclease de restrição e, assim, podem ser isoladas da fonte de tecido apropriada utilizando-se as endonucleases de restrição apropriadas. Em alguns casos, a seqüência de nucleotídeos plena de uma seqüência de flanqueamento pode ser conhecida. Aqui, a seqüência de flanqueamento pode ser sintetizada utilizando-se os métodos descritos aqui para síntese ou clonagem de ácido nucleico.

Onde se conhece toda ou apenas uma porção da seqüência de flanqueamento, ela pode ser obtida utilizando-se reação em cadeia de polimerase (PCR) e/ou por meio de seleção de uma biblioteca genômica com

uma sonda apropriada, como um oligonucleotídeo e/ou fragmento de sequência de flanqueamento da mesma espécie ou de outra espécie. Onde não se conhece a sequência de flanqueamento, é possível isolar um fragmento de DNA contendo uma sequência de flanqueamento de um pedaço maior de DNA que pode conter, por exemplo, uma sequência codificante ou mesmo outro gene ou outros genes. O isolamento pode ser realizado por meio de digestão com endonuclease de restrição para produzir o fragmento de DNA apropriado seguido de isolamento utilizando-se purificação em gel de agarose, cromatografia de coluna Qiagen[®] (Chatsworth, CA), ou outros métodos conhecidos pelo artesão versado. A seleção de enzimas apropriadas para se realizar esta finalidade será facilmente aparente para alguém com prática ordinária na técnica.

Uma origem de replicação é tipicamente uma parte daqueles vetores de expressão procarióticos adquiridos comercialmente, e a origem auxilia na amplificação do vetor numa célula hospedeira. Se o vetor de escolha não contiver um sítio de origem de replicação, é possível sintetizar um quimicamente com base numa sequência conhecida, e ligar o mesmo no vetor. Por exemplo, a origem de replicação do plasmídeo pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) é adequada para a maior parte das bactérias gram-negativas, e várias origens virais (por exemplo, SV40, poliovírus, adenovírus, vírus da estomatite vesicular (VSV), ou papilomavírus, como HPV ou BPV) são úteis para clonar vetores em células mamíferas. Geralmente, o componente de origem de replicação não é necessário para vetores de expressão mamíferos (por exemplo, a origem SV40 é utilizada freqüentemente porque só contém o promotor precoce do vírus).

Uma sequência de terminação de transcrição encontra-se localizada tipicamente a 3' relativamente à ponta da região codificante de polipeptídeo e serve para terminar transcrição. Usualmente, uma sequência de terminação de transcrição em células procarióticas é um fragmento rico em

G-C seguido de uma sequência poly-T. Embora a sequência seja facilmente clonada de uma biblioteca ou mesmo adquirida comercialmente obténível como parte de um vetor, ela pode ser facilmente sintetizada utilizando-se métodos para síntese de ácido nucleico, como aqueles descritos aqui.

Um gene marcador selecionável codifica uma proteína necessária para a sobrevivência e o crescimento de uma célula hospedeira desenvolvida em um meio de cultura seletivo. Genes marcadores de seleção típicos codificam proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou outras toxinas, por exemplo, ampicilina, tetraciclina, ou canamicina para células hospedeiras procarióticas; (b) complementam deficiências auxotróficas da célula; ou (c) fornecem nutrientes críticos não disponíveis de meios complexos ou definidos. Marcadores selecionáveis preferidos são o gene de resistência à canamicina, o gene de resistência à ampicilina, e o gene de resistência à tetraciclina. Um gene de resistência à neomicina também pode ser usado para seleção em células hospedeiras procarióticas e eucarióticas.

É possível utilizar outros genes selecionáveis para amplificar o gene que será expresso. Amplificação é o processo em que genes que se encontram em maior demanda para a produção de uma proteína crítica para crescimento ou sobrevivência da célula são reiterados geralmente em tandem com os cromossomos de gerações sucessivas de células recombinantes. Exemplos de marcadores selecionáveis apropriados para células mamíferas incluem diidrofolato redutase (DHFR) e timidina quinase desprovida de promotor. Transformantes de células mamíferas são colocados sob pressão de seleção sendo que apenas os transformantes são adaptados unicamente para sobreviver em virtude do gene selecionável presente no vetor. A pressão de seleção é imposta cultivando-se as células transformadas em condições em que a concentração de agente de seleção no meio é incrementada sucessivamente, levando com isto à amplificação do gene selecionável e também do DNA que codifica outro gene, como polipeptídeo IL-1R1

compreendendo o vetor. Como um resultado, sintetiza-se a partir do DNA amplificado maiores quantidades de um polipeptídeo, como polipeptídeo IL-1R1.

5 Geralmente é necessário um sítio de ligação de ribossoma para iniciação da tradução de mRNA e que é caracterizado por uma seqüência Shine-Dalgarno (procariontes) ou uma seqüência Kozak (eucariontes). O elemento encontra-se localizado tipicamente a 3' do promotor e a 5' da seqüência codificante do polipeptídeo a ser expresso.

10 Em alguns casos, como onde se deseja glicosilação em um sistema de expressão de célula hospedeira eucariótica, é possível manipular as diversas seqüências pré- ou pro- para melhorar glicosilação ou rendimento. Por exemplo, é possível alterar o sítio de clivagem de peptidase de um peptídeo-sinal particular, ou adicionar seqüências pro-, que também podem afetar glicosilação. O produto de proteína final pode apresentar, na posição 1
15 (relativamente ao primeiro aminoácido da proteína madura) um ou mais aminoácidos adicionais incidentes a expressão, que podem não ter sido totalmente removidos. Por exemplo, o produto de proteína final pode apresentar um ou dois radicais de aminoácidos encontrados no sítio de clivagem de peptidase, ligados à ponta amino. Alternativamente, o uso de
20 alguns sítios de clivagem com enzima pode resultar numa forma ligeiramente truncada do polipeptídeo desejado, se a enzima cortar numa área dentro do polipeptídeo maduro.

Os vetores de expressão e clonagem da invenção conterão tipicamente um promotor que é reconhecido pelo organismo hospedeiro e
25 ligado operacionalmente à molécula que codifica o anticorpo anti-IL-1R1. Promotores são seqüências não-transcritas localizadas a montante (isto é, a 5') do códon de partida de um gene estrutural (geralmente dentro de cerca de 100 a 1000 bp [pares de bases]) que controlam a transcrição do gene estrutural. Promotores são agrupados convencionalmente em uma de duas classes:

promotores induzíveis e promotores constitutivos. Promotores induzíveis iniciam níveis incrementados de transcrição de DNA sob seu controle em resposta a alguma alteração em condições de cultura, como a presença ou ausência de um nutriente ou uma alteração na temperatura. Promotores constitutivos, por outro lado, iniciam produção contínua de produto gênico; ou seja, há pouco ou nenhum controle sobre a expressão do gene. Conhece-se bem um grande número de promotores, reconhecidos por uma variedade de células hospedeiras potenciais. Um promotor apropriado é ligado operacionalmente ao DNA codificando cadeia pesada ou cadeia leve compreendendo um anticorpo anti-IL-1R1 da invenção por meio da remoção do promotor do DNA-fonte por meio de digestão com enzima de restrição e inserção da seqüência de promotor desejada no vetor.

Promotores apropriados para uso com hospedeiros de levedura também são bem conhecidos na técnica. Utiliza-se vantajosamente acentuadores de levedura com promotores de levedura. Promotores apropriados para uso com células hospedeiras mamíferas são bem conhecidos e incluem, embora sem limitação, aqueles obtidos dos genomas de vírus, como poliomavírus, vírus da varíola avícola, adenovírus (como Adenovírus 2), papiloma-vírus bovino, sarcoma-vírus avícola, citomegalovírus, retrovírus, vírus da hepatite B e, da forma mais preferível, vírus símio 40 (SV40). Outros promotores mamíferos apropriados incluem promotores mamíferos heterólogos, por exemplo, promotores de choque de calor e o promotor de actina.

Promotores adicionais que podem ser de interesse incluem, embora sem limitação: a região do promotor precoce de SV40 (Bernoist e Chambon, 1981, Nature 290:304-10); o promotor de CMV; o promotor contido na repetição terminal longa a 3' do sarcoma-vírus de Rous (Yamamoto *et al.*, 1980, Cell 22:787-97); o promotor de timidina quinase do herpes (Wagner *et al.*, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1444-45); as

seqüências reguladoras do gene de metalotionina (Brinster *et al.*, 1982, Nature 296:39-42); vetores de expressão procarióticos, como o promotor de beta-lactamase (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:3727-31); ou o promotor *tac* (DeBoer *et al.*, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25). Também são interessantes as regiões de controle transcricional animal a seguir, que apresentam especificidade para tecido e que foram utilizadas em animais transgênicos: a região de controle de gene da elastase I que é ativa em células acinar pancreáticas (Swift *et al.*, 1984, Cell 38:639-46; Ornitz *et al.*, 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409 (1986); MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515); a região de controle do gene da insulina que é ativo em células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, Nature 315:115-22); a região de controle do gene da imunoglobulina que é ativa em células linfóides (Grosschedl *et al.*, 1984, Cell 38:647-58; Adames *et al.*, 1985, Nature 318:533-38; Alexander *et al.*, 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-44); a região de controle de vírus do tumor mamário em camundongo que é ativa em células testiculares, da mama, linfóides e mastócitos (Leder *et al.*, 1986, Cell 45:485-95); a região de controle do gene da albumina que é ativa no fígado (Pinkert *et al.*, 1987, Genes e Devel. 1:268-76); a região de controle do gene da alfa-feto-proteína que é ativa no fígado (Krumlauf *et al.*, 1985, Mol. Cell. Biol. 5:1639-48; Hammer *et al.*, 1987, Science 235:53-58); a região de controle do gene da alfa 1-antitripsina que é ativa no fígado (Kelsey *et al.*, 1987, Genes e Devel. 1:161-71); a região de controle do gene da beta-globina que é ativa em células mielóides (Mogam *et al.*, 1985, Nature 315:338-40; Kollias *et al.*, 1986, Cell 46:89-94); a região de controle do gene da proteína básica mielina que é ativa em células de oligodendrócitos no cérebro (Readhead *et al.*, 1987, Cell 48:703-12); a região de controle do gene de cadeia leve-2 da miosina que é ativa no músculo esquelético (Sani, 1985, Nature 314:283-86); e a região de controle do gene do hormônio liberador gonadotrófico que é ativa no hipotálamo (Mason *et al.*, 1986, Science

234:1372-78).

É possível inserir uma seqüência acentuadora no vetor para incrementar transcrição de DNA que codifica cadeia leve ou cadeia pesada compreendendo um anticorpo anti-IL-1R1 da invenção por eucariontes superiores. Acentuadores são elementos de DNA com ação *cis*, usualmente com comprimento de cerca de 10-300 bp, que atuam no promotor para incrementar transcrição. Acentuadores são relativamente independentes da orientação e posição. Eles foram encontrados a 5' e 3' relativamente à unidade de transcrição. Conhece-se várias seqüências acentuadoras obteníveis de genes mamíferos (por exemplo, globina, elastasa, albumina, alfa-feto-proteína e insulina). Tipicamente, contudo, utiliza-se um acentuador de um vírus. O acentuador de SV40, o acentuador de promotor precoce do citomegalovírus, o acentuador do políoma, e acentuadores de adenovírus conhecidos na técnica são elementos acentuadores exemplares para a ativação de promotores eucarióticos. Embora um acentuador possa ser recomposto no vetor em uma posição 5' ou 3' relativamente a uma molécula de ácido nucleico, sendo que encontra-se localizado tipicamente em um sítio a 5' do promotor.

Vetores de expressão da invenção podem ser construídos a partir de um vetor de partida, como um vetor comercialmente obtenível. Referidos vetores pode ou não conter todas as seqüências de flanqueamento desejadas. Onde uma ou mais das seqüências de flanqueamento, como aqui se descreveu, já não estão presentes no vetor, elas podem ser obtidas individualmente e ligadas no vetor. Métodos usados para obter cada uma das seqüências de flanqueamento são bem conhecidos por alguém versado na técnica.

Após se ter construído o vetor e se ter inserido uma molécula de ácido nucleico que codifica cadeia leve ou cadeia pesada ou cadeia leve e cadeia pesada compreendendo um anticorpo anti-IL-1R1 no sítio apropriado do vetor, o vetor completado pode ser inserido em uma célula hospedeira

apropriada para amplificação e/ou expressão do polipeptídeo. A transformação de um vetor de expressão para um anticorpo anti-IL-1R1 numa célula hospedeira selecionada pode ser realizada por meio de métodos bem conhecidos, incluindo transfecção, infecção, co-precipitação com fosfato de cálcio, eletroporação, microinjeção, lipofecção, transfecção mediada com DEAE-dextrano, ou outras técnicas conhecidas. O método selecionado será, em parte, uma função do tipo de célula hospedeira a ser usada. Estes métodos e outros métodos apropriados são bem conhecidos pela pessoa versada na técnica, e são apresentados, por exemplo, em Sambrook *et al.*, supra.

A célula hospedeira, quando cultivada em condições apropriadas, sintetiza um anticorpo anti-IL-1R1 que pode ser coletado subsequente do meio de cultura (se a célula hospedeira secretar o mesmo no meio) ou diretamente da célula hospedeira que produz o mesmo (se não for secretado). A seleção de uma célula hospedeira apropriada dependerá de vários fatores, como níveis de expressão desejados, modificações no polipeptídeo que são desejáveis ou necessárias para a atividade (como glicosilação ou fosforilação) e facilidade de dobragem em uma molécula biologicamente ativa.

Linhas de células mamíferas obteníveis como hospedeiros para expressão são bem conhecidas na técnica e incluem, embora sem limitação, muitas linhas de células imortalizadas obteníveis junto à American Type Culture Collection (A.T.C.C.), incluindo, embora sem limitação, células de ovário de hamster chinês (CHO), células HeLa, células de rim de hamster bebê (BHK), células de rim de macaco (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por exemplo, Hep G2), e uma quantidade de outras linhas de células. Em determinadas concretizações, é possível selecionar linhas de células determinando-se quais linhas de células apresentam altos níveis de expressão e produzem anticorpos com propriedades de ligação de IL-1R1 constitutivas. Em outra concretização pode-se selecionar uma linha de

células da linhagem de células B que não produz seu próprio anticorpo, mas que apresenta uma capacidade de gerar e secretar um anticorpo heterólogo (por exemplo, linhas de células de mieloma de camundongo NSO e SP2/0).

Anticorpos da invenção são úteis para detectar IL-1R1 em amostras biológicas e identificação de células ou tecidos que produzem proteína de IL-1R1. Referidos anticorpos que se ligam a IL-1R1 e bloqueiam interação com outros compostos de ligação apresentam uso terapêutico na modulação de doenças mediadas com IL-1. Em concretizações preferidas, anticorpos para IL-1R1 podem bloquear ligação de IL-1R1 a IL-1 β ou IL-1 α , o que pode resultar em interrupção da cascata de transdução de sinal de IL-1.

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

Em determinadas concretizações, a invenção proporciona métodos de tratar distúrbios clínicos associados com reações inflamatórias mediadas com IL-1 ou reações imunorreguladoras mediadas com IL-1. Os métodos da invenção incluem administrar um anticorpo anti-IL1R1 da invenção a um indivíduo que é afligido por uma doença inflamatória ou imunorreguladora que é mediada com IL-1. Como usados aqui, os termos "doença", "condição clínica", ou "condição anormal", são usados intercambiavelmente com o termo "distúrbio clínico".

Em uma concretização particular, os métodos da invenção envolvem administrar a um paciente um anticorpo anti-IL-1R1 da invenção, prevenindo com isso a ligação de IL-1 a seu receptor de superfície celular (IL-1R1).

Para tratar um distúrbio clínico caracterizado por expressão

anormal ou excessiva de IL-1 ou sinalização anormal ou excessiva de IL-1, uma molécula compreendendo um anticorpo de IL-1R tipo 1 desta invenção é administrada ao paciente numa quantidade e durante um período suficiente para induzir uma melhora sustentado em pelo menos um indicador que reflete a gravidade do distúrbio. Uma melhora é considerada "sustentada" se o paciente apresentar a melhora em pelo menos duas ocasiões separadas durante pelo menos quatro semanas. O grau de melhora é determinado com base em sinais ou sintomas, e também pode-se empregar questionários que são fornecidos ao paciente, como questionários sobre a qualidade de vida.

Pode-se recorrer a vários indicadores que refletem a extensão da doença do paciente para determinar se a quantidade e o tempo do tratamento são suficientes. O valor da linha de base para o indicador ou indicadores selecionados é determinado por meio de exame do paciente antes da administração da primeira dose do anticorpo. De preferência, o exame de linha de base é realizado dentro de cerca de 60 dias da administração da primeira dose. Se o anticorpo de IL-1R for administrado para tratar sintomas agudos, como por exemplo, para tratar lesões traumáticas (lesão traumática do joelho, ataque, lesão na cabeça, etc.), a primeira dose é administrada assim que praticamente possível após a ocorrência da lesão ou evento.

A melhora é induzida por meio da administração repetida de uma dose de anticorpo até que o paciente manifeste uma melhora relativamente à linha de base para o iniciador ou indicadores selecionados. No tratamento de condições crônicas, este grau de melhora é obtido administrando-se repetidamente este medicamento durante um período de pelo menos um mês ou mais, por exemplo, durante um, dois ou três meses ou mais, ou indefinidamente. Frequentemente um período de uma a seis semanas, ou mesmo uma dose única, é suficiente para tratar condições agudas.

Embora a extensão da doença do paciente após tratamento

possa parecer melhorada de acordo com um ou mais indicadores, tratamento pode ser continuado indefinidamente no mesmo nível ou numa dose ou frequência reduzida. Uma vez que o tratamento foi reduzido ou interrompido, ele pode ser prosseguido mais tarde no nível original caso sintomas voltem a aparecer.

É possível utilizar qualquer via de administração considerada eficaz para administrar terapeuticamente o anticorpo. O anticorpo pode ser injetado pelas via intra-articular, intravenosa, intramuscular, intralesional, intraperitoneal, intracraniana, por inalação ou subcutânea, por injeção de *bolus* ou infusão contínua. Por exemplo, doenças pulmonares podem envolver métodos intranasais e de inalação. Outros meios vantajosos de administração incluem liberação controlada de implantes, inalação de aerossol, gotas oftálmicas, preparações orais, incluindo pílulas, xaropes, losangos ou goma de mascar, e preparações tópicas, como loções, géis, sprays, ungüentos ou outras técnicas apropriadas. Administração por inalação é particularmente benéfica quando se trata doenças associadas com distúrbios pulmonares.

Em uma concretização da invenção, um anticorpo anti-IL-1R1 da invenção pode ser administrado uma vez ao mês. Em outra concretização o anticorpo é administrado uma vez a cada duas semanas ou uma vez por semana para tratar vários distúrbios clínicos divulgados aqui. Em outra concretização adicional o anticorpo é administrado pelo menos duas vezes por semana, e em outra concretização é administrado pelo menos uma vez por dia. Um paciente adulto é uma pessoa com 18 anos de vida ou mais velha. Se injetada, a quantidade efetiva, por dose de adulto, abrange de 1-200 mg/m², ou de 1-40 mg/m² ou cerca de 5-25 mg/m². Alternativamente, é possível administrar uma dose plana, cuja quantidade pode abranger de 2-400 mg/dose, 2-100 mg/dose ou de cerca de 10-80 mg/dose. Se a dose for administrada mais de uma vez por semana, uma faixa de dose exemplar é idêntica às faixas de dosagem descritas previamente ou menor. Em uma

concretização da invenção, as várias indicações descritas abaixo são tratadas por meio de administração de uma preparação aceitável para injeção contendo anticorpo de receptor de IL-1 a 80-100 mg/dose, ou alternativamente, contendo 80 mg por dose. A dose é administrada repetidamente. Caso se
5 utilize uma via de administração diferente de injeção, a dose é ajustada apropriadamente de acordo com práticas clínicas convencionais. Por exemplo, se a via de administração for inalação, a dosagem pode ser de uma a sete vezes por semana a faixas de dosagem de 10 mg/dose a 50 mg por dose.

Em concretizações preferidas, a invenção também proporciona
10 composições farmacêuticas compreendendo uma quantidade terapêuticamente efetiva de uma ou de uma pluralidade de anticorpos da invenção em conjunto com um diluente, veículo, solubilizador, emulsificante, conservante e/ou adjuvante farmacêuticamente aceitável. De preferência, materiais de formulação aceitáveis são não-tóxicos para os recipientes nas dosagens e
15 concentrações empregadas. Em concretizações preferidas, proporciona-se composições farmacêuticas compreendendo uma quantidade terapêuticamente efetiva de anticorpos anti-IL-1R1.

Em determinadas concretizações, a composição farmacêutica
pode conter materiais de formulação para modificar, manter ou conservar, por
20 exemplo, o pH, a osmolaridade, viscosidade, claridade, cor, isotonicidade, odor, esterilidade, estabilidade, taxa de dissolução ou de liberação, adsorção ou penetração da composição. Nessas concretizações, materiais de formulação vantajosos incluem, embora sem limitação, aminoácidos (como glicina, glutamina, asparagina, arginina ou lisina); antimicrobianos; antioxidantes
25 (como ácido ascórbico, sulfito de sódio ou hidrogeniosulfito de sódio); tamponantes (como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos ou outros ácidos orgânicos); agentes encorpantes (como manitol ou glicina); agentes quelantes (como etilenodiamina ácido tetraacético (EDTA)); agentes complexadores (como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina ou

hidroxipropil-beta-ciclodextrina); cargas; monossacarídeos; dissacarídeos; e outros carboidratos (como glucose, manose ou dextrinas); proteínas (como albumina do soro, gelatina ou imunoglobulinas); agentes corantes, aromatizantes e diluentes; agentes emulsificantes; polímeros hidrofílicos (como polivinilpirrolidona); polipeptídeos com baixo peso molecular; contra-
5 íons formadores de sal (como sódio); conservantes (como cloreto de benzalcônio, ácido benzóico, ácido salicílico, timerosal, álcool de fenetila, metilparabeno, propilparabeno, cloro-hexidina, ácido sórbico ou peróxido de hidrogênio); solventes (como glicerina, propileno glicol ou polietileno glicol);
10 alcoóis de açúcar (como manitol ou sorbitol); agentes de suspensão; tensoativos ou agentes umectantes (como plurônicos, PEG, ésteres de sorbitano, polissorbatos, como polissorbato 20, polissorbato 80, triton, trimetamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes incrementadores de estabilidade (como sucrose ou sorbitol); agentes incrementadores de
15 tonicidade (como halogenetos de metal de álcali, de preferência cloreto de sódio ou potássio, manitol ou sorbitol); veículos de fornecimento; diluentes; excipientes e/ou adjuvantes farmacêuticos. Ver, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edição, (A.R. Gennaro, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

Em determinadas concretizações, a composição farmacêutica
20 ótima será determinada por alguém versado na técnica dependendo, por exemplo, da via intencionada para administração, do formato de fornecimento e dosagem desejada. Ver, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*. Em determinadas concretizações, referidas composições podem influenciar o estado físico, estabilidade, taxa de liberação *in vivo* e
25 taxa de eliminação *in vivo* dos anticorpos da invenção.

Em determinadas concretizações, o veículo ou suporte primário em uma composição farmacêutica pode ter natureza aquosa ou não-aquosa. Por exemplo, um veículo ou suporte apropriado pode ser água para injeção, solução salina fisiológica ou fluido cerebro-espinhal artificial,

possivelmente suplementado com outros materiais comuns em composições para administração parenteral. Solução salina tamponada neutra ou solução salina misturada com albumina de soro são veículos exemplares adicionais. Em concretizações preferidas, composições farmacêuticas compreendem tamponante Tris com pH de cerca de pH 7,0-8,5, ou tamponante de acetato com pH de cerca de pH 4,0-5,5, e podem incluir adicionalmente sorbitol ou um substituto vantajosos para o mesmo. Em determinadas concretizações da invenção, é possível preparar composições de anticorpo anti-IL-1R1 para armazenamento por meio de misturação da composição selecionada apresentando o grau desejado de pureza com agentes de formulação opcionais (Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*) na forma de uma torta liofilizada ou de uma solução aquosa. Adicionalmente, em determinadas concretizações, o produto de anticorpo anti-IL-1R1 pode ser formulado como um liofilizado empregando-se excipientes, como sucrose.

As composições farmacêuticas da invenção podem ser selecionadas para fornecimento parenteral. As composições podem ser selecionadas para inalação ou para fornecimento através do trato digestivo, como oralmente. A preparação de referidas composições farmacêuticamente aceitáveis encontra-se dentro da prática da técnica.

Os componentes de formulação estão presentes, de preferência, em concentrações que são aceitáveis no sítio de administração. Em determinadas concretizações utiliza-se tamponantes para manter a composição a pH fisiológico ou a um pH ligeiramente inferior, tipicamente numa faixa de pH de cerca de 5 a cerca de 8.

Quando se considera a administração parenteral, as composições terapêuticas para uso nesta invenção podem ser fornecidas em forma de uma solução aquosa isenta de pirógeno, parenteralmente aceitável compreendendo o anticorpo anti-IL-1R1 desejado em um veículo farmacêuticamente aceitável. Um veículo particularmente vantajoso para

injeção parenteral é água destilada estéril em que o anticorpo anti-IL-1R1 é formulado como uma solução estéril, isotônica, adequadamente conservada. Em determinadas concretizações, a preparação pode envolver a formulação da molécula desejada com um agente, como microesferas injetáveis, partículas bio-erodíveis, compostos poliméricos (como ácido polilático ou ácido poliglicólico), pérolas ou liposomas, que podem proporcionar liberação controlada ou sustentada do produto que pode ser fornecido via injeção de depósito. Em determinadas concretizações também é possível usar ácido hialurônico, exercendo o efeito de promover duração sustentada na circulação. Em determinadas concretizações, é possível utilizar dispositivos de fornecimento de drogas implantáveis para introduzir a molécula de anticorpo desejada.

Composições farmacêuticas da invenção podem ser formuladas por inalação. Nestas concretizações, anticorpos anti-IL-1R1 são formulados como um pó seco para inalação. Em concretizações preferidas, também é possível formular soluções para inalação de anticorpo anti-IL-1R1 com um propelente para fornecimento em aerossol. Em determinadas concretizações, soluções podem ser nebulizadas. Administração pulmonar e métodos de formulação para a mesma são descritos adicionalmente na Publicação de Patente Internacional nº WO94120069, incorporada por referência, que descreve fornecimento pulmonar de proteínas quimicamente modificadas.

Considera-se também que formulações podem ser administradas oralmente. Anticorpos anti-IL-1R1 que são administrados desta maneira podem ser formulados com ou sem veículos comumente usados na composição de formas de dosagem sólidas, como tabletes e cápsulas. Em determinadas concretizações pode-se indicar uma cápsula para liberar a porção ativa da formulação no ponto do trato gastrointestinal quando a biodisponibilidade é maximizada e a degradação pré-sistêmica é minimizada.

X
M

É possível incluir agentes adicionais para facilitar a absorção do anticorpo anti-IL-1R1. Também é possível utilizar diluentes, aromatizantes, ceras com baixo ponto de fusão, óleos vegetais, lubrificantes, agentes de suspensão, agentes de desintegração de tabletes, e ligandos.

5 De preferência proporciona-se uma composição farmacêutica da invenção que compreende uma quantidade efetiva de um ou de uma pluralidade de anticorpos anti-IL-1R1 em uma mistura com excipientes não-tóxicos que são adequados para a fabricação de tabletes. Mediante dissolução dos tabletes em água estéril, ou outro veículo apropriado, é possível preparar
10 soluções em forma de dosagem unitária. Excipientes vantajosos incluem, embora sem limitação, diluentes inertes, como carbonato de cálcio, bicarbonato ou carbonato de sódio, lactose, ou fosfato de cálcio; ou agentes de ligação, como amido, gelatina, ou acácia; ou agentes lubrificantes, como estearato de magnésio, ácido esteárico, ou talco.

15 Composições farmacêuticas adicionais serão evidentes para aqueles com prática na técnica, incluindo formulações que envolvem anticorpos anti-IL-1R1 em formulações de fornecimento sustentado ou controlado. Técnicas para formular uma variedade de outros meios de fornecimento sustentado ou controlado, como veículos de lipossoma,
20 micropartículas bio-erodíveis ou pérolas porosas e injeções de depósito, também são conhecidas por aqueles versados na técnica. Ver por exemplo, Publicação de Patente Internacional nº WO93/15722, incorporada por referência, que descreve liberação controlada de micropartículas poliméricas porosas para fornecimento de composições farmacêuticas. Preparações de
25 liberação sustentada podem incluir matrizes de polímero semi-permeáveis na forma de artigos modelados, por exemplo películas, ou microcápsulas. Matrizes de liberação sustentada podem incluir poliésteres, hidrogéis, polilactídeos (como divulgado na Patente U.S. 3,773,919 e Publicação de Pedido de Patente Européia nº EP 058481), copolímeros de ácido L-glutâmico

e gama etil-L-glutamato (Sidman *et al.*, 1983, Biopolymers 22:547-556), poli (2-hidroxietil-metacrilato) (Langer *et al.*, 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 e Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105), etileno acetato de vinila (Langer *et al.*, *supra*) ou ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (Publicação de Pedido de Patente Européia nº EP 133,988). Composições de liberação sustentada também podem incluir liposomas que podem ser preparados por meio de qualquer um dos diversos métodos conhecidos na técnica. Ver por exemplo, Eppstein *et al.*, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692; Publicação de Pedido de Patente Européia nº EP 036,676; EP 088,046 e EP 143,949.

Composições farmacêuticas usadas para administração *in vivo* são proporcionadas tipicamente como preparações estéreis. Esterilização pode ser realizada por meio de filtração por meio de membranas de filtração estéril. Quando a composição é liofilizada, a esterilização utilizando este método pode ser conduzida antes ou após a liofilização e reconstituição. Composições para administração parenteral podem ser armazenadas em forma liofilizada ou em uma solução. Composições parenterais são geralmente colocadas em um recipiente apresentando uma abertura de acesso estéril, uma bolsa de solução intravenosa ou um frasco apresentando uma tampa perfurável com um agulha de injeção hipodérmica.

Uma vez formulada a composição farmacêutica, esta pode ser armazenada em frascos estéreis como uma solução, suspensão, gel, emulsão, sólido, ou como um pó desidratado ou liofilizado. Referidas formulações podem ser armazenadas em forma de pronto emprego ou numa forma (por exemplo, liofilizada) que é reconstituída antes da administração.

A invenção também proporciona kits para produzir uma unidade de administração em dose única. Os kits da invenção podem conter, cada um, um primeiro recipiente apresentando uma proteína seca, e também um segundo recipiente contendo uma formulação aquosa. Em determinadas

concretizações desta invenção, proporciona-se kits contendo seringas simples e de câmaras múltiplas previamente enchidas (por exemplo, seringas líquidas e lio-seringas).

A quantidade efetiva de uma composição farmacêutica contendo anticorpo anti-IL-1R1 a ser empregada terapeuticamente dependerá, por exemplo, do contexto e dos objetivos terapêuticos. Alguém versado na técnica considerará que os níveis de dosagem apropriados para tratamento variarão dependendo, em parte, da molécula fornecida, da indicação para a qual se está utilizando o anticorpo anti-IL-1R1, da via de administração, e do tamanho (peso corporal, superfície do corpo, ou tamanho do órgão) e/ou condição (a idade e estado geral de saúde) do paciente. Em determinadas concretizações, o clínico pode titular a dosagem e modificar a via de administração de forma a obter o efeito terapêutico ótimo. Uma dosagem típica pode abranger de cerca de 0,1 µg/kg até cerca de 100 mg/kg ou mais, dependendo dos fatores indicados acima. Em concretizações preferidas, a dosagem pode abranger de 0,1 mg/kg até cerca de 100 mg/kg; mais preferivelmente de 1 µg/kg até cerca de 100 mg/kg; ou ainda mais preferivelmente de 5 µg/kg até cerca de 100 mg/kg.

A frequência de dosagem dependerá dos parâmetros farmacocinéticos do anticorpo anti-IL-1R1 particular na formulação utilizada. Tipicamente, um clínico administra a composição até atingir uma dosagem que proporcione o efeito desejado. A composição pode ser administrada, portanto, como uma dose simples, ou como duas ou mais doses (que podem ou não conter a mesma quantidade da molécula desejada) ao longo do tempo, ou como uma infusão contínua via um cateter ou dispositivo de implantação. Um refinamento adicional da dosagem apropriada é realizado rotineiramente por aqueles com prática ordinária na técnica e encontra-se no âmbito das tarefas realizadas rotineiramente por aqueles. Dosagens apropriadas podem ser determinadas através do uso de dados apropriados relativos a dose-



resposta.

A via de administração da composição farmacêutica é de acordo com métodos conhecidos, por exemplo oralmente, por meio de injeção pelas vias intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intra-parenquimal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intra-arterial, intraportal, ou intralesional; por meio de sistemas de liberação sustentada ou por meio de dispositivos de implantação. Em determinadas concretizações, as composições podem ser administradas por meio de injeção de bolus ou, continuamente, por meio de infusão, ou por meio de dispositivo de implantação.

A composição também pode ser administrada localmente via implantação de uma membrana, esponja ou outro material apropriado sobre o qual a molécula desejada foi absorvida ou encapsulada. Em determinadas concretizações, onde se utiliza um dispositivo de implantação, o dispositivo pode ser implantado em qualquer tecido ou órgão adequado, e o fornecimento da molécula desejada pode ser via difusão, *bolus* de liberação prolongada, ou administração contínua.

Também pode ser desejável utilizar composições farmacêuticas de anticorpo anti-IL-1R1 de acordo com a invenção *ex vivo*. Nesses casos, células, tecidos ou órgãos que foram removidos do paciente são expostos a composições farmacêuticas de anticorpo anti-IL-1R1 após o que as células, tecidos e/ou órgãos são implantados subsequente de volta no paciente.

Em particular, anticorpos anti-IL-1R1 podem ser fornecidos mediante implantação de determinadas células que foram manipuladas geneticamente, utilizando-se métodos, como aqueles aqui descritos, para expressar e secretar o polipeptídeo. Em determinadas concretizações, referidas células podem ser células animais ou humanas, e podem ser autólogas, heterológicas, ou xenogênicas. Em determinadas concretizações, as

células podem ser imortalizadas. Em outras concretizações, visando diminuir a possibilidade de uma resposta imunológica, as células podem ser encapsuladas para evitar infiltração de tecidos adjacentes. Em concretizações adicionais, os materiais de encapsulação consistem tipicamente de membranas ou envelopes poliméricos semi-permeáveis biocompatíveis que permitem a liberação do produto(s) de proteína, mas impedem a destruição das células pelo sistema imunológico do paciente ou por outros fatores detrimen-
5
tais dos tecidos circundantes.

Em determinadas concretizações, a invenção abrange adicionalmente a administração de um anticorpo anti-IL-1R1 ou composição farmacêutica da invenção concorrentemente com uma ou mais outras drogas que são administradas ao mesmo paciente, sendo que cada droga é administrada de acordo com um regime vantajoso para aquele medicamento. Isto abrange pré-tratamento, tratamento simultâneo, tratamento sequencial e regimes alternantes. Exemplos de referidas drogas incluem, embora sem
10
15
limitação, antivirais, antibióticos, analgésicos, corticosteróides, antagonistas de citocinas inflamatórias, drogas anti-reumáticas modificadoras de doenças (DMARDs), e antiinflamatórios não-esteróides.

Em outras concretizações, um anticorpo anti-IL-1R1 ou composição farmacêutica da invenção pode ser administrada em combinação com outros inibidores de citocina, incluindo aqueles que antagonizam, por exemplo, RANKL, TGF β , IFN γ , IL-6 ou IL-8 e TNF, particularmente TNF α . Em combinação com IL-6, um anticorpo desta invenção pode ser usado para tratar e prevenir a recorrência de ataques, incluindo ataques induzidos por antagonismo de receptor de GABA $_A$, ataques associados com episódios ictais de EEG e ataques límbicos motores que ocorrem durante o *status epilepticus*. Em combinação com inibidor de IFN γ , um anticorpo desta invenção é útil para tratar fibrose pulmonar idiopática e fibrose cística. A combinação de um anticorpo de receptor de IL-1 e inibidores RANKL, por exemplo um
20
25

anticorpo RANKL é útil para prevenir destruição óssea em vários cenários incluindo, embora sem limitação, vários distúrbios reumáticos, osteoporose, mieloma múltiplo ou outras malignidades que causam degeneração óssea, ou terapia anti-tumor objetivada em prevenir metástase para o osso, ou destruição óssea associada com fragmentos de desgaste de prótese ou com periodontite. Adicionalmente, anticorpos da invenção podem ser administrados em combinação com inibidores de IL-17 referidas formas de um receptor de IL-17 (como IL-17R:Fc) ou um anticorpo de IL-17 ou anticorpo IL-17R, proteína de ligação de IL-18, formas solúveis de receptores de IL-18, e anticorpos IL-18, anticorpos contra receptores de IL-18 ou anticorpos contra ligando de CD30 ou contra CD4.

A invenção abrange adicionalmente métodos para utilização de um anticorpo anti-IL1R1 ou composição farmacêutica da invenção no tratamento dos distúrbios clínicos aqui divulgados em combinação com um inibidor de TNF, preferivelmente TNFR:Fc (ENBREL[®]) e qualquer combinação das citocinas e inibidores de citocina descritos acima que são agentes ativos em terapias de combinação. Por exemplo, de acordo com a presente invenção, é possível utilizar métodos de terapia de combinação para tratar artrite reumatóide, AVC, asma, psoríase, etc.

Condições tratadas efetivamente com um anticorpo anti-IL-1R1 ou composição farmacêutica aqui divulgados incluem doenças pulmonares, como asma, doença pulmonar obstrutiva crônica, proteinose alveolar pulmonar, fibrose e pneumopatia induzida com bleomicina, fibrose pulmonar induzida com radiação, fibrose cística, acúmulo de colágeno nos pulmões, e ARDS, sendo todas estas tratadas com combinações de um anticorpo para IL-1R e um inibidor de IL-4 e/ou inibidor de IL-13, por exemplo anticorpo de IL-4R que inibe atividade de IL-13 e IL-4. Os anticorpos e composições farmacêuticas da invenção divulgados também são úteis para tratar displasia bronco-pulmonar (BPD); doenças pulmonares

obstrutivas crônicas (por exemplo enfisema e bronquite crônica), e doença pulmonar fibrótica crônica de crianças prematuras. Adicionalmente, os compostos, composições e terapias de combinação da invenção são usados para tratar doenças ocupacionais do pulmão, incluindo asbestose, pneumoconiose do trabalhador do carvão, silicose ou condições semelhantes associadas com exposição prolongada a partículas finas. Em outros aspectos da invenção, os compostos, composições e terapias de combinação divulgados são usados para tratar pneumonia organizadora de *bronchioliterans*, fibrose pulmonar, incluindo fibrose pulmonar idiopática e fibrose pulmonar induzida por radiação; sarcoidose pulmonar; e alergias, incluindo rinite alérgica, dermatite de contato, dermatite atópica e asma.

Referidas combinações também são úteis para tratar pacientes que sofrem de vários distúrbios da pele, incluindo, embora sem limitar-se à *dermatitis herpetiformis* (doença de Duhring), dermatite atópica, dermatite de contato, urticária (incluindo urticária idiopática crônica), e doenças autoimunes formadoras de bolhas, incluindo *pemphigus vulgaris* e penfigóide buloso. Outras doenças tratáveis com a combinação de um anticorpo IL-1R e um inibidor de IL-4 e/ou IL-13 incluem *myesthenia gravis*, sarcoidose, incluindo sarcoidose pulmonar, escleroderma, artrite reativa, síndrome hiper IgE, esclerose múltipla e síndrome hipereosinófila idiopática. A combinação também é utilizada para tratar reações alérgicas a medicação e como um adjuvante na imunoterapia de alergias.

Os anticorpos de receptor de IL-1 e composições farmacêuticas aqui descritas são úteis para tratar doenças protozoárias, incluindo malária e esquistossomose e para tratar *erythema nodosum leprosum*; meningite bacteriana ou viral; tuberculose, incluindo tuberculose pulmonar; e pneumonite secundária a uma infecção bacteriana ou viral, incluindo infecção por influenza e mononucleose infecciosa.

Lesões e distúrbios cardiovasculares são tratáveis e/ou podem

ser prevenidos como descrito com composições farmacêuticas ou anticorpos anti-IL1-R1 sozinhos ou em combinação com outros inibidores de citocina. Distúrbios cardiovasculares que podem ser tratados incluem aneurismas aórticos; incluindo aneurismas aórticos abdominais, síndrome coronária aguda, arterite; oclusão vascular, incluindo oclusão arterial cerebral; complicações de cirurgia de *by-pass* coronário; lesão de reperfusão isquêmica; doença cardíaca, incluindo doença do coração aterosclerótico, miocardite, incluindo miocardite autoimune crônica e miocardite viral; falha cardíaca, incluindo falha cardíaca crônica, falha cardíaca congestiva, caquexia da falha cardíaca; infarto miocárdico; restenose e/ou aterosclerose após cirurgia cardíaca ou após procedimentos angioplásticos com balão na artéria carótida; isquemia miocárdial silente; disfunção da bomba ventricular esquerda, complicações pós-implantação de dispositivos auxiliares ventriculares esquerdos; fenômenos de Raynaud; tromboflebite; vasculite, incluindo vasculite de Kawasaki; doença veno-oclusiva, arterite de células gigantes, granulomatose de Wegener; confusão mental após cirurgia de *by-pass* cardiopulmonar, e púrpura de Schoenlein-Henoch.

Em determinadas concretizações, também é possível utilizar anticorpos anti-IL-1R1 e composições farmacêuticas da invenção para tratar condições de dor crônica, como dor pélvica crônica, incluindo prostatite crônica/síndrome da dor pélvica, e dor pós-herpética.

Distúrbios do sistema endócrino incluindo diabetes de início juvenil (inclui diabetes melito autoimune e tipos de diabetes dependentes de insulina) e diabetes de início na maturidade (inclui diabetes não-dependente de insulina e diabetes mediada com obesidade) também podem ser tratados com anticorpos anti-IL-1R1 ou composições farmacêuticas da invenção. Referido tratamento inclui condições secundárias associadas com diabetes, como retinopatia diabética, rejeição de transplante de rim em pacientes diabéticos, resistência à insulina mediada com obesidade, e falha renal, que,

por si só, pode ser associada com proteinúria e hipertensão. Outros distúrbios endócrinos também são tratáveis com estes compostos e incluem doença do ovário policístico, adrenoleucodistrofia ligada a X, hipotireoidismo e tireoidite, incluindo tireoidite de Hashimoto (isto é, tireoidite autoimune), disfunção das células da tireóide, incluindo síndrome da doença eutiróide.

Condições do sistema gastrointestinal são tratáveis ou podem ser prevenidas com anticorpos anti-IL-1-R1 ou composições farmacêuticas da invenção, sozinhos ou em combinação com outros terapêuticos. Estas condições incluem doença cólica, doença de Crohn; colite ulcerativa; gastroparese idiopática; pancreatite, incluindo pancreatite crônica; pancreatite aguda, doença do intestino inflamatório e úlceras, incluindo úlceras gástricas e duodenais.

Distúrbios do sistema genitourinário também são tratáveis ou podem ser prevenidos com anticorpos anti-IL-1R1 ou composições farmacêuticas aqui descritas. Referidos distúrbios incluem glomerulonefrite, incluindo glomerulonefrite autoimune, glomerulonefrite devida a exposição a toxinas ou glomerulonefrite secundária a infecções com estreptococos hemolíticos ou outros agentes infecciosos. Também é possível tratar com os compostos, composições e terapias de combinação da invenção a síndrome urêmica e suas complicações clínicas (por exemplo, falha renal, anemia, e cardiomiopatia hipertrófica), incluindo síndrome urêmica associada com exposição a toxinas ambientais, drogas e outras causas. Complicações que surgem de inflamação da parede da vesícula biliar que leva a alteração na função absorptiva são tratáveis ou podem ser prevenidas com os anticorpos desta invenção. Incluem-se complicações como colelitíase (cálculos na vesícula) e coliedocolitíase (cálculos nas vias biliárias) e a recorrência de colelitíase e coliedocolitíase. Condições adicionais tratáveis com os compostos, composições e terapias de combinação da invenção são complicações de hemodiálise; condições da próstata, incluindo hipertrofia

prostática benigna, prostatite não-bacteriana e prostatite crônica; e complicações de hemodiálise.

Também se proporciona aqui métodos de utilização de anticorpos anti-IL-1R1 da invenção, composições, e terapias de combinação para tratar diversos distúrbios hematológicos e oncológicos. Por exemplo, anticorpos anti-IL-1R1, sozinhos ou em combinação com outros inibidores de citocina ou outros agentes ativos como descritos acima, podem ser utilizados para tratar várias formas de câncer, incluindo leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crônica leucemia, carcinoma nasofaríngeo vírus-positivo, glioma, cânceres do colo, estômago, próstata, células renais, cervical e do ovário, câncer do pulmão (SCLC e NSCLC), incluindo caquexia associada com câncer, fadiga, astenia, síndrome paraneoplástica de caquexia e hipercalcemia. Tumores sólidos, incluindo sarcoma, osteossarcoma, e carcinoma, como adenocarcinoma (por exemplo, câncer da mama) e carcinoma de células escamosas também são tratáveis. Cânceres adicionais que podem ser tratados incluem câncer do esôfago, câncer gástrico, carcinoma da vesícula biliar, leucemia, incluindo leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crônica, leucemia mielóide, leucemia linfoblástica crônica ou aguda e leucemia de células peludas. Outras malignidades com potencial metastásico invasivo, incluindo mieloma múltiplo, podem ser tratadas com os compostos, composições e terapias de combinação em pauta.

Adicionalmente, os anticorpos anti-IL-1R1 divulgados podem ser usados para tratar anemias e distúrbios hematológicos, incluindo neutropenia idiopática crônica, anemia de doença crônica, anemia aplástica, incluindo anemia aplástica de Fanconi; púrpura trombocitopênica idiopática (ITP); púrpura trombocitopênica trombótica, síndromes mielodisplásticas (incluindo anemia refratária, anemia refratária com sideroblastos anelados, anemia refratária com excesso de blastos, anemia refratária com excesso de blastos em transformação); mielofibrose/metaplasia mielóide; e crise vaso-

oclusiva de células em forma de foice. Diversos distúrbios linfoproliferativos também são tratáveis com anticorpos anti-IL-1R1 da invenção, incluindo síndrome linfoproliferativa autoimune (ALPS), leucemia linfoblástica crônica, leucemia de células peludas, leucemia linfática crônica, linfoma de células T periféricas, linfoma linfocítico pequeno, linfoma de células de manto, linfoma folicular, linfoma de Burkitt, linfoma de células T positivo para vírus de Epstein-Barr, linfoma histiocítico, doença de Hodgkin, linfoma agressivo difuso, leucemias linfáticas agudas, doença linfoproliferativa T gama, linfoma de células B cutâneas, linfoma de células T cutâneas (isto é, fungóides da micose) e síndrome de Sezary.

Condições hereditárias, como doença de Gaucher, doença de Huntington, doença de IgA linear, e distrofia muscular podem ser tratadas com os anticorpos desta invenção.

Outras condições tratáveis ou que podem ser prevenidas com os anticorpos de receptor de IL-1 ou composições farmacêuticas incluem aquelas resultantes de lesões na cabeça ou medula espinhal, incluindo hematoma subdural devido a trauma na cabeça. Em conexão com esta terapia, as composições e combinações descritas são vantajosas para prevenir dano neurológico craniano e para prevenir e tratar cefaléia cervicogênica. As composições e combinações descritas também são adequadas para tratar efeitos colaterais neurológicos associados com irradiação do cérebro.

Anticorpos anti-IL-1R1 e composição farmacêutica da invenção também são úteis para tratar condições do fígado, como hepatite, incluindo hepatite alcoólica aguda, hepatite aguda viral ou induzida com droga, hepatite A, B e C, colangite esclerosante, epitélio sinusóide hepático, e inflamação do fígado devido a causas desconhecidas.

Distúrbios que envolvem perda de audição e que estão associados com expressão anormal de IL-1 podem ser tratados com os anticorpos anti-IL-1R1 ou composições farmacêuticas da invenção. Distúrbios

do tipo referido incluem perda de audição associada com nervo coclear que, como se considera, resulta de um processo autoimune, isto é, perda de audição autoimune. Também podem ser tratadas ou que podem ser prevenidas com os anticorpos anti-IL-1R1 ou composições farmacêuticas da invenção a

5 síndrome de Meniere e colesteatoma, um distúrbio do ouvido médio freqüentemente associado com perda de audição.

Distúrbios não-artríticos dos ossos e juntas e que também podem ser tratados com os anticorpos descritos aqui. Estes abrangem distúrbios de osteoclastos que levam à perda óssea, como embora sem limitação,

10 osteoporose, incluindo osteoporose da menopausa, osteoartrite, periodontite resultante de soltura ou perda dos dentes, e soltura de prótese após substituição de junta (geralmente associada com uma resposta inflamatória a fragmentos de desgaste). Esta última condição também é denominada "osteólise de implante ortopédico". Outra condição que pode ser tratada com

15 os compostos, composições e terapias de combinação da invenção é a disfunção da junta mandibular temporal (TMJ).

Os anticorpos anti-IL-1R1 ou composições farmacêuticas da invenção também podem ser usados para tratar distúrbios reumáticos incluindo artrite reumatóide adulta e juvenil; escleroderma; lúpus eritematoso

20 sistêmico; gota; osteoartrite; polimialgia reumática; espondiloartropatias soronegativas, incluindo espondilite anquilosante, e doença de Reiter, artrite psoriática e artrite de Lyme crônica. Os anticorpos desta invenção também são úteis para tratar inflamação do músculo voluntário e outros músculos, incluindo dermatomiosite, miosite de corpos de inclusão, polimiosite, e

25 linfangioleiomiomatose.

Outro uso para os anticorpos e composições farmacêuticas da invenção é o tratamento e/ou a prevenção de amiloidose primária e a amiloidose secundária que é característica de diversas condições incluindo doença de Alzheimer, amiloidose reativa secundária; síndrome de Down; e



amiloidose associada com diálise. Com os anticorpos ou composições farmacêuticas da invenção também é possível tratar síndromes da febre periódica herdada, incluindo febre Mediterrânea familiar, hiperimunoglobulina D e síndrome da febre periódica e síndromes periódicas associadas com receptor de TNF (TRAPS).

Em outras concretizações, os anticorpos ou composições farmacêuticas da invenção podem ser usados para tratar distúrbios envolvendo a pele ou membranas mucosas. Distúrbios do tipo referido incluem doenças acantolíticas, incluindo doença de Darier, queratose folicular e *pemphigus vulgaris*. Distúrbios de pele adicionais que podem ser tratados utilizando-se anticorpos da invenção incluem acne, acne rosácea, *alopecia areata*, estomatite aftosa, penfigóide buloso, *burns*, eczema, eritema, incluindo eritema multiforme e eritema multiforme *bullosum* (síndrome de Stevens-Johnson), doença de pele inflamatória, *lichen planus*, doença bulosa de IgA linear (dermatose bulosa crônica da infância), perda da elasticidade da pele, úlceras da superfície das mucosas, incluindo úlceras gástricas, dermatite neutrofílica (síndrome de Sweet), dermatomiosite, *pityriasis rubra pilaris*, psoríase, pioderma gangrenoso, reticulo-histiocitose multicêntrica, e necrólise epidérmica tóxica. Outras condições relacionadas com a pele que podem ser tratadas com as terapias e terapias de combinação da presente invenção incluem dermatite herpetiforme.

Distúrbios adicionais que podem ser tratados com os anticorpos ou composições farmacêuticas da invenção incluem doença enxerto-versus-hospedeiro, e complicações resultantes de transplante de órgãos sólidos, como coração, fígado, pele, rim, pulmão (obliteração das vias aéreas por transplante de pulmão) ou outros transplantes, incluindo transplantes de medula óssea.

Distúrbios oculares também podem ser tratados ou prevenidos com os anticorpos anti-IL-1R1 ou composições farmacêuticas descritos,

incluindo descolamento retinal regmatógeno, e doença inflamatória do olho, incluindo doença inflamatória do olho associada com o hábito de fumar e degeneração macular.

Anticorpos ou composições farmacêuticas da invenção, como descritos aqui, são úteis para tratar distúrbios que afetam o sistema reprodutivo feminino. Exemplos incluem, embora sem limitação, falha de implantes múltiplos/infertilidade; síndrome da perda fetal ou perda de embrião IV (aborto espontâneo); gravidezes pré-eclâmpticas ou eclampsia; endometriose, cervicite crônica, e parto prematuro.

Adicionalmente, os anticorpos ou composições farmacêuticas da invenção são úteis para tratar e/ou prevenir ciática, sintomas do envelhecimento, reações graves a drogas (por exemplo, toxicidade de IL-2 ou pneumopatia induzida com bleomicina e fibrose), ou para suprimir a resposta inflamatória antes, durante ou após a transfusão de células sanguíneas vermelhas alogênicas na cirurgia cardíaca ou outra cirurgia, ou no tratamento de uma lesão traumática em um membro ou junta, como lesão traumática do joelho. Diversos outros distúrbios clínicos tratáveis com os anticorpos anti-IL-1R1 ou composições farmacêuticas divulgados incluem: esclerose múltipla; síndrome de Behcet; síndrome de Sjogren; anemia hemolítica autoimune; beta talassemia; esclerose lateral amiotrófica (doença de Lou Gehrig); doença de Parkinson; associada com deficiências hereditárias, incluindo retardo mental ligado a X.

Adicionalmente, os anticorpos anti-IL-1R1 ou composições farmacêuticas da invenção são úteis para tratar lesões no sistema nervoso central (SNC), incluindo os efeitos de neurotransmissores neurotóxicos descarregados durante a excitação de inflamação no sistema nervoso central, e para inibir ou prevenir o desenvolvimento de cicatrizes gliais em sítios da lesão no sistema nervoso central. Em conexão com epilepsia e o tratamento de ataques apopléticos, reduzir a gravidade e o número de ataques apopléticos

a1

recorrentes, e reduzindo a gravidade dos efeitos deletérios de ataques apopléticos, reduzindo perda neuronal, degeneração neuronal, e gliose associada com ataques apopléticos.

Usos adicionais para os anticorpos ou composições farmacêuticas da invenção incluem, embora sem limitação, tratar miopatia e polineuropatia de doença crítica (CIPNM) polineuropatia aguda; anorexia nervosa; paralisia de Bell; síndrome da fadiga crônica; demência transmissível, incluindo doença de Creutzfeld-Jacob; neuropatia desmielinizante; síndrome de Guillain-Barre; doença de disco vertebral; síndrome da Guerra do Golfo; polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica, miastenia grave; isquemia cerebral silente; distúrbios do sono, incluindo narcolepsia e apnéia do sono; degeneração neuronal crônica; e AVC, incluindo doenças isquêmicas. Outros usos adicionais para os anticorpos da invenção são anorexia e/ou condições anoréxicas, peritonite, endotoxemia e choque séptico, formação de granuloma, ataque por intermação, síndrome de Churg-Strauss, inflamação crônica subsequente a infecções agudas, como tuberculose e lepra, esclerose sistêmica e cicatrização hipertrófica.

Em outras concretizações, proteínas de fusão de avidina compreendendo uma seqüência de aminoácidos de um dos anticorpos de IL-1R1 da invenção podem ser construídas para diversos fins. Proteínas de fusão de avidina podem ser geradas, por exemplo, utilizando-se um vetor de expressão mamífero contendo seqüência de cDNA codificando avidina de galinha recombinante adjacente a um sítio de clonagem múltiplo para inserção de um parceiro de fusão de gene-alvo específico. O vetor pode incluir uma seqüência de avidina com sua seqüência-sinal endógena para permitir secreção de parceiros de genes de fusão distintos que não contêm naturalmente seqüências-sinal. A proteína de fusão expressa pelo vetor apresenta um marcador de proteína avidina na porção N-terminal do parceiro

de fusão. A estratégia de fusão como descrita aqui apresenta a capacidade de secretar proteínas que normalmente são expressas intracelularmente, como genes de transdução de sinal ou receptores de hormônios nucleares.

Alternativamente, é possível utilizar um vetor que codifica avidina sem sua sequência-sinal endógena, que resultará na marcação C-terminal de parceiros de proteína de fusão. Uma fusão de avidina C-terminal também permite secreção de proteína com base na sequência-sinal endógena do parceiro de fusão. Uma estratégia do tipo referido pode ser aplicada de forma a permitir o correto processamento e dobragem da proteína ou para determinar a validade de uma sequência-sinal proposta. Adicionalmente, o vetor pode compreender uma sequência curta de nucleotídeos codificando uma sequência de aminoácidos, que pode atuar como um substrato clivável específico para enzima, entre a avidina e sequências de parceiro de fusão. Referidas sequências cliváveis com enzima permitem a separação do parceiro de fusão da avidina para fins de purificação ou liberação de proteína.

É possível utilizar proteínas de fusão de avidina da invenção, por exemplo, na seleção de anticorpos, caracterização funcional (determinação da utilidade de um anticorpo como um agonista ou antagonista, agente neutralizador, etc.), mapeamento de epitopo, ou estratégias de imunização. Fusões de avidina de uma proteína-alvo também podem ser utilizadas em formatos de ensaios farmacocinéticos, de eficácia ou outro ensaio convencional, projetados para testar amostras pré-clínicas ou amostras clínicas de pacientes quanto à presença do anticorpo terapêutico em amostras de sangue, urina, ou outros tecidos. Parceiros de fusão de proteína avidina podem ser preparados como sequências truncadas ou de comprimento pleno, domínios estruturais isolados específicos, ou como sequências quiméricas com outros homólogos do parceiro de fusão de outras espécies.

Proteínas de fusão de avidina podem ser expressas utilizando-se meios convencionais de introduzir genes em células, como descrito aqui e

conhecido na técnica. As proteínas podem ser expressas, por exemplo, em células 293 ou CHO transfetando-se as células com uma construção de fusão de avidina em uma solução de lipídeos, como na Lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA).

5 Meios condicionados e/ou lisados de células de células expressando as proteínas de fusão podem ser coletados e aplicados sobre um substrato de ensaio, como pérolas de poliestireno revestidas com biotina ou placas ELISA revestidas com biotina. A coleta do meio condicionado e/ou lisado de células pode ser realizada em um momento que permite expressão

10 ótima da proteína de fusão. O momento pode ser determinado experimentalmente por aqueles com prática na técnica, porém usualmente é de cerca de 48 horas após a transfecção. Proteínas de fusão também podem ser analisadas na membrana celular ou intracelularmente quanto à expressão e funcionalidade na ligação de ligandos, receptores, ou anticorpos conhecidos.

15 Proteínas de fusão de avidina da invenção podem ser analisadas por meio de qualquer método conhecido ou previamente caracterizado que utiliza interações de biotina-avidina. Referidos métodos incluem, embora sem limitação, citometria de fluxo e microscopia/formação de imagem fluorescente. Por exemplo, fusões de avidina expressas em meios

20 ou lisados de células podem ser aplicadas sobre pérolas revestidas com biotina e manchadas com um anticorpo anti-avidina marcado fluorescentemente para indicar nível de expressão. Também é possível aplicar anticorpos fluorescentes que reconhecem o parceiro de fusão de proteína específico em um formato multicolorimétrico. Adicionalmente, anticorpos

25 não-marcados específicos para o parceiro de fusão de proteína podem ser aplicados simultaneamente com anticorpos marcados fluorescentemente em um ensaio de competição.

Em determinadas concretizações, a invenção proporciona métodos para mapear epítopos utilizando proteínas de fusão de avidina. Um

exemplo de um método de mapeamento de epitopos da invenção é proporcionado abaixo no que se refere ao mapeamento de epitopos para anticorpos anti-IL-1R1. No entanto, alguém com prática na técnica reconhecerá que referidos métodos podem ser aplicados facilmente no mapeamento de epitopos para qualquer anticorpo e não se limita a anticorpos anti-IL-1R1. Por exemplo, cDNA que codifica avidina de galinha (com seqüência-sinal endógena) pode ser conjugado à ponta 5' de cDNAs que codificam uma proteína de interesse (isto é uma proteína que é reconhecida por anticorpos para os quais se deseja a determinação de um epitopo) fundida a uma seqüência FLAG-etiqueta na ponta 3'. Os genes de fusão marcados com FLAG podem ser montados em um vetor de expressão utilizando-se técnicas moleculares convencionais. É possível gerar, com o uso de técnicas convencionais, um quadro de proteínas de avidina mutantes marcadas com FLAG em que determinados aminoácidos foram substituídos (por exemplo, com radicais de aminoácidos correspondentes de outras espécies animais). As proteínas mutantes e de tipo selvagem podem ser expressas em células hospedeiras e a ligação das proteínas mutantes ou de tipo selvagem com um anticorpo de interesse pode ser detectada utilizando-se, por exemplo, análise de *Western blot* ou ensaios de ligação à base de pérolas, como descrito aqui. Assim, é possível definir um epitopo determinando-se quais substituições nas proteínas mutantes destroem a ligação com o anticorpo de interesse.

EXEMPLOS

Os exemplos a seguir, incluindo os experimentos conduzidos e os resultados obtidos são proporcionados apenas para fins ilustrativos e não devem ser interpretados como limitando a invenção.

Exemplo 1

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

Camundongos HuMab transgênicos

Anticorpos monoclonais totalmente humanos para receptor tipo 1 de IL-1 (IL-1R1) foram preparados utilizando-se a cepa HCo7 de camundongos transgênicos, que expressa genes de anticorpo humano. Em cada uma destas cepas de mouse, o gene endógeno de cadeia leve kappa de camundongo foi disrompido homozigoticamente como descrito em Chen *et al.* (1993, EMBO J. 12:811-820), e o gene endógeno de cadeia pesada de camundongo foi disrompido homozigoticamente como descrito no Exemplo 1 da Publicação de Pedido de Patente Internacional No. WO 01/09187 (incorporado por referência). Cada uma destas cepas de camundongo porta um transgene de cadeia leve kappa humana, KCo5, como descrito em Fishwild *et al.* (1996, Nature Biotechnology 14:845-851). A cepa HCo7 porta o transgene de cadeia pesada humana de HCo7 como descrito nas patentes dos E.U.A. nums. 5,545,806; 5,625,825; e 5,545,807 (incorporadas por referência). A cepa HCo7 é referida aqui como camundongos HuMab.

Imunizações de HuMab

Para gerar anticorpos monoclonais totalmente humanos para IL-1R1, camundongos HuMab foram imunizados com IL-1R1 recombinante purificado derivado de células de inseto ou mamíferas (por exemplo, células CHO) como antígeno. Esquemas gerais de imunização para camundongos HuMab encontram-se descritos em Lonberg *et al.* (1994, Nature 368:856-859; Fishwild *et al.*, *supra*; e Publicação de Pedido de Patente Internacional No. WO 98/24884, cujos ensinamentos são incorporados por referência). Camundongos tinham 6-16 semanas de idade quando da primeira infusão de antígeno. Uma preparação recombinante purificada (25-50 µg) de antígeno de IL-1R1 (por exemplo, purificada de células de inseto ou mamíferas transfectadas expressando IL-1R1) foi usada para imunizar os camundongos HuMab intraperitonealmente (IP) ou subcutaneamente (Sc).

Imunizações de camundongos HuMab transgênicos foram obtidas utilizando-se antígeno em adjuvante de Freund completo e duas

injeções, seguido de 2-4 semanas de imunização IP (até um total de 11 imunizações) com o antígeno em adjuvante de Freund incompleto. Várias dúzias de camundongos foram imunizadas para cada antígeno. Um total de 149 camundongos da cepa HCo7 foram imunizados com IL-1R1. A resposta imunológica foi monitorada por meio de sangrias retroorbitais.

Para selecionar camundongos HuMab produzindo anticorpos que se ligam a IL-1R1, soros de camundongos imunizados foram testados por meio de ELISA como descrito por Fishwild *et al.*, *supra*. Em resumo, placas de microtitulação foram revestidas com IL-1R1 purificado recombinante de células de inseto ou mamíferas a 1-2 pg/ml em PBS e 50 pl/poço incubadas a 4°C de um dia para o outro, depois bloqueadas com 200 pl/poço de soro de galinha a 5 % em PBS/Tween (0,05 %). Diluições de plasma de camundongos imunizados com IL-1R1 foram adicionadas em cada poço e incubadas durante 1-2 horas à temperatura ambiente. As placas foram lavadas com PBS/Tween e depois incubadas com um reagente policlonal específico para Fc de IgG anti-humana de cabra conjugado com peroxidase de rabanete (HRP) durante 1 hora à temperatura ambiente. Placas foram lavadas com PBS/Tween e incubadas com um reagente policlonal específico para Fc de IgG anti-humana de cabra conjugado com peroxidase de rabanete (HRP) durante 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem, as placas foram reveladas com substrato ABTS (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, número de catálogo nº A-1888, 0,22 mg/ml) e analisadas espectrofotometricamente a uma OD [densidade óptica] de 415-495. Utilizou-se camundongos com titulações suficientes de imunoglobulina humana anti-IL-1R1 para produzir anticorpos monoclonais como descrito abaixo.

Geração de hibridomas produzindo anticorpos monoclonais humanos para IL-1R1

Camundongos foram preparados para produção de anticorpos monoclonais por meio de reforço com antígeno intravenosamente 2 dias antes

do sacrifício, e removeu-se os baços em seguida. Os esplenócitos de camundongo foram isolados dos camundongos HuMab e fundidos com PEG a uma linha de células de mieloma de camundongo utilizando-se protocolos convencionais. Tipicamente, realizou-se 20-30 fusões para cada antígeno.

5 Em resumo, suspensões de células simples de linfócitos esplênicos de camundongos imunizados foram fundidas a uma quarta parte do número de células de mieloma de camundongo não-secretadoras P3X63-Ag8.653 (A.T.C.C., Número de acesso CRL 1580) ou células de mieloma de camundongo não-secretadoras SP2/0 (A.T.C.C., CRL 1581) com 50 % de
10 PEG (Sigma). Células foram plaqueadas a aproximadamente 1×10^5 /poço em placas de microtitulação de fundo plano, seguido de uma incubação de cerca de duas semanas em meio seletivo contendo 10 % de soro bovino fetal, 10 % de meio condicionado P388D1- (A.T.C.C., Número de acesso CRL TIB-63), 3-5 % de origem (IGEN) em DMEM (Mediatech, número de catálogo CRL
15 10013, com alto teor de glucose, L-glutamina e piruvato de sódio) mais 5 mM de HEPES, 0,055 mM de 2-mercaptoetanol, 50 mg/ml de gentamicina e 1×10^{-6} M de HAT (Sigma, número de catálogo CRL P-7185). Após 1-2 semanas, células foram cultivadas em meio em que o HAT foi substituído por HT.

Os hibridomas resultantes foram selecionados quanto à
20 produção de anticorpos específicos para antígeno. Poços individuais foram selecionados por meio de ELISA (descrito acima) quanto a anticorpos de IgG monoclonais anti-IL-1R1 humanos. Assim que ocorreu crescimento extensivo de hibridoma, meio foi monitorado, usualmente após 10-14 dias. Hibridomas secretadores de anticorpos foram replaqueados, novamente selecionados e, se
25 ainda positivos para IgG humana, anticorpos monoclonais anti-IL-1R1 foram subclonados pelo menos duas vezes com diluição limitante. Os subclones estáveis foram então cultivados *in vitro* para gerar pequenas quantidades de anticorpo em meio de cultura de tecido para caracterização.

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

Utilizou-se um ensaio ELISA como descrito acima para selecionar hibridomas que apresentaram reatividade positiva com imunógeno de IL-1R1. Hibridomas que secretam um anticorpo monoclonal que se ligaram com alta avidéz a IL-1R1 foram subclonados e adicionalmente caracterizados. Selecionou-se um clone de cada hibridoma que conservou a reatividade de células parentais (como determinado por meio de ELISA) para a preparação de um banco de células de 5-10 frascos armazenados em nitrogênio líquido.

Realizou-se um ELISA específico para isótipo para se determinar o isótipo dos anticorpos monoclonais produzidos como divulgado aqui. Nestes experimentos, poços de placas de microtitulação foram revestidos com 50 µl/poço de uma solução de 1 µg/ml de cadeia leve kappa anti-humana de camundongo em PBS e incubados a 4°C de um dia para o outro. Após bloqueio com 5 % de soro de galinha as placas foram reagidas com sobrenadante de cada anticorpo monoclonal testado e um controle de isótipo purificado. Placas foram incubadas à temperatura ambiente durante 1-2 horas. Os poços foram então reagidos com anti-soros policlonais anti-humanos de cabra conjugados com peroxidase de rabanete específicos para IgG1, IgG2 ou IgG4 humana e placas foram reveladas e analisadas como descrito abaixo.

Anticorpos monoclonais de sobrenadantes de hibridoma que apresentaram ligação significativa com IL-1R1 como detectado por ELISA foram testados adicionalmente quanto à atividade biológica utilizando-se ensaios de ligação *in vitro* e ensaios à base de condrócitos humanos e de células sanguíneas integrais. Os anticorpos que apresentaram a melhor atividade foram denominados 15C4, 26F5, 27F2, 24E12, e 10H7. Os anticorpos foram submetidos a um experimento de triagem preliminar de epitopos. Placas ELISA foram revestidas com sIL-1R1 humana (1+2+3 domínio), sIL-1R1 humana truncada (1+2 domínio), sIL-1R1 de rato, sIL-1R



tipo II humana, e ovalbumina (controle negativo). A ligação de anticorpo foi detectada com um anticorpo Fe anti-humano conjugado com peroxidase de rabanete (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Os resultados encontram-se resumidos na Tabela 2. Uma marca de verificação ($\sqrt{}$) na Tabela 2 representa um resultado positivo para ligação; "X" representa um resultado negativo. Anticorpos 15C4, 26F5, 27F2 e 24E12 ligam-se apenas a proteína IL-1R1 que apresenta todos os três domínios extracelulares, indicando que os epitopos para cada um enquadram-se no terceiro domínio. Anticorpo 10H7 liga-se ao IL-1R1 de domínio extracelular de comprimento pleno e também a uma proteína truncada que só apresenta domínios 1 e 2, demonstrando que o epitopo para este anticorpo situa-se no domínio 1 ou 2. Nenhum dos anticorpos testados apresenta reatividade cruzada com o receptor tipo II humano ou com IL-1R1 de rato.

Tabela 2

Anticorpo	OA (Controle negativo)	Hu sIL-1R1 (1+2+3 Domínio)	Hu sIL-1 RI (1+2 Domínio)	Hu sIL-1 RI I (1+2+3 Domínio)	Rat sIL-1R1 (1+2+3 Domínio)
15C4	X	$\sqrt{}$	X	X	X
26F5	X	$\sqrt{}$	X	X	X
27F2	X	$\sqrt{}$	X	X	X
24E12	X	$\sqrt{}$	X	X	X
10H7	X	$\sqrt{}$	$\sqrt{}$	X	X

Exemplo 2

Inibição *in vitro* da formação de complexo de receptor tipo 1 de IL-1 por meio de anti-IL-1R1

Anticorpos

A capacidade dos anticorpos em inibir os eventos de ligação extracelulares requerida para sinalização de IL-1 foi avaliada com proteínas recombinantes *in vitro* em um ensaio em que a ligação de IL-1 a IL-1R resulta em formação de um sítio de ligação com alta afinidade por IL-1RAcP. A ligação de IL-1RAcP a IL-1R ligado a IL-1 (referida como uma "formação de complexo") é medida da maneira descrita a seguir. Proteínas recombinantes

foram incubadas em ensaios de ligação em placas de microtitulação na ausência (controle) ou na presença de anticorpos. Valores de IC_{50} foram derivados de comparações de valores de controle com valores obtidos na presença de anticorpo a concentrações entre 10 fM e 1 μ M. Em resumo, o

5 ensaio foi conduzido como a seguir. IL-1R1 biotinilada e pérolas revestidas com estreptavidina (Dyna, Dynabeads M-28) foram colocadas em placas de microtitulação. Adicionou-se então anticorpo nos poços apropriados em uma diluição serial que cobre uma ampla faixa de concentrações. Adicionou-se IL-1 β ou IL-1 α a uma concentração de 1 nM, e adicionou-se IL1RAcP marcado

10 com rutênio (preparado com NHS-Etiqueta (IGEN) de acordo com protocolos da IGEN) a uma concentração final de 5 nM. Após incubação durante 1 hora à temperatura ambiente, a reação de ligação foi analisada com um instrumento ORIGINTM 1,5 ou um instrumento M8 (IGEN International Inc.). A ligação de IL-1RAcP a IL-1R1 ligado a IL-1 foi determinada detectando-se o sinal de

15 eletroquimioluminescência associado com as pérolas ligadas a IL-1R1. A redução de sinal resultante da competição de anticorpos da ligação de IL-1 ou IL-1RAcP foi calculada como percentual de sinal de ECL para ligação máxima (nenhuma competição).

A curva de resposta de inibição para cada anticorpo nestes

20 ensaios de ligação foi estabelecida e derivou-se as IC_{50} s utilizando o *software* PRISMTM. Os resultados para inibição de eventos de ligação induzidos com IL-1 β são ilustrados com o gráfico na Figura 12. Os valores de IC_{50} para inibição da formação de complexo são mostrados na Tabela 3 abaixo. Anticorpos 15C4, 26F5, 27F2, e 24E12 inibem fortemente a formação de

25 complexo. Estes anticorpos são todos ligando de terceiro domínio de IL-1R1, como descrito acima. Anticorpo 10H7 pertence a uma classe de anticorpos que se liga a uma construção do IL-1R que não apresenta o terceiro domínio. 10H7 é um inibidor menos potente de ligação impelida por IL-1 de IL-1RAcP do que os ligandos de terceiro domínio. A inibição da formação de complexo

pelos anticorpos da invenção foi comparada com a inibição por IL-1ra. Os ligandos de terceiro domínio demonstraram capacidade semelhante ou ligeiramente maior de inibir formação de complexo em comparação com IL-1ra.

5 Figura 13 ilustra a capacidade do anticorpo 15C4 em inibir formação de complexo IL-1R1/IL-1 α /RAcP. A IC₅₀ para formação de complexo IL-1R1/IL-1 α /RAcP foi de 43 pM.

Tabela 3

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

Exemplo 3

10 **Anticorpos anti-IL-1R1 inibem ligação de IL-1 β e IL-1ra ao Receptor**

A capacidade de anticorpos anti-IL-1R1 de inibir ligação de IL-1 β ou IL-1ra a IL-1R1 foi avaliada em um ensaio com proteínas recombinantes. A mistura de reação continha 0,1 mg/ml de estreptavidina Dynabeads M-280 (Dyna) e 1 nM de IL-1R1 biotinilado. Adicionou-se anticorpos a concentrações de 320 nM a 0,3 nM. A adição de IL-1 β (5 nM) marcada com rutênio ou IL-1ra (1 nM) iniciou a ligação que prosseguiu durante 1 hora à temperatura ambiente. As misturas de reação foram medidas como acima utilizando-se um instrumento ORIGENTM 1,5 ou M8 (IGEN International Inc.). A competição foi calculada como o percentual de sinal de ECL para ligação máxima (nenhuma competição). Anticorpos 15C4, 26F5, e 27F2, os anticorpos mais potentes, bloqueiam ligação do ligando (IL-1 β) com o receptor, mas não interferem significativamente com a ligação de IL-1ra em comparação com IgG de controle. Em contraste, anticorpo 24E12 liga-se a receptor mas não bloqueia a ligação de IL-1 β ou IL-1ra com o receptor. Assim, o anticorpo 24E12 representa uma classe única de ligandos de terceiro domínio distinta da classe representada por 15C4, 26F5, e 27F2. Anticorpo

10H7 inibe ambos, IL-1 β e IL-1ra, de se ligarem ao receptor. Os resultados encontram-se resumidos na Figura 14.

Exemplo 4

Ensaaios com condrócitos e sangue integral humano

5 Condrócitos humanos primários (Cell Applications Inc., San Diego, CA) foram semeados em placas de 96 poços a uma densidade de 10.000 células/poço em meio DMEM contendo 1 % de FBS e 1 % de Pen Strep (GIBCO). Células foram deixadas recuperando de um dia para o outro antes da adição de anticorpos anti-IL1-RI a concentrações abrangendo de 10
10 nM a 0,1 pM durante 20 minutos. Adicionou-se IL-1 β a uma concentração de 1 pM ($\sim$ EC₅₀) e sobrenadantes de cultura foram colhidos após 16 horas de incubação a 37°C. Níveis de IL-6 no sobrenadante foram medidos utilizando-se um ELISA (Pierce-Endogen, Rockford, IL, nº de catálogo EH2IL-65) de acordo com as instruções do fabricante. A curva de resposta de inibição para
15 cada anticorpo da invenção nos ensaios à base de células foi estabelecida e valores de IC₅₀ foram derivados utilizando-se programa PRISM™. Anticorpos 15C4, 26F5, e 27F2 são inibidores potentes de sinalização de IL-1 em comparação com IL-1ra (Figura 15A). Anticorpos 24E12 e 10H7 são marcadamente menos potentes do que 15C4 e 27F2 (Figura 15B). Os valores
20 de IC₅₀ para inibição da produção de IL-6 induzida por IL-1 β condrócitos humanos são mostrados nas Tabelas 4A e 4B (correspondendo à Figura 15A e 15B respectivamente).

 Anticorpos monoclonais anti-IL-1R1 15C4, 26F5, e 27F2 foram pré-incubados durante 40-60 minutos com sangue integral humano
25 coletado de voluntários normais em recipientes a vácuo com heparina de sódio. Os ensaios foram realizados como a seguir: 100 μ l de sangue recentemente isolado foram repartidos em poços de uma placa de 96 poços. Adicionou-se 50 μ l de anticorpo em meio RPMI contendo 10 % de soro AB humano. Em seguida, adicionou-se IL-1 β a uma concentração de 30 pM

(EC₅₀). Sobrenadantes de cultura foram coletados após 18 horas, e níveis de IL-6 no sobrenadante foram medidos utilizando-se um ELISA. Como um controle, IL-Ira foi pré-incubada durante 40-60 minutos com sangue integral e mediu-se a produção de IL-6 como acima. Os três anticorpos anti-IL-1R1 bloquearam a atividade de IL-1 com potência comparável àquela de IL-Ira (Figura 16). Os valores de IC₅₀ para inibição da produção de IL-6 induzida por IL-1 em sangue integral humano são mostrados na Tabela 5.

Tabela 4A

IC ₅₀	Anticorpos anti-IL-1R1 humanos			rIL-Ira
	15C4	27F2	26F5	
	limites de confiabilidade de 95 %	16 pM	32 pM	26 pM
	15 pM a 18 pM	21 pM a 49 pM	19 pM a 36 pM	22 pM ao 46 pM

Tabela 4B

IC ₅₀	Anticorpos anti-IL-1R1 humanos				rIL-ra
	15C4	27F2	10H7	24E12	
	limites de confiabilidade de 95 %	7 pM	28 pM	7,5 pM	NA
	5,8 pM a 7,9 pM	22 pM a 35 pM	5,6 nM a 10 nM	NA	17 pM a 23 pM

Tabela 5

Doador	Parâmetros de análise	15C4	26F5	27F2	IL-Ira
	IC ₅₀	126 pM	410 pM	249 pM	241 pM
1047	limites de confiabilidade de 95 %	47 pM a 339 pM	213 pM a 790 pM	88 pM a 703 pM	124 pM a 471 pM
1319	IC ₅₀	111 pM	174 pM	579 pM	381 pM
	limites de confiabilidade de 95 %	59 pM a 208 pM	60 pM a 501 pM	249 pM a 1,3 nM	167 pM a 875 pM
Composto	IC ₅₀	126 pM	372 pM	387 pM	264 pM
(Dados combinados)	limites de confiabilidade de 95 %	62 pM a 255 pM	187 pM a 739 pM	202 pM a 748 pM	134 pM a 517 pM

Exemplo 5**Mutagênese e mapeamento de epitopos**

Mutagênese direcionada para sítio (Altered Sites® *in vitro* Mutagenesis System, Promega, Madison WI) de IL-1R1 foi usada para preparar um quadro de proteínas mutantes ("muteínas") em que radicais de

aminoácidos de rato foram substituídos pela sequência humana correspondem. Construiu-se quinze plasmídeos mutados diferentes (ver barras numeradas na Figura 17). Plasmídeos que codificam estas proteínas substituídas e o IL-1R1 parental foram transfectados transientemente em células CHO. Gerou-se transfectantes falsos como controles negativos. Meio condicionado (CM) destas células foi concentrado ~20 vezes utilizando-se colunas de concentração Centriprep 10 (Amicon). A expressão das muteínas foi avaliada por meio de SDS-PAGE e *Western blotting*. Treze proteínas mutantes foram expressas em níveis que permitiram avaliação da ligação de anticorpo. As proteínas foram carregadas sobre um gel, submetidas a eletroforese e transferidas para membranas. As membranas foram bloqueadas em 1 % de leite em PBS, 0,1 % de Tween-20 e depois incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente com anticorpos anti-IL-1R 15C4, 27F2, ou 24E12 a 0,5 ug/ml em PBS, 0,1 % de Tween-20. Após lavagem, membranas foram incubadas com IgG-Fc-HRP anti-humano de cabra. O sinal foi detectado utilizando-se substrato de quimioluminescência (ECL) (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Sequências específicas para humanos críticas para ligação de anticorpo foram identificadas como aquelas que, quando substituídas por sequências de rato, reduziram ou eliminaram sinal de ECL.

Reconhecimento com 15C4 de mutantes 1, 2, 4 e 10 foi prejudicado quando comparado com 24E12 (Figura 18, quadro superior). De forma semelhante, a ligação de 27F2 com mutantes 1, 2 e 4 foi prejudicada (Figura 18, quadro do meio). 24E12 não apresentou ligação significativa com mutantes 12, 13, 14 e 15 (Figura 18, quadro inferior).

Isolamento e caracterização de anticorpos anti-IL-1R1 humanos identificou três classes distintas de anticorpos competitivos (Figura 19). Os inibidores mais fortes de atividade biológica de IL-1, como demonstrado por bio-ensaios à base de células, são aqueles anticorpos que se ligam ao terceiro domínio de IL-1R1 e previnem associação com IL-1- β .

Experimentos de mapeamento de epitopos utilizando um quadro de proteínas mutantes de terceiro domínio demonstrou que esta classe de anticorpos, que inclui 15C4, 27F2 e 26F5, compartilha um epítipo conformacional que se superpõe, mas que não é idêntico. Figuras 20 e 21 ilustram a posição de epitopos 15C4 no terceiro domínio do receptor de IL-1, em um diagrama de faixas de receptor de IL-1 ligado com IL-1ra (Schreuder *et al.*, 1997, Nature 386:194-200). Os radicais de receptor de IL-1 que definem ligação da classe de anticorpos mais potente são ilustrados em cinza. Estes anticorpos demonstraram potência superior, e, assim, estes epitopos definem sítios de ligação para anticorpos de uma classe superior. Os sítios de ligação de 15C4 e 27F2 sobrepõem-se mas não são idênticos, conforme determinado pela análise mutacional dos 15 sítios diferentes dentro de IL-1R1 descrito acima. Os sítios são ilustrados na Figura 17 como barras numeradas acima da sequência de proteína. Sítios críticos de interação parecem encontrar-se em mutações nos sítios 1 (LSDIA; SEQ ID NO: 41), 2 (VIDE; SEQ ID NO: 42), 4 (YSV) e 10 (TCFA; SEQ ID NO: 43). Sítios de ligação de 15C4 e 27F2 encontram-se compreendidos nos sítios 1 e 2, porque a substituição dos radicais de rato pelos radicais humanos em qualquer sítio elimina a ligação. 27F2 difere de 15C4 pelo fato de que alterações no sítio 4 eliminam completamente sua ligação, enquanto que a ligação com 15C4 é reduzida, porém não completamente eliminada. Mutation 10 também reduz ligação com 15C4, porém 27F2 não apresenta interação óbvia com este sítio. Examinação da estrutura cristalina revela que estes radicais definem uma face do terceiro domínio que é orientada no sentido do espaço ocupado por ligando ligado (Figuras 20 e 21) (Vigers *et al.*, 1997, Nature 386:190-194).

A segunda classe de anticorpos identificada, representada por 10H7, não precisa do terceiro domínio para ligação, e, diferentemente da classe preferida, inibe ligação com IL-1ra. Esta classe é ativa em bio-ensaios, porém é menos potente do que a classe preferida.

Em contraste com a forte inibição de bio-ensaios de IL-1 com a classe preferida de anticorpos, 24E12 é um inibidor efetivo em bio-ensaios. Anticorpo 24E12 inibe a ligação de IL-1RAcP com IL-1R ligado com IL-1. O epitopo para esta classe de anticorpos, definida pelos mutantes 12, 13, 14 e 15, é proximal relativamente ao domínio de transmembrana de IL-1R1, e encontra-se numa região não diretamente envolvida em ligação com IL-1 ou IL-1ra (Figura 22).

Exemplo 6

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

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

As cadeias leves para três hibridomas expressando anticorpos monoclonais que ligam α IL-1R1, 15C4, 27F2, e 26F5 foram clonadas no vetor de expressão de células mamíferas pDSR α 19 (ver Pedido Internacional, Publicação nº WO 90/14363, que é incorporado aqui por referência para qualquer fim). A construção do plasmídeo que codifica a cadeia leve kappa de 15C4 é descrita aqui explicitamente; a clonagem da outra espécie de cadeia leve foi realizada utilizando-se procedimentos semelhantes. A região variável de cadeia leve kappa de α IL-1R1 foi obtida utilizando-se métodos de amplificação com reação em cadeia de polimerase (PCR) de cDNA de primeiro filamento preparado a partir de RNA total de 15C4 hibridoma de α IL-1R1 utilizando-se reagente TRIzol® (Invitrogen). cDNA de primeiro filamento foi sintetizado utilizando-se um iniciador randômico com um adaptador de extensão (5'- GGC CGG ATA GGC CTC CAN NNN NNT -3'; SEQ ID NO: 44) e 5' RACE (amplificação rápida de pontas de cDNA) foi realizada utilizando-se o kit GeneRacer™ (Invitrogen). No caso da cadeia leve completa, o iniciador *forward* foi o iniciador embutido GeneRacer™ (5'- GGA CAC TGA CAT GGA CTG AAG GAG TA -3'; SEQ ID NO: 45) e o iniciador invertido foi 5'- GGG GTC AGG CTG GAA CTG AGG -3' (SEQ ID NO: 46). Os produtos de RACE foram clonados em pCR4-TOPO

(Invitrogen) e determinou-se as seqüências de DNA. Utilizou-se a seqüência de DNA *consensus* da cadeia kappa de 15C4 para projetar iniciadores para amplificação com PCR da cadeia de anticorpo de comprimento pleno. O iniciador de PCR de kappa a 5' codificou a ponta amino da seqüência-sinal, um sítio de enzima de restrição *XbaI*, e uma seqüência Kozak otimizada (5'-CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC CAT GTC GCC ATC ACA ACT CAT TGG G -3'; SEQ ID NO: 47). O iniciador a 3' codificou a ponta carboxila e códon de terminação, e também um sítio de restrição *SalI* (5'-CTT GTC GAC TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCT C -3'; SEQ ID NO: 48).

5' α IL-1R1 15C4 iniciador kappa (SEQ ID NO: 47):

5'- CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC CAT GTC GCC ATC ACA ACT
 XbaI Kozak M S P S Q L
 CAT TGG G -3'

I G (SEQ ID NO: 49)

3' α IL-1R1 15C4 iniciador kappa (SEQ ID NO: 48):

5'- CTT GTC GAC TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCT C -3'
 SalI * C E G R N F S (SEQ ID NO: 50)

O clone de cadeia kappa de 15C4 de α IL-1R1 de comprimento pleno foi obtido utilizando-se um pCR4: clone de kappa de 15C4 por meio de amplificação com PCR com os iniciadores de kappa de 15C4 de α IL-1R1 a 5' e 3'. A reação PCR gerou um produto de 733 pares de bases codificando o 233 radicais de aminoácidos (incluindo a seqüência-sinal de cadeia kappa com 19 aminoácidos) da cadeia kappa de 15C4 de α IL-1R1. O produto de PCR foi purificado utilizando-se um kit de purificação de PCR QIAquick (Qiagen número de catálogo 28104), cortado com *XbaI* e *SalI*, isolado com gel e purificado utilizando-se um kit de extração em gel QIAquick (Qiagen número de catálogo 28704). Este fragmento de PCR contendo a cadeia kappa

de 15C4 de α IL-1R1 completa foi então ligada no vetor de expressão mamífero pDSR α 19. O clone de expressão da cadeia kappa de 15C4 teve o DNA seqüenciado para confirmar que codificou o mesmo peptídeo que foi identificado no hibridoma de 15C4. O vetor de expressão final, pDSR α 19:15C4 kappa tem 5468 pares de bases e contém as sete regiões funcionais descritas na Tabela 6.

Tabela 6

Quantidade de pares de bases do plasmídeo:

2 a 881	Um sinal de poliadenilação/terminação de transcrição da subunidade α do hormônio de glicoproteína pituitária bovina (α -FSH) (Goodwin <i>et al.</i> , 1983, Nucleic Acids Res. 11:6873-82; Genbank Accession Number X00004)
882 a 2027	Um minigene de diidrofolato redutase (DHFR) de camundongo contendo o promotor DHFR endógeno de camundongo, as seqüências codificadoras de cDNA, e os sinais de poliadenilação/terminação de transcrição de DHFR (Gasser <i>et al.</i> , 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6522-6; Nunberg <i>et al.</i> , 1980, Cell 19:355-64; Setzer <i>et al.</i> , 1982, J. Biol. Chem. 257:5143-7; McGrogan <i>et al.</i> , 1985, J. Biol. Chem. 260:2307-14)
2031 a 3947	seqüências de pBR322 contendo o gene marcador de resistência à ampicilina e a origem de replicação do plasmídeo em <i>E. coli</i> (Genbank Accession Number J01749)
3949 a 4292	Um promotor precoce, acentuador e origem de replicação de SV40 (Takebe <i>et al.</i> , 1988, Mol. Cell Biol. 8:466-72, Genbank Accession Number J02400)
4299 a 4565	Um elemento acentuador de tradução do domínio LTR de HTLV-1 (Seiki <i>et al.</i> , 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:3618-22, Genbank Accession Number J02029)
4574 a 4730	Um íntron dos sinais doadores/receptores de recomposição de 16S, 19S do SV40 (Okayama e Berg, 1983, Mol. Cell Biol. 3:280-9, Genbank Accession Number J02400)
4755 a 5468	O cDNA de cadeia leve kappa de 15C4 entre os sítios XbaI e SalI

Construção de pDSR19:hIgG1C_H

Construiu-se um plasmídeo de expressão de MAb de IgC1 de região constante humana/região variável de rato pDSR α 19: IgG1 (rVh/hCh1) como o resultado de uma ligação de três peças de produto de PCR de região variável de anticorpo de rato terminado com *Xba*I e *Bsm*BI, a região constante de IgG1 humana (domínios C_{H1}, articulação, C_{H2} e C_{H3}) derivada por meio de clivagem com *Sal*I e isolamento em gel do fragmento de *Bsm*BI e *Sal*I do

5 plasmídeo linear pDSR α 19:hIgG1 C_H (pontas *Hind*III e *Bsm*BI) e um pDSRa19 linearizado com pontas *Xba*I e *Sal*I (ver Pedido de Patente Provisional dos E.U.A. co-pendente e de co-propriedade nº 60/370,407, depositado em 5 de abril de 2002, "Human Anti-OPGL Neutralizing Antibodies As Selective OPGL Pathway Inhibitors", incorporado por referência). O vetor de expressão final, IgG1 de região constante humana/região variável de rato pDSR α 19: (rVh/hCh1), tem 6158 pares de bases e contém as 7 regiões funcionais descritas na Tabela 7.

Tabela 7

Quantidade de
pares de bases do
plasmídeo:

2 a 881	Um sinal de poliadenilação/terminação de transcrição da subunidade α do hormônio de glicoproteína pituitária bovina (α -FSH) (Goodwin <i>et al.</i> , 1983, Nucleic Acids Res. <u>11</u> :6873-82; Genbank Accession Number X00004)
882 a 2027	Um minigene de diidrofolato redutase (DHFR) de camundongo contendo o promotor de DHFR endógeno de camundongo, as seqüências codificantes de cDNA, e os sinais de poliadenilação/terminação de transcrição de DHFR (Gasser <i>et al.</i> , 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. <u>79</u> :6522-6; Nunberg <i>et al.</i> , 1980, Cell <u>19</u> :355-64; Setzer <i>et al.</i> , 1982, J. Biol. Chem. <u>257</u> :5143-7; McGrogan <i>et al.</i> , 1985, J. Biol. Chem. <u>260</u> :2307-14)
2031 a 3947	Seqüências de pBR322 contendo o gene marcador de resistência à ampicilina e a origem de replicação do plasmídeo em <i>E. coli</i> (Genbank Accession Number J01749)
3949 a 4292	Um promotor precoce, acentuador e origem de replicação de SV40 (Takebe <i>et al.</i> , 1988, Mol. Cell Biol. <u>8</u> :466-72, Genbank Accession Number J02400)
4299 a 4565	Um elemento acentuador de tradução do domínio de LTR de HTLV-1 (Seiki <i>et al.</i> , 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA <u>80</u> :3618-22, Genbank Accession Number J02029)
4574 a 4730	Um íntron dos sinais doador/receptor de recomposição de 16S, 19S do SV40 (Okayama e Berg, 1983. Mol. Cell Biol. <u>3</u> :280-9, Genbank Accession Number J02400)
4755 a 6158	O cDNA de cadeia pesada de rVh/hCh1 entre os sítios <i>Xba</i> I e <i>Sal</i> I. Esta seqüência de fragmento de cadeia pesada é mostrada abaixo (SEQ ID NO: 51) com as seqüências dos sítios de restrição sublinhados: <i>Xba</i> I <u>TCTAG</u> ACCACCATGG ACATCAGGCT CAGCTTAGTT TTCCTTGTCCTTTTCATAAA AGGTGTCCAG TGTGAGGTAG AACTGGTGGA GTCTGGGGGC GGCTTAGTAC AACCTGGAAG GTCCATGACA CTCTCCTGTG CAGCCTCGGG ATTCACCTTC AGAACCTATG GCATGGCCTG GGTCCGCCAG GCCCAACGA AGGGTCTGGA GTGGGTCTCA

	TCAATTA CTG CTAGTGGTGG TACCACCTAC TATCGAGACT CCGTGAAGGG CCGCTTCACT ATTTTATAGGG ATAATGCAAA AAGTACCCTA TACCTGCAGA TGGACAGTCC GAGGTCTGAG GACACGGCCA CTTATTCTG TACATCAATT <i>BsmBI</i> TCGGAATACT GGGGCCACGG AGTCATGGTC ACCGTCCTCTA GTGCCTCCACCAAGGGCCCA TCGGTCTTCC CCCTGGCACC CTCCTCCAAG AGCACCTCTGGGGGCACAGC GGCCCTGGGC TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCC GAACCG GTGACGGTGT CGTGGAATC AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT CCGGGCTGTC CTACAGTCCT CAGGACTCTA CTCCTCAGC AGCGTGGTGACCGTGCCCTC CAGCAGCTTG GGCACCCAGA CCTACATCTG CAACGTGAATCACAAGCCCA GCAACACCAA GGTGGACAAG AAAGTTGAGC CCAAATCTTG TGACAAAAT CACACATGCC CACCGTGCCC AGCACCTGAA CTCCTGGGGG GACCGTCAGT CTTCTCTTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC TCCCGGACCC CTGAGGTCAC ATGCGTGGTG GTGGACGTGA GCCACGAAGACCTGAGGTC AAGTTCAACT GGTACGTGGA CGGCGTGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG GAGCAGTACA ACAGCACGTA CCGTGTGGTG AGCGTCCTCA CCGTCTGCA CCAGGACTGG CTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAAG CCCTCCCAGC CCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC OCTGCCCCCA TCCCGGGATG AGCTGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAT CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGGAGAACA CTACAAGACC ACGCCTCCCC TGCTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCCTCT ATAGCAAGCT CACCGTGGAC AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC AACCCTACA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCCGGTA <i>Sall</i> AATGATAAGT CGAC
--	--

O plasmídeo linear pDSR α 19:hIgG1C_H foi preparado digerindo-se o plasmídeo de IgG1 de região constante humana/região variável de rato pDSR19: com as enzimas de restrição *Xba*I e *Bsm*BI para remover a região variável de rato e purificado utilizando-se um kit de extração em gel QIAquick. O plasmídeo linear pDSR α 19:hIgG1C_H contendo o domínio de região constante de IgG1 humana com 1 kbp foi utilizado para aceitar regiões variáveis de anticorpo α IL-1R derivado de hibridoma.

Clonagem da cadeia pesada de MAb 15C4 anti-IL1-RI 15C4

As cadeia pesadas para dez hibridomas expressando anticorpos monoclonais de ligação de α IL1-RI, 15C4, 27F2, e 26F5 foram clonadas no vetor de expressão de células mamíferas pDSR α 19. A construção do plasmídeo que codifica a cadeia pesada de 15C4 é descrita explicitamente; clonagem das outras espécies de cadeia pesada foi realizada utilizando-se procedimentos semelhantes. A região variável de cadeia pesada de 15C4 de α IL-1R1 foi obtida utilizando-se métodos de amplificação de PCR de cDNA

de primeiro filamento preparado de RNA total de 15C4 de hibridoma de α IL-1R1 utilizando-se reagente TRIzol®. cDNA de primeiro filamento foi sintetizado utilizando-se um iniciador randômico com um adaptador de extensão (5'- GGC CGG ATA GGC CTC CAN NNN NNT -3'; SEQ ID NO: 44) e realizou-se uma 5' RACE (amplificação rápida de pontas de cDNA) utilizando-se o kit GeneRacer™. Para a cadeia pesada de comprimento parcial, o iniciador *forward* foi o iniciador embutido GeneRacer™ (5' GGA CAC TGA CAT GGA CTG AAG GAG TA -3'; SEQ ID NO: 45) e o iniciador invertido foi 5'- TGA GGA CGC TGA CCA CAC G -3' (SEQ ID NO 52.). Os produtos de RACE foram clonados em pCR4-TOPO e determinou-se as seqüências de DNA. A seqüência de DNA *consensus* da região variável de cadeia pesada de 15C4 foi utilizada para projetar iniciadores para a amplificação com PCr da região variável de cadeia pesada. O iniciador de PCR de cadeia pesada a 5' codificou a ponta amino da seqüência-sinal, um sítio de enzima de restrição *Xba*I, e uma seqüência Kozak otimizada (5'-CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC CAT GGG GTC AAC CGC CAT CCT CG-3'; SEQ ID NO: 53). O iniciador a 3' codificou a ponta carboxila da região variável, incluindo um sítio *Bsm*BI de filamento em senso naturalmente ocorrente (5'-GTG GAG GCA CTA GAG ACG GTG ACC AGG GTT CC-3'; SEQ ID NO: 54).

5' α IL-1R1 15C4 iniciador de cadeia pesada (SEQ ID NO: 53):

5'- CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC C ATG GGG TCA ACC GCC

*Xba*I Kozak M G S T A

ATC CTCG -3'

I L (SEQ ID NO: 55)

3' α IL-1R1 15C4 iniciador de cadeia pesada (SEQ ID NO: 54):

5'- GTG GAG GCA CTA GAG ACG GTG ACC AGG GTT CC-3'

T S A S S V T V L T G (SEQ ID NO: 56)

*Bsm*BI

Construção do clone de expressão de cadeia pesada de IgG1 anti-IL1-R1

O clone de cadeia pesada de 15C4 de α IL-1R1 de comprimento pleno foi obtido de um clone de cadeia pesada de pCR4:15C4 por meio de amplificação com PCR com os iniciadores de cadeia pesada de 15C4 de α IL-1R1 a 5' e 3'. A reação PCR gerou um produto com 442 pares de bases codificando os 137 radicais de aminoácidos (incluindo a sequência-sinal de cadeia pesada com 19 aminoácidos) da região variável de cadeia pesada de 15C4 de α IL-1R1. O produto de PCR foi purificado utilizando-se um kit de purificação com PCR QIAquick e depois digerido com *Xba*I e *Bsm*BI, isolado em gel e purificado utilizando-se um kit de extração em gel QIAquick. Este fragmento contendo a região variável de cadeia pesada de 15C4 de α IL-1R1 completa foi então ligado no vetor de expressão mamífero pDSR α 19:hIgG1CH. O clone de expressão de IgG1 de cadeia pesada de 15C4 teve o DNA sequenciado para confirmar que ele codificava o mesmo peptídeo de região variável de cadeia pesada que foi identificado no hibridoma de 15C4. O vetor de expressão final, cadeia pesada de pDSR α 9:15C4 IgG1 apresenta 6173 pares de bases e contém as sete regiões funcionais descritas na Tabela 8.

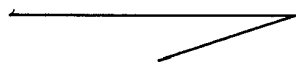


Tabela 8

Quantidade de
pares de bases
do plasmídeo:

2 a 881	Um sinal de poliadenilação/terminação de transcrição da subunidade α do hormônio de glicoproteína pituitária bovina (α -FSH) (Goodwin <i>et al.</i> , 1983, <i>Nucleic Acids Res.</i> 11:6873-82; Genbank Accession Number X00004)
882 a 2027	Um minigene de diidrofolato redutase (DHFR) de camundongo contendo o promotor de DHFR endógeno de camundongo, as seqüências codificantes de cDNA, e os sinais de poliadenilação/terminação de transcrição de DHFR (Gasser <i>et al.</i> , 1982, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 79:6522-6; Nunberg <i>et al.</i> , 1980, <i>Cell</i> 19:355-64; Setzer <i>et al.</i> , 1982, <i>J Biol. Chem.</i> 257:5143-7; McGrogan <i>et al.</i> , 1985, <i>J. Biol. Chem.</i> 260:2307-14)
2031 a 3947	Seqüências de pBR322 contendo o gene marcador de resistência à ampicilina e a origem de replicação do plasmídeo em <i>E. coli</i> (Genbank Accession Number J01749)
3949 a 4292	Um promotor precoce, acentuador e origem de replicação de SV40 (Takebe <i>et al.</i> , 1988, <i>Mol. Cell Biol.</i> 8:466-72, Genbank Accession Number J02400)
4299 a 4565	Um elemento acentuador de tradução do domínio de LTR de HTLV-1 (Seiki <i>et al.</i> , 1983, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 80:3618-22, Genbank Accession Number J02029)
4574 a 4730	Um íntron dos sinais doador/receptor de recomposição de 16S, 19S do SV40 (Okayama e Berg, 1983, <i>Mol. Cell Biol.</i> 3:280-9, Genbank Accession Number J02400)
4755 a 6173	O cDNA de IgG1 de cadeia pesada de 15C4 entre os sítios <i>XbaI</i> e <i>SalI</i>

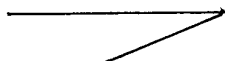
Construção de pDSR19:hIgG2C_H

- Construiu-se uma plasmídeo de expressão de MAb de IgG2 de região constante humana/região variável humana pDSR α 19: (hVh/hCh2) como o resultado de uma ligação de três peças de produto de PCR de região variável de anticorpo humano terminado com *XbaI* e *BsmBI*, uma região constante de IgG2 humana (domínios C_{H1}, articulação, CH₂ e CH₃) com pontas *BsmBI* e *SalI* e um pDSR α 19 linearizado com pontas *XbaI* e *SalI*. O vetor de expressão final, IgG1 de região constante humana/região variável humana pDSR α 19: (hVh/hCh2) (ver Pedido de Patente Provisional dos E.U.A. co-pendente e de co-propriedade nº 60/370,407, depositado em 5 de abril de 2002, "Human Anti-OPGL Neutralizing Antibodies As Selective OPGL Pathway Inhibitors"), tem 6164 pares de bases e contém as 7 regiões funcionais descritas na Tabela 9.

Tabela 9

Quantidade de
pares de bases
do plasmídeo:

2 a 881	Um sinal de poliadenilação/terminação de transcrição da subunidade alfa do hormônio de glicoproteína pituitária bovina (α -FSH) (Goodwin <i>et al.</i> , 1983, <i>Nucleic Acids Res.</i> 11:6873-82; Genbank Accession Number X00004)
882 a 2027	Um minigene de diidrofolato redutase (DHFR) de camundongo contendo o promotor de DHFR endógeno de camundongo, as seqüências codificantes de cDNA, e os sinais de poliadenilação/terminação de transcrição de DHFR (Gasser <i>et al.</i> , 1982, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 79:6522-6; Nunberg <i>et al.</i> , 1980, <i>Cell</i> 19:355-64; Setzer <i>et al.</i> , 1982, <i>J Biol. Chem.</i> 257:5143-7; McGrogan <i>et al.</i> , 1985, <i>J. Biol. Chem.</i> 260:2307-14)
2031 a 3947	seqüências de pBR322 contendo o gene marcador de resistência à ampicilina e a origem de replicação do plasmídeo em <i>E. coli</i> (Genbank Accession Number J01749)
3949 a 4292	Um promotor precoce, acentuador e origem de replicação de SV40 (Takebe <i>et al.</i> , 1988, <i>Mol. Cell Biol.</i> 8:466-72, Genbank Accession Number J02400)
4299 a 4565	Um elemento acentuador de tradução do domínio de LTR de HTLV-1 (Seiki <i>et al.</i> , 1983, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 80:3618-22, Genbank Accession Number J02029)
4574 a 4730	Um íntron dos sinais doador/receptor de recomposição de 16S, 19S do SV40 (Okayama e Berg, 1983. <i>Mol. Cell Biol.</i> 3:280-9, Genbank Accession Number J02400)



4755 a 6164	O cDNA de cadeia pesada hVh/hCh2 entre os sítios <i>Xba</i>I e <i>Sal</i>I. A sequência deste fragmento de cadeia pesada aparece abaixo (SEQ ID NO: 57) com os sítios de restrição sublinhados: <i>Xba</i>I <u>TCTAGA</u> CCACCATGGA CATGAGGGTC CCCGCTCAGC TCCTGGGGCT CCTGCTATTG TGGTTGAGAG GTGCCAGATG TGAGGTCCAG CTGGTGCACTCTGGGGGAGG CTTGGTACAT CCTGGGGGGT CCCTGAGACT CTCCTGTGCAGGCTCTGGAT TCACCTTCAG TGGCCATGCT TTGCACTGGG TTCGCCAGGCTCCAGGAAAA GGTCTGGAGT GGGTATCAGG TATTGGTACT CATGGTGGGACATACTATGC AGACTCCGTG AAGGGCCGAT TCACCATCTC CAGAGACAATGCCAAGAACT CCTTGTCTTCT TCAAATGAAC AGCCTGAGCG CCGAGGACATGGCTGTGTAT TACTGTACAA GAAGAAACTG <i>Bsm</i>BI GGGACAATTT GACTACTGGGGCCAGGGAAC CCTGGTCACC <u>GTCTCTAGTG</u> CCTCCACCAA GGGCCCATCGGTCTTCCCC TGGCGCCCTG CTCCAGGAGC ACCTCCGAGA GCACAGCGGCCCTGGGCTGC CTGGTCAAGG ACTACTTCCC CGAACCGGTG ACGGTGTCGTGGAACCTCAGG CGCTCTGACC AGCGGCGTGC ACACCTTCCC AGCTGTCCTACAGTCCTCAG GACTCTACTC CCTCAGCAGC GTGGTGACCG TGCCCTCCAGCAACTTCGGC ACCCAGACCT ACACCTGCAA CGTAGATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGT GGACAAGACA GTTGAGCGCA AATGTTGTGT CGAGTGCCCAACCGTGCCAG CACCACCTGT GGCAGGACCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCCAAACCCAAG GACACCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCACGTGCGTGGTGGTGA CGTGAGCCAC GAAGACCCCG AGGTCCAGTT CAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG ACAAAGCCAC GGGAGGAGCAGTTCAACAGC ACGTTCCGTG TGGTCAGCGT CCTCACCGTT GTGCACCAGGACTGGCTGAA CGGCAAGGAG TACAAGTGCA AGGTCTCCAA CAAAGGCCTCCCAGCCCCCA TCGAGAAAAC CATCTCCAAA ACCAAAGGGC AGCCCCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGC CCCCATCCCG GGAGGAGATG ACCAAGAACCAGGTCAGCCT GACCTGCCTG GTCAAAGGCT TCTACCCAG CGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG AACAACTACA AGACCACACCTCCCATGCTG GACTCCGACG GCTCCTTCTT CCTCTACAGC AAGCTCACCGTGGACAAGAG CAGGTGGCAG CAGGGGAACG TCTTCTCATG CTCCGTGATGCATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACGCAG <i>Sal</i>I AAGAGCCTCT CCCTGTCTCCGGGTAAATGA <u>TAAGTCGAC</u>
-------------	---

O plasmídeo linear pDSR α 19:hIgG2_H foi preparado digerindo-se o plasmídeo de IgG2 de região constante humana/região variável humana pDSR19: com as enzimas de restrição *Xba*I e *Bsm*BI para remover a região variável humana, e purificado utilizando-se um kit de extração em gel QIAquick. O plasmídeo linear pDSR α 19:hIgG2_H contendo o domínio de região constante de IgG2 humana com 1 kbp foi utilizado de forma a aceitar regiões variáveis de anticorpo de α IL-1R derivadas de hibridoma.

Construção do clone de expressão de cadeia pesada de IgG2 anti-IL1-RI IgG2

O fragmento de região variável de cadeia pesada de 15C4 α IL-1R1, descrito acima, foi ligado no vetor de expressão mamífero

pDSR α 19:hIgG2C_H. O clone de expressão de IgG2 de cadeia pesada de 15C4 teve o DNA seqüenciado para confirmar que ele codificava o mesmo peptídeo de região variável de cadeia pesada que foi identificado no hibridoma de 15C4. O vetor de expressão final, pDSR α 19:cadeia pesada de IgG2 de 15C4 apresentou 6161 pares de bases e contém as sete regiões funcionais descritas na Tabela 10.

Tabela 10

Quantidade de pares de bases do plasmídeo:

2 a 881	Um sinal de poliadenilação/terminação de transcrição da subunidade alfa do hormônio de glicoproteína pituitária bovina (α -FSH) (Goodwin <i>et al.</i> , 1983, <i>Nucleic Acids Res.</i> 11:6873-82; Genbank Accession Number X00004)
882 a 2027	Um minigene de diidrofolato redutase (DHFR) de camundongo contendo o promotor de DHFR endógeno de camundongo, as seqüências codificantes de cDNA, e os sinais de poliadenilação/terminação de transcrição de DHFR (Gasser <i>et al.</i> , 1982, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 79:6522-6; Nunberg <i>et al.</i> , 1980, <i>Cell</i> 19:355-64; Setzer <i>et al.</i> , 1982, <i>J Biol. Chem.</i> 257:5143-7; McGrogan <i>et al.</i> , 1985, <i>J. Biol. Chem.</i> 260:2307-14)
2031 a 3947	Seqüências de pBR322 contendo o gene marcador de resistência à ampicilina e a origem de replicação do plasmídeo em <i>E. coli</i> (Genbank Accession Number J01749)
3949 a 4292	Um promotor precoce, acentuador e origem de replicação de SV40 (Takebe <i>et al.</i> , 1988, <i>Mol. Cell Biol.</i> 8:466-72, Genbank Accession Number J02400)
4299 a 4565	Um elemento acentuador de tradução do domínio de LTR de HTLV-1 (Seiki <i>et al.</i> , 1983, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 80:3618-22, Genbank Accession Number J02029)
4574 a 4730	Um íntron dos sinais doador/receptor de recomposição de 16S, 19S do SV40 (Okayama e Berg, 1983, <i>Mol. Cell Biol.</i> 3:280-9, Genbank Accession Number J02400)
4755 a 6161	O cDNA de IgG2 de cadeia pesada de 15C4 entre os sítios <i>Xba</i> I e <i>Sal</i> I

Construção de pDSR19:hIgG4C_H

Construiu-se um plasmídeo de expressão de MAb de IgG4 de região constante humana/região variável humana pDSR α 19: (hVh/hCh4) como o resultado de uma ligação de três peças de produto de PCR de região variável de anticorpo humano terminada em *Xba*I e *Bsm*BI, um fragmento de região constante de IgG4 humana digerida com *Bsm*BI e *Sal*I isolada com gel (domínios C_{H1}, articulação, C_{H2} e C_{H3}) e um pDSR α 19

linearizado com pontas *Xba*I e *Sal*I. O vetor de expressão final, IgG4 de região constante humana/região variável humana: pDSR α 19: (hVh/hCh4) (ver Pedido de Patente Provisional dos E.U.A. co-pendente e de co-propriedade nº 60/370,407, depositado em 5 de abril de 2002, "Human Anti-OPGL Neutralizing Antibodies As Selective OPGL Pathway Inhibitors"), tem 6167

5 pares de bases e contém as 7 regiões funcionais descritas na Tabela 11.

Tabela 11

Quantidade de pares de bases do plasmídeo:

2 a 881	Um sinal de poliadenilação/terminação de transcrição da subunidade alfa do hormônio de glicoproteína pituitária bovina (α -FSH) (Goodwin <i>et al.</i> , 1983, <i>Nucleic Acids Res.</i> 11:6873-82; Genbank Accession Number X00004)
882 a 2027	Um minigene de diidrofolato redutase (DHFR) de camundongo contendo o promotor de DHFR endógeno de camundongo, as seqüências codificantes de cDNA, e os sinais de poliadenilação/terminação de transcrição de DHFR (Gasser <i>et al.</i> , 1982, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 79:6522-6; Nunberg <i>et al.</i> , 1980, <i>Cell</i> 19:355-64; Setzer <i>et al.</i> , 1982, <i>J Biol. Chem.</i> 257:5143-7; McGrogan <i>et al.</i> , 1985, <i>J. Biol. Chem.</i> 260:2307-14)
2031 a 3947	Seqüências de pBR322 contendo o gene marcador de resistência à ampicilina e a origem de replicação do plasmídeo em <i>E. coli</i> (Genbank Accession Number J01749)
3949 a 4292	Um promotor precoce, acentuador e origem de replicação de SV40 (Takebe <i>et al.</i> , 1988, <i>Mol. Cell Biol.</i> 8:466-72, Genbank Accession Number J02400)
4299 a 4565	Um elemento acentuador de tradução do domínio de LTR de HTLV-1 (Seiki <i>et al.</i> , 1983, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 80:3618-22, Genbank Accession Number J02029)
4574 a 4730	Um íntron dos sinais doador/receptor de recomposição de 16S, 19S do SV40 (Okayama e Berg, 1983, <i>Mol. Cell Biol.</i> 3:280-9, Genbank Accession Number J02400)
4755 a 6167	O cDNA de cadeia pesada hVh/hCh4 entre os sítios <i>Xba</i> I e <i>Sal</i> I sites. A seqüência deste fragmento de cadeia pesada aparece abaixo (SEQ ID NO:58) com os sítios de restrição sublinhados: <i>Xba</i> I <u>TCTAGACCACCAT</u> GGACATGAGG GTCCCCGCTC AGCTCCTGGG GCTCCTGCTA TTGTGGTTGA GAGGTGCCAG ATGTGAGGTC CAGCTGGTGCACTCTGGGGG AGGCTTGGTA CATCCTGGGG GGTCCCTGAG ACTCTCCTGTGCAGGCTCTG GATTCACCTT CAGTGGCCAT GCTTTGCACT GGGTTCGCCAGGCTCCAGGA AAAGGTCTGG AGTGGGTATC AGGTATTGGT ACTCATGGTGGGACATACTA TGCAGACTCC GTGAAGGGCC GATTCACCAT CTCCAGAGACAATGCCAAGA ACTCCTTGTT TCTTCAAATG AACAGCCTGA GCGCCGAGGACATGGCTGTG TATTACTGTA CAAGAAGAAA CTGGGGACAA TTTGACTACTGGGGCCAGGG <i>Bsm</i> B1 AACCCTGGTC ACCG <u>TCTCTA</u> GTGCCAGCAC CAAGGGGCCATCCGTCTTCC

	CCCTGGCGCC CTGCTCCAGG AGCACCCTCG AGAGCACAGCCGCGCTGGGC TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCCGAACCG GTGACGGTGTGCTGGAACTC AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT CCCGGCTGTCTACAGTCTT CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCGTGGTGA CCGTGCCCTCCAGCAGCTTG GGCACGAAGA CCTACACCTG CAACGTAGAT CACAAGCCCAGCAACACCAA GGTGGACAAG AGAGTTGAGT CCAAATATGG TCCCCCATGCCCATCATGCC CAGCACCTGA GTTCTTGGGG GGACCATCAG TCTTCTGTTCCTCCCAAAA CCCAAGGACA CTCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCACGTGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCAGGAAG ACCCCGAGGT CCAGTTCAACTGGTACGTGG ATGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGAGGAGCAGTTC AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCCTGCACCAAGGACTG GCTGAACGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAAGGCCTCCCGT CCTCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGGCAGCCCCGAGAGCCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCAGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA CCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TACAGCAGGCTAACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGGAGG GGAATGTCTT CTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC <i>SalI</i> ACACAGAAGA GCCTCTCCCTGTCTCTGGGT AAATGATAAG TCGAC
--	---

O plasmídeo linear pDSR α 19:hIgG4C_H foi preparado digerindo-se o plasmídeo de IgG4 de região constante humana/região variável humana pDSR19: com as enzimas de restrição *XbaI* e *BsmBI* para remover a região variável humana, e purificado utilizando-se um kit de extração em gel QIAquick. O plasmídeo linear pDSR α 19:hIgG4C_H contendo o domínio de região constante de IgG4 humana com 1 kbp foi utilizado para aceitar regiões variáveis de anticorpo de α IL-1R derivadas de hibridoma.

Construção do clone de expressão de cadeia pesada de IgG4 anti-IL1-R1

O fragmento de região variável de cadeia pesada de 15C4 de α IL-1R1, descrito acima, foi ligado em um vetor de expressão mamífero pDSR α 19:hIgG4C_H. O clone de expressão de IgG4 de cadeia pesada de 15C4 teve o DNA seqüenciado para confirmar que ele continha o mesmo peptídeo de região variável de cadeia pesada que foi identificado no hibridoma de 15C4. O vetor de expressão final, cadeia pesada de IgG4 de 15C4 de pDSR α 19: apresentava 6164 pares de bases e contém as sete regiões funcionais descritas na Tabela 12.

Tabela 12

Quantidade de pares de bases	
------------------------------	--

do plasmídeo:

2 a 881	Um sinal de poliadenilação/terminação de transcrição da subunidade α do hormônio de glicoproteína pituitária bovina (α -FSH) (Goodwin <i>et al.</i> , 1983, <i>Nucleic Acids Res.</i> 11:6873-82; Genbank Accession Number X00004)
882 a 2027	Um minigene de diidrofolato redutase (DHFR) de camundongo contendo o promotor de DHFR endógeno de camundongo, as seqüências codificantes de cDNA, e os sinais de poliadenilação/terminação de transcrição de DHFR (Gasser <i>et al.</i> , 1982, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 79:6522-6; Nunberg <i>et al.</i> , 1980, <i>Cell</i> 19:355-64; Setzer <i>et al.</i> , 1982, <i>J Biol. Chem.</i> 257:5143-7; McGrogan <i>et al.</i> , 1985, <i>J. Biol. Chem.</i> 260:2307-14)
2031 a 3947	Seqüências de pBR322 contendo o gene marcador de resistência à ampicilina e a origem de replicação do plasmídeo em <i>E. coli</i> (Genbank Accession Number J01749)
3949 a 4292	Um promotor precoce, acentuador e origem de replicação de SV40 (Takebe <i>et al.</i> , 1988, <i>Mol. Cell Biol.</i> 8:466-72, Genbank Accession Number 102400)
4299 a 4565	Um elemento acentuador de tradução do domínio de LTR de HTLV-1 (Seiki <i>et al.</i> , 1983, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 80:3618-22, Genbank Accession Number J02029)
4574 a 4730	Um íntron dos sinais doador/receptor de recomposição de 16S, 19S do SV40 (Okayama e Berg, 1983, <i>Mol. Cell Biol.</i> 3:280-9, Genbank Accession Number J02400)
4755 a 6164	O cDNA de cadeia pesada de 15C4 entre os sítios <i>Xba</i> I e <i>Sal</i> I

Exemplo 7

Expressão de anticorpos anti-IL-1R1 em células de Ovário de Hâms-ter Chinês (CHO)

Anticorpos anti-IL-1R1 recombinantes são gerados em células de ovário de hâms-ter chinês, especificamente CHO AM-1/D, como divulgado na Patente U.S. 6,210,924 (incorporada por referência). Em resumo, as seqüências de DNA codificando as cadeias pesada ou leve completas de cada anticorpo anti-IL-1R1 da invenção são clonadas em vetores de expressão. Células CHO AM-1/D são co-transfectadas com um vetor de expressão capaz de expressar uma cadeia pesada completa e um vetor de expressão expressando a cadeia leve completa do anticorpo anti-IL-1R1 apropriado. Por exemplo, para gerar o anticorpo 26F5, células são co-transfectadas com um vetor capaz de expressar uma cadeia leve completa compreendendo a seqüência de aminoácidos como apresentado na SEQ ID NO:38 e um vetor capaz de expressar uma cadeia pesada completa compreendendo a seqüência

de aminoácidos indicada na SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, ou SEQ ID NO: 24. Para gerar o anticorpo 27F2, células são co-transfectadas com um vetor capaz de expressar uma cadeia leve completa compreendendo a sequência de aminoácidos como indicado na SEQ ID NO: 38 e um vetor capaz de expressar uma cadeia pesada completa compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, ou SEQ ID NO: 30. Para gerar o anticorpo 15C4, células são co-transfectadas com um vetor capaz de expressar uma cadeia leve completa compreendendo a sequência de aminoácidos como indicado na SEQ ID NO: 40 e um vetor capaz de expressar uma cadeia pesada completa compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, ou SEQ ID NO: 36. A Tabela 13 resume as cadeias pesada completa e leve completa para os diversos anticorpos 1L-1R1. A indicação ".../IgG " descreve a sequência da região constante para o anticorpo particular.

Tabela 13

Anticorpo	Região variável de cadeia pesada + Região constante de cadeia pesada	Cadeia pesada completa
26F5/IgG1 (nucleotídeo)	SEQ ID NO: 9 + SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 19
26F5/IgG1 (aminoácido)	SEQ ID NO: 10 + SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 20
26F5/IgG2 (nucleotídeo)	SEQ ID NO: 9 + SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 21
26F5/IgG2 (aminoácido)	SEQ ID NO: 10 + SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 22
26F5/IgG4 (nucleotídeo)	SEQ ID NO: 9 + SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 23
26F5/IgG4 (aminoácido)	SEQ ID NO: 10 + SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 24
27F2/IgG1 (nucleotídeo)	SEQ ID NO: 13 + SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 25
27F2/IgG1 (aminoácido)	SEQ ID NO: 14 + SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 26
27F2/IgG2 (nucleotídeo)	SEQ ID NO: 13 + SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 27
27F2/IgG2 (aminoácido)	SEQ ID NO: 14 + SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 28
27F2/IgG4 (nucleotídeo)	SEQ ID NO: 13 + SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 29

121

27F2/IgG4 (aminoácido)	SEQ ID NO: 14 + SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 30
15C4/IgG1 (nucleotídeo)	SEQ ID NO: 15 + SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 31
15C4/IgG1 (aminoácido)	SEQ ID NO: 16 + SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 32
15C4/IgG2 (nucleotídeo)	SEQ ID NO: 15 + SEQ ID NO: 5	SEQ ED NO: 33
15C4/IgG2 (aminoácido)	SEQ ID NO: 16 + SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 34
15C4/IgG4 (nucleotídeo)	SEQ ID NO: 15 + SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 35
15C4/IgG4 (aminoácido)	SEQ ID NO: 16 + SEQ 1D NO: 8	SEQ ID NO: 36
Anticorpo	Região variável de cadeia leve + Região constante de cadeia leve	Cadeia leve completa
26F5/27F2 (nucleotídeo)	SEQ ID NO: 11 + SEQ 1D NO: 3	SEQ ID NO: 37
26F5/27F2 (aminoácido)	SEQ ID NO: 12 + SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 38
15C4 (nucleotídeo)	SEQ ID NO: 17 + SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 39
15C4 (aminoácido)	SEQ ID NO: 18 + SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 40

A expressão estável de anticorpos anti-IL-1R1 é obtida co-transfectando-se células CHO AM-1/D com deficiência de diidrofolato redutase (DHFR) com o vetores de expressão. Transfecções são realizadas utilizando-se técnicas convencionais (co-precipitação com fosfato de cálcio) e seleção com DHFR. Colônias transfectadas são isoladas e desenvolvidas à confluência em placas de 24 poços. Anticorpos produzidos por células transfectadas são examinados quanto à atividade de dobragem e neutralização apropriada. Clones que super-produzem anticorpos anti-IL-1R1 apropriadamente dobrados dos isótipos de IgG1, IgG2, e IgG4 são selecionados e anticorpos são purificados como descrito abaixo.

Exemplo 8

Produção de anticorpo anti-IL-1R1

Anticorpos anti-IL-1R1 são produzidos por meio de expressão em uma linha clonal de células CHO. Para cada operação de produção, células de um único frasco são descongeladas em meio de cultura de células isento de soro. As células são desenvolvidas inicialmente em um frasco T e são

expandidas serialmente por meio de uma série de frascos de centrifugação até que tenha sido gerado inóculo suficiente para semear um biorreator de 20 l. Após crescimento durante 5-10 dias, a cultura é então utilizada para inocular um biorreator de 300 l. Após desenvolvimento durante mais 5-10 dias, a cultura é utilizada para inocular um biorreator de 2000 l. Produção é realizada em um biorreator de 2000 l utilizando-se uma cultura de batelada alimentada, em que uma alimentação de nutriente contendo componentes de meio concentrados é adicionada para manter desenvolvimento das células e viabilidade da cultura. A produção dura aproximadamente duas semanas, sendo que durante este período anticorpo anti-IL1-R1 é produzido constitutivamente pelas células e secretado no meio de cultura de células.

O reator de produção é controlado a um nível ajustado de pH, temperatura, e oxigênio dissolvido: pH é controlado com a adição de gás de dióxido de carbono e carbonato de sódio; o oxigênio dissolvido é controlado com fluxos de ar, nitrogênio, e oxigênio.

Ao final da produção, o caldo de células é introduzido em uma centrífuga de discos empilhados e o sobrenadante da cultura é separado das células. O concentrado é clarificado adicionalmente por meio de um filtro de profundidade, seguido de um filtro de 0,2 μm . O meio condicionado clarificado é então concentrado por meio de ultrafiltração de fluxo tangencial. O meio condicionado é concentrado a de 15 a 30 vezes. O meio condicionado concentrado resultante é então processado com purificação ou congelado para purificação numa data ulterior.

Exemplo 9

Mapeamento de epitopos utilizando-se proteínas de fusão de avidina

Para gerar proteínas de fusão de avidina, cDNA codificando avidina de galinha (com sequência-sinal endógena) foi conjugado com a ponta 5' de cDNAs codificando os domínios extracelulares maduros de IL-1R1 humano ou de *cynomolgus* fundido com uma sequência FLAG-etiqueta na

ponta 3'. Os genes de fusão marcados com FLAG foram montados em um vetor pALTERMAX utilizando-se técnicas moleculares convencionais. A sequência de aminoácidos da proteína de fusão de IL-1R1 humana - avidina é mostrada na Figura 23 (SEQ ID NO: 59). A sequência de aminoácidos da proteína de fusão de IL-1R1 de avidina - *cynomolgus* é mostrada na Figura 24 (SEQ ID NO: 60). Gerou-se um quadro de proteínas mutantes avidina-*cyno* IL-1R1-FLAG em que aminoácidos humanos foram substituídos pelos radicais de *cynomolgus* correspondentes utilizando-se o sistema de mutagênese mamífera *in vitro* Altered Sites II (Promega Corp.). As mutações são ilustradas na Figura 24.

Plasmídeos codificando as proteínas de tipo selvagem e mutante de avidina-*cyno*IL-1R e também a proteína de avidina-*hu*IL-1R-FLAG foram transfectados transientemente para células 293T utilizando-se reagente de transfecção Cytofectine (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Utilizou-se transfectantes falsos como controles negativos. A ligação do anticorpo monoclonal (MAb) anti-*hu*IL-1R1 com estas proteínas foi avaliada por meio de *Western blot* e ensaios de ligação à base de pérolas utilizando-se meio condicionado (CM) colhido das células transfectadas.

Para análise de *Western blot*, CM foi diluído a 1:3 em tamponante de amostra de SDS não-redutor, fervido durante 5-10 minutos e carregado em géis de Tris-glicina a 10 %. Após SDS-PAGE e transferência Western, as membranas foram bloqueadas com 3 % de BSA/1 % de ovalbumina em PBS/0,1 % de Tween-20 (PBST) e manchadas com MAbs anti-*hu*IL-1R1. Utilizou-se um anticorpo IgG-Fc-HRP anti-humano de cabra (Pierce Chemical Co.) diluído a 1:15.000 em PBST para detecção secundária. Utilizou-se detecção anti-FLAG para normalizar o carregamento de proteína. Captura de imagem e densitometria foram realizadas utilizando-se um sistema de formação de imagem digital FluorChem 8000 (Alpha Innotech Corp.). As intensidades de sinal para os MAbs anti-*hu*IL-1R1 foram normalizadas contra

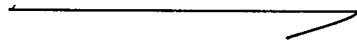
os valores para o anticorpos anti-FLAG para compensar a variação do carregamento de proteína. A ligação de anticorpos foi expressa como um percentual de ligação com a IL-1R1-FLAG avidina-humana.

Os resultados do *Western blot* são mostrados na Figura 25A. A figura 25B mostra a análise densitométrica de um conjunto em duplicata de experimentos de *Western blot*. Radicais humanos críticos para ligação de anticorpo são aqueles que restauram sinal quando substituídos em *cynoIL-1R1*. Em geral, mutações 1 e 2 (ilustradas na Figura 24), sozinhas ou em combinação, restauraram ligação com muitos dos anticorpos (15C4/IgG2, 5B8, 1C2, 24H2, 16E9, 26E4 e 20G1), enquanto que mutações 10.1 e 10.2 não o fizeram. Nenhum destes anticorpos ligou-se a *cynoIL-1RI* de tipo selvagem. Dois anticorpos (27F2 e 19C8) ligaram-se consistentemente a todas as proteínas mutantes e também a *cynoIL-1R1* de tipo selvagem. Isto sugeriu que epitopo 4 (radicais Y279-V281 de *cynoIL-1R1*), identificado nas proteínas parálogas de rato/humano e inalterado em IL-1R1 *cynomolgus*, foi o epitopo dominante para estes anticorpos. Epitopo 4 encontra-se em **negrito**, italizado e sublinhado na sequência de aminoácidos mostrada na Figura 24.

Nos ensaios de ligação multiplexados à base de pérolas, proteínas de fusão de avidina foram capturadas por meio de incubação do CM com pérolas fluorescentes revestidas com biotina, um conjunto de pérolas por proteína de fusão (Beadlyte Multi-Biotin 10plex Bead Kit; Upstate Biotechnologies). As pérolas foram lavadas e combinadas em PBST e repartidas nos poços de uma placa de 96 poços com fundo (Millipore Corp.). Anticorpos (MAbs anti-huIL-1R1 ou MAb anti-FLAG) foram adicionados a 25 µg/ml e incubados durante 1 hora. As pérolas foram novamente lavadas e utilizou-se uma mistura de anticorpo de IgG anti-camundongo conjugado com ficoeritrina e (Fab')₂ de IgG anti-humano para detectar ligação de anticorpo. Após uma incubação de 1 hora, as pérolas foram lavadas e ressuspensas em PBST. Intensidades de fluorescência média (MFI) foram medidas utilizando-

se um Luminex 100 (Luminex Corp). Os dados foram normalizados utilizando-se os valores de MFI para ligação de MAb anti-FLAG para compensar variação no carregamento de proteína. Ligação de anticorpos foi expressa como um percentual de ligação com a avidin-huIL-1R1-FLAG (Figura 26). O padrão de ligação dos anticorpos anti-IL-1R1 com as proteínas avidin-*cyno*IL1R1 -FLAG mutadas com radicais humanos e também com proteínas de IL-1R1 humana e de *cynomolgus* de tipo selvagem foi consistente com a análise de imuno-manchamento mostrada na Figura 25.

Deve-se compreender que a divulgação precedente enfatiza determinadas concretizações específicas da invenção e que todas as modificações ou alternativas equivalentes às mesmas encontram-se dentro do espírito e da abrangência da invenção como apresentado nas reivindicações anexas.



REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo humano isolado que se liga especificamente a receptor tipo 1 de interleucina-1, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende:

a. regiões de estrutura de cadeia pesada humana, uma região de CDR1 de cadeia pesada, em que a região CDR1 consiste de uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 63, uma região de CDR2 de cadeia pesada, em que a região CDR2 consiste da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 66, e uma região de CDR3 de cadeia pesada, em que a região de CDR3 consiste da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 69; e

b. regiões de estrutura de cadeia leve humana, uma região de CDR1 de cadeia leve, em que a região de CDR1 consiste da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 71, uma região CDR2 de cadeia leve, em que a região CDR2 consiste da sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 73, e uma região de CDR3 de cadeia leve, em que a região de CDR3 consiste da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 75.

2. Anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a região variável de cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos da região variável da cadeia pesada 15C4, como definido na SEQ ID NO: 80, e em que a região variável da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos da região variável da cadeia leve 15C4, como definido na SEQ ID NO: 81.

3. Anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que (i) a região variável de cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos da região variável da cadeia pesada 15C4, como definido na SEQ ID NO: 80, e ainda compreende uma região constante de cadeia pesada IgG, e (ii) em que a região variável de cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos da região variável da cadeia leve 15C4, como definido na SEQ ID NO: 81, e

ainda compreende uma região constante de cadeia kappa.

4. Anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3 caracterizado pelo fato de que compreende:

a. uma cadeia leve consistindo de uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 40; e

b. uma cadeia pesada consistindo de uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, ou SEQ ID NO: 36, em que o fragmento de ligação ao antígeno tem uma deleção do amino terminal e/ou uma deleção do carboxi-terminal.

5. Anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o fragmento de ligação a antígeno de cadeia pesada consiste de uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 32, e o fragmento de ligação a antígeno da cadeia leve consiste de uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 40, e em que o fragmento de ligação a antígeno tem uma deleção amino-terminal e/ou uma deleção carboxi-terminal.

6. Anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o fragmento de ligação a antígeno da cadeia pesada consiste de uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 34, e o fragmento de ligação a antígeno da cadeia leve consiste de uma sequência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 40, e em que o fragmento de ligação a antígeno tem uma deleção amino-terminal e/ou uma deleção carboxi-terminal.

7. Anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o fragmento de ligação a antígeno da cadeia pesada consiste de uma

seqüência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 36, e o fragmento de ligação a antígeno da cadeia leve consiste de uma seqüência de aminoácidos como apresentada na SEQ ID NO: 40, e em que o fragmento de ligação a antígeno tem uma deleção amino-terminal e/ou uma deleção carboxi-terminal.

8. Anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a cadeia pesada compreende uma região variável consistindo da seqüência de aminoácidos como definida pela SEQ ID NO: 80.

9. Anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 e 8, caracterizado pelo fato de que a cadeia leve compreende uma região variável consistindo da seqüência de aminoácidos como definida pela SEQ ID NO: 81.

10. Anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a região variável de cadeia pesada consiste de uma seqüência de aminoácidos como definida na SEQ ID NO: 80, e em que a região variável de cadeia leve consiste de uma seqüência de aminoácidos como definido na SEQ ID NO: 81.

11. Anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 e 8 a 10, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma região constante da cadeia kappa consistindo da SEQ ID NO: 4.

12. Anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3 e 8-11, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma região constante de IgG1 de cadeia pesada consistindo da SEQ ID NO: 2.

13. Anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3 e 8-11, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma região constante de IgG2 de cadeia pesada

consistindo da SEQ ID NO: 6.

14. Anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3 e 8-11, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma região constante de IgG4 de cadeia pesada consistindo da SEQ ID NO: 8.

15. Anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-2 e 8-10, caracterizado pelo fato de que a cadeia pesada e a cadeia leve estão ligadas por um ligante flexível para formar um anticorpo de cadeia simples.

16. Anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que é um anticorpo Fv de cadeia simples.

17. Anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-2 e 8-10, caracterizado pelo fato de que é um fragmento de anticorpo Fab.

18. Anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-2 e 8-10, caracterizado pelo fato de que é um fragmento de anticorpo Fab'.

19. Anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-2 e 8-10, caracterizado pelo fato de que é um fragmento de anticorpo (Fab')₂.

20. Anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-14, caracterizado pelo fato de que é um anticorpo totalmente humano.

21. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1-12, caracterizado pelo fato de que é um anticorpo IgG1.

22. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1-11 e 13, caracterizado pelo fato de que é um anticorpo IgG2.

23. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1-11 e 14,

caracterizado pelo fato de que é um anticorpo IgG4.

24. Anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-23, caracterizado pelo fato de que o anticorpo inibe a ligação de IL-1 ao seu receptor.

25. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1-24, caracterizado pelo fato de que se liga especificamente ao polipeptídeo da SEQ ID NO: 76.

26. Anticorpo da reivindicação 1-25, caracterizado pelo fato de que se liga especificamente à sequência de aminoácidos YSV.

27. Molécula de ácido nucleico isolada caracterizada pelo fato de que consiste em qualquer uma das seguintes SEQ IDs: 15, 31, 33, 35 e suas sequências degeneradas que codificam os anticorpos como definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 26.

28. Molécula de ácido nucleico isolada caracterizada pelo fato de que consiste em qualquer uma das SEQ IDs: 17, 39, 40 e suas sequências degeneradas que codificam os anticorpos como definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 26.

29. Vetor caracterizado pelo fato de que compreende a molécula de ácido nucleico como definida na reivindicação 27 ou 28.

30. Anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende uma cadeia pesada ou região variável de cadeia pesada que é codificada pela molécula de ácido nucleico como definida na reivindicação 27.

31. Anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende uma cadeia leve ou região variável de cadeia leve que é codificada pela molécula de ácido nucleico como definida na reivindicação 28.

32. Anticorpo, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende uma cadeia pesada ou região

variável de cadeia pesada que é codificada pela molécula de ácido nucleico como definida na reivindicação 27, e uma cadeia leve ou região variável de cadeia leve que é codificada pela molécula de ácido nucleico como definida na reivindicação 28.

33. Uso de um anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 26 e 30-32 caracterizado pelo fato de que é para a preparação de uma composição farmacêutica para tratar uma doença mediada por IL-1 em um paciente, em que a doença mediada por IL-1 é selecionada de doença pulmonar, doença pulmonar obstrutiva crônica, ou DPOC, proteinose alveolar pulmonar, pneumopatia induzida por bleomicina, fibrose pulmonar, fibrose pulmonar idiopática, fibrose pulmonar induzida por radiação, fibrose cística, acúmulo de colágeno nos pulmões, síndrome do desconforto respiratório agudo ou SDRA, displasia broncopulmonar ou DBP, doenças pulmonares de obstrução crônica selecionadas dentre enfisema e bronquite crônica, doença pulmonar fibrótica crônica, asbestose, pneumoconiose do trabalhador de carvão, silicose, pneumonia em organização de bronquioliteranos, sarcoidose pulmonar, rinite alérgica, dermatite de contacto, dermatite atópica, diabetes, doença inflamatória do intestino, artrite reumatoide e asma.

34. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de que compreende um transportador farmacêuticamente aceitável e uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 26 e 30-32.

FIG. 1A

Região Constante de Ig G1 de Cadeia Pesada

gcctccacca	agggcccatc	ggtcttcccc	ctggcaccct	cctccaagag	cacctctggg	60
ggcacagcgg	ccctgggctg	cctgggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggg	gacgggtgtcg	120
tggaactcag	gcgccctgac	cagcggcggtg	cacaccttcc	cggtgttcct	acagtcctca	180
ggactctact	ccctcagcag	cgtgggtgacc	gtgccctcca	gcagcttggg	caccagacc	240
tacatctgca	acgtgaatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggacaagaa	agttgagccc	300
aaatcttggtg	acaaaactca	cacatgcccc	ccgtgcccag	cacctgaact	cctgggggga	360
ccgtcagtct	tctctttccc	cccaaaaccc	aaggacaccc	tcatgatctc	ccggaccct	420
gaggtcacat	gcgtgggtgt	ggacgtgagc	cacgaagacc	ctgaggtcaa	gttcaactgg	480
tacgtggacg	gcgtggaggt	gcataatgcc	aagacaaagc	cgcgaggagg	gcagtacaac	540
agcacgtacc	gtgtgggtcag	cgtcctcacc	gtcctgcacc	aggactgggt	gaatggcaag	600
gagtacaagt	gcaaggtctc	caacaaagcc	ctcccagccc	ccatcgagaa	aaccatctcc	660
aaagccaaag	ggcagccccc	agaaccacag	gtgtacaccc	tgcccccatc	ccgggatgag	720
ctgaccaaga	accaggtcag	cctgacctgc	ctggtcaaag	gcttctatcc	cagcgacatc	780
gccgtggagt	gggagagcaa	tgggcagccg	gagaacaact	acaagaccac	gcctcccgtg	840
ctggactccg	acggctcctt	cttctctctat	agcaagetca	ccgtggacaa	gagcaggtgg	900
cagcagggga	acgtcttctc	atgctccgtg	atgcatgagg	ctctgcacaa	ccactacacg	960
cagaagagcc	tctccctgtc	tccgggtaaa				990

FIG. 1B

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

FIG. 2A

Região constante de cadeia Kappa

cgaactgtgg	ctgcaccatc	tgtcttcac	ttcccgccat	ctgatgagca	gttgaaatct	60
ggaactgcct	ctggttggtg	cctgctgaat	aacttctatc	ccagagagggc	caaagtacag	120
tggaagggtg	ataacgcctt	ccaatcgggt	aactcccagg	agagtgtcac	agagcaggac	180
agcaaggaca	gcacctacag	cctcagcagc	accctgacgc	tgagcaaagc	agactacgag	240
aaacacaaaag	tctacgcctg	cgaagtcacc	catcaggggc	tgagctcgcc	cgtcacaaaag	300
agcttcaaca	ggggagagtg	t				321

FIG. 2B

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

FIG. 3A

Região constante de Ig G2 cadeia pesada

gcctccacca	agggcccatc	ggtctttccc	ctggcgccct	gctccaggag	cacctccgag	60
agcacagcgg	ccctgggctg	cctgggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggg	gacgggtgtcg	120
tggaaactcag	gcgctctgac	cagcggcgtg	cacaccttcc	cagctgtcct	acagtcctca	180
ggactctact	ccctcagcag	cgtgggtgacc	gtgccctcca	gcaacttcgg	caccagacc	240
tacacctgca	acgtagatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggacaagac	agttgagcgc	300
aaatgttggtg	tcgagtgtcc	accgtgtcca	gcaccacctg	tggcaggacc	gtcagtcttc	360
ctcttcccc	caaaacccaa	ggacaccctc	atgatctccc	ggacccctga	ggtcacgtgc	420
gtgggtgggtg	acgtgagcca	cgaagacccc	gaggtccagt	tcaactggta	cgtggacggc	480
gtggaggtgc	ataatgccaa	gacaaagcca	cgggaggagc	agttcaacag	cacgttcctg	540
gtggtcagcg	tcctcacctg	tgtgcaccag	gactggctga	acggcaagga	gtacaagtgc	600
aaggtctcca	acaaaggcct	cccagccccc	atcgagaaaa	ccatctccaa	aaccaaaggg	660
cagccccgag	aaccacaggt	gtacaccctg	cccccatccc	gggaggagat	gaccaagaac	720
caggtcagcc	tgacctgcct	ggtcaaaggc	ttctacccca	gcgacatcgc	cgtggagtgg	780
gagagcaatg	ggcagccgga	gaacaactac	aagaccacac	ctcccatgct	ggactccgac	840
ggctccttct	tcctctacag	caagctcacc	gtggacaaga	gcaggtggca	gcaggggaac	900
gtcttctcat	gctccgtgat	gcatgaggct	ctgcacaacc	actacacgca	gaagagcctc	960
tcctgtctc	cgggtaaa					978

FIG. 3B

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

195
2

FIG. 4A

Região constante de Ig G4 cadeia pesada

gccagcacca	agggggccatc	cgtcttcccc	ctggcgccct	gctccaggag	cacctccgag	60
agcacagccg	ccctgggctg	cctgggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggt	gacggtgtcg	120
tggaaactcag	gcgccttgac	cagcggcgctg	cacaccttcc	cggctgtcct	acagtcctca	180
ggactctact	ccctcagcag	cgtgggtgacc	gtgcccccca	gcagcttggg	cacgaagacc	240
tacacctgca	acgtagatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggacaagag	agttgagtc	300
aaatatggtc	ccccatgccc	atcatgcca	gcacctgagt	tcctgggggg	accatcagtc	360
ttcctgttcc	ccccaaaacc	caaggacact	ctcatgatct	cccggacccc	tgaggtcacg	420
tgcgtgggtg	tggacgtgag	ccaggaagac	cccagaggtcc	agttcaactg	gtacgtggat	480
ggcgtggagg	tgcataaatgc	caagacaaag	ccgcgggagg	agcagttcaa	cagcacgtac	540
cgtgtggtoa	gcgtcctcac	cgtcctgcac	caggactggc	tgaacggcaa	ggagtacaag	600
tgcaaggtct	ccaacaaagg	cctcccgctcc	tccatcgaga	aaaccatctc	caaagccaaa	660
gggcagcccc	gagagccaca	ggtgtacacc	ctgcccccat	cccaggagga	gatgaccaag	720
aaccaggtoa	gcctgacctg	cctgggtcaaa	ggcttctacc	ccagcgacat	cgccgtggag	780
tgggagagca	atgggcagcc	ggagaacaac	tacaagacca	cgcctcccgt	gctggactcc	840
gacggctcct	tcttcctcta	cagcaggcta	accgtgraca	agagcaggtg	gcaggagggg	900
aatgtcttct	catgctccgt	gakgcatgag	gctctgcaca	accactacac	acagaagagc	960
ctctccctgt	ctctgggtaa	a				981

FIG. 4B

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

FIG. 5A

Cadeia pesada de 26F5

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

FIG. 5B

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

FIG. 6A

Cadeia pesada de 26F5

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

FIG. 6B

MEAPQQLFL	LLLWLPTTG	EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SYLAWYQQKP	60
GQAPRLLIYD	ASNRATGIPA	RFSGSGSGTD	FTLTISSELP	EDFAVYYCQQ	RSNWPPLTFG	120
GGTKVEIK						128

FIG. 7A

Cadeia pesada de 27F2

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

FIG. 7B

MEFGLSWVFL	VALLRGVQCQ	VQLVESGGGV	VQPGRSIRLS	CAVSGFTFSN	YGMHWVRQAP	60
GKGLEWVAAI	WNDGENKHHA	GSVRGRFTIS	RDNSKNTLYL	QMNSLRAEDT	AVYYCARGRY	120
FDWLLFEYWG	QGTILVTVSS					139

FIG. 8A

Cadeia pesada de 15C4

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

FIG. 8B

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

FIG. 9A

Cadeia pesada de 15C4

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

FIG. 9B

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

10/27 10314038

901
2

FIG. 10

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

				CDR3		
26F5	<u>AHSVRGRFTI</u>	SRDNSKNTLY	LQMNSPRAED	<u>TAVYYCARAR</u>	<u>SFDWLLFEFW</u>	GQGTILTVSS
27F2	<u>AGSVRGRFTI</u>	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	<u>TAVYYCARGR</u>	<u>YFDWLLFEYW</u>	GQGTILTVSS
15C4	<u>SPSFQGVVTI</u>	SADNSNSATY	LQWSSLKASD	<u>TAMYFCARQR</u>	<u>ELDYFDYWGO</u>	GTLTVTVSS

204

FIG. 11

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

FIG. 12

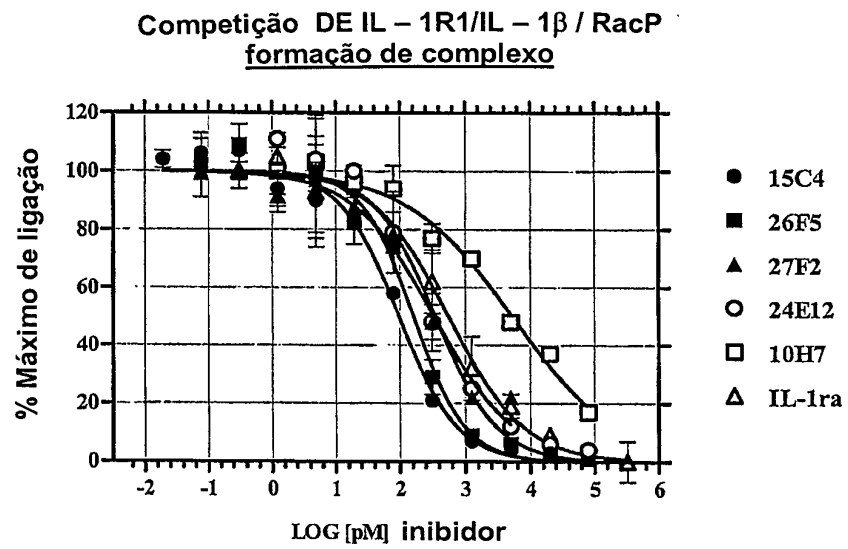


FIG. 13

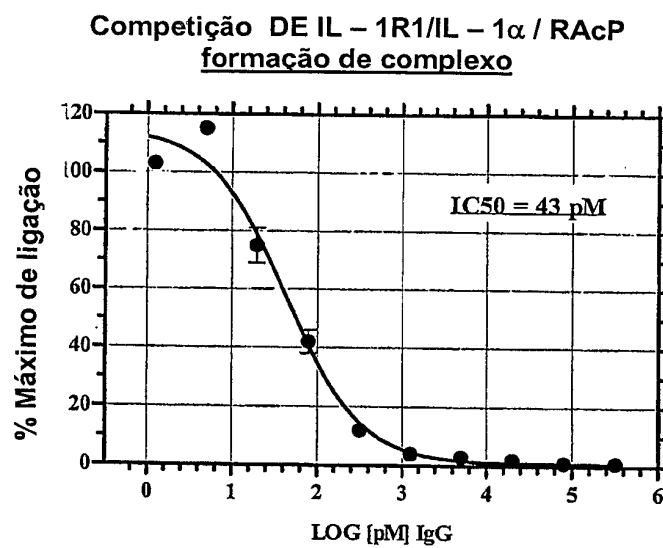
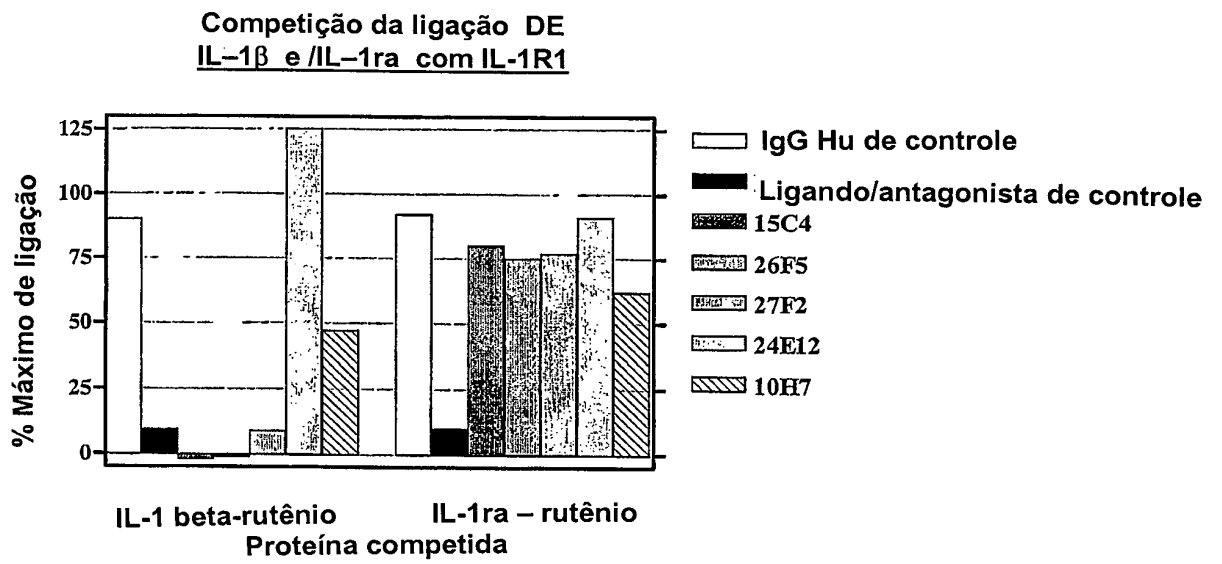


FIG. 14



206

FIG. 15A

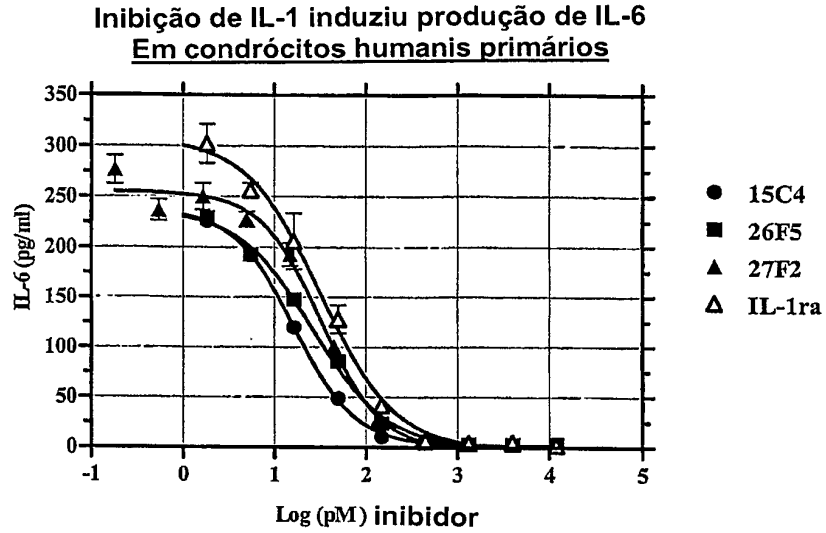
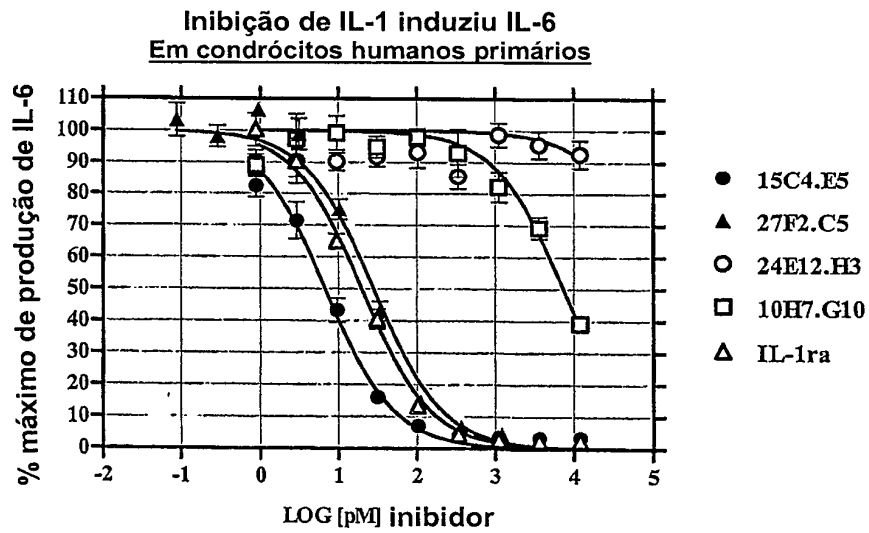
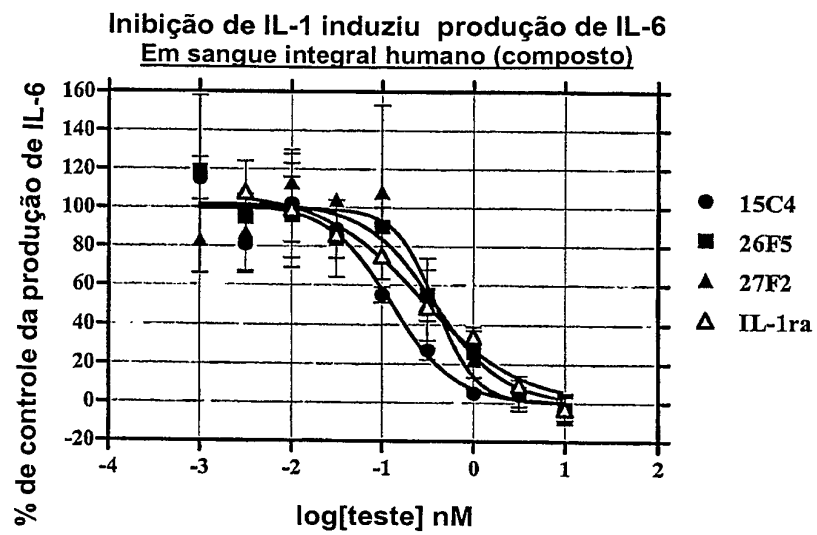


FIG. 15B

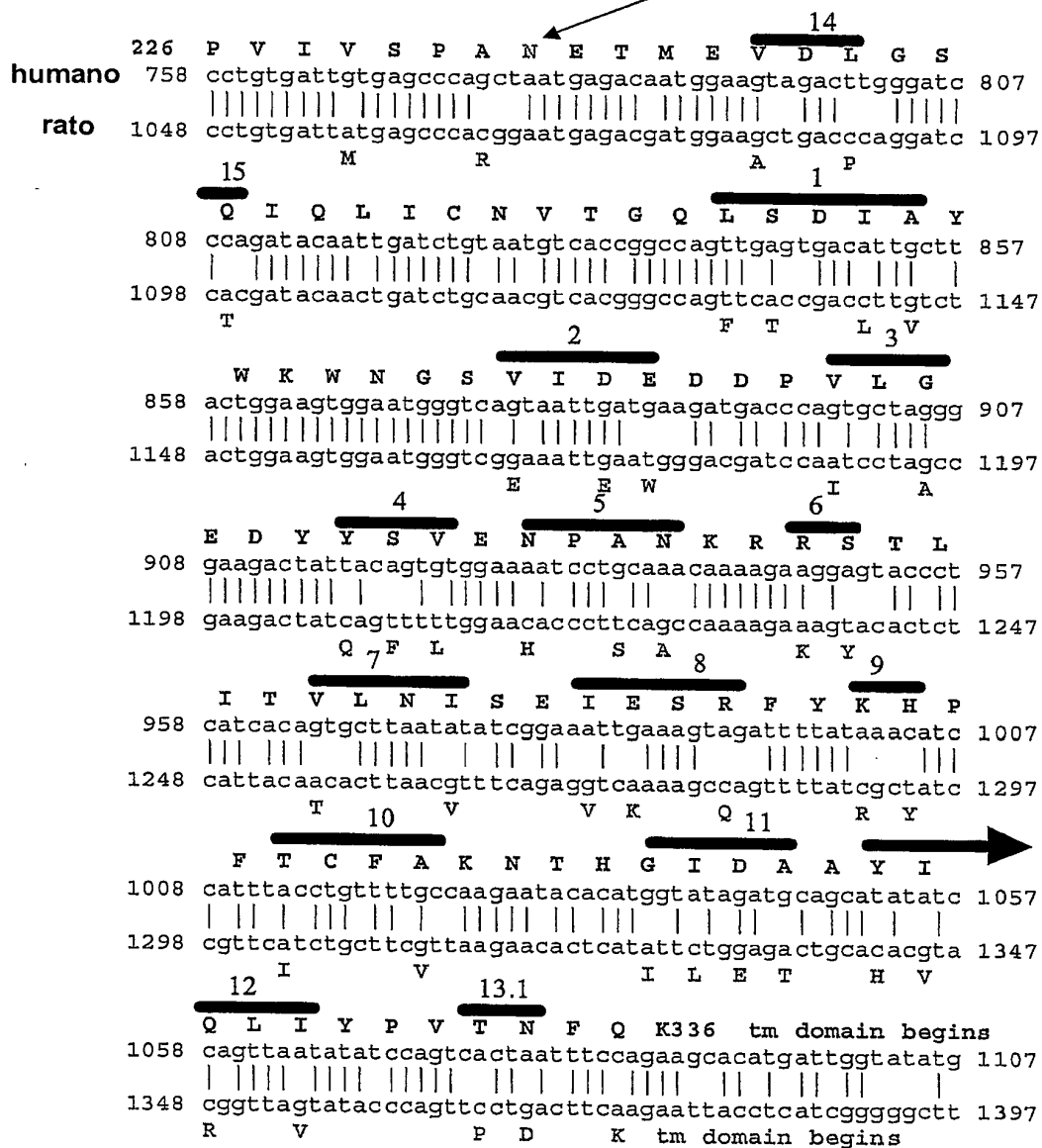


20X

FIG. 16



hIL-1R 



209
K

FIG. 18

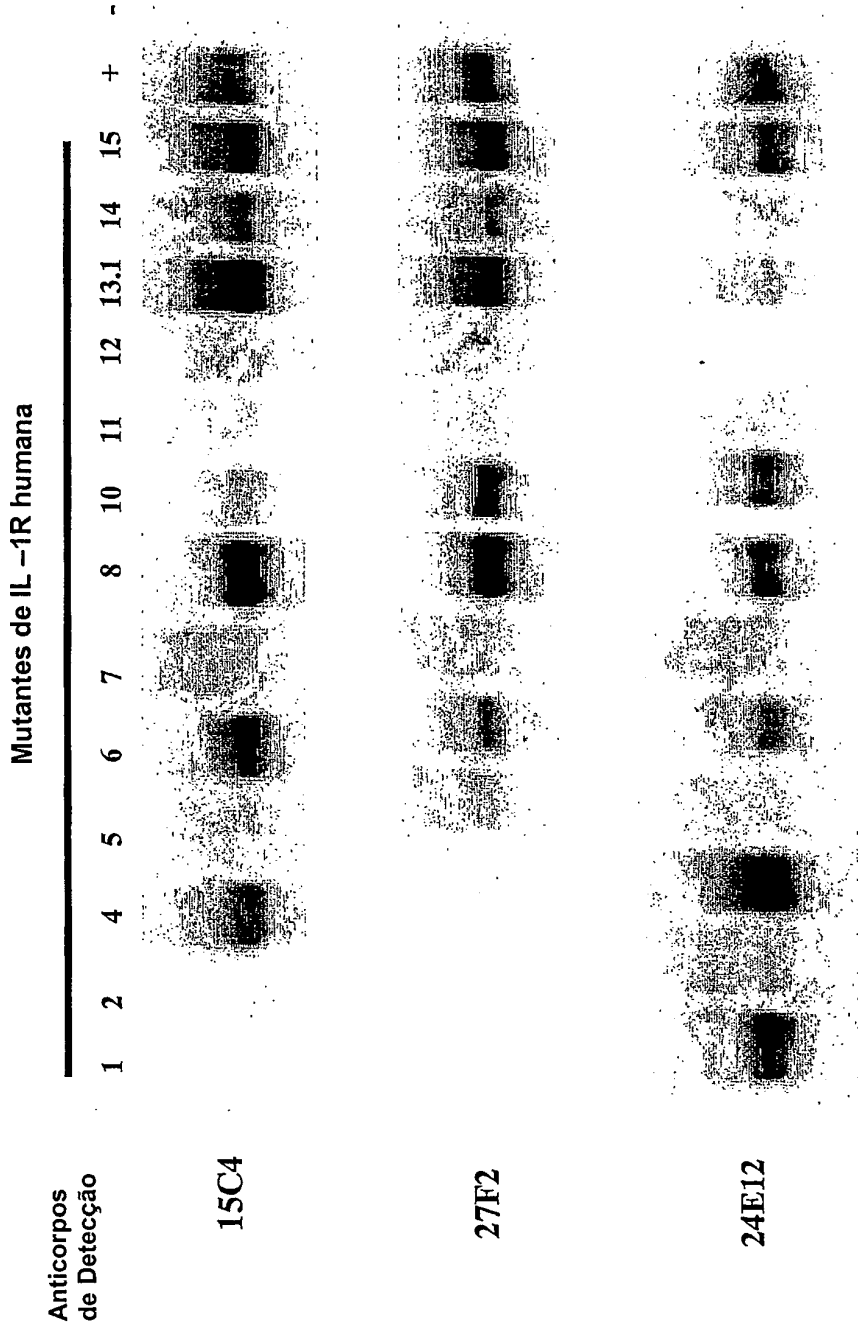


FIG. 20



8/12/20

FIG. 21

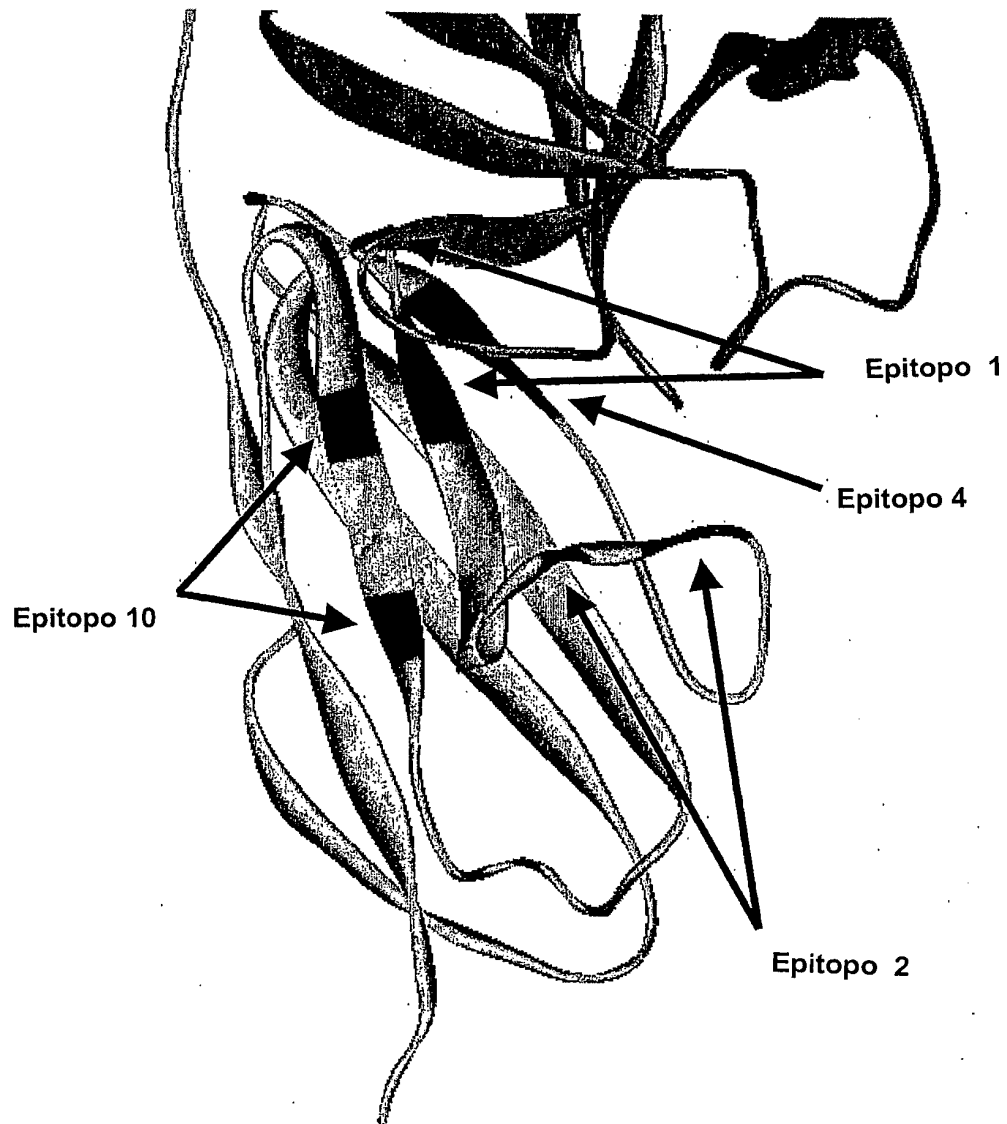
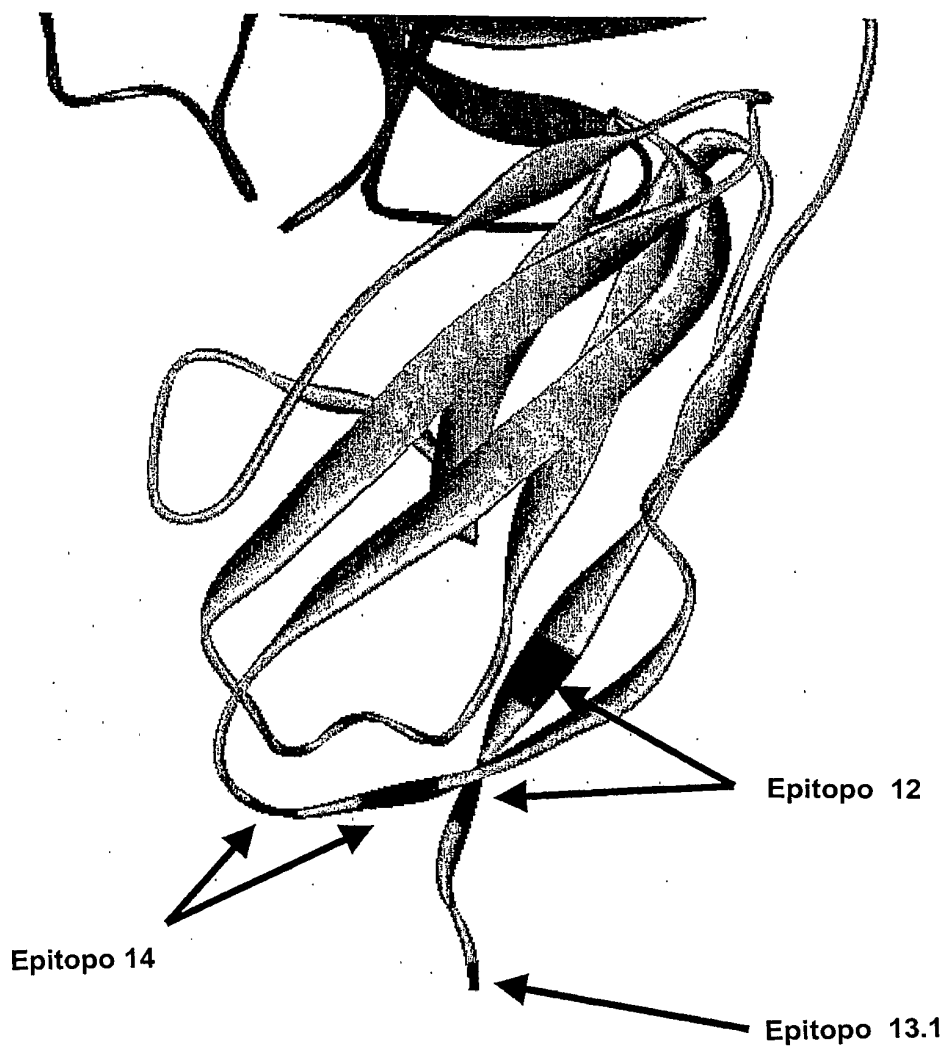


FIG. 22



2/14

FIG. 23

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

216

FIG. 24

1 MVHATSPLLL LLLLSLALVA PGLSARKCSL TGKWTNDLGS NMTIGAVNSK GEFTGTYTTA
61 VTATSNEIKE SPLHGTQNTI NKRTQPTFGF TVNWKFSSEST TVFTGQCFID RNGKEVLKTM
121 WLLRSSVNDI GDDWKATRVG INIFTRLRTQ KEQLLASLLE ADKCNEREEK IILVSSANEI
181 DVRPCPLNPN EYKGTITWYK NDSKTPISTE QASRIHQHKK KLWFVPAKVE DSGHYICVVR
241 NSSYCLRIKI TAKFVENEPN LCYNAEAIKF QRLPVAGDGG LVCPYMEFFK DENNELPKLL
301 WYKDCKPLLL DNIHFSGVKD RLIVMNVAEK HRGNYTCHAS YTYLGKQYPI TRVIEFITLE

Mutação 1

Mutação 2



361 ENKPTRPVIV SPANETIEVD LGSQIQLICN VTGQLSDTAY WKWNGSFIDE DDPVLGEDYY
Humana

Mutação 10,1

Mutação 10,2

V

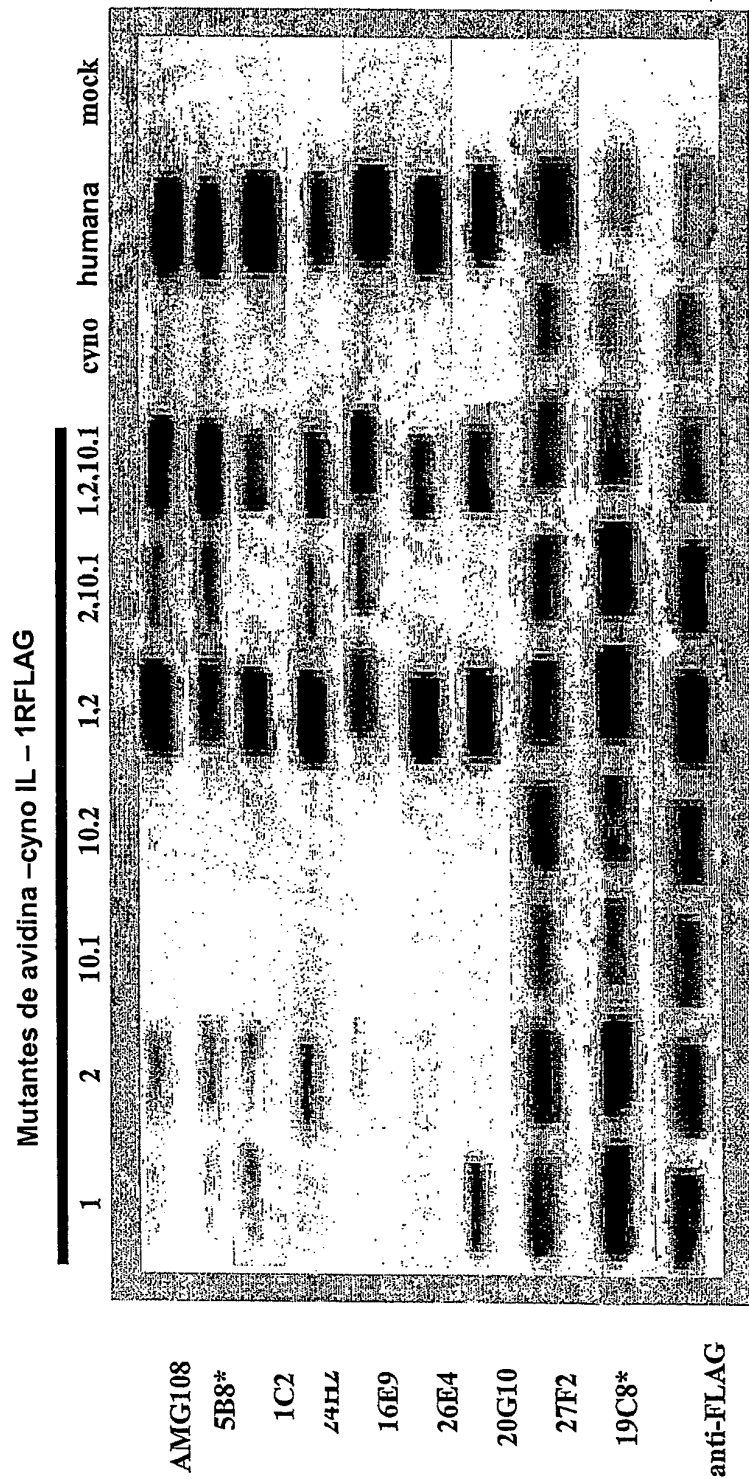


421 SVENPANKRR STLITVLNIS ETESRFYKHP FTCLARNTHG MDAAYVQLIY PVTKFQKDYK
Humana

F K

481 DDDDK

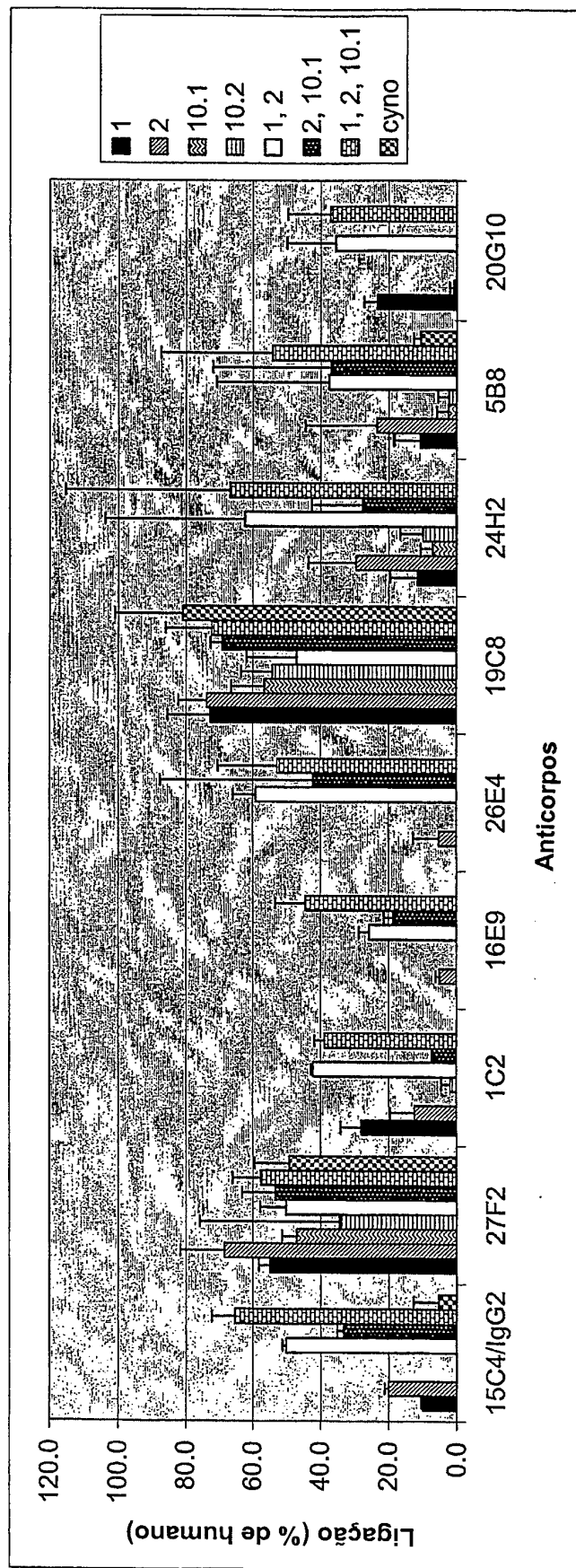
FIG. 25A

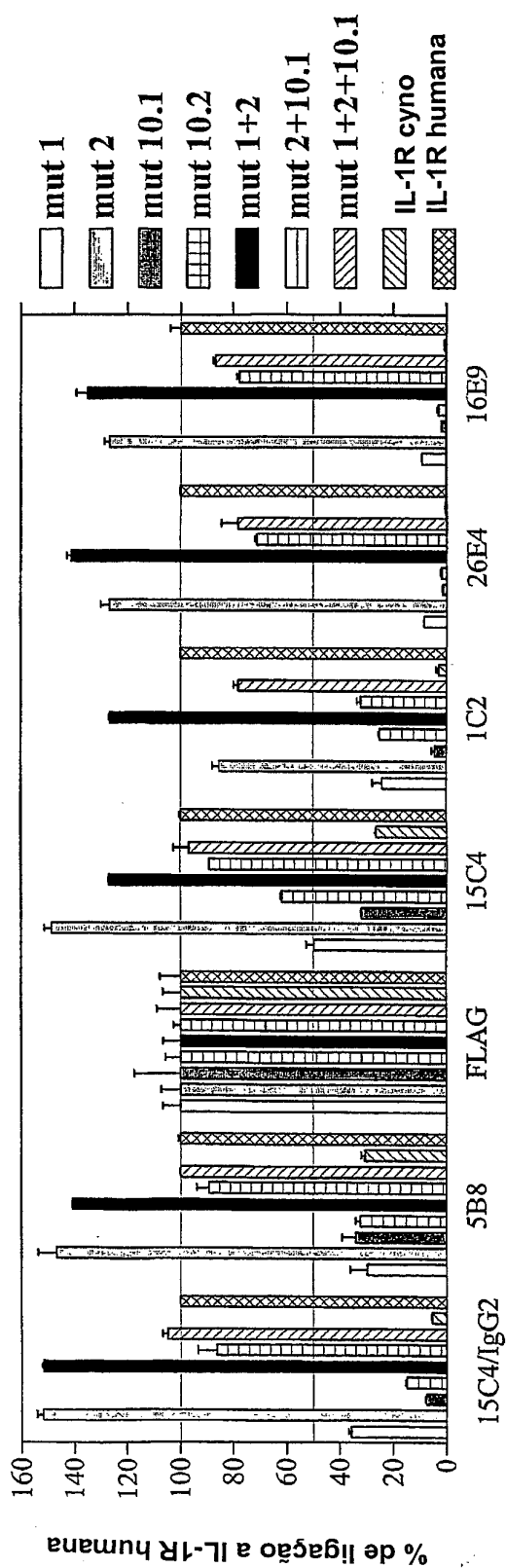


25127

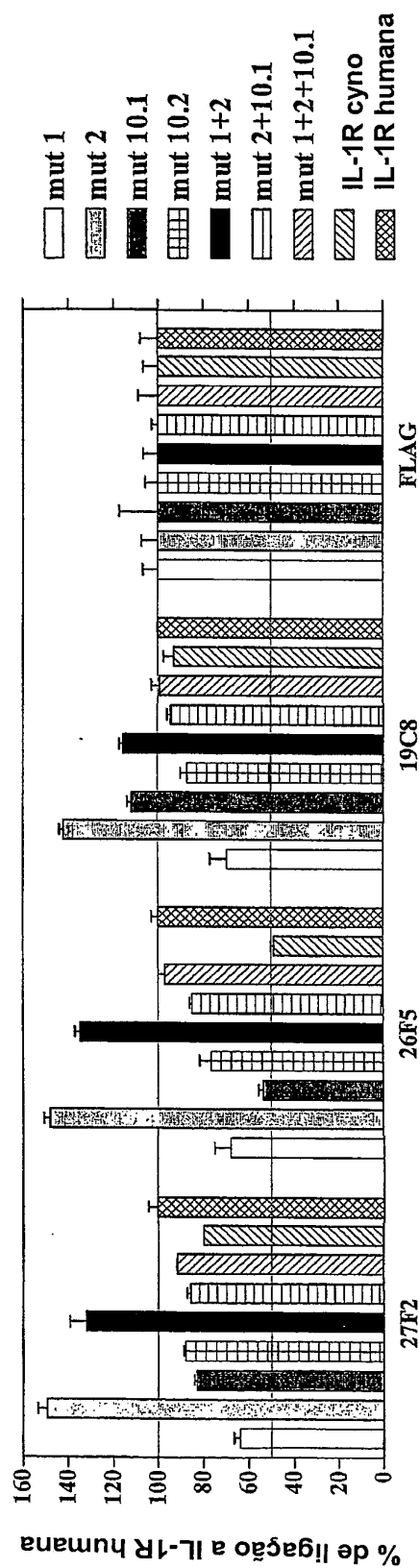
216

FIG. 25B





Anticorpos de receptor anti-huLL-1



Anticorpos de receptor anti-huLL-1

FIG. 26