



NUMERO DE PUBLICATION : 1002375A3

NUMERO DE DEPOT : 8800975

Classif. Internat.: A61K

MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

Date de délivrance : 22 Janvier 1991

**Le Ministre des Affaires Economiques,**

Vu la Convention de Paris du 20 Mars 1883 pour la Protection de la propriété industrielle;

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d' invention, notamment l' article 22;

Vu l' arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d' invention, notamment l' article 28;

Vu le procès verbal dressé le 26 Aout 1988 à 14h10  
à l' Office de la Propriété Industrielle

**ARRETE:**

ARTICLE 1.- Il est délivré à : BIOGEN INC.  
Cambridge Center 14, CAMBRIDGE MASSACHUSETTS 02142(ETATS-UNIS D'AMERIQUE)

représenté(e)(s) par : DELLICOUR Paul, OFFICE DE BREVETS E. DELLICOUR, Rue  
Fabry, 18/012 - B-4000 LIEGE.

un brevet d' invention d' une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : MATIERES BIOLOGIQUES, PROCEDE POUR LA PRODUCTION DE MATIERES BIOLOGIQUES ET POUR L'UTILISATION DE TELLES MATIERES EN THERAPIE.

INVENTEUR(S) : Dayer Jean-Michel, Chemin Rieu 8, 1208 Genève (CH); Seckinger Philippe Lucien, rue Jacques Grosselin 4, 1227 Carouge (CH); Mazzei Gonzalo José, rue Neckar 11, 1201 Genève (CH); Shaw Alan Reed, quai du Cheval Blanc 19, 1227 Genève (CH)

Priorité(s) 26.08.87 US USA 089632

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l' invention, sans garantie du mérite de l' invention ou de l' exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeur(s).

Bruxelles, le 22 Janvier 1991  
PAR DELEGATION SPECIALE :

WUYTS L.  
Directeur

-1-

Matières biologiques, procédé pour la production de matières biologiques et pour l'utilisation de telles matières en thérapie.

La présente invention concerne les inhibiteurs de l'interleukine 1 (IL-1 INHs) inhibant de manière sélective l'activité de l'interleukine 1. L'invention concerne également des procédés permettant de purifier de tels IL-1 INHs à partir d'urine et de produire de tels IL-1 INHs au moyen d'hôtes transformés avec des molécules d'ADN recombinant comportant des séquences ADN codant les inhibiteurs, ainsi que des méthodes de traitement et des compositions caractérisées par de tels IL-1 INHs. Ces méthodes et agents sont utiles dans les applications et les thérapies immunosuppressives et anti-inflammatoires.

L'interleukine 1 (IL-1) est une cytokine protéique produite essentiellement par des cellules de la lignée des macrophages/monocytes. Il existe deux gènes IL-1 distincts capables de coder des polypeptides IL-1 -- IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  [P. Auron et al., "Nucleotide Sequence of Human Monocyte Interleukin-1 Precursor cDNA", Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, p. 7907 (1984); C. March et al., "Cloning, Sequences And Expression of Two Distinct Human Interleukin 1 Complementary DNA's  $\alpha$  and  $\beta$  ", Nature, 315, p. 641 (1985)]. Des études de leurs activités biologiques respectives à l'aide d'IL-1 $\alpha$  and  $\beta$  recombinants ont permis de montrer jusqu'à présent que les deux formes d'IL-1 se partagent de multiples activités biologiques.

L'IL-1 présente plusieurs activités biologiques distinctes. De par une de ces activités -- l'activité LAF ou facteur d'activation des lymphocytes -- l'IL-1 est un médiateur de réponse immunologique et stimule la maturation, la différenciation et la croissance de nombreux types de cellules, comme par exemple les lymphocytes T et B immatures [P. Auron et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, supra]. De par une autre de ses activités -- l'activité MCF ou facteur de cellules mononucléaires -- l'IL-1 joue un rôle central dans la régulation de diverses réponses inflammatoires [C. Dinarello, "An Update of Human Interleukin 1", J. Clin. Immun., 5, p. 287 (1985)] et stimule diverses cellules, par exemple les fibroblastes et les chondrocytes, en vue de produire respectivement la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) et le collagène. Ces réponses entrent dans la pathogénésie de maladies comme l'arthrite rhumatoïdale ou de maladies associées à la destruction de tissus [J. Dayer, "Cytokines and Other Mediators in Rheumatoid Arthritis", Springer Semin. Immunopath, 7, p. 387 (1984)]. De plus, on sait que l'IL-1 induit la production de l'IL-2 [J. W. Lowenthal et al. "IL-1 Dependent Induction of Both IL-2 Secretion and IL-2 Receptor Expression By Thymoma Cells", J. Imm., 137, pp. 1226-1231 (1986)] favorisant la prolifération des cellules T. Enfin, on sait aussi que l'IL-1 stimule les molécules sur les cellules endothéliales afin de capturer les globules blancs du sang [J. Oppenheim et al., "There is More Than One Interleukin 1", Immun. Today, 7, p. 45 (1986)].

Il serait par conséquent intéressant d'identifier et d'isoler un inhibiteur de l'IL-1 supprimant la prolifération de certaines cellules T et B antigènes ainsi que la synthèse des prostaglandines et du collagène par des fibroblastes. Un tel composé serait utile pour le traitement de troubles impliquant des réponses immunitaires et inflammatoires. De plus, il serait souhaitable d'isoler un inhibiteur de l'IL-1 capable de supprimer la production de l'IL-2 induite par l'IL-1. Il serait également intéressant d'identifier un composé inhibant de manière sélective

les activités de l'IL-1 sans inhiber en même temps d'autres protéines, par exemple les facteurs de nécroses tumorales comme le TNF- $\alpha$ , se partageant diverses propriétés biologiques de l'IL-1, c'est-à-dire la production de PGE-<sub>2</sub> et de collagène par les fibroblastes dermiques humains [J. Dayer et al., "Cachectin/Tumor Necrosis Factor Stimulates Collagenase and Prostaglandin E<sub>2</sub> Production by Human Synovial Cells and Dermal Fibroblasts", J. Exp. Med., 162, p. 2163 (1985)] ou l'induction de la prolifération de fibroblastes [P. Seckinger et al., "A Urine Inhibitor of Interleukin 1 Activity Affects Both Interleukin 1  $\alpha$  and  $\beta$  But Not Tumor Necrosis Factor $\alpha$ ", J. Immun., 139, p. 1541 (1987)].

A l'heure actuelle, des composés décrits comme ayant des effets inhibiteurs sur l'IL-1, comme par exemple les prostaglandines, agissent essentiellement en tant qu'inhibiteurs non sélectifs. Il a également été signalé que l'urine de patients fébriles contient un inhibiteur sélectif de l'IL-1, possédant un poids moléculaire de 20 à 30 kD [Z. Liao et al. "Identification of a Specific Interleukin 1 Inhibitor In The Urine of Febrile Patients", J. Exp. Med., 159, p. 126 (1984)]. Liao ne suggère pas que ce composé puisse se présenter autrement que dans une forme très brute ou qu'il inhibe l'activité MCF de l'IL-1, inhibe la liaison de l'IL-1 à des récepteurs de cellules cibles ou inhibe la prolifération de fibroblastes en présence de l'IL-1. Un deuxième composé signalé comme ayant des effets inhibiteurs sur l'IL-1 [W. Arend et al., "Effects of Immune Complexes On Production By Human Monocytes of Interleukin or an Interleukin 1 Inhibitor", J. Immun., 134, p. 3868 (1985)] est produit par des monocytes humains cultivés sur des complexes immunogènes adhérents. Cependant, le rapport Arend est ambigu du fait qu'il ne précise pas si le composé inhibe à la fois l'activité LAF et l'activité MCF de l'IL-1 (voir page 3874). De toute façon, le rapport Arend ne précise pas que le composé est substantiellement pur ou qu'il empêche la liaison de l'IL-1 à des récepteurs de cellules cibles ou qu'il inhibe la prolifération des fibroblastes en présence de

l'IL-1. Un troisième composé signalé comme ayant des effets inhibiteurs sur l'IL-1 [J-F. Balavoine et al., "Prostaglandin E<sub>2</sub> And Collagenase Production By Fibroblasts And Synovial Cells Is Regulated By Urine-derived Human Interleukin 1 And Inhibitor(s)", J. Clin. Invest., 78, p. 1120 (1986)] se présenterait sous une  
5 forme très brute, mais son mode d'action n'est pas décrit.

La présente invention résout les problèmes mentionnés ci-avant en fournissant des inhibiteurs de l'IL-1 ("IL-1 INHs") substan-  
10 tiellement purs, lesquels inhibent de manière sélective les activités LAF et MCF de l'IL-1, inhibent la production de l'IL-2 induite par l'IL-1, inhibent la prolifération des fibroblastes induite par l'IL-1 et se lient aux récepteurs de l'IL-1 sur des cellules cibles, destinés à être utilisés dans des compositions,  
15 des méthodes et des thérapies immunosuppressives ou anti-inflammatoires. Les IL-1 INHs suivant la présente invention n'inhibent pas la production de PGE<sub>2</sub> et de collagène induite par TNF $\alpha$  dans des cellules cibles. Les IL-1 INHs de la présente invention sont dès lors utiles dans une variété de compositions et  
20 de méthodes destinées à des applications immunosuppressives et anti-inflammatoires. Les IL-1 INHs de l'invention se caractérisent en ce qu'ils sont des polypeptides présentant un poids moléculaire de 25 kD environ sur SDS/PAGE et un point isoélectrique de 4,7 comme déterminé par chromatofocalisation.

25 Une première mise en oeuvre d'un procédé de la présente invention permettant de produire ces IL-1 INHs est la purification à partir de sources naturelles. Une telle purification comprend les étapes de concentration d'urine brute de patients fébriles, de  
30 précipitation de l'IL-1 INH brut de l'urine et de fractionnement de l'IL-1 INH des autres protéines de ce précipité par une ou plusieurs chromatographies par échange d'ions, chromatographies hydrophobes, filtrations sur gel et immunoabsorptions.

35 Une seconde mise en oeuvre présentement préférée d'un procédé de

la présente invention permettant de produire ces IL-1 INHs est la production recombinante de tels inhibiteurs. Dans un tel procédé, des séquences ADN codant pour les IL-1 INHs de la présente invention, des molécules d'ADN recombinant caractérisées par ces  
5 séquences et divers hôtes unicellulaires transformés avec ces séquences et molécules d'ADN, sont utilisés en vue de produire les IL-1 INHs de la présente invention (avec ou sans une méthionine supplémentaire à terminaison N) ou des portions de ceux-ci par fermentation des hôtes transformés. Il est clair que le  
10 polypeptide de l'IL-1 INH suivant la présente invention, lequel présente une activité IL-1 INH, peut comporter diverses autres substitutions, additions ou suppressions à la séquence aminoacide de l'IL-1 INH.

15 Un autre objet de la présente invention est d'utiliser les IL-1 INHs de l'invention en vue de déterminer les structures moléculaires et la localisation des sites actifs pour l'IL-1 INH et d'employer cette information en vue de concevoir des fragments et des peptides utilisables en tant qu'IL-1 INHs dans les  
20 compositions et les méthodes immunosuppressives ou anti-inflammatoires de la présente invention.

La figure 1 présente le profil d'activité de l'IL-1 INH d'urine obtenu à partir de l'étape Sépharose QAE.

25 La figure 2 montre le profil d'activité de l'IL-1 INH d'urine obtenu à partir de l'étape Sépharose DEAE.

La figure 3 montre le profil d'activité de l'IL-1 INH d'urine de  
30 la fraction de filtration AcA54.

La figure 4 montre la réponse de dose des échantillons d'IL-1 INH d'urine après chaque étape de purification, mesurée au cours d'essais de liaison IL-1/LAF et IL-1/récepteurs.

La figure 5 montre l'activité de l'IL-1 INH mesurée au cours de l'essai IL-1/LAF.

5 La figure 6 montre l'activité de l'IL-1 INH mesurée au cours de l'essai IL-1/MCF.

La figure 7 montre que l'IL-1 INH n'influence pas la production de  $PGE_2$  induite par hrTNF $\alpha$ .

10 La figure 8 montre l'activité de l'IL-1 INH mesurée au cours de l'essai IL-1/prolifération des fibroblastes.

15 La figure 9 montre l'activité spécifique de l'IL-1 INH mesurée après chaque étape de purification au cours de l'essai de liaison IL-1/récepteurs, de l'essai LAF, de l'essai EL-4/CTLL et de l'essai MCF.

Afin que l'invention décrite dans la présente soit parfaitement comprise, il est prévu la description détaillée ci-après.

20

Les termes suivants sont employés dans la description :

25 MCF : Facteur de cellules mononucléaires. L'activité MCF de l'IL-1 définit son aptitude à stimuler la production de prostaglandine E et de collagène dans de nombreuses cellules cibles, par exemple les fibroblastes, les cellules synoviales.

30 LAF : Facteur d'activation des lymphocytes. L'activité LAF de l'IL-1 définit son aptitude à stimuler la prolifération et la différenciation des lymphocytes T et B.

35 CTLL : Lignée de cellules lymphocytes T cytotoxiques. Les cellules CTLL sont co-incubées avec des cellules EL-4 et utilisées pour tester l'effet stimulateur de l'IL-1 sur la production de l'IL-2 à partir de cellules EL-4; l'IL-2 stimule alors la prolifération des

cellules CTLL, laquelle est mesurable.

La présente invention concerne des IL-1 INHs substantiellement purs. Des IL-1 INHs substantiellement purs, comme défini par  
5 l'invention, sont substantiellement exempts de contaminants majeurs, en particulier l'apolipoprotéine A1 et la protéine de liaison rétinol, et migrent selon une seule bande sur SDS/PAGE.

Les IL-1 INHs de la présente invention inhibent de manière  
10 sélective les activités LAF et MCF de l'IL-1, inhibent la production de l'IL-2 par les cellules EL-4 induite par l'IL-1, inhibent la prolifération des fibroblastes induite par l'IL-1 et se lient aux récepteurs de l'IL-1 sur des cellules cibles. Une telle inhibition sélective est définie comme étant l'aptitude à  
15 empêcher l'activité induite par l'IL-1 tout en n'ayant pas l'aptitude à empêcher d'autres composés de présenter certaines activités similaires à l'IL-1, comme par exemple le TNF $\alpha$  recombinant de l'être humain (hrTNF $\alpha$ ), lequel est un médiateur de production de PGE<sub>2</sub> et de collagène. Cette spécificité est un  
20 facteur important permettant d'inhiber de façon sélective l'IL-1 sans perturber l'activité requise de la part d'autres médiateurs du système immunitaire. Nous avons démontré cette spécificité de nos IL-1 INHs en comparant l'effet des IL-1 INHs de l'invention sur l'activité de l'IL-1 à celle de hrTNF $\alpha$ , au moyen d'essais  
25 IL-1/MCF et de prolifération des fibroblastes.

Les IL-1 INHs de la présente invention ont de préférence un poids moléculaire d'environ 25 kD sur SDS-PAGE et un point isoélectrique de 4,7 comme déterminé par chromatofocalisation.

30

Les IL-1 INHs de la présente invention sont capables d'inhiber une réponse induite par l'IL-1 au cours d'un essai LAF, d'un essai MCF, d'un essai EL-4/lymphocytes T cytotoxiques ("EL-4/CTLL") et d'un essai de prolifération des fibroblastes. Dans l'essai IL-1 /  
35 LAF, l'inhibition de la prolifération des cellules T induite par



l'IL-1  $\alpha$  ou  $\beta$  est mesurée en détectant une diminution du niveau d'incorporation de  $[H^3]$  thymidine en présence de diverses dilutions d'un IL-1 INH de la présente invention. Dans l'essai IL-1/MCF, l'inhibition de la production de  $PGE_2$  induite par l'IL-1  
5 est mesurée au moyen d'un double essai de radioimmunité des anticorps, en se servant d'un antiserum vis-à-vis de  $PGE_2$  en présence de diverses dilutions d'un IL-1 INH de la présente invention. La diminution de  $PGE_2$  dans le milieu, détectée au moyen d'un essai de radioimmunité, indique l'activité de l'IL-1 INH.  
10 Dans l'essai EL-4/CTLL, l'inhibition de la production de l'IL-2 induite par l'IL-1 est mesurée en présence de diverses dilutions d'un IL-1 INH de la présente invention. L'inhibition est observée comme étant une réduction du niveau d'acceptation de  $[H^3]$  thymidine ( $[H^3]$ -TdR) servant de mesure de la prolifération des  
15 cellules CTLL. Une prolifération a lieu uniquement en présence de l'IL-1, lequel induit l'IL-2 en fonction de la dose présente. Dans l'essai de prolifération des fibroblastes, l'inhibition de l'acceptation de  $[H^3]$ -TdR par les fibroblastes induits par l'IL-1 est mesurée en présence de diverses dilutions d'un IL-1 INH de la  
20 présente invention.

Comme décrit ci-avant, les IL-1 INHs de la présente invention se lient spécifiquement à des récepteurs de l'IL-1 sur des cellules cibles. Cette liaison fut démontrée en utilisant une série  
25 d'essais de liaison à l'IL-1. En premier lieu, nous avons mesuré l'effet de concentrations croissantes d'un IL-1 INH sur la liaison d'IL-1 marqué à des récepteurs sur des cellules cibles. Nous avons observé que des concentrations élevées d'IL-1 INH réduisaient la quantité d'IL-1 marqué entrant en liaison. Ensuite, nous avons  
30 ajouté un complément d'IL-1 INH non marqué et avons observé l'effet de ce complément sur l'IL-1 marqué relié à une cellule cible. Cet essai a permis de démontrer que le complément d'IL-1 INH rivalisait avantageusement avec l'IL-1 marqué relié à la surface des cellules cibles et le remplaçait. Nous avons par la  
35 suite ajouté un complément de protéine de liaison rétinol et avons

observé que la liaison de l'IL-1 INH aux cellules cibles ne se trouvait pas empêchée. Cet essai a permis de démontrer que nos IL-1 INHs rivalisent spécifiquement avec l'IL-1 pour se lier aux récepteurs de l'IL-1 sur des cellules cibles.

5

La présente invention concerne également un procédé de purification permettant d'isoler un IL-1 INH de l'invention à partir de sources naturelles, par exemple des patients très fébriles ou des patients du SIDA souffrant d'infections occasionnelles. Ce procédé comprend plusieurs étapes. Globalement, ces étapes sont (1) la concentration d'urine; (2) la précipitation de l'IL-1 INH brut de l'urine concentrée et le fractionnement de l'IL-1 INH des autres protéines de ce précipité par au moins une chromatographie par échange d'ions, une chromatographie hydrophobe, une filtration sur gel et une immunoabsorption.

15

Dans la mise en oeuvre présentement préférée de ce procédé, nous avons d'abord concentré de l'urine brute de patients fébriles au moyen de méthodes standard, par exemple l'ultrafiltration. Nous avons ensuite précipité une fraction brute contenant l'IL-1 INH de l'échantillon d'urine concentrée, à l'aide de sulfate d'ammonium. Après avoir éliminé le sulfate d'ammonium par dialyse, nous avons séparé les fractions contenant l'activité de l'IL-1 INH des autres protéines, à l'aide de la chromatographie par échange d'ions. Plus spécifiquement, dans notre mise en oeuvre favorite, nous employons deux échangeurs d'anions -- une colonne Sépharose diéthyl-(2-hydroxypropyl)aminoéthyl [colonne Sépharose (QAE)] et une colonne Sépharose diéthylaminoéthyl [colonne Sépharose (DEAE)] -- de façon indépendante ou de manière combinée; la colonne Sépharose DEAE suivant de préférence la colonne Sépharose QAE. Afin de surveiller l'activité des diverses fractions, nous avons utilisé l'essai LAF et l'essai de liaison des récepteurs. Dans ce procédé, les fractions actives de l'IL-1 INH sont ensuite fractionnées en fonction du poids moléculaire, à l'aide d'une filtration sur gel, de préférence un gel AcA54, en sélectionnant de nouveau les

35

fractions actives comme décrit ci-avant. Les fractions sélectionnées se caractérisent en ce qu'elles possèdent un poids moléculaire de 25 kD environ et représentent au moins 90% de la teneur en protéines. Les principaux contaminants sont  
5 l'apolipoprotéine A1 et la protéine de liaison rétinol. Bien que ces contaminants peuvent être éliminés de plusieurs façons, nous préférons utiliser des anticorps monoclonaux ou polyclonaux agissant sur l'apolipoprotéine et la protéine de liaison rétinol par la méthode d'immunoabsorption.

10 Les fractions actives de l'IL-1 INH ci-dessus sont ensuite purifiées par chromatographie hydrophobe à l'aide d'une colonne Sépharose phényl fractionnant les protéines en fonction de leur caractère hydrophobe. L'apolipoprotéine A1 et la protéine de  
15 liaison rétinol, par exemple, sont plus hydrophobes que les protéines de la présente invention et seront dès lors retenues sur la colonne.

En utilisant le procédé décrit ci-avant et présentement préféré,  
20 l'activité spécifique de l'IL-1 INH de la présente invention, c'est-à-dire la quantité d'IL-1 INH requise pour produire une inhibition demi-maximale, a augmenté après chaque étape de purification. Voir Figure 9. Nous avons utilisé un essai de liaison IL-1/récepteurs; un essai LAF, un essai EL-4/CTLL et un  
25 essai MCF en vue de mesurer cette activité spécifique. Cependant, plusieurs autres essais auraient tout aussi bien pu être utilisés.

L'IL-1 INH purifié dans le procédé ci-dessus, ou procédé présentement préféré, peut être directement utilisé dans les  
30 compositions et les méthodes immunosuppressives et anti-inflammatoires de la présente invention. Cependant, nous préférons utiliser une telle protéine purifiée en tant que source de données de séquences aminoacides, afin de permettre l'utilisation de notre conception des éprouvettes d'ADN en vue d'isoler et de  
35 sélectionner une séquence ADN codant pour un IL-1 INH de la

présente invention. De telles séquences ADN, y compris les molécules d'ADN recombinant, et les hôtes unicellulaires transformés avec elles peuvent alors être employés pour produire de grandes quantités d'IL-1 INHs de la présente invention, substantiellement exempts d'autres protéines humaines, pour une utilisation dans les compositions et les thérapies de la présente invention.

Plus spécifiquement, nous déterminons les séquences aminoacides de divers fragments et portions de notre IL-1 INH purifié. Nous utilisons alors ces séquences et les séquences ADN codant pour celles-ci afin de concevoir une série d'éprouvettes d'ADN potentiellement utiles pour explorer diverses librairies d'ADN dans le but de détecter des séquences ADN codant pour les IL-1 INHs de la présente invention. De telles librairies comprennent les banques de gènes chromosomiques et les librairies d'ADN ou d'ADNc préparées sur base de tissus ou de lignées de cellules capables de produire avec certitude les IL-1 INHs de la présente invention. De telles lignées de cellules comprennent les lignées de cellules du genre monocyte bien connues des spécialistes.

Comme moyen permettant de préparer l'ADNc, de cloner et d'exprimer enfin les polypeptiques de l'IL-1 INH, de l'ARNm poly A<sup>+</sup> est isolé d'une source de cellules produisant l'IL-1 INH, comme par exemple des macrophages stimulés, au moyen de méthodes conventionnelles telles que celles décrites par Land et al., "5-Terminal Sequences Of Eukaryotic mRNA Can Be Cloned With High Efficiency", Nucleic Acids Research, 9, pp. 2251-66 (1981); Okayama and Berg, "High Efficiency Cloning of Full-Length cDNA", Mol. and Cell. Biol., 2, pp. 161-70 (1982); et Maniatis et al. dans "Molecular Cloning" (ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York), pp. 229-46 (1982). Ensuite, une librairie d'ADNc sur base de l'ARNm poly A<sup>+</sup> isolé ci-dessus est réalisée au moyen de méthodes conventionnelles, par exemple celles décrites par Wickens et al. "Synthesis of Double-Stranded DNA Complementary to Lysosyme,

Ovomucoid And Ovalhuman mRNAs", J. Biol. Chem., 253, pp. 2483-95 (1978); Maniatis et al. dans "Molecular Cloning" (ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York), pp. 229-46 (1982); et V. Gubler et al. "A Simple And Very Efficient Method For Generating cDNA Libraries", Gene, 25, pp. 263-69 (1983).

Il existe plusieurs approches en matière d'exploration d'une librairie de clones en vue de détecter un clone contenant une molécule particulière d'ADN recombinant, c'est-à-dire un clone  
10 contenant un insert pour l'IL-1 INH. Par exemple, sur base d'une séquence aminoacide partielle de notre IL-1 INH, des éprouvettes d'ADN comportant une série de fragments d'ADN synthétique codant pour des parties sélectionnées des IL-1 INHs de la présente invention peuvent être réalisées. Les techniques permettant de  
15 déterminer les séquences aminoacides sont bien connues des spécialistes. Après avoir déterminé les séquences aminoacides de diverses régions de l'IL-1 INH, des échantillons d'éprouvettes d'IL-1 INH dégénéré peuvent être synthétisés chimiquement par le biais des techniques conventionnelles de synthèse d'ADN  
20 phosphoamide, en vue de leur utilisation pour explorer une série de librairies d'ADN afin de sélectionner des séquences ADN apparentées par hybridation. Les éprouvettes d'ADN sont alors marquées aux terminaisons 5' avec  $^{32}\text{P}$  à l'aide de kinase polynucléotide T4 et  $^{32}\text{P}$ -ATP, substantiellement comme décrit par  
25 A. M. Maxam and W. Gilbert, "A New Method For Sequencing DNA", Proc. Natl. Acad. Sci. Usa, 74, pp 560-64 (1977). Ces éprouvettes d'ADN sont alors utilisées pour explorer les libraires d'ADNc ou de génomes, par exemple les librairies d'ADNc dérivées des lignées de cellules leucémiques du genre monocyte U937, THP-I et HL60, en  
30 vue de déceler des séquences ADN codant les IL-1 INHs de la présente invention, en se servant des méthodes conventionnelles. Ces séquences sélectionnées peuvent alors être exploitées en vue de l'expression des IL-1 INHs dans des hôtes procaryotiques et eucaryotiques transformés en même temps qu'eux, au moyen de  
35 techniques bien connues des spécialistes. Elles sont également

utiles en tant qu'éprouvettes d'exploration permettant de sélectionner d'autres séquences ADN apparentées codant pour des IL-1 INHs mammifères.

5 Les séquences ADN et les molécules d'ADN de la présente invention peuvent être exprimées à l'aide d'une importante variété de combinaisons d'hôtes/vecteurs. Des vecteurs utiles peuvent être constituer, par exemple, de segments de séquences ADN chromosomiques, non chromosomiques et synthétiques, tels que  
10 divers dérivés connus de SV40 et plasmides bactériens connus, par exemple les plasmides d'E.coli comprenant colE1, pCR1, pBR322, pMB9 et RP4; les ADN phages, par exemple les nombreux dérivés de phage, par exemple NM 989, et autres phages d'ADN, par exemple M13 et autres phages filamenteux d'ADN à toron unique; les vecteurs  
15 utiles dans les levures, tels que le plasmide 2 $\mu$ ; les vecteurs utiles dans les cellules eucaryotiques, tels que des vecteurs utiles dans les cellules animales, comme celles contenant des séquences ADN dérivées des adénovirus et rétrovirus de SV40 et des vecteurs dérivés de combinaisons de plasmides et d'ADN phages,  
20 comme les plasmides ayant été modifiés pour utiliser de l'ADN phage ou autres dérivés de ceux-ci.

De tels vecteurs d'expression se caractérisent également par au moins une séquence de contrôle d'expression, laquelle est  
25 utilement reliée à la séquence ADN de l'IL-1 INH insérée dans le vecteur afin de contrôler et de réguler l'expression de cette séquence ADN clonée. Des exemples de séquences de contrôle d'expression utiles sont le système lac, le système trp, le système tac, le système trc, les principales régions opérateur et promoteur de  $\lambda$  phage, la région de contrôle de la protéine de  
30 couverture fd, les promoteurs glycolytique de la levure, par exemple le promoteur de la kinase 3-phosphoglycérate, les promoteurs de la phosphatase acide de levure, par exemple Pho5, les promoteurs des facteurs de reproduction  $\alpha$  de la levure, et les  
35 promoteurs dérivés de polyoma, adénovirus, rétrovirus and virus

simien, par exemple les promoteurs de départ et les promoteurs d'arrivée ou SV40, et autres séquences contrôlant l'expression de gènes de cellules procaryotiques ou eucaryotiques et leurs virus ou combinaisons de celles-ci.

5

Parmi de tels vecteurs d'expression utiles figurent les vecteurs induisant l'expression des séquences ADN clonées de l'IL-1 INH dans les hôtes eucaryotiques, comme les cellules animales et humaines [par exemple, P.J. Southern and P. Berg, J. Mol. Appl. Genet., 1, pp. 327-41 (1982); S. Subramani et al., Mol. Cell. Biol., 1, pp. 854-64 (1981); R. J. Kaufmann and P.A. Sharp, "Amplification And Expression of Sequences Cotransfected with A Modular Dihydrofolate Reductase Complementary DNA Gene", J. Mol. Biol., 159, pp. 601-21 (1982); R. J. Kaufmann and P.A. Sharp, Mol. Cell. Biol., 159, pp. 601-64 (1982); S.I. Scahill et al., "Expression And Characterization Of The Product of A Human Immune Interferon DNA Gene In Chinese Hamster Ovary Cells", Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 80, pp. 4654-59 (1983); G. Urlaub and L.A. Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 77, pp. 4216-20 (1980)].

20

De plus, au sein de chaque vecteur d'expression spécifique, différents sites peuvent être sélectionnés pour l'insertion des séquences ADN de l'IL-1 INH de la présente invention. Ces sites sont habituellement désignés par l'endonucléase de restriction qui les traverse. De tels sites sont bien connus des spécialistes. Il y a lieu de préciser qu'un vecteur d'expression utile dans la présente invention ne doit pas nécessairement posséder un site d'endonucléase de restriction en vue de l'insertion du fragment d'ADN choisi. Au lieu d'un tel site, le vecteur pourrait être relié au fragment d'ADN par d'autres moyens. Le vecteur d'expression, et en particulier le site choisi dans celui-ci en vue de l'insertion d'un fragment d'ADN sélectionné et sa liaison effective à une séquence de contrôle d'expression, est déterminé par une série de facteurs, par exemple le nombre de sites susceptibles de recevoir une enzyme de restriction particulière,

35

la grosseur de la protéine à exprimer, la tendance à une dégradation protéolytique de la protéine souhaitée par des enzymes de cellules hôtes, la contamination ou la liaison de la protéine à exprimer par des protéines de cellules hôtes difficiles à éliminer en cours de purification; les caractéristiques d'expression, comme la localisation des codons de départ et de terminaison relatifs aux séquences du vecteur, et d'autres facteurs connus des spécialistes. Le choix d'un vecteur et d'un site d'insertion pour une séquence ADN est déterminé par un équilibre de ces facteurs, tous les choix n'étant pas d'efficacité égale pour un cas bien précis.

Des hôtes d'expression utiles sont les hôtes eucaryotiques et procaryotiques bien connus, comme par exemple les souches d'E.coli, telles que E.coli SG-936, E.coli HB 101, E.coli W3110, E.coli X1776, E.coli X2282, E.coli DHI, et E.coli MRC1, Pseudomonas, Bacillus, tels que Bacillus subtilis, Streptomyces, les levures et autres champignons, les cellules animales telles que les cellules COS et CHO, et les cellules humaines et les cellules végétales en culture de tissus.

Bien entendu, toutes les combinaisons de vecteurs d'hôtes / d'expression fonctionnent selon une efficacité égale au cours de l'expression des séquences ADN de la présente invention ou de la production des polypeptides correspondant aux IL-1 INHs de la présente invention. Cependant, un choix particulier d'une combinaison de vecteurs d'hôtes / d'expression peut être effectué par les spécialistes, après étude des principes exposés dans la présente, sans sortir du champ de la présente invention. Une telle sélection doit par exemple reposer sur un équilibre d'un nombre de facteurs. Ceux-ci comprennent, par exemple, la compatibilité de l'hôte et du vecteur, la toxicité des protéines codées par la séquence ADN à l'égard de l'hôte, la facilité de récupération de la protéine souhaitée, les caractéristiques d'expression des séquences ADN et des séquences de contrôle d'expression qui y sont



activement liées, la sécurité biologique, les coûts et le croisement, la forme ou autres modifications de post-expression nécessaires en vue de l'obtention de la protéine souhaitée.

5 Les IL-1 INHs produits par fermentation des hôtes procaryotiques et eucaryotiques transformés avec les séquences ADN de la présente invention peuvent être employés dans les compositions et les méthodes immunosuppressives et anti-inflammatoires de la présente invention.

10

Les IL-1 INHs de la présente invention peuvent également être analysés de manière à déterminer leurs sites actifs en vue de la production de fragments ou de peptides, y compris des peptides synthétiques, possédant l'activité des IL-1 INHs. Parmi les techniques connues permettant de déterminer de tels sites actifs figurent la cristallographie par rayons X, la résonance magnétique nucléaire, le dichroïsme circulaire, la spectroscopie U.V. et la mutagénèse spécifique de sites. Il en résulte que ces fragments ou peptides font également partie de la présente invention et peuvent être utilisés dans des méthodes et des buts immunosuppressifs ou anti-inflammatoires.

20

L'administration des polypeptides de l'IL-1 INH de la présente invention, ou de peptides dérivés ou synthétisés sur base de ceux-ci ou en utilisant leurs séquences aminoacides, ou leurs sels ou des dérivés pharmaceutiquement acceptables de ceux-ci, peut être assurée par le biais de n'importe lequel des agents ou modes d'administration classiques acceptés, présentant une activité immunosuppressive ou anti-inflammatoire. Ceux-ci comprennent l'administration par voie orale, parentérale, sous-cutanée, intraveineuse, intralésionale ou topique. Les injections locales, intralésionales ou intraveineuses sont préférées.

30

Les compositions utilisées dans ces thérapies peuvent également se présenter sous diverses formes. Celles-ci comprennent par exemple

35

les formes solides, semi-solides et liquides, comme les pastilles, les pilules, les poudres, les suspensions ou solutions liquides, les suppositoires, les solutions à injecter et à infuser. La forme préférée dépend du mode d'administration et de l'application thérapeutique envisagés. Les compositions comporteront également de préférence des véhicules classiques pharmaceutiquement acceptables et peuvent comprendre d'autres agents médicamenteux, adjuvants, excipients, etc., par exemple des préparations de plasma ou de sérumalbumine d'être humain. Les compositions de l'invention se présentent de préférence sous la forme de doses unitaires et seront généralement administrées une ou plusieurs fois par jour.

Afin que l'invention décrite ci-avant soit encore mieux comprise, il est prévu les exemples qui suivent. Il s'entend que ces exemples sont donnés à des fins illustratives uniquement et ne doivent pas être interprétés comme limitant d'aucune façon la présente invention aux méthodes spécifiques exposées ci-après.

Exemple 1 : Purification de l'IL-1 INH

a) Concentration de protéine à partir d'urine humaine

A 4°C, 100 litres d'urine de patients très fébriles (sup. à 38,5°C) exempts d'infections urinaires furent concentrés à deux litres à l'aide d'un appareil Amicon d'ultrafiltration à fibres creuses. La solution obtenue présentait une activité spécifique de 12 U/mg de protéine comme déterminé au moyen de l'essai IL-1/ liaison des récepteurs décrit dans l'exemple 2, 166 U/mg de protéine comme déterminé au moyen de l'essai LAF décrit dans l'exemple 3, 32 U/mg de protéine comme déterminé au moyen de l'essai EL-4/CTLL décrit dans l'exemple 4 et 125 U/mg de protéine comme déterminé au moyen de l'essai MCF décrit dans l'exemple 5. Un "U" ou Unité est défini comme étant la quantité de l'IL-1 INH (µg) produisant une inhibition demi-maximale dans chaque essai

biologique. Voir Fig.9.

b) Précipitation de protéine à partir d'urine humaine

5 Nous avons d'abord saturé l'échantillon d'urine concentrée avec du sulfate d'ammonium solide, en ajoutant lentement le sulfate d'ammonium tout en mélangeant de façon constante, à 4°C, jusqu'à ce qu'une saturation par le sulfate d'ammonium de 40% fut atteinte. Nous avons ensuite retiré le précipité de la solution,  
10 par centrifugation à 10.000 t/min. pendant 1 heure dans une centrifugeuse Sorvall RC-5B (E. I. Du Pont, New Town, Conn.) à rotor GSA à angle fixe. Nous avons alors éliminé la boulette, avons ajusté le liquide surnageant à 80 % de saturation par le sulfate d'ammonium et avons centrifugé à 10.000 t/min. pendant 1  
15 heure. Nous avons ensuite remis la boulette obtenue en suspension dans 20 mM de phosphate de sodium (pH 7,2) avec 150 mM de NaCl (650 ml). Nous avons alors dialysé la solution pendant 24 heures en présence de 45 litres (deux fois) contenant 10 mM de Tris Hcl (pH 8), 2 mM d'EDTA et 5 mM de HCl benzamidine, en vue d'éliminer  
20 le sulfate d'ammonium.

c) Chromatographie par échange d'ions

Nous avons ensuite séparé des autres protéines l'activité de  
25 l'IL-1 INH dans notre fraction combinée, en exploitant l'affinité de liaison élevée que présente l'IL-1 INH à l'égard de deux échangeurs d'anions différents. Chaque échangeur d'anions fut utilisé de manière indépendante ou de façon combinée, la colonne Sépharose DEAE suivant de préférence la colonne Sépharose QAE.

30

1) Colonne Sépharose diéthyl-(2-hydroxypropyl)aminoéthyl - (QAE)

Bien que de nombreux systèmes chromatographiques d'échange d'anions soient bien connus des spécialistes, nous avons choisi  
35 d'utiliser en premier lieu une colonne Sépharose QAE de 5 cm de

diamètre X 45 cm (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, New Jersey). Après chargement de la solution dialysée ci-dessus, nous avons lavé la colonne jusqu'à ce que les protéines non liées en soient éluées (densité optique à 280 nm). Nous avons élué les protéines liées à l'aide de quatre volumes de colonne d'un gradient de sel de 0 à 0,8 M de NaCl dissous dans le tampon d'équilibration. Le débit de colonne était de 120 ml/h. Nous avons surveillé l'activité des diverses fractions au moyen des essais LAF et de liaison des récepteurs (*infra*). Voir Figure 1. Les fractions présentant l'activité biologique de l'IL-1 INH furent éluées aux environs de 150 mM de NaCl. Les fractions actives combinées présentaient une activité spécifique de 33 U/mg de protéine comme déterminé au moyen de l'essai de liaison des récepteurs de l'IL-1 décrit dans l'exemple 2, 63 U/mg de protéine comme déterminé au moyen de l'essai LAF décrit dans l'exemple 3, 27 U/mg de protéine comme déterminé au moyen de l'essai EL-4/CTLL décrit dans l'exemple 4 et 200 U/mg de protéine comme déterminé au moyen de l'essai MCF décrit dans l'exemple 5. Voir Figure 9.

20 2) Colonne Sépharose diéthylaminoéthyl - (DEAE).

Nous avons dialysé l'échantillon actif en présence de 10 mM de Tris HCl (pH 7) chargé sur une colonne Sépharose DEAE à débit rapide, de 2,5 cm X 30 cm (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, New Jersey). La colonne chargée fut lavée avec le tampon d'équilibration (10 mM de Tris HCl, de pH 7) jusqu'à ce que la densité optique (à 280 nm) fut de 0 environ. Nous avons alors élué la protéine liée à l'aide d'un gradient de 0 à 0,2 M de NaCl dissous dans le tampon d'équilibration. Le gradient correspondait à 10 fois le volume de la colonne. Le débit de colonne était de 78 ml/h. Nous avons de nouveau surveillé l'activité des différentes fractions comme décrit ci-dessus. Ladite élution a permis l'élution des fractions contenant l'activité de l'IL-1 INH à la fin de l'étape de lavage avec les 90 mM de NaCl. La figure 2 montre le profil d'activité de l'IL-1 INH d'urine sur la colonne

Sépharose DEAE, dans laquelle l'activité inhibitrice fut suivie de (A) l'essai IL-1/LAF et (B) l'essai IL-1/liaison des récepteurs.

Nous avons ensuite concentré l'échantillon actif à 6 mL au moyen  
5 d'un appareil Amicon d'ultrafiltration à membrane YM-10. La  
solution obtenue présentait une activité spécifique de 50 U/mg de  
protéine comme déterminé au moyen de l'essai IL-1/liaison des  
récepteurs (infra), 125 U/mg de protéine comme déterminé au moyen  
de l'essai LAF (infra), 40 U/mg de protéine comme déterminé au  
10 moyen de l'essai EL-4/CTLL (infra) et 500 U/mg de protéine comme  
déterminé au moyen de l'essai MCF (infra). Voir Figure 9.

Il s'entend bien sûr que d'autres colonnes d'échange d'anions  
auraient également pu être choisies sans pour autant sortir du  
15 champ d'application de la présente invention.

d) Ultrogel AcA54

Nous avons ensuite fractionné par deux fois le concentré préparé  
20 comme décrit ci-dessus, en fonction du poids moléculaire, au moyen  
d'une filtration sur gel. Bien qu'un nombre de systèmes de  
filtration sur gel adéquats soient bien connus des spécialistes,  
nous avons choisi d'utiliser un gel AcA54 (LKB, Suède) présentant  
une plage de fractionnement entre 6000 et 70.000 daltons. Nous  
25 avons de nouveau surveillé l'activité des fractions comme précisé  
ci-avant. Voir Figure 3. L'échantillon des fractions actives  
présentait une activité spécifique de 1666 U/mg de protéine comme  
déterminé au moyen de l'essai IL-1/liaison des récepteurs (infra),  
526 U/mg de protéine comme déterminé au moyen de l'essai LAF  
30 (infra), 333 U/mg de protéine comme déterminé au moyen de l'essai  
EL-4/CTLL (infra) et 1110 U/mg de protéine comme déterminé au  
moyen de l'essai MCF (infra) ( Voir Figure 9) et un poids  
moléculaire d'environ 25 kD. De nouveau, il s'entend que d'autres  
systèmes de filtration auraient également pu être utilisés.

La figure 4 montre la réponse de dose des divers échantillons d'IL-1 INH d'urine au cours de (A) l'essai IL-1/LAF et (B) les essais IL-1/ liaison des récepteurs décrits ci-après. Après chaque étape de purification, c'est-à-dire : urine concentrée, Sépharose QAE, Sépharose DEAE et AcA54 (deux fois), la concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) de l'IL-1 INH requis pour provoquer l'inhibition, a diminué, indiquant de la sorte une protéine plus pure.

e) Immunoabsorption négative

10

Nous avons analysé l'échantillon actif résultant de la filtration sur gel, au moyen d'un séquençage aminoacide suivant la méthode classique de dégradation automatisée d'Edman, et avons observé que les deux principaux contaminants représentant au moins 90 % de la teneur en protéines était l'apolipoprotéine A1 et la protéine de liaison rétinol. Bien que diverses méthodes soient disponibles pour extraire ces protéines, nous avons choisi l'immunoabsorption et la chromatographie hydrophobe.

20

Dès lors, nous avons ensuite éliminé par immunoabsorption les principaux contaminants de l'échantillon actif d'IL-1 INH AcA54. Les anticorps monoclonaux et polyclonaux vis-à-vis de la protéine de liaison rétinol et de l'apolipoprotéine A1 furent générés à l'aide de méthodes standard d'immunisation. Nous avons alors partiellement purifié l'immunoglobuline Gs (IgGs) par précipitation avec une saturation de 40 % de sulfate d'ammonium. La boulette d'IgGs fut remise en suspension dans 0,2 M de phosphate de sodium et dialysée en présence du même tampon. Nous avons ensuite couplé l'échantillon d'IgGs à de l'agarose activé par du vinylsulfone comme décrit par les fabricants (KEM-EN-TEC, Biotechnology Corp., Danemark). Après avoir équilibré l'immunoabsorbant, en nous servant d'une solution saline à tampon phosphate, nous avons absorbé les contaminants de l'échantillon d'IL-1 INH en passant plusieurs fois l'échantillon sur l'immunoabsorbant jusqu'à absorption complète de la protéine de

35

liaison rétinol et de l'apolipoprotéine A1, comme déterminé par électrophorèse sur plaque de gel de sodium dodécyl sulfate-polyacrylamide (SDS-PAGE). La solution finale présentait une activité spécifique de 3334 U/mg de protéine comme déterminé au moyen de l'essai IL-1/liaison des récepteurs (infra), 2500 U/mg de protéine comme déterminé au moyen de l'essai LAF (infra), 1250 U/mg de protéine comme déterminé au moyen de l'essai EL-4/CTLL (infra), 2160 U/mg de protéine comme déterminé au moyen de l'essai MCF (infra) ( Voir Figure 9) et fournissait une seule crête sur SDS/PAGE.

f) Sépharose phényl

L'échantillon d'inhibiteur de l'IL-1 immunoabsorbé fut ajusté à 1 M de NaCl en ajoutant un volume de 2 M de NaCl dissous dans 10 mM de Tris HCl de pH7 et chargé sur la colonne Sépharose phényl (0,5 x 5 cm - cette résine fut obtenue auprès de Pharmacia Fine Chemicals, Suède). Cette résine fut préalablement équilibrée avec 10 mM de Tris HCl de pH 7 contenant 0,2 M de NaCl (tampon d'équilibration). Après chargement, la colonne fut lavée avec 3 volumes de colonne du tampon d'équilibration afin d'éluer toutes les protéines non liées. Les protéines liées furent éluées avec un gradient de 0,2 M de NaCl à 0 M dissous dans 10 mM de Tris HCl de pH 7. Le gradient total correspondait à 50 fois le volume de la colonne. Le débit de colonne était de 30 ml/h. L'activité de l'inhibiteur de l'IL-1 fut élue aux environs de 0,160 M de NaCl, pour une protéine présentant un poids moléculaire de 25 kD et un point isoélectrique de 4.7. La solution finale présentait une activité spécifique de 38461 U/mg de protéine comme déterminé au moyen de l'essai IL-1/liaison des récepteurs (infra), 2500 U/mg de protéine comme déterminé au moyen de l'essai LAF (infra), 35020 U/mg de protéine comme déterminé au moyen de l'essai EL-4/CTLL (infra), 30303 U/mg de protéine comme déterminé au moyen de l'essai MCF (infra) (Voir Figure 9) et fournissait une seule crête sur SDS/PAGE.

Exemple 2 : Aptitude de l'IL-1 INH pour la liaison aux récepteurs

Afin de déterminer les caractéristiques de liaison de notre IL-1 INH au récepteur de l'IL-1 sur des cellules cibles EL-4-6.1, nous  
5 avons d'abord vérifié si l'IL-1 INH interférait sur la liaison de [125I]-IL-1 aux cellules cibles. Nous avons marqué l'IL-1 avec 125I par la méthode de la chloramine T [Lowenthal et al., "Binding and Internalization of Interleukin-1 by T Cells", J. Exp. Med., 164, p. 1060] et l'avons coincubé avec un complément d'IL-1 INH  
10 non marqué, suivi d'un lavage sur un gradient d'huile. A l'aide d'un compteur gamma, nous avons ensuite mesuré la matière retenue avec les cellules et avons découvert qu'une augmentation de la concentration de l'IL-1 INH réduisait la quantité de [125I]-IL-1 lié à la surface des cellules cibles.

15 Nous avons également vérifié si l'IL-1 INH interférait sur la liaison de [125I]-IL-1 INH aux cellules cibles, si la liaison de [125I]-IL-1 INH pouvait être concurrencée par l'IL-1 non marqué ou si la liaison de [125I]-IL-1 INH aux cellules cibles pouvait être  
20 mise en concurrence avec la protéine de liaison rétinol ou l'apolipoprotéine A1. A l'aide de [125I], nous avons marqué l'IL-1 INH suivant la méthode de Bolton et Hunter [Bolton and Hunter - "The Labelling of Proteins To High specific Radioactivities By Conjugation to a 125I-Containing Acylating Agent", Biochem. J., 133, p. 529 (1973)]. L'incubation de la matière avec des cellules  
25 cibles EL-4-6.1, suivie d'un lavage sur un gradient d'huile, et l'analyse sur SDS PAGE ont révélé qu'une espèce de 25 kD environ se liait aux cellules EL-4. Nous avons observé que la coincubation de [125I]-IL-1 INH avec un complément d'IL-1 INH non marqué  
30 empêchait la liaison de l'espèce de 25 kD marquée. Nous avons également coincubé [125I]-IL-1 INH avec 50 nanogrammes d'IL-1 $\beta$  non marqué et avons découvert que ceci empêchait la liaison de l'espèce de 25 kD marquée. Nous avons également coincubé [125I]-IL-1 INH avec 1  $\mu$ g de protéine de liaison rétinol immunopurifiée  
35 et avec 1  $\mu$ g d'apolipoprotéine A1 recombinante et avons découvert



que ceci n'empêchait pas la liaison de l'espèce de 25 kD marquée. Par conséquent, l'espèce de 25 kD présente dans la préparation de l'IL-1 INH marqué se lie à la surface de cellules EL-4-6.1 intactes et cette liaison est concurrencée par l'inhibiteur non  
5 marqué et par l'IL-1, mais non par la protéine de liaison rétinol ni par l'apolipoprotéine A1.

Exemple 3 : Essai IL-1/LAF

10 Nous avons démontré l'activité inhibitrice de l'IL-1 INH au cours d'un essai IL-1/LAF, comme mesuré par la prolifération des thymocytes (cellule T) dans la souris C<sub>3</sub>H/HeJ [J.M. Dayer et al., "Human Recombinant IL-1 Stimulates Collagenase And Prostaglandin  
E2 Production By Human Synovial Cells", J. Clin Invest., 77, p.  
15 645 (1986)]. Nous avons costimulé les thymocytes pendant 72 heures avec PHA (1 µg/ml) en présence de hrIL-1α [P. Wingfield et al., "Purification and Characterization of Human Interleukin-1 Expressed In E.coli." Eur. J. Biochem, 165, p. 537 (1987)] ou d'IL-1β [P. Wingfield et al., "Purification And Characterization  
20 of Human Interleukin-1 β Expressed In Recombinant E.coli", Eur. J. Biochem, 160, P. 491 (1986)] à différentes concentrations finales de hrIL-1 variant de 20 pg/ml à 2.000 pg/ml, comme montré à la figure 5. Nous avons obtenu l'inhibition complète de la prolifération des thymocytes costimulés avec hrIL-1α ou IL-1β  
25 lorsque nous avons ajouté aux cellules les fractions de l'IL-1 INH de l'exemple 1(e). L'activité inhibitrice fut surveillée pour trois dilutions de l'IL-1 INH : 1/20, 1/40 et 1/80.

Etant donné que l'addition d'IL-1 INH à des cellules PHA-stimulées, en l'absence de hrIL-1, n'influait pas  
30 l'incorporation de [H<sup>3</sup>]-TdR, nous avons pu déterminer que l'inhibition n'était pas due à un effet cytotoxique ou non spécifique mais précisément à l'inhibition de l'activité biologique de l'IL-1.

Exemple 4 : Essai EL-4/CTLL

Nous avons déterminé l'activité inhibitrice de l'IL-1 INH en observant si l'aptitude de l'IL-1 $\alpha$  ou de l'IL-1 $\beta$  à induire la production de l'IL-2 dans les cellules EL-4 pouvait être inhibée [voir par exemple A.J.H. Gearing et al., "A Simple Sensitive Bioassay For IL-1 Which Is Unresponsive to 10<sup>3</sup> U/ml Of IL-2", J. Immun. Met., 99, p. 7 (1987)]. Celle-ci est mesurée en cocultivant un sous-clone de cellules EL-4 incapable d'assimiler la thymidine du milieu avoisinant avec des cellules CTLL-2 et en observant si les cellules CTLL-2 prolifèrent ou non.

Les cellules EL-4-6.1 c10 et les cellules CTLL-2 furent cultivées ensemble à une concentration de 10<sup>4</sup> cellules de chaque type, en présence d'IL-1 $\alpha$  ou d'IL-1 $\beta$  à environ 1 microgramme/ml et de l'IL-1 INH de l'exemple 1(e). Nous avons ajouté 1 microCurie de [H<sup>3</sup>]-TdR après 18 heures de coculture et avons incubé pendant encore 6 heures à 37°C dans une atmosphère humidifiée. Les cellules furent récoltées dans un appareil MASH de récolte de cellules sur des lames de fibre de verre; elles furent ensuite séchées et préparées avec un cocktail à scintillations en vue du comptage dans un compteur bêta. Nous avons obtenu l'inhibition complète de l'incorporation de [H<sup>3</sup>]-TdR à des dilutions de 1/20, 1/40 et 1/80 de l'IL-1 INH.

Exemple 5 : Essai IL-1/MCF

Nous avons encore démontré l'activité inhibitrice de l'IL-1 INH au cours d'un essai IL-1/MCF, comme mesuré sur des fibroblastes obtenus à partir de prépuces d'enfants [J. Dayer et al., "Participation Of Monocyte-Macrophage And Lymphocyte In The Production Of A Factor That Stimulates Collagenase And Prostaglandin Release By Rheumatoid Synovial Cells," J. Clin. Invest., 64, p. 1386 (1979); J. Dayer et al., "Induction Of Human Interleukin-1 mRNA Measured By Collagenase And Prostaglandin E2-

Stimulating Activity In Rheumatoid Synovial Cells", Eur. J. Immunol., 14, p. 898 (1984)]. Nous avons stimulé les fibroblastes avec hrIL-1 $\alpha$  or hrIL-1 $\beta$  aux mêmes concentrations que dans l'essai IL-1/LAF et avons surveillé l'activité inhibitrice aux mêmes dilutions finales de l'IL-1 INH que dans l'essai IL-1/LAF. Par la suite, nous avons cultivé les cellules pendant 72 heures et avons mesuré la production de la prostaglandine E<sub>2</sub> dans les fibroblastes au moyen d'un double essai de radioimmunisation des anticorps [J. Dayer (1979), supra] en utilisant un antisérum vis-à-vis de la prostaglandine E<sub>2</sub>. Comme illustré à la figure 6, nous avons observé une réponse de dose de production de prostaglandine E<sub>2</sub> jusque des concentrations de 100 pg/ml par soit hrIL-1 $\alpha$  ou hrIL-1 $\beta$ . Nous fûmes en mesure d'inhiber cette activité biologique en ajoutant les fractions de l'IL-1 INH de l'exemple 1(e). Nous avons pu déterminer que l'IL-1 INH était de nouveau actif vis-à-vis de hrIL-1 $\alpha$  et de hrIL-1 $\beta$ .

Nous avons alors réalisé l'essai ci-dessus en remplaçant hrIL-1 par hrTNF $\alpha$  [A. Marmenout et al., "Molecular Cloning and Expression of TNF And Comparison With Mouse TNF", Eur. J. Biochem, 152, pp. 515-22 (1985)] en vue de déterminer la spécificité de l'IL-1 INH, état donné que TNF $\alpha$  est également un médiateur de production de la prostaglandine E<sub>2</sub> et du collagène. Comme illustré à la figure 7, la production de la prostaglandine E<sub>2</sub> induite par hrTNF ne fut pas influencée de manière significative par l'addition de notre IL-1 INH, illustrant ainsi la spécificité de notre IL-1 INH.

#### Exemple 6 : Essai de prolifération des fibroblastes

Nous avons encore testé l'activité biologique de l'IL-1 en présence de l'IL-1 INH de l'exemple 1(e), au moyen d'un essai de prolifération des fibroblastes mesurée par l'incorporation de [<sup>3</sup>H]-TdR. Après culture de fibroblastes de prépuces humains dans le MEM d'Eagle augmenté de 10 mM d'HEPES, 100 U/ml de pénicilline, 100 ug/ml de streptomycine, 1% de glutamine, 1 % d'acides aminés

non essentiels et 2% de FCS, nous avons ensemencé les cellules dans des plaques à 96 puits (2000 cellules/puits) et les avons cultivées pendant 24 heures dans un incubateur à 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C. Après avoir enlevé le milieu, nous avons stimulé les cellules  
5 fibroblastiques en ajoutant soit hrIL-1  $\alpha$  ou hrIL-1  $\beta$  et avons ajouté l'IL-1 INH selon les mêmes dilutions que pour les essais ci-avant. Nous avons attendu 48 heures et avons ensuite excité les cellules avec [H<sup>3</sup>]-Tdr pendant 16 heures. Le milieu fut enlevé des cellules, lesquelles furent alors lavées à l'aide de PBS et  
10 trypsinisées à 37°C pendant 15 minutes. A l'aide d'un appareil de récolte de cellules (Skatron, Lier, Norvège), nous avons récolté et placé les cellules sur des filtres de verre (Skatron, Inc., Sterling, Virginia, U.S.A), lavées à l'eau et séchées à l'air, puis nous avons déterminé l'incorporation cpm au moyen d'un  
15 compteur à scintillations. Comme illustré à la Figure 8, la prolifération des fibroblastes dépendait des doses de hrIL-1  $\alpha$  et de hrIL-1  $\beta$ . Nous avons obtenu une incorporation maximale de [H<sup>3</sup>]-Tdr avec 250 pg/ml de hrIL-1  $\alpha$  ou  $\beta$ . L'addition de la fraction inhibitrice Aca54 entraîna également une réduction totale de la  
20 prolifération induite par hrIL-1. Nous avons également obtenu une réversibilité complète de l'inhibition en augmentant les concentrations d'IL-1 ou en diluant l'IL-1 INH.

Nous avons également déterminé la spécificité de cette inhibition  
25 en stimulant les fibroblastes avec hrTNF  $\alpha$ , ce qui induit une prolifération des fibroblastes en fonction de la dose, jusque des concentrations de 250 pg/ml. Le fait d'ajouter la fraction inhibitrice Aca54 ne provoqua pas l'inhibition de l'activité biologique de hrTNF  $\alpha$ . Ceci confirme la spécificité de l'IL-1 INH.

30

#### Exemple 7 : Détermination du point isolélectrique

Nous avons utilisé l'échantillon de protéine de l'exemple 1(e) et l'avons chargé sur une colonne (2,5 X 10 cm) de chromato-  
35 focalisation du type PBE 94 (Pharmacia Fine Chemical, Suède),

préalablement équilibré avec 25 mM d'imidazole (pH 7,5). Nous  
avons ajouté un polytampon 74 HCl, de pH 4, lequel a permis  
l'élution des protéines liées, en fonction de leur point  
isoélectrique. Nous avons pu déterminer que le point isoélectrique  
5 de l'IL-1 INH correspondait à 4,7.

Bien que la présente invention ait été décrite ci-avant au moyen  
de diverses structures de mise en oeuvre des procédés propres à la  
présente invention, il est évident que les concepts de base  
10 peuvent être modifiés en vue de fournir d'autres structures  
utilisant les procédés et les compositions de la présente  
invention.

Par conséquent, il s'entend que le champ de la présente invention  
15 est défini par les revendications y afférant qui suivent, plutôt  
que par les structures spécifiques exposées ci-avant à titre  
d'exemple uniquement.

20

25

30

35

## Revendications

1. Un IL-1 INH substantiellement pur caractérisé par une activité inhibitrice de l'activité LAF de l'IL-1, de l'activité MCF de l'IL-1 et de la prolifération de fibroblastes induite par l'IL-1, et par une activité non inhibitrice de la production de PGE<sub>2</sub> et de collagène induite par TNF $\alpha$ .  
5
2. IL-1 INH suivant la revendication 1, caractérisé par une activité inhibitrice de la production d'IL-2 induite par l'IL-1.  
10
3. IL-1 INH suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'il se lie spécifiquement à des récepteurs de l'IL-1 sur des cellules cibles.  
15
4. IL-1 INH suivant une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il présente un poids moléculaire d'environ 25.000 daltons sur SDS PAGE.
- 20 5. IL-1 INH suivant la revendication 4, caractérisé en ce qu'il présente un point isoélectrique de 4,7 déterminé par chromatofocalisation.
- 25 6. IL-1 INH suivant une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il est substantiellement exempt d'autres protéines.
7. IL-1 INH suivant la revendication 6, caractérisé en ce que les autres protéines sont sélectionnées du groupe constitué de l'apolipoprotéine A1 et de la protéine de liaison rétinol.  
30
8. IL-1 INH suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'il présente une activité spécifique d'au moins  $1,2 \times 10^3$  U/mg dans un essai EL-4/CTLL.
- 35 9. IL-1 INH suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'il

présente une activité spécifique d'au moins  $3,8 \times 10^4$  U/mg dans un essai de liaison aux récepteurs de l'IL-1.

5 10. IL-1 INH suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'il présente une activité spécifique d'au moins  $6,2 \times 10^4$  U/mg dans un essai IL-1/LAF.

10 11. IL-1 INH suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'il présente une activité spécifique d'au moins  $3,5 \times 10^4$  U/mg dans un essai EL-4/CTLL.

15 12. IL-1 INH suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'il présente une activité spécifique d'au moins  $3,0 \times 10^4$  U/mg dans un essai IL-1/MCF.

20 13. Une méthode de purification d'un IL-1 INH suivant une des revendications 1 à 12, comportant les étapes de a) concentration d'urine de patients fébriles; b) précipitation d'IL-1 INH brut à partir de l'urine concentrée; et c) fractionnement de l'IL-1 INH d'autres contaminants au moyen d'au moins une chromatographie par échange d'ions, une chromatographie hydrophobe, une filtration sur gel et une immunoabsorption.

25 14. Méthode suivant la revendication 13, caractérisée en ce que l'IL-1 INH brut est précipité de l'urine concentrée au moyen de sulfate d'ammonium.

30 15. Méthode de purification d'un IL-1 INH suivant une des revendications 1 à 12, caractérisée en ce qu'elle comprend le fractionnement de l'IL-1 INH d'autres contaminants au moyen d'au moins une chromatographie par échange d'ions, une chromatographie hydrophobe, une filtration sur gel et une immunoabsorption.

35 16. Méthode suivant la revendication 13 ou 15, caractérisée en ce que la chromatographie par échange d'ions est réalisée au moyen de

colonnes Sépharose QAE ou DEAE, de manière indépendante ou de façon combinée.

5 17. Méthode suivant la revendication 13, caractérisée en ce que la filtration sur gel est réalisée sur un gel AcA54.

10 18. Méthode suivant la revendication 13, caractérisée en ce que l'immunoabsorption est réalisée par utilisation d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux vis-à-vis de la protéine de liaison rétinol et de l'apolipoprotéine A1.

15 19. Une méthode de production d'une molécule d'ADN recombinant, caractérisée par un codage de séquence ADN pour un IL-1 INH suivant une des revendications 1 à 12, comportant les étapes de :  
a) détermination de la séquence aminoacide d'un IL-1 INH purifié;  
b) réalisation d'une série de sondes d'oligonucléotides sur base de la séquence aminoacide de l'étape a);  
c) exploration d'une librairie d'ADN ou d'ADNc;  
d) sélection de clones hybridant aux sondes dans des conditions  
20 traditionnelles;  
e) analyse des clones sélectionnés par séquençage ou expression en vue de déterminer s'ils contiennent une séquence ADN codant pour l'IL-1 INH.

25 20. Une molécule d'ADN recombinant comportant une séquence ADN codant sur expression pour un IL-1 INH suivant une des revendications 1 à 12.

30 21. Molécule d'ADN recombinant suivant la revendication 20, caractérisée en ce qu'elle comporte une séquence de contrôle d'expression, laquelle est activement reliée à la séquence ADN codant pour l'IL-1 INH dans la molécule d'ADN recombinant.

35 22. Molécule d'ADN recombinant suivant la revendication 21, caractérisée en ce que sa séquence de contrôle d'expression est



sélectionnée sur base d'un groupe constitué du système lac, du système trp, du système tac, du système trc, de régions majeures opérateur et promoteur de phage, de la région de contrôle de la protéine de couverture fd, des promoteurs de départ et de fin de SV40, de promoteurs dérivés de polyoma, adénovirus et virus simien, du promoteur de la kinase 3-phosphoglycérate, des promoteurs de la phosphatase acide de levure, du promoteur des facteurs de reproduction de la levure et combinaison de ceux-ci.

23. Un procédé pour la production d'un IL-1 INH suivant une des revendications 1 à 12 comportant l'étape de culture d'un hôte unicellulaire transformé avec une molécule d'ADN recombinant suivant la revendication 21 ou 22.

24. Une composition pharmaceutique comportant une quantité thérapeutiquement efficace d'un IL-INH suivant une des revendications 1 à 12 ou produit par les méthodes d'une des revendications 13 à 18, dans un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

25. Une méthode de traitement de maladies et d'inflammations comportant l'étape de traitement de manière pharmaceutiquement acceptable d'un mammifère à l'aide de la composition suivant la revendication 24.

25

30

35

Fig. 1

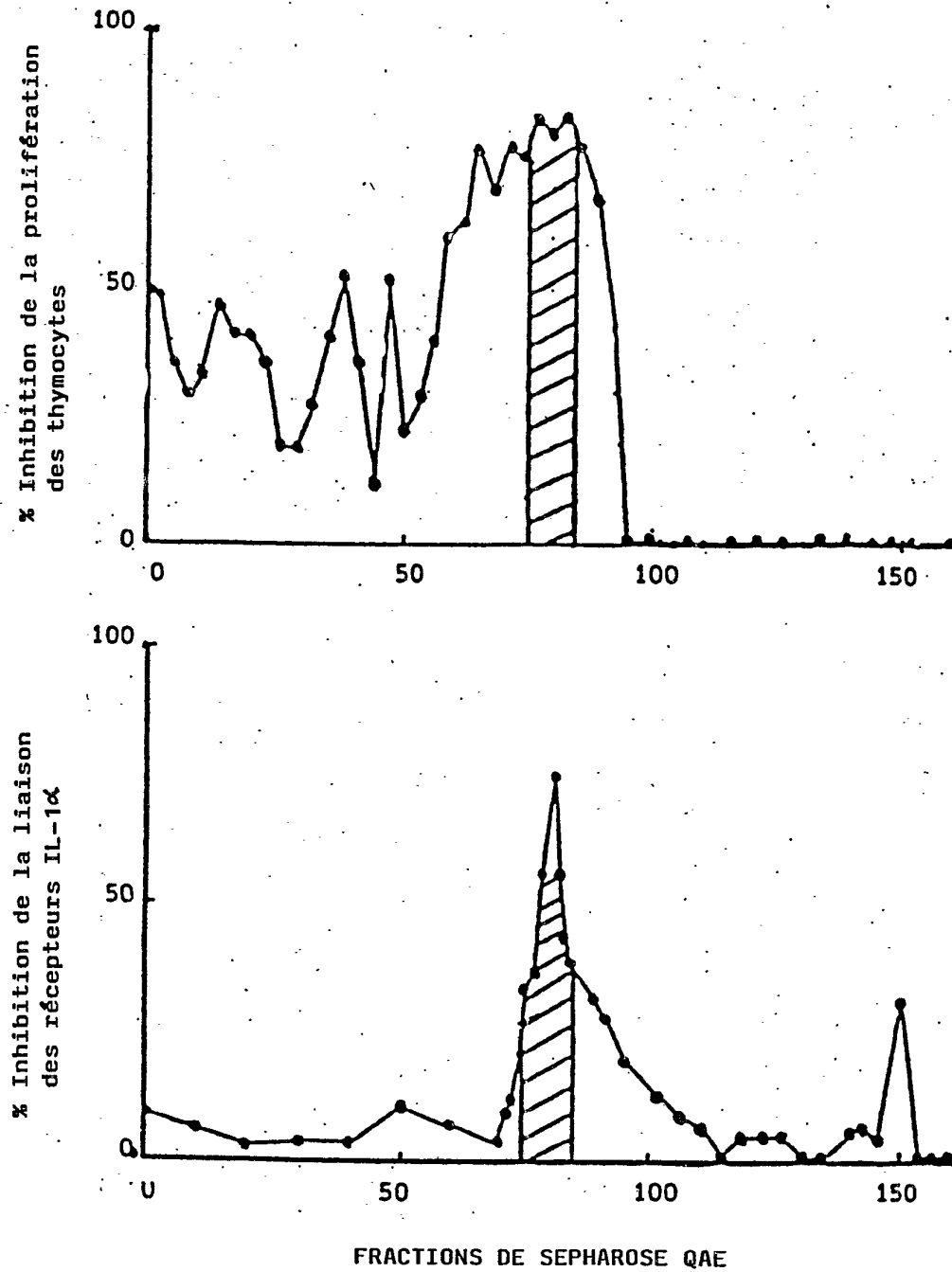


Fig. 2

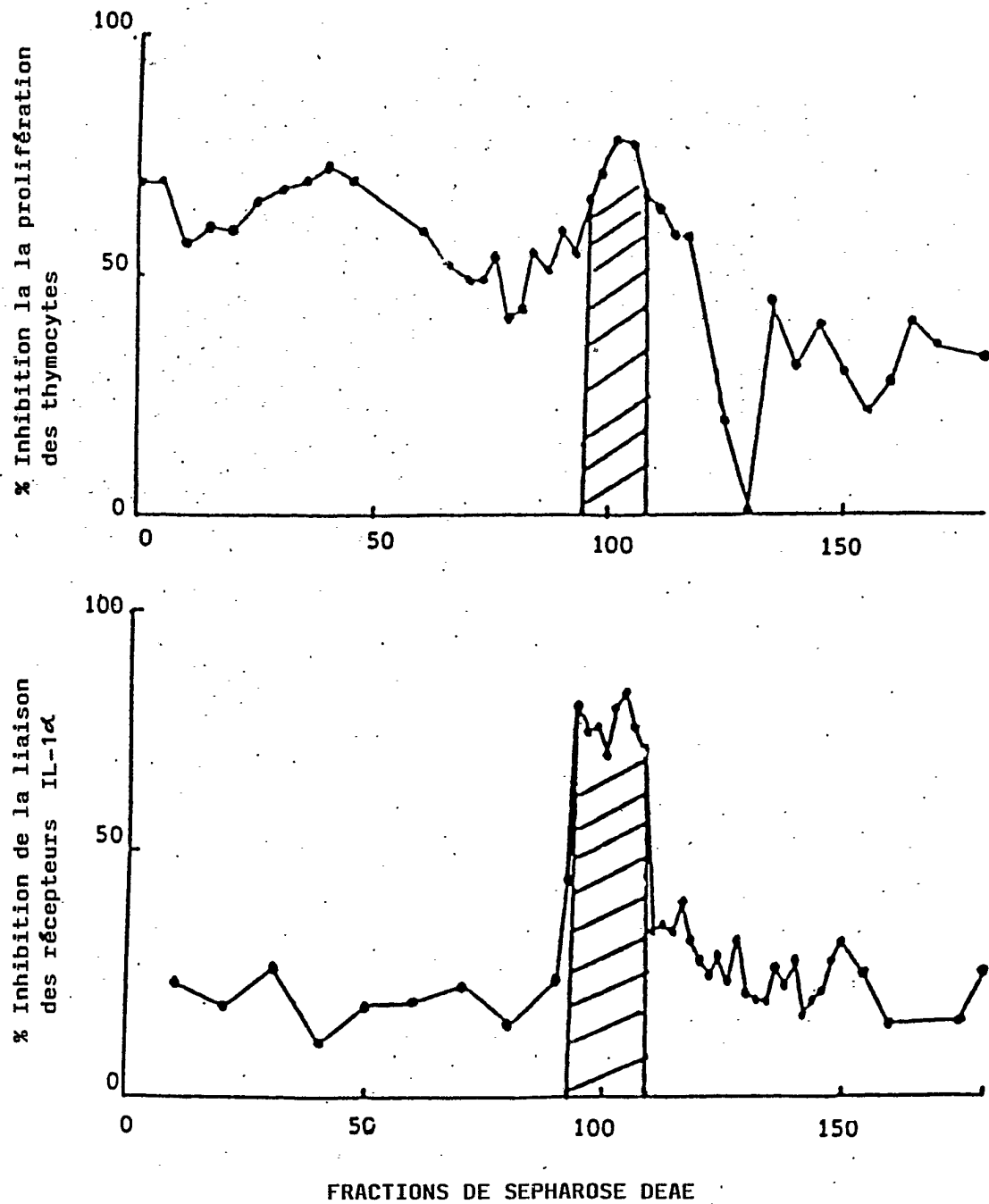


Fig. 3

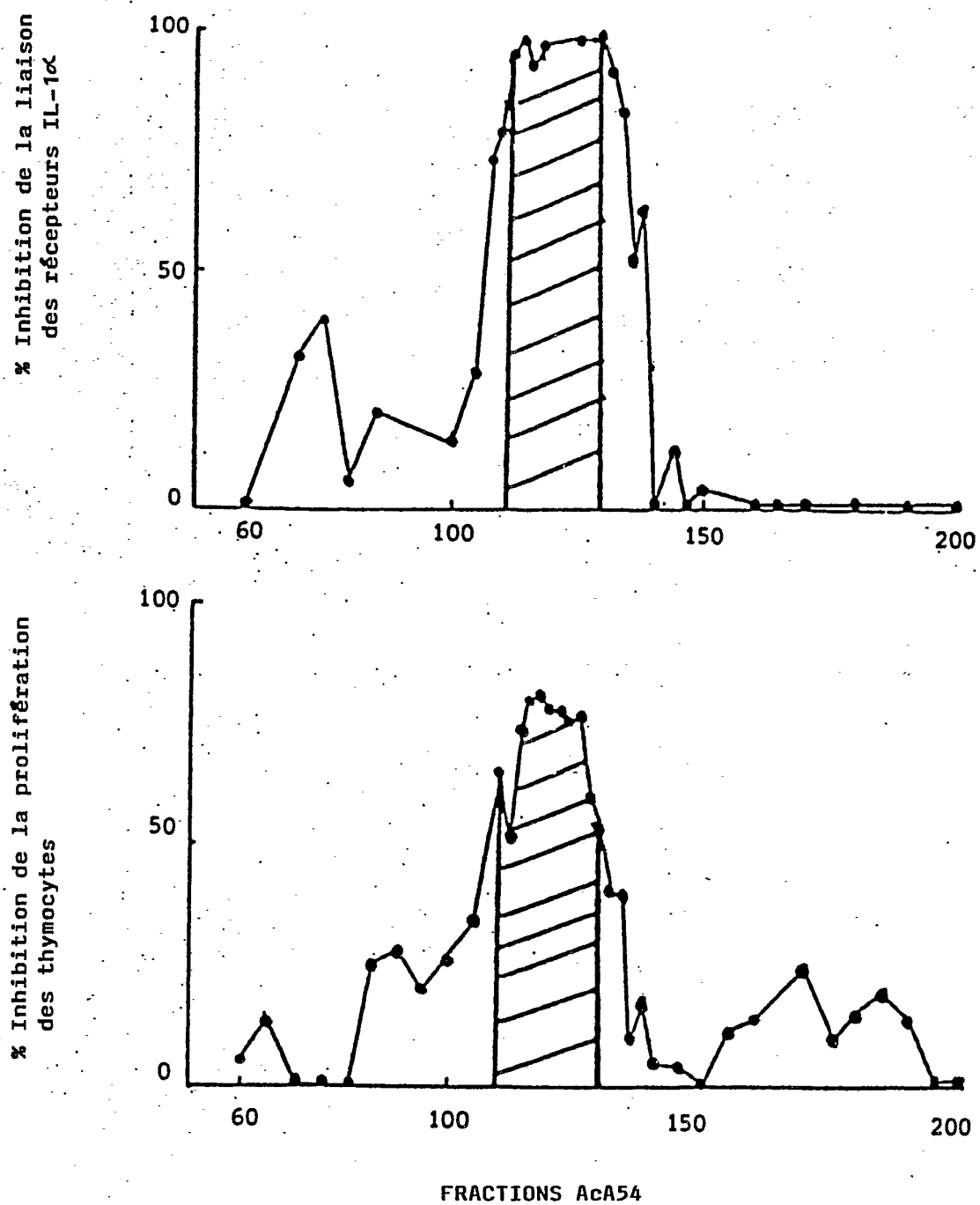
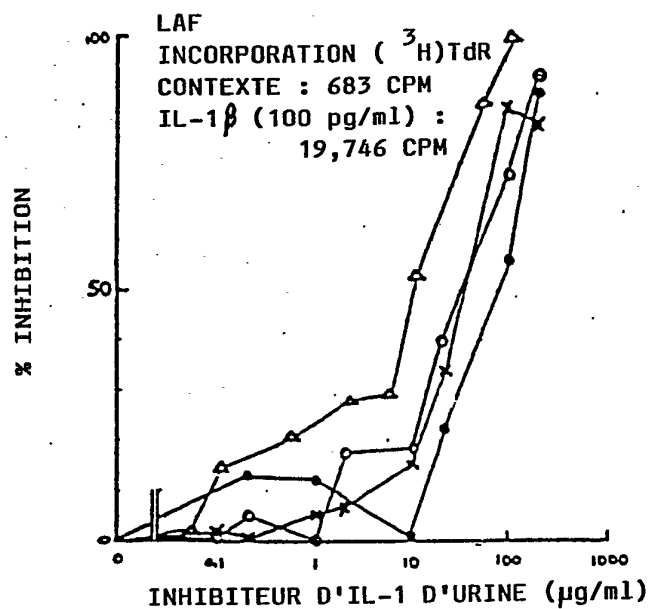
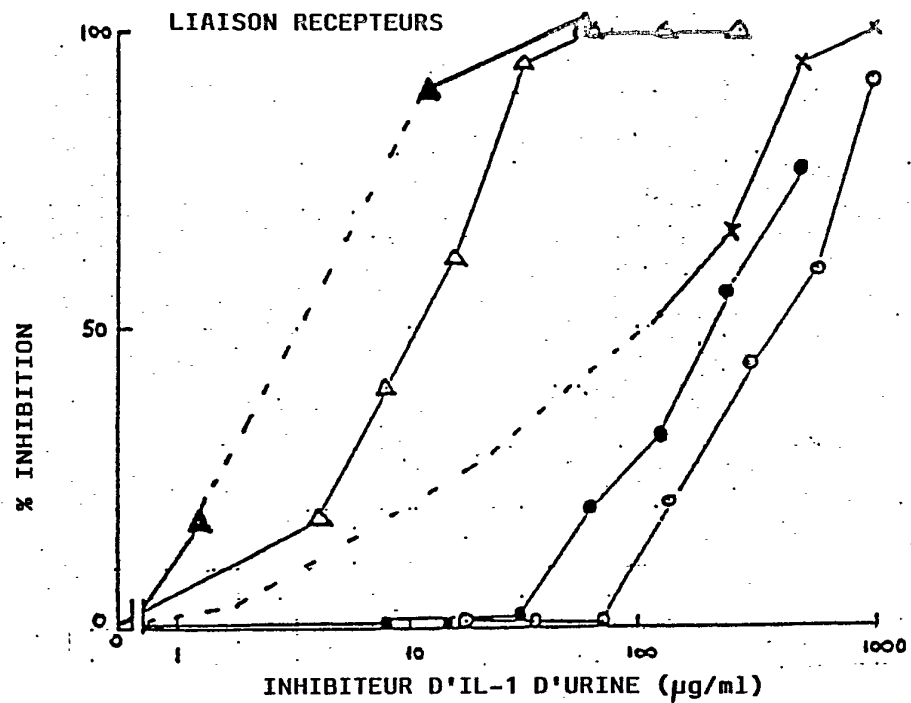


Fig. 4

-36-



- ▲ = AcA54, deuxième fraction de filtration
- △ = AcA54, première fraction de filtration
- × = DEAE - Fraction de colonne Sépharose
- = QAE - Fraction de colonne Sépharose
- = Fraction d'urine

Fig.5

ACTIVITE IL-1 INH MESUREE AU COURS DE L'ESSAI IL-1 / LAF

| Concentration finale de<br>hrIL-1 (pg/mL) pour les<br>thymocytes PHA-stimulés | Forme de hrIL-1<br>ajouté aux<br>thymocytes | Dilution finale de la fraction inhibitrice AcA54 (a)                    |              |              |              |
|-------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|--------------|--------------|--------------|
|                                                                               |                                             | Aucune                                                                  | 1/20         | 1/40         | 1/80         |
|                                                                               |                                             | Incorporation de [ <sup>3</sup> H]-TdR dans les thymocytes murins (cpm) |              |              |              |
| 0                                                                             | -                                           | 1,1 +/- 0,1                                                             | 1,1 +/- 0,2  | 1,3 +/- 0,1  | 1,1 +/- 0,1  |
| 20                                                                            | α                                           | 3,5 +/- 0,4                                                             | 1,0 +/- 0,1  | 1,1 +/- 0,2  | 1,1 +/- 0,1  |
|                                                                               | β                                           | 5,7 +/- 0,4                                                             | 1,0 +/- 0,1  | 1,1 +/- 0,1  | 1,0 +/- 0,2  |
| 40                                                                            | α                                           | 8,6 +/- 3,0                                                             | 1,0 +/- 0,1  | 0,9 +/- 0,1  | 1,0 +/- 0,1  |
|                                                                               | β                                           | 8,2 +/- 2,0                                                             | 1,0 +/- 0,1  | 1,2 +/- 0,2  | 1,5 +/- 0,4  |
| 100                                                                           | α                                           | 14,6 +/- 1,0                                                            | 1,0 +/- 0,1  | 1,4 +/- 0,1  | 2,5 +/- 0,5  |
|                                                                               | β                                           | 15,4 +/- 2,2                                                            | 1,2 +/- 0,1  | 1,6 +/- 0,1  | 3,2 +/- 0,4  |
| 2000                                                                          | α                                           | 24,7 +/- 3,5                                                            | 10,2 +/- 1,5 | 16,0 +/- 3,1 | 25,4 +/- 4,7 |
|                                                                               | β                                           | 20,1 +/- 2,6                                                            | 20,1 +/- 2,6 | 12,1 +/- 4,0 | 22,8 +/- 0,2 |

(a) Des fractions tampon (aucune) ou des fractions inhibitrices Aca54 (18 - 25 kD) (voir Fig. 1) furent incubées à diverses dilutions en présence ou en l'absence de différentes concentrations de hrIL-1 $\alpha$  ou de hrIL-1 $\beta$ .

(b) L'incorporation de [ $^3$ H]-IdR dans les thymocytes en présence de PHA (IL-1/LAF) fut mesurée.

Les valeurs représentent des moyennes +/- SEM (N = 3).

ACTIVITE IL-1 INH MESUREE AU COURS DE L'ESSAI IL-1 / MCF

| Concentration finale de<br>hrIL-1 (pg/ml) sur les<br>fibroblastes humains        | Forme de hrIL-1<br>ajouté aux<br>fibroblastes | Dilution finale de la fraction inhibitrice AcA54 (a) |            |             |              |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------|-------------|--------------|
|                                                                                  |                                               | Aucune                                               |            |             |              |
|                                                                                  |                                               | 1/20                                                 | 1/40       | 1/80        |              |
| Production de PGE <sub>2</sub> par les fibroblastes dermiques humains (ng/ml)(b) |                                               |                                                      |            |             |              |
| 0                                                                                | -                                             | 0,5 +/- 0,1                                          | 8 +/- 3,6  | 8 +/- 2,9   | 7 +/- 2,0    |
| 20                                                                               | α                                             | 20 +/- 4,6                                           | 8 +/- 3,5  | 6 +/- 2,6   | 10 +/- 4,8   |
|                                                                                  | β                                             | 17 +/- 3,1                                           | 12 +/- 3,1 | 11 +/- 2,0  | 12 +/- 5,0   |
| 40                                                                               | α                                             | 41 +/- 9,6                                           | 13 +/- 4,2 | 10 +/- 0,9  | 12 +/- 5,1   |
|                                                                                  | β                                             | 28 +/- 8,6                                           | 13 +/- 5,8 | 13 +/- 3,4  | 6 +/- 2,2    |
| 100                                                                              | α                                             | 62 +/- 11,1                                          | 8 +/- 3,8  | 15 +/- 8,2  | 16 +/- 2,1   |
|                                                                                  | β                                             | 55 +/- 5,2                                           | 15 +/- 6,4 | 21 +/- 6,0  | 26 +/- 5,1   |
| 2000                                                                             | α                                             | 46 +/- 3,9                                           | 49 +/- 7,4 | 71 +/- 10,2 | 87 +/- 11,7  |
|                                                                                  | β                                             | 64 +/- 13                                            | 47 +/- 7,0 | 57 +/- 39,0 | 113 +/- 16,2 |

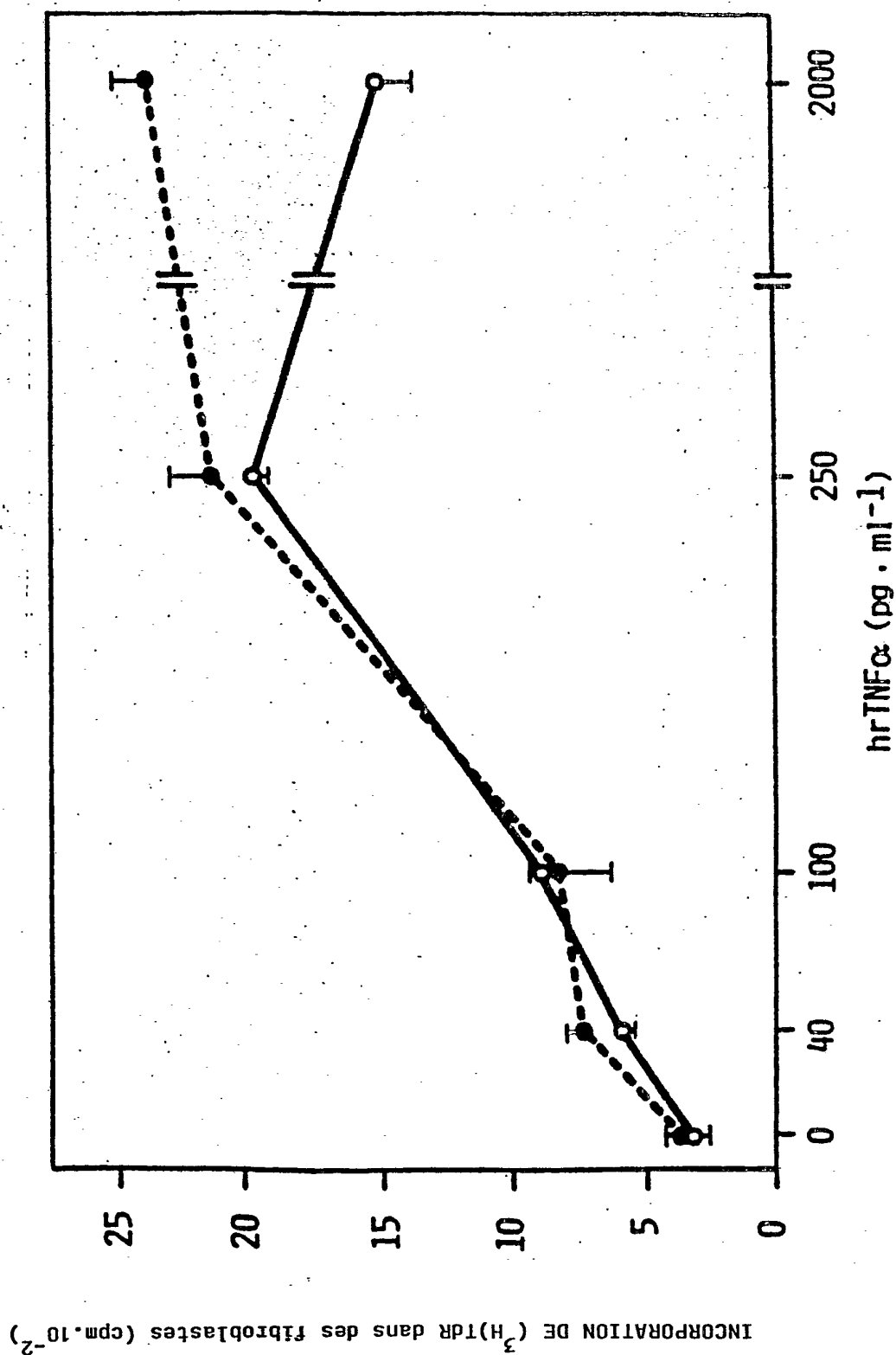
(a) Des fractions tampon (aucune) ou des fractions inhibitrices Aca54 (18 - 25 kD) (voir Fig. 1) furent incubées à diverses dilutions en présence ou en l'absence de différentes concentrations de hrIL-1 $\alpha$  ou de hrIL-1 $\beta$ .

(b) La production de PGE<sub>2</sub> par les fibroblastes dermiques humains cultivés fut mesurée après 3 jours de culture.

Les valeurs représentent des moyennes +/- SEM (N = 3).

Fig. 6

Fig. 7





ACTIVITE IL-1 INH MESUREE AU COURS DE L'ESSAI IL-1 / PROLIFERATION DES FIBROBLASTES

| Concentration finale de<br>hrIL-1 (pg/ml) sur les<br>fibroblastes dermiques<br>humains | Forme de hrIL-1<br>ajouté aux<br>fibroblastes | Dilution finale de la fraction inhibitrice AcA54 (a) |             |             |             | Incorporation de [ <sup>3</sup> H]-TdR dans les fibroblastes dermiques humains<br>(cpm x 10 <sup>-3</sup> ) (b) |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                        |                                               | Aucune                                               |             |             |             |                                                                                                                 |
|                                                                                        |                                               | 1/20                                                 | 1/40        | 1/80        |             |                                                                                                                 |
| 0                                                                                      | -                                             | 1,3 +/- 0,4                                          | 1,2 +/- 0,3 | 1,1 +/- 0,3 | 1,4 +/- 0,4 |                                                                                                                 |
| 20                                                                                     | α                                             | 2,1 +/- 0,4                                          | 1,1 +/- 0,3 | 1,0 +/- 0,3 | 1,4 +/- 0,2 |                                                                                                                 |
|                                                                                        | β                                             | 2,7 +/- 0,2                                          | 1,6 +/- 0,1 | 1,3 +/- 0,3 | 1,6 +/- 0,6 |                                                                                                                 |
| 40                                                                                     | α                                             | 2,5 +/- 0,3                                          | 0,9 +/- 0,1 | 1,1 +/- 0,4 | 1,1 +/- 0,2 |                                                                                                                 |
|                                                                                        | β                                             | 3,9 +/- 0,2                                          | 1,3 +/- 0,1 | 1,6 +/- 0,1 | 2,4 +/- 0,1 |                                                                                                                 |
| 100                                                                                    | α                                             | 3,1 +/- 0,6                                          | 1,0 +/- 0,3 | 1,4 +/- 0,2 | 2,4 +/- 0,5 |                                                                                                                 |
|                                                                                        | β                                             | 4,0 +/- 0,4                                          | 1,6 +/- 0,3 | 2,0 +/- 0,2 | 2,7 +/- 0,2 |                                                                                                                 |
| 250                                                                                    | α                                             | 4,0 +/- 0,6                                          | 1,6 +/- 0,1 | 2,1 +/- 0,5 | 3,3 +/- 0,3 |                                                                                                                 |
|                                                                                        | β                                             | 4,3 +/- 0,8                                          | 1,9 +/- 0,2 | 2,4 +/- 0,4 | 2,6 +/- 0,2 |                                                                                                                 |
| 2000                                                                                   | α                                             | 3,8 +/- 0,5                                          | 2,8 +/- 0,7 | 3,0 +/- 0,3 | 4,0 +/- 0,8 |                                                                                                                 |
|                                                                                        | β                                             | 4,1 +/- 0,6                                          | 2,8 +/- 0,4 | 3,4 +/- 0,6 | 4,8 +/- 0,5 |                                                                                                                 |

(a) Des fractions tampon (aucune) ou des fractions inhibitrices AcA54 (18 - 25 kD) (voir Fig. 1) furent incubées à diverses dilutions en présence ou en l'absence de différentes concentrations de hrIL-1α ou de hrIL-1β.

(b) L'incorporation de [<sup>3</sup>H]-TdR dans les fibroblastes dermiques humains (IL-1/prolifération) fut mesurée.  
Les valeurs représentent des moyennes +/- SEM (N = 3).

Fig. 8

08806975

-41-

Fig. 9

## PURIFICATION DE L'INHIBITEUR DE L'IL-1

## ESSAIS BIOLOGIQUES

| Etape                        | Protéine | Liaison IL-1 - Récepteurs |                 |             |              | LAF   | EL-4/CTLL   | MCF   |
|------------------------------|----------|---------------------------|-----------------|-------------|--------------|-------|-------------|-------|
|                              |          | Activité spécifique       | Activité totale | Rendement % | Purification |       |             |       |
|                              |          |                           |                 |             |              |       |             |       |
|                              | mg       | * unités/mg               | * unités        | %           | - pli        |       | * unités/mg |       |
|                              |          |                           | x10-3           |             |              |       |             |       |
| 1. Urine concentrée          | 15190    | 12                        | 192             | 100         | 1            | 166   | 32          | 125   |
| 2. Sépharose QAE             | 3350     | 33                        | 112             | 58          | 3            | 63    | 27          | 200   |
| 3. Sépharose DEAE            | 480      | 50                        | 24              | 13          | 4            | 125   | 40          | 500   |
| 4. AcA 54 (I)                | 48       | 454                       | 22              | 12          | 37           | 500   | 250         | 540   |
| 5. AcA 54 (II)               | 9,3      | 1666                      | 16              | 8           | 138          | 526   | 333         | 1110  |
| 6. Absorption immunonégative | 0,9      | 3334                      | 3               | 1,6         | 277          | 2500  | 1250        | 2160  |
| 7. Sépharose phényl          | 0,053    | 38461                     | 2               | 1           | 3205         | 62500 | 35020       | 30303 |

\* L'unité ( $D_{50}$ ) est définie comme étant la quantité d'inhibiteur de l'IL-1 ( $\mu$ g) produisant une inhibition demi-maximale au cours des essais biologiques, c'est-à-dire les essais de liaison IL-1/récepteurs, IL-1/LAF, coculture IL-1/EL-4-CTLL et IL-1/MCF.



Office européen  
des brevets

**RAPPORT DE RECHERCHE**  
établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2  
de la loi belge sur les brevets d'invention  
du 28 mars 1984

Numero de la demande  
nationale

BE 8800975  
B0 1441

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Catégorie                                                                                                                                                                                                                           | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes                                                                                                                                                                                      | Revendication concernée                                                                                                                                                                                                                                         | CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.5)                 |
| X                                                                                                                                                                                                                                   | PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 83, décembre 1986, pages 9119-9123; K.M. BROWN et al.: "Uromodulin, an immunosuppressive protein derived from pregnancy urine, is an inhibitor of interleukin 1"<br>* En entier *                                                   | 1-3,6-7                                                                                                                                                                                                                                                         | A 61 K 35/22                                         |
| Y                                                                                                                                                                                                                                   | IDEM                                                                                                                                                                                                                                                                 | 8-18,24                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                      |
| X                                                                                                                                                                                                                                   | THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 134, no. 6, juin 1985, pages 3868-3875, The American Association of Immunologists; W.P. AREND et al.: "Effects of immune complexes on production by human monocytes of interleukin 1 or an interleukin 1 inhibitor"<br>* En entier * | 1-4,6-7                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                      |
| Y                                                                                                                                                                                                                                   | IDEM                                                                                                                                                                                                                                                                 | 8-18,24                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                      |
| X                                                                                                                                                                                                                                   | J. EXP. MED., vol. 159, janvier 1984, pages 126-136, The Rockefeller University Press; Z. LIAO et al.: "Identification of a specific interleukin 1 inhibitor in the urine of febrile patients"<br>* En entier *                                                      | 1-4,6-7                                                                                                                                                                                                                                                         | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)<br>A 61 K |
| Y                                                                                                                                                                                                                                   | IDEM                                                                                                                                                                                                                                                                 | 8-18,24                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                      |
|                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                      | -/-                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                      |
| Date d'achèvement de la recherche                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                      | Examineur                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                      |
| 03-07-1990                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                      | DIEDENHOFEN A.                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                      |
| <b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b>                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                      |
| X : particulièrement pertinent à lui seul<br>Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie<br>A : arrière-plan technologique<br>O : divulgation non-écrite<br>P : document intercalaire |                                                                                                                                                                                                                                                                      | T : théorie ou principe à la base de l'invention<br>E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date<br>D : cité dans la demande<br>L : cité pour d'autres raisons<br>& : membre de la même famille, document correspondant |                                                      |

## **ABSENCE D'UNITE D'INVENTION**

**La présente demande ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir**

**1. Revendications :**

**2. Revendications :**

**3. Revendications :**

**4. Revendications :**

**Le présent rapport de recherche a été établi de façon complète pour les parties de la demande qui se rapportent à l'invention ou pluralité d'inventions mentionnée dans les revendications:**

## **ETENDUE DE LA RECHERCHE**

**Compte tenu des documents considérés comme pertinents, le présent rapport de recherche a été établi de façon complète pour les parties de la demande qui se rapportent à l'invention ou pluralité d'inventions mentionnée en premier lieu dans les revendications, à savoir les revendications :**

**Les éléments figurant dans les**

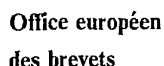
**1. Revendications :**

**2. Revendications :**

**3. Revendications :**

**4. Revendications :**

**n'ont pas été pris en considération que dans le cadre de la recherche relative aux caractéristiques de l'invention ou de la pluralité d'inventions mentionnée en premier lieu dans les revendications**



établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2  
de la loi belge sur les brevets d'invention  
du 28 mars 1984

BE 8800975  
BO 1441

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                          | CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.5)       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Catégorie                                                                                                                                                                                                                           | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes                                                                                                                                                                        | Revendication concernée                                                                                                                                                                                                                                                  |                                            |
| X                                                                                                                                                                                                                                   | THE JOURNAL OF THE IMMUNOLOGY, vol. 136, no. 10, 5 mai 1986, pages 3686-3692, The American Association of Immunologists, US; K. TIKU et al.:<br>"Normal human neutrophils are a source of a specific interleukin 1 inhibitor"<br>* En entier *         | 1-3                                                                                                                                                                                                                                                                      | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5) |
| Y                                                                                                                                                                                                                                   | IDEM                                                                                                                                                                                                                                                   | 8-18,24                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                            |
| X                                                                                                                                                                                                                                   | THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 138, no. 5, 1 mars 1987, pages 1457-1463, The American Association of Immunologists, US; T. SCHWARZ et al.:<br>"UV-irradiated epidermal cells produce a specific inhibitor of interleukin 1 activity"<br>* En entier * | 1-3,24                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                            |
| X                                                                                                                                                                                                                                   | THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 137, no. 7, 1 octobre 1986, pages 2245-2251, The American Association of Immunologists, US; A. KEMP et al.:<br>"Inhibition of interleukin 1 activity by a factor in submandibular glands of rats"<br>* En entier *     | 1-7                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                            |
| Y                                                                                                                                                                                                                                   | IDEM                                                                                                                                                                                                                                                   | 8-18,24                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                            |
|                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                        | -/-                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                            |
| Date d'achèvement de la recherche                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                        | Examineur                                                                                                                                                                                                                                                                |                                            |
| 03-07-1990                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                        | DIEDENHOFEN A.                                                                                                                                                                                                                                                           |                                            |
| CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                        | T : théorie ou principe à la base de l'invention<br>E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date<br>D : cité dans la demande<br>L : cité pour d'autres raisons<br>.....<br>& : membre de la même famille, document correspondant |                                            |
| X : particulièrement pertinent à lui seul<br>Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie<br>A : arrière-plan technologique<br>O : divulgation non-écrite<br>P : document intercalaire |                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                            |

## **ABSENCE D'UNITE D'INVENTION**

**La présente demande ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir**

**1. Revendications :**

**2. Revendications :**

**3. Revendications :**

**4. Revendications :**

**Le présent rapport de recherche a été établi de façon complète pour les parties de la demande qui se rapportent à l'invention ou pluralité d'inventions mentionnée dans les revendications:**

## **ETENDUE DE LA RECHERCHE**

**Compte tenu des documents considérés comme pertinents, le présent rapport de recherche a été établi de façon complète pour les parties de la demande qui se rapportent à l'invention ou pluralité d'inventions mentionnée en premier lieu dans les revendications, à savoir les revendications :**

**Les éléments figurant dans les**

**1. Revendications :**

**2. Revendications :**

**3. Revendications :**

**4. Revendications :**

**n'ont pas été pris en considération que dans le cadre de la recherche relative aux caractéristiques de l'invention ou de la pluralité d'inventions mentionnée en premier lieu dans les revendications**



Office européen  
des brevets

## RAPPORT DE RECHERCHE

établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2  
de la loi belge sur les brevets d'invention  
du 28 mars 1984

Numero de la demande  
nationale  
Page 3

BE 8800975  
BO 1441

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Catégorie                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes                                                                                                                                                                                                                                     | Revendication concernée                                                                                                                                                                                                                                                  | CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.5)       |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | J. OF. CLIN. INVEST., vol. 78, octobre 1986, pages 1120-1124, The American Society for Clinical Investigation, Inc.; J.-F. BALAVOINE et al.:<br>"Prostaglandin E2 and collagenase production by fibroblasts and synovial cells is regulated by urine-derived human interleukin 1 and inhibitor(s)"<br>* En entier * | 1-15,17                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                            |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | IDEM<br>---                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 16,18,24                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                            |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | BIOTECHNIQUES, novembre/décembre 1983, pages 198-203; G. SOFER et al.:<br>"Designing an optimal chromatographic purification scheme for proteins"<br>* En entier *                                                                                                                                                  | 13-18                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                            |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                          | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5) |
| <b>RECHERCHE INCOMPLETE</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                            |
| <p>La division de la recherche estime que l'article 6(4) de l'Accord de travail entre l'OEB et l'Etat belge est applicable à la présente demande de brevet belge, de sorte qu'une recherche significative sur l'état de la technique ne peut être effectuée au regard d'une partie des revendications.</p> <p>Revendications ayant fait l'objet de recherches complètes: 1-24<br/><del>Revendications ayant fait l'objet de recherches incomplètes:</del><br/>Revendications n'ayant pas fait l'objet de recherches: 25<br/>Raison pour la limitation de la recherche: Méthode de traitement thérapeutique du corps humain ou animal (article 52(4)).</p> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                            |
| Date d'achèvement de la recherche                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Examineur                                                                                                                                                                                                                                                                |                                            |
| 03-07-1990                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | DIEDENHOFEN A.                                                                                                                                                                                                                                                           |                                            |
| <b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                            |
| X : particulièrement pertinent à lui seul<br>Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie<br>A : arrière-plan technologique<br>O : divulgation non-écrite<br>P : document intercalaire                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | T : théorie ou principe à la base de l'invention<br>E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date<br>D : cité dans la demande<br>L : cité pour d'autres raisons<br>.....<br>& : membre de la même famille, document correspondant |                                            |