



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

(21) **PI0616446-3 A2**

(22) Data de Depósito: 28/09/2006  
(43) Data da Publicação: 21/06/2011  
(RPI 2111)



\* B R P I O 6 1 6 4 4 6 A 2 \*

(51) *Int.Cl.:*  
A61K 39/385 2006.01  
C12N 7/04 2006.01  
C07K 14/545 2006.01

(54) Título: **COMPOSIÇÃO CONTENDO CONJUGADOS DE INTERLEUCINA-1, VACINA, USO DA VACINA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DA COMPOSIÇÃO OU DA VACINA, BEM COMO MEDICAMENTO**

(30) Prioridade Unionista: 28/09/2005 US 60/721,106

(73) Titular(es): CYTOS BIOTECHNOLOGY AG

(72) Inventor(es): Alain Tissot, Gunther Spohn, Martin Bachmann

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006066866 de 28/09/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/039552 de 12/04/2007

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO CONTENDO CONJUGADOS DE INTERLEUCINA-1, VACINA, USO DA VACINA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DA COMPOSIÇÃO OU DA VACINA, BEM COMO MEDICAMENTO. A presente invenção pertence aos campos de Biologia molecular, Virologia, Imunologia e Medicina. A invenção provê uma composição compreendendo uma disposição de antígeno ordenada e repetitiva, onde o antígeno é uma proteína IL-1, uma muteína de IL-1 ou um fragmento de IL-1. Mais especificamente, a invenção provê uma composição compreendendo uma partícula do tipo vírus, e pelo menos uma proteína IL-1, muteína de IL-1 ou pelo menos um fragmento de IL-1 ligado a ela. A invenção também provê um processo para produção de vacinas para o tratamento de doenças inflamatórias e doenças auto-imunes crônicas, doenças genéticas e doenças cardiovasculares. A composição da invenção induz eficientemente respostas imunes, em particular respostas de anticorpo. Ainda, as composições da invenção são particularmente úteis para induzir eficientemente respostas imunes auto-específicas dentro do contexto indicado.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "COMPOSIÇÃO CONTENDO CONJUGADOS DE INTERLEUCINA-1, VACINA, USO DA VACINA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DA COMPOSIÇÃO OU DA VACINA, BEM COMO MEDICAMENTO".

#### CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção pertence aos campos de Medicina, Saúde pública, Imunologia, Biologia molecular e Virologia. A invenção provê composições compreendendo uma partícula do tipo vírus (VLP) ou uma partícula de vírus e pelo menos um antígeno, onde o dito antígeno é uma proteína Interleucina-1 (IL-1), um fragmento de IL-1 ou peptídeo ou uma muteína de IL-1 covalentemente ligado à VLP ou à partícula do vírus. A invenção também provê um processo para produção das composições. As composições da presente invenção são úteis na produção de vacinas para o tratamento de vários distúrbios humanos, incluindo artrite reumatóide, osteoartrite e outros. As composições da invenção induzem então respostas imunes eficientes, em particular respostas de anticorpo.

#### TÉCNICA RELACIONADA

IL-1 é uma citocina pró-inflamatória potente produzida por vários tipos de célula, incluindo macrófagos, células dendríticas, células B e células T (Dinarello, C.A., 1991, *Blood* 77(8):1627-1652). Ela consiste em duas espécies moleculares, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , que compartilham apenas identidade de seqüência limitada, mas exercem atividades biológicas similares através de ligação a receptor de IL-1 tipo I (IL-1RI) (Dinarello, C.A. e outros, 1997, *Cytokine & Growth Factor Rev.* 8:253). Ambas moléculas de IL-1 também se ligam a um segundo receptor de IL-1 (IL-1RII), que não tem o domínio de sinalização intracelular, e é acreditado desempenhar um papel regulador como um receptor de atração (Dinarello, C.A. e outros, 1997, *Cytokine & Growth Factor Rev.* 8:253). Ainda, um terceiro membro da família IL-1, o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra), se liga a ambos receptores sem exercer qualquer atividade agonística. IL-1ra junto com IL-1RII e as formas soltas (*shed*) de IL-1RI e IL-1RII neutralizam a atividade de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e asseguram uma regulação firme da resposta inflamatória.

Uma desregulação da resposta inflamatória mediada por IL-1 é

observada em muitos distúrbios humanos, incluindo artrite reumatóide, doença inflamatória do intestino, doenças renais, osteoporose e outros. Em cada uma dessas doenças superprodução de IL-1 e/ou subprodução de IL-1ra predis põem ao desenvolvimento de doença (Arend, W.P., 2003, *Cytokine & Growth Factor Reviews* 13:323-340). Uma versão recombinante de IL-1ra (anakinra, Kineret<sup>®</sup>) é eficaz na redução de inflamação e prevenção de

5 dado tecido em vários distúrbios inflamatórios, mas a necessidade de concentrações sistêmicas altas e a meia-vida curta do fármaco requerem administrações freqüentes (diárias) de doses altas (~10 mg), resultando em custo

10 alto de produtos e problemas de obediência do paciente potenciais (*Kineret<sup>®</sup> prescribing information*, Amgen; Granowitz, E.V. e outros, 1992, *Cytokine* 4:353). Ainda, uma grande proporção de pacientes desenvolve anticorpos contra Kineret<sup>®</sup>, que neutralizam potencialmente a atividade biológica do fármaco (Fleischmann, R.M. e outros, 2003, *Arthritis Rheum.* 46:2287).

15 Novas técnicas terapêuticas então focam nas estratégias de imunização ativa, que induzem a produção de anticorpos de neutralização de IL-1 pelo sistema imune do paciente. Svenson e colaboradores (2000, *J. Immunol. Methods* 236:1-8) imunizaram camundongos com IL-1 $\alpha$  recombinante quimicamente ligada com cruzamento a derivado de proteína purificada de tuberculina (PPD), e observaram a indução de anticorpos que neutralizaram a atividade biológica de IL-1 $\alpha$ . Esta estratégia se apóia na aplicação

20 de ajuda de célula T para autorreativar células B através de ligação física do auto-antígeno a um antígeno estranho.

A Patente US 6.093.405 revela um método de redução do nível

25 de uma citocina em circulação através da imunização com uma composição imunogênica contendo a própria citocina quimicamente ou fisicamente inativada. Enquanto neste método citocinas nativas são tornadas imunogênicas através de tratamento físico ou químico, a presente invenção revela um método para tornar citocinas nativas imunogênicas através da sua apresentação

30 de uma maneira altamente repetitiva sobre a superfície de VLPs. O WO2003/084979 descreve ainda o uso de compostos imunogênicos contendo peptídeos derivados de citocina de 5-40 aminoácidos de comprimento

para o tratamento de doenças associadas com uma superprodução de citocinas.

### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Foi, agora, surpreendentemente constatado pela requerente que  
5 as composições e vacinas da invenção, respectivamente, compreendendo  
pelo menos uma molécula de IL-1, não são apenas capazes de indução de  
respostas imunes contra IL-1, então em particular respostas de anticorpo,  
mas são, ainda, capazes de neutralização da atividade pró-inflamatória de  
IL-1 *in vivo*. Ainda, a requerente surpreendentemente verificou que molécula  
10 de IL-1, quando covalentemente ligada à VLP de acordo com a invenção,  
pode proteger de inflamação e de sinais clínicos de artrite em um modelo de  
camundongo de artrite reumatóide. Além disso, a requerente constatou que  
as composições da invenção protegeram os camundongos melhor do de-  
senvolvimento de sintomas de artrite do que o antagonista de receptor de IL-  
15 1 recombinante Kineret<sup>®</sup>, que é aprovado para o tratamento de artrite reuma-  
tóide humana (Exemplo 7). Ainda, foi ainda surpreendentemente constatado  
pela requerente que as composições da invenção eram capazes de inibir o  
desenvolvimento de sintomas ateroscleróticos, quando injetadas em camun-  
dongos geneticamente suscetíveis (Exemplo 4) e então são um tratamento  
20 eficiente para aterosclerose. Ainda, foi demonstrado que IL-1 está envolvida  
na patogênese de aterosclerose.

Então, no primeiro aspecto, a presente invenção provê uma  
composição que compreende (a) uma partícula tipo vírus (VLP) com pelo  
menos um primeiro sítio de ligação; e (b) pelo menos um antígeno com pelo  
25 menos um segundo sítio de ligação, onde o dito pelo menos um antígeno  
uma molécula de IL-1 de preferência selecionada do grupo consistindo em  
proteína de IL-1, fragmento maduro de IL-1, peptídeo de IL-1 e muteína de  
IL-1, onde (a) e (b) são ligados através do dito pelo menos um primeiro e dito  
pelo menos um segundo sítio de ligação, de preferência para formar uma  
30 disposição de antígeno ordenada e repetitiva. Em modalidades preferidas da  
invenção, as partículas do tipo vírus adequadas para uso na presente inven-  
ção compreendem proteína recombinante, de preferência proteína de reves-

timento recombinante ou fragmento dela, de um vírus, de preferência de um bacteriófago de RNA. Em uma modalidade preferida, a composição da invenção compreende pelo menos um fragmento maduro de IL-1, de preferência compreendendo a atividade biológica de IL-1. Então, a presente invenção usa a apresentação do auto-antígeno de uma maneira altamente repetitiva em partículas do tipo vírus para estimular células B auto-reativas.

Em outro aspecto, a presente invenção provê uma composição de vacina.

Ainda, a presente invenção provê um método para administrar a composição de vacina a um humano ou um animal, de preferência um mamífero. A composição de vacina da invenção é capaz de induzir resposta imune forte, em particular resposta de anticorpo, tipicamente e de preferência sem a presença de pelo menos um adjuvante. Deste modo, em uma modalidade preferida, a vacina é destituída de um adjuvante. Evitando o uso de adjuvante pode haver redução da possível ocorrência de respostas de célula T inflamatórias indesejadas.

Em uma modalidade preferida, a VLP é uma VLP de um bacteriófago de RNA. Em uma modalidade preferida adicional, o dito bacteriófago de RNA é um bacteriófago de RNA selecionado do grupo consistindo em: Q $\beta$ , fr, GA e AP205. Em uma modalidade preferida adicional a dita VLP de um bacteriófago de RNA compreendida pela composição e pela composição de vacina, respectivamente, é recombinantemente produzida em um hospedeiro onde a VLP de um bacteriófago de RNA é essencialmente livre de um RNA hospedeiro, de preferência ácido nucléico hospedeiro. É vantajoso reduzir, ou de preferência eliminar, a quantidade de RNA hospedeiro para evitar respostas de célula T indesejadas bem como outros efeitos colaterais indesejados, tal como febre.

Em um aspecto, a presente invenção provê um método de tratamento de uma doença selecionada do grupo consistindo em: (a) doenças vasculares; (b) doenças inflamatórias dependentes de IL-1 herdadas; (c) doenças inflamatórias autoimunes crônicas; (d) doenças degenerativas do osso e cartilagem; (e) doenças alérgicas; e (f) doença neurológica; doenças onde

proteína IL-1 faz a mediação da, ou contribui para a, condição, onde o método compreende administrar a composição da invenção ou a composição de vacina da invenção, respectivamente, a um animal, de preferência humano. Doenças, onde a proteína IL-1 faz a mediação da, ou contribui para a, condição, são, por exemplo, aterosclerose, febre Mediterrânea familiar, artrite reumatóide, osteoartrite e alergia.

Em um aspecto adicional, a presente invenção provê uma composição farmacêutica compreendendo a composição da invenção e um veículo farmacêutico aceitável.

Novamente em um aspecto adicional, a presente invenção provê um método de produção da composição da invenção compreendendo (a) provisão de uma VLP com pelo menos um primeiro sítio de ligação; (b) provisão de pelo menos um antígeno, onde o dito antígeno é uma molécula de IL-1, uma proteína de IL-1, um fragmento maduro de IL-1, um peptídeo de IL-1 ou uma muteína de IL-1, com pelo menos um segundo sítio de ligação; e (c) combinação da dita VLP e dito pelo menos um antígeno para produzir a dita composição, onde o dito pelo menos um antígeno e a dita VLP são ligados através do dito pelo menos um primeiro e dito pelo menos um segundo sítios de ligação.

## BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

### **Figura 1: Acoplamento de proteína mL-1 $\beta_{119-269}$ à proteína de capsídeo de Q $\beta$**

As proteínas foram analisadas em um gel de SDS- poliacrilamida a 12% sob condições de redução. O gel foi tingido com *Coomassie Brilliant Blue*. Pesos moleculares de proteínas marcadoras são dados em kDa na margem esquerda, identidades de faixas de proteína são indicadas na margem direita. Faixa 1: Marcador de proteína pré-tingida (New England Biolabs). Faixa 2: proteína de capsídeo de Q $\beta$  derivatizada. Faixa 3: proteína mL-1 $\beta_{119-269}$  reduzida livre. Faixa 4: reação de acoplamento de Q $\beta$ -mL-1 $\beta_{119-269}$ .

### **Figura 2: Acoplamento de proteína mL-1 $\alpha_{117-270}$ à proteína de capsídeo de Q $\beta$**

As proteínas foram analisadas em um gel de SDS- poliacrilamida a 12% sob condições de redução. O gel foi tingido com *Coomassie Brilliant Blue*. Pesos moleculares de proteínas marcadoras são dados em kDa na margem esquerda, identidades de faixas de proteína são indicadas na margem direita. Faixa 1: Marcador de proteína pré-tingida (New England Biolabs). Faixa 2: proteína de capsídeo de Q $\beta$ . Faixa 3: proteína mL-1 $\alpha_{117-270}$  reduzida livre. Faixa 4: reação de acoplamento de Q $\beta$ -mL-1 $\alpha_{117-270}$ .

### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A menos que de outro modo definido, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm os mesmos significados conforme geralmente compreendido por um versado na técnica à qual a presente invenção pertence.

Adjuvante: O termo "adjuvante" conforme aqui usado refere-se a estimuladores não-específicos da resposta imune ou substâncias que permitem a geração de um depósito no hospedeiro que quando combinado com a vacina e composição farmacêutica, respectivamente, da presente invenção, pode prover uma resposta imune ainda mais acentuada. Adjuvantes preferidos são adjuvante de Freund completo e incompleto, adjuvante contendo alumínio, de preferência hidróxido de alumínio e muramildipeptídeo modificado. Adjuvantes preferidos adicionais são géis minerais tal como hidróxido de alumínio, substâncias tensoativas tal como lisolectina, polióis pluronic, poliânions, peptídeos, emulsões em óleo, hemocianinas de límpeto *keyhole*, dinitrofenol e adjuvantes humanos tal como BCG (bacilo *Calmette Guerin*) e *Corynebacterium parvum*. Tais adjuvantes são também bem conhecidos na técnica. Adjuvantes adicionais que podem ser administrados com as composições da invenção incluem, mas não estão limitados a, imunomodulador de lipídeo Monofosforil, AdjuVax 100a, QS-21, QS-18, CRL1005, sais de alumínio (Alum), MF-59, OM-174, OM-197, OM-294 e tecnologia de adjuvante Virossomal. Os adjuvantes podem também compreender uma mistura dessas substâncias. VLP foi geralmente descrita como um adjuvante. No entanto, o termo "adjuvante", conforme usado dentro do contexto do presente pedido, refere-se a um adjuvante não sendo a VLP usada para as composições da

invenção, ao contrário ele refere-se a um componente distinto, adicional.

Antígeno: Conforme aqui usado, o termo "antígeno" refere-se a uma molécula capaz de ser ligada por um anticorpo ou um receptor de célula T (TCR) se apresentada por moléculas MHC. O termo "antígeno", conforme aqui usado, refere-se também a epítopos de célula T. Um antígeno é adicionalmente capaz de ser reconhecido pelo sistema imune e/ou ser capaz de induzir uma resposta imune humoral e/ou resposta imune celular levando à ativação de linfócitos B e/ou T. Isto pode, no entanto, requerer que, pelo menos em certos casos, o antígeno contenha ou esteja ligado a um epítipo de célula Th e seja dado em adjuvante. Um antígeno pode ter um ou mais epítopos (epítopos B e T). A reação específica referida acima pretende indicar que o antígeno vai de preferência reagir, tipicamente de uma maneira altamente seletiva, com seu anticorpo correspondente ou TCR e não com uma multiplicidade de outros anticorpos ou TCRs que podem ser evocados por outros antígenos. Antígenos conforme aqui usado podem ser também misturas de vários antígenos individuais.

Epítipo: O termo epítipo refere-se a porções contínuas ou descontínuas de um antígeno, de preferência um polipeptídeo, onde as ditas porções podem ser especificamente ligadas por um anticorpo ou por um receptor de célula T dentro do contexto de uma molécula MHC. Com relação a anticorpos, ligação específica exclui ligação não-específica, mas não necessariamente exclui reatividade cruzada. Um epítipo compreende tipicamente 5-10 aminoácidos em uma conformação espacial que é única para o sítio de antígeno.

Ligação específica (anticorpo/antígeno): Dentro do presente pedido, anticorpos são definidos ser especificamente ligantes se eles se ligarem ao antígeno com uma afinidade de ligação ( $K_a$ ) de  $10^6 \text{ M}^{-1}$  ou mais, de preferência  $10^7 \text{ M}^{-1}$  ou mais, com mais preferência  $10^8 \text{ M}^{-1}$  ou mais e com mais preferência  $10^9 \text{ M}^{-1}$  ou mais. A afinidade de um anticorpo pode ser prontamente determinada por uma pessoa de habilidade comum na técnica (por exemplo, através de análise Scatchard, através de ELISA ou análise Biacore).



Ligação específica (IL-1/receptor de IL-1): A interação entre um receptor e um ligante de receptor pode ser caracterizada por métodos biofísicos geralmente conhecidos na técnica, incluindo, por exemplo, ELISA ou análise Biacore. Uma molécula de IL-1 é considerada como sendo capaz de se ligar especificamente a um receptor de IL-1, quando a afinidade de ligação ( $K_a$ ) da dita IL-1 ao dito receptor de IL-1 for pelo menos  $10^5 M^{-1}$ , de preferência pelo menos  $10^6 M^{-1}$ , com mais preferência pelo menos  $10^7 M^{-1}$ , com mais preferência ainda pelo menos  $10^8 M^{-1}$  e com mais preferência pelo menos  $10^9 M^{-1}$ ; onde de preferência o dito receptor de IL-1 é um receptor de IL-1 de camundongo ou humano, com mais preferência humano. Ainda de preferência, o dito receptor de IL-1 compreende ou com mais preferência consiste em qualquer uma das seqüências SEQ ID NO:166 a SEQ ID NO:169, com mais preferência o dito receptor de IL-1 compreende ou de preferência consiste em qualquer uma das seqüências SEQ ID NO:166 e SEQ ID NO:167.

Associado: O termo "associado" ou "associação" conforme aqui usado refere-se a todos os modos possíveis, de preferência interações químicas, através dos quais duas moléculas são unidas. Interações químicas incluem interações covalentes e não-covalentes. Exemplos típicos para interações não-covalentes são interações iônicas, interações hidrofóbicas ou ligações hidrogênio, enquanto interações covalentes são baseadas, a título de exemplo, em ligações covalentes tal como éster, éter, fosfoéster, amida, peptídeo, ligações carbono-fósforo, ligações carbono-enxofre tal como tioéter ou ligações imida.

Sítio de Ligação, Primeiro: Conforme aqui usado, a expressão "primeiro sítio de ligação" refere-se a um elemento que é de ocorrência natural com a VLP ou que é artificialmente adicionado à VLP, e ao qual o segundo sítio de ligação pode ser ligado. O primeiro sítio de ligação de preferência é uma proteína, um polipeptídeo, um aminoácido, um peptídeo, um açúcar, um polinucleotídeo, um polímero natural ou sintético, um metabólito ou composto secundário (biotina, fluoresceína, retinol, digoxigenina, íons de metal, fluoreto de fenilmetilsulfonila) ou um grupo quimicamente reativo tal como

um grupo amino, um grupo carboxila, um grupo sulfidril, um grupo hidroxila, um grupo guanidinila, um grupo histidinila ou uma combinação deles. Uma modalidade preferida de um grupo quimicamente reativo sendo o primeiro sítio de ligação é o grupo amino de um aminoácido, de preferência de lisina.

5 O primeiro sítio de ligação está localizado, tipicamente sobre a superfície, e de preferência na superfície externa da VLP. Primeiros sítios de ligação múltiplos estão presentes na superfície, de preferência na superfície externa de partícula do tipo vírus, tipicamente em uma configuração repetitiva. Em uma modalidade preferida, o primeiro sítio de ligação está associado com a VLP,  
10 através de pelo menos uma ligação covalente, de preferência através de pelo menos uma ligação peptídica. Em uma modalidade preferida adicional o primeiro sítio de ligação é de ocorrência natural com a VLP. Alternativamente, em uma modalidade preferida o primeiro sítio de ligação é artificialmente adicionado à VLP.

15 **Sítio de Ligação, Segundo:** Conforme aqui usado, a expressão "segundo sítio de ligação" refere-se a um elemento que é de ocorrência natural com ou que é artificialmente adicionado à molécula de IL-1 e ao qual o primeiro sítio de ligação pode ser ligado. O segundo sítio de ligação da molécula de IL-1 é de preferência uma proteína, um polipeptídeo, um peptídeo,  
20 um aminoácido, um açúcar, um polinucleotídeo, um polímero natural ou sintético, um metabólito ou composto secundário (biotina, fluoresceína, retinol, digoxigenina, íons de metal, fluoreto de fenilmetilsulfonila) ou um grupo quimicamente reativo tal como um grupo amino, um grupo carboxila, um grupo sulfidril, um grupo hidroxila, um grupo guanidinila, um grupo histidinila ou  
25 uma combinação deles. Uma modalidade preferida de um grupo quimicamente reativo sendo o segundo sítio de ligação é o grupo sulfidril, de preferência de um aminoácido cisteína. O termo "molécula de IL-1 com pelo menos um segundo sítio de ligação" refere-se, então, a um construto compreendendo a molécula de IL-1 e pelo menos um segundo sítio de ligação. No  
30 entanto, em particular para um segundo sítio de ligação, que não é de ocorrência natural dentro da molécula de IL-1, tal construto tipicamente e de preferência compreende ainda um "ligante". Em outra modalidade preferida o

segundo sítio de ligação é associado com a molécula de IL-1 através de pelo menos uma ligação covalente, de preferência através de pelo menos uma ligação peptídeo. Em uma modalidade adicional, o segundo sítio de ligação é de ocorrência natural dentro da molécula de IL-1. Em outra modalidade preferida adicional, o segundo sítio de ligação é artificialmente adicionado à molécula de IL-1 através de um ligante, onde o dito ligante compreende ou alternativamente consiste em uma cisteína. De preferência, o ligante é fundido à molécula de IL-1 por uma ligação peptídeo.

Proteína de revestimento: O termo "proteína de revestimento" e o termo intercomutavelmente usado "proteína capsídeo" dentro do presente pedido referem-se a uma proteína viral, de preferência uma subunidade de um capsídeo natural de um vírus, de preferência de um fator de RNA, que é capaz de ser incorporada a um capsídeo de vírus ou uma VLP.

Molécula de IL-1: O termo "molécula de IL-1" ou de maneira sucinta "IL-1", conforme aqui usado, refere-se a qualquer polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido tendo pelo menos 80%, de preferência pelo menos 90%, com mais preferência pelo menos 95%, com mais preferência ainda pelo menos 99% e com mais preferência 100% de identidade de seqüência com qualquer uma das seqüências selecionadas do grupo consistindo em SEQ ID NO:36 a SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:130 a SEQ ID NO:140 e SEQ ID NO:163 a SEQ ID NO:165. O termo "molécula de IL-1", conforme aqui usado, refere-se de preferência a qualquer proteína IL-1, fragmento de IL-1, fragmento maduro de IL-1, peptídeo de IL-1 ou muteína de IL-1 compreendendo ou alternativamente consistindo em um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido tendo pelo menos 80%, de preferência pelo menos 90%, com mais preferência pelo menos 95%, com mais preferência ainda pelo menos 99% e com mais preferência 100% de identidade de seqüência com qualquer uma das seqüências selecionadas do grupo consistindo em SEQ ID NO:36 a SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:130 a SEQ ID NO:140 e SEQ ID NO:163 a SEQ ID NO:165. O termo molécula de IL-1, conforme aqui usado, refere-se também tipicamente e de preferência a ortólogos de proteínas IL-1 de qualquer espécie animal. Uma molécula de IL-1 é

de preferência, mas não necessariamente, capaz de ligação ao receptor de IL-1 e compreende de preferência ainda atividade biológica.

5 Molécula de IL-1 alfa: O termo "molécula de IL-1 alfa" ou sucin-  
tamente "IL-1 alfa", conforme aqui usado, refere-se a uma proteína IL-1 alfa,  
fragmento de IL-1 alfa, fragmento maduro de IL-1 alfa, peptídeo de IL-1 alfa  
ou muteína de IL-1 alfa compreendendo ou alternativamente consistindo em  
um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido tendo pelo menos  
80%, de preferência pelo menos 90%, com mais preferência pelo menos  
95%, com mais preferência ainda pelo menos 99% e com mais preferência  
10 100% de identidade de seqüência com qualquer uma das seqüências sele-  
cionadas do grupo consistindo em SEQ ID NO:36 a 48, SEQ ID NO:63, SEQ  
ID NO:65, SEQ ID NO:67 a SEQ ID NO:88 e SEQ ID NO: 163. Uma modali-  
dade especificamente preferida de IL-1 alfa é IL-1 alfa humana 119-271  
(SEQ ID NO:63).

15 Molécula de IL-1 beta: O termo "molécula de IL-1 beta" ou sucin-  
tamente "IL-1 beta", conforme aqui usado, refere-se a uma proteína IL-1 be-  
ta, fragmento de IL-1 beta, fragmento maduro de IL-1 beta, peptídeo de IL-1  
beta ou muteína de IL-1 beta compreendendo ou alternativamente consistin-  
do em um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido tendo pelo me-  
20 nos 80%, de preferência pelo menos 90%, com mais preferência pelo menos  
95%, com mais preferência ainda pelo menos 99% e com mais preferência  
100% de identidade de seqüência com qualquer uma das seqüências sele-  
cionadas do grupo consistindo na SEQ ID NO:49 a SEQ ID NO:62, SEQ ID  
NO:64, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:89 a SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:130 a  
25 SEQ ID NO:140, SEQ ID NO:164 e SEQ ID NO:165. Uma modalidade espe-  
cificamente preferida de IL-1 beta é IL-1beta humana 117-269 (SEQ ID NO:  
64).

30 Proteína IL-1: O termo "proteína IL-1", conforme aqui usado, re-  
fere-se a uma proteína de ocorrência natural, onde a dita proteína de ocor-  
rência natural tem uma seqüência de aminoácido tendo pelo menos 80%, de  
preferência pelo menos 90%, com mais preferência pelo menos 95, com  
mais preferência ainda pelo menos 99% e com mais preferência 100% de

identidade de seqüência com qualquer uma das SEQ ID NO:36 a SEQ ID NO: 62; ou onde a dita proteína de ocorrência natural é capaz de ligação ao receptor de IL-1 e de preferência compreende atividade biológica. O termo "proteína IL-1", conforme aqui usado, de preferência refere-se a uma proteí-

5 na de ocorrência natural, onde a dita proteína de ocorrência natural tem uma seqüência de aminoácido tendo pelo menos 80%, de preferência pelo menos 90%, com mais preferência pelo menos 95%, com mais preferência ainda pelo menos 99% e com mais preferência 100% de identidade de seqüência com qualquer uma das SEQ ID NO:36 a SEQ ID NO:62; e onde a dita prote-

10 ína de ocorrência natural é capaz de se ligar ao receptor de IL-1 e de preferência compreende atividade biológica. Tipicamente e de preferência, o termo "proteína IL-1", conforme usado, refere-se a pelo menos uma proteína de ocorrência natural, onde a dita proteína é capaz de ligação com o receptor de IL-1 e compreende atividade biológica, e onde ainda a dita proteína com-

15 preende ou alternativamente consiste em um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido tendo pelo menos 80%, de preferência pelo menos 90%, com mais preferência pelo menos 95%, com mais preferência ainda pelo menos 99% e com mais preferência 100% de identidade de seqüência com qualquer uma das SEQ ID NO:36 a SEQ ID NO:62. Então, o termo "pro-

20 teína IL-1 alfa" refere-se a uma proteína IL-1 compreendendo ou alternativamente consistindo em um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido tendo pelo menos 80%, de preferência pelo menos 90%, com mais preferência pelo menos 95%, com mais preferência ainda pelo menos 99% e com mais preferência 100% de identidade de seqüência com qualquer um

25 das SEQ ID NO:36 a SEQ ID NO:48, onde o termo "proteína IL-1 beta" refere-se a uma proteína IL-1 compreendendo ou alternativamente consistindo em um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido tendo pelo menos 80%, de preferência pelo menos 90%, com mais preferência pelo menos 95%, com mais preferência ainda pelo menos 99% e com mais preferência

30 100% de identidade de seqüência com qualquer uma das SEQ ID NO:49 a SEQ ID NO:62.

Fragmento de IL-1: O termo "fragmento de IL-1", conforme aqui

usado, refere-se a um polipeptídeo compreendendo uma extensão consecutiva de uma proteína IL-1, onde o dito polipeptídeo é pelo menos de 50, de preferência pelo menos 100, com mais preferência pelo menos 150 aminoácidos de comprimento. Tipicamente e de preferência, o dito fragmento de IL-1 é no máximo de 300, com mais preferência no máximo 250 e com mais preferência no máximo 200 aminoácidos de comprimento. Tipicamente e de preferência, fragmentos de IL-1 são capazes de ligação do receptor de IL-1 e ainda de preferência compreendem atividade biológica. Deste modo, os termos "fragmento de IL-1 alfa" e "fragmento de "IL-1 beta" referem-se a um fragmento de IL-1 conforme definido, onde a dita proteína IL-1 é uma proteína IL-1 alfa ou uma proteína IL-1 beta, respectivamente.

Fragmento maduro de IL-1: O termo "fragmento maduro de IL-1", conforme aqui usado, refere-se a um fragmento de IL-1, onde o dito fragmento de IL-1 é um produto de maturação de ocorrência natural de uma proteína IL-1. Deste modo, os termos "fragmento maduro de IL-1 alfa" e "fragmento maduro de IL-1 beta", conforme aqui usado, referem-se a fragmentos maduros de IL-1 conforme definido, onde a dita proteína IL-1 é uma proteína IL-1 alfa ou uma proteína IL-1 beta, respectivamente. Modalidades preferidas de fragmentos maduros de IL-1 alfa são SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:65 e SEQ ID NO:163. Modalidades preferidas de fragmentos maduros de IL-1 beta são SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:164 e SEQ ID NO:165.

Fragmentos maduros de IL-1 alfa preferidos compreendem ou consistem de preferência em uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo em: (a) IL-1 alfa humana 119-271 (SEQ ID NO:63); (b) IL-1 alfa de camundongo 117-270 (SEQ ID NO:65); (c) IL-1 alfa de camundongo 117-270s (SEQ ID NO:163); e (e) uma sequência de aminoácido que é pelo menos 80% ou de preferência pelo menos 90%, com mais preferência 95% ou com mais preferência pelo menos 99% idêntica a uma das SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:65 e SEQ ID NO:163.

Os fragmentos maduros de IL-1 beta preferidos compreendem ou de preferência consistem em uma sequência de aminoácido selecionada

do grupo consistindo em: (a) IL-1 beta humana 117-269 (SEQ ID NO:64); (b) IL-1 beta humana 116-269 (SEQ ID NO:165); (c) IL-1 beta de camundongo 119-269 (SEQ ID NO:66); (d) IL-1 beta de camundongo 119-269s (SEQ ID NO:164); e (e) uma seqüência de aminoácido que é pelo menos 80% ou de preferência pelo menos 90%, com mais preferência pelo menos 95% ou com mais preferência pelo menos 99% idêntica a qualquer uma das SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:164 e SEQ ID NO:165.

Peptídeo de IL-1: O termo "peptídeo de IL-1", conforme aqui usado, refere-se a um polipeptídeo compreendendo uma extensão consecutiva de uma proteína de ocorrência natural, onde a dita proteína é capaz de ligação do receptor de IL-1 e de preferência compreende atividade biológica, onde o dito polipeptídeo é de 4 a 49, de preferência 6 a 35, com mais preferência 10 a 25 aminoácidos de comprimento. O polipeptídeo de IL-1 pode ser, mas tipicamente não é, capaz de ligação com o receptor de IL-1 e tipicamente não tem nenhuma atividade biológica. Deste modo, os termos "peptídeo de IL-1 alfa" e "peptídeo de IL-1 beta", conforme aqui usado, referem-se a peptídeos de IL-1 conforme definido, onde a dita proteína de ocorrência natural é uma proteína IL-1 alfa ou uma proteína IL-1 beta, respectivamente. Peptídeos de IL-1 preferidos são SEQ ID NO:82 até SEQ ID NO:116.

Muteína de IL-1: O termo "muteína de IL-1" conforme aqui usado compreende ou de preferência consiste em qualquer polipeptídeo derivado de uma molécula de IL-1, de preferência de a partir de uma proteína IL-1 alfa ou uma IL-1 beta, um fragmento de IL-1 alfa ou um IL-1 beta, um fragmento maduro de IL-1 alfa ou um IL-1 beta ou um peptídeo de IL-1 alfa ou um de IL-1 beta, onde de preferência o dito polipeptídeo exibe atividade biológica reduzida conforme comparado com a molécula de IL-1 da qual ele é derivado. Deste modo, muteínas de IL-1 alfa e muteínas de IL-1 beta são muteínas de IL-1 conforme definido, onde o dito polipeptídeo é derivado de uma molécula de IL-1 alfa ou uma molécula de IL-1 beta, respectivamente.

Em muteínas de IL-1 preferidas, a dita atividade biológica é menos do que 80%, com mais preferência menos do que 60%, com mais preferência ainda menos do que 40%, com mais preferência ainda menos do que

20% da atividade biológica da molécula de IL-1 da qual ela é derivada. Muteínas de IL-1 preferidas adicionais são derivadas de um fragmento maduro de IL-1, onde a dita atividade biológica da dita muteína de IL-1 é menos do que 80%, com mais preferência menos do que 60%, com mais preferência ainda menos do que 40%, com mais preferência ainda menos do que 20% da atividade biológica do fragmento maduro de IL-1 do qual a dita muteína de IL-1 é derivada. Muteínas de IL-1 muito preferidas não exibem atividade biológica. Ainda de preferência, mas não necessariamente, as muteínas de IL-1 são capazes de especificamente se ligar a um receptor de IL-1. Muito preferidas são as muteínas de IL-1 derivadas de (i) uma proteína IL-1, de preferência de a partir da SEQ ID NO:36 a SEQ ID NO:62; ou (ii) com mais preferência de um fragmento de IL-1 maduro, de preferência de qualquer um de SEQ ID NO:63 a SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:130 e SEQ ID NO:163 até SEQ ID NO:165.

15 As muteínas de IL-1 úteis no contexto foram descritas em Kamogashira e outros (1988) *J. Biochem.* 104:837-840; Gehrke e outros (1990) *The Journal of Biological Chemistry* 265(11):5922-5925; Conca e outros (1991) *The Journal of Biological Chemistry* 266(25):16265-16268; Ju e outros (1991) *PNAS* 88:2658-2662; Auron e outros (1992) *Biochemistry* 20 31:6632-6638; Guinet e outros (1993) *Eur. J. Blochem.* 211:583-590; Camacho (1993) *Biochemistry* 32:8749-8757; Baumann (1993) *Journal of Receptor Research* 13(1-4):245-262; Simon (1993) *The Journal of Biological Chemistry* 268(13):9771-9779; e Simoncsits (1994) *Cytokine* 6(2):206-214, cujas descrições são aqui incorporadas a título de referência.

25 Muteínas de IL-1 preferidas compreendem ou de preferência consistem em um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido que difere da seqüência de aminoácido de uma proteína IL-1, um fragmento de IL-1, um fragmento maduro de IL-1 ou um peptídeo de IL-1 em 1 a 10, de preferência 1 a 6, com mais preferência 1 a 5, com mais preferência ainda 1 a 4, 30 com mais preferência ainda 1 a 3, com mais preferência ainda 1 a 2 e com mais preferência em exatamente 1 resíduo de aminoácido, onde de preferência o(s) dito(s) resíduo(s) de aminoácido é/são (i) deletados do dito poli-



peptídeo, (ii) inseridos no dito polipeptídeo, (iii) trocados por um outro resí-  
duo de aminoácido ou (iv) qualquer combinação de (i) a (iii). Em uma moda-  
lidade preferida, os ditos resíduos de aminoácido estão em uma extensão  
consecutiva. Muteínas de IL-1 preferidas adicionais compreendem ou de  
5 preferêcia consistem em um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoá-  
cido que difere da seqüência de aminoácido de uma proteína IL-1, um frag-  
mento de IL-1 ou um fragmento maduro de IL-1, de preferêcia de um frag-  
mento maduro de IL1, em 1 a 10, de preferêcia 1 a 6, com mais preferêcia  
1 a 5, com mais preferêcia ainda 1 a 4, com mais preferêcia ainda 1 a 3,  
10 com mais preferêcia ainda 1 a 3, e com mais preferêcia em exatamente 1  
resíduo de aminoácido, onde de preferêcia o(s) dito(s) resíduo(s) de ami-  
noácido são (i) deletado(s) do dito polipeptídeo, (ii) inserido(s) no dito poli-  
peptídeo, (iii) trocado(s) por um outro resíduo de aminoácido ou (iv) qualquer  
combinação de (i) a (iii).

15 Muteínas de IL-1 preferidas adicionais compreendem ou de pre-  
ferêcia consistem em um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido  
que difere da seqüência de aminoácido de qualquer uma da SEQ ID NO:36  
a SEQ ID NO:48 ou SEQ ID NO:49 a SEQ ID NO:62 em 1 a 10, de preferên-  
cia 1 a 6, com mais preferêcia 1 a 5, com mais preferêcia ainda 1 a 4, com  
20 mais preferêcia ainda 1 a 3, com mais preferêcia ainda 1 a 2 e com mais  
preferêcia em exatamente 1 resíduo de aminoácido, onde de preferêcia  
o(s) dito(s) resíduo(s) de aminoácido é/são (i) deletado(s) do dito polipeptí-  
deo, (ii) inserido(s) no dito polipeptídeo, (iii) trocado(s) por outro resíduo de  
aminoácido ou (iv) qualquer combinação de (i) a (iii). Muteínas de IL-1 prefe-  
25 ridas adicionais compreendem ou de preferêcia consistem em um polipep-  
tídeo tendo uma seqüência de aminoácido que difere da seqüência de ami-  
noácido selecionada do grupo consistindo em (i) qualquer uma das SEQ ID  
NO:63, SEQ ID NO:65 e SEQ ID NO:163, com mais preferêcia SEQ ID  
NO:63; ou (ii) qualquer uma das selecionadas do grupo consistindo na SEQ  
30 ID NO: 64, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:164 e SEQ ID  
NO:165, com mais preferêcia SEQ ID NO:64 em 1 a 10, de preferêcia 1 a  
6, com mais preferêcia 1 a 5, com mais preferêcia ainda 1 a 4, com mais

preferência ainda 1 a 3, com mais preferência ainda 1 a 2 e com mais preferência em exatamente 1 resíduo de aminoácido, onde de preferência o(s) dito(s) resíduo(s) de aminoácido é/são (i) deletado(s) do dito polipeptídeo, (ii) inserido(s) no dito polipeptídeo, (iii) trocado(s) por outro resíduo de aminoácido ou (iv) qualquer combinação de (i) a (iii).

Muteínas de IL-1 preferidas adicionais são muteínas IL-1 alfa, onde as ditas muteínas IL-1 alfa compreendem ou de preferência consistem em um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido que difere da seqüência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID NO:36 a SEQ ID NO:48 em 1 a 6, de preferência 1 a 5, com mais preferência 1 a 4, com mais preferência ainda 1 a 3, com mais preferência ainda 1 a 2 e com mais preferência em exatamente 1 resíduo de aminoácido, onde de preferência o(s) dito(s) resíduo(s) de aminoácido é/são (i) deletado(s) do dito polipeptídeo, (ii) inserido(s) no dito polipeptídeo, (iii) trocado(s) por outro resíduo de aminoácido ou (iv) qualquer combinação de (i) a (iii). Muteínas de IL-1 alfa preferidas adicionais compreendem ou de preferência consistem em um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido que difere da seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo em (i) qualquer uma das SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:65 e SEQ ID NO:163, com mais preferência SEQ ID NO:63; ou 1 a 6, de preferência 1 a 5, com mais preferência ainda 1 a 4, com mais preferência ainda 1 a 3, com mais preferência ainda 1 a 2 e com mais preferência em exatamente 1 resíduo de aminoácido, onde de preferência o(s) dito(s) resíduo(s) de aminoácido é/são (i) deletado(s) do dito polipeptídeo, (ii) inserido(s) no dito polipeptídeo, (iii) trocado(s) por outro resíduo de aminoácido ou (iv) qualquer combinação de (i) a (iii). Muteínas de IL-1 alfa muito preferidas compreendem ou consistem de preferência em um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido que difere da seqüência de aminoácido da SEQ ID NO:63 em 1 a 10, de preferência 1 a 6, com mais preferência 1 a 5, com mais preferência ainda 1 a 4, com mais preferência ainda 1 a 3, com mais preferência ainda 1 a 2 e com mais preferência em exatamente 1 resíduo de aminoácido, onde de preferência o(s) dito(s) resíduo(s) de aminoácido é/são (i) deletado(s) do dito polipeptídeo, (ii) inseri-

do(s) no dito polipeptídeo, (iii) trocado(s) por outro resíduo de aminoácido ou (iv) qualquer combinação de (i) a (iii).

Muteínas de IL-1 preferidas adicionais são muteínas de IL-1 beta, onde as ditas muteínas de IL-1 beta compreendem ou com mais preferência consistem em um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido que difere da seqüência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID NO:49 a SEQ ID NO:62 em 1 a 10, de preferência 1 a 5, com mais preferência 1 a 4, com mais preferência 1 a 3, com mais preferência ainda de preferência 1 a 2 e com mais preferência exatamente 1 resíduo de aminoácido, onde de preferência o(s) dito(s) resíduo(s) de aminoácido é/são (i) deletado(s) do dito polipeptídeo, (ii) inserido(s) no dito polipeptídeo, (iii) trocado(s) por outro resíduo de aminoácido ou (iv) qualquer combinação de (i) a (iii). Muteínas de IL-1 beta preferidas adicionais compreendem ou de preferência consistem em um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido que difere da seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66, SEQ ID:130, SEQ ID NO:164 e SEQ ID NO:165, com mais preferência SEQ ID NO:64, em 1 a 6, de preferência 1 a 5, com mais preferência 1 a 4, com mais preferência ainda 1 a 3, com mais preferência ainda 1 a 2 e com mais preferência em exatamente 1 resíduo de aminoácido, onde de preferência o(s) dito(s) resíduo(s) de aminoácido é/são (i) deletado(s) do dito polipeptídeo, (ii) inserido(s) no dito polipeptídeo, (iii) trocado(s) por outro resíduo de aminoácido ou (iv) qualquer combinação de (i) a (iii). Muteínas de IL-1 beta muito preferidas compreendem ou de preferência consistem em um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido que difere da seqüência de aminoácido da SEQ ID NO:64 em 1 a 10, de preferência 1 a 6, com mais preferência 1 a 5, com mais preferência 1 a 4, com mais preferência ainda 1 a 3, com mais preferência ainda 1 a 2 e com mais preferência em exatamente 1 resíduo de aminoácido, onde de preferência o(s) dito(s) resíduo(s) de aminoácido é/são (i) deletado(s) do dito polipeptídeo, (ii) inserido(s) no dito polipeptídeo, (iii) trocado(s) por outro resíduo de aminoácido ou (iv) qualquer combinação de (i) a (iii). Muteínas de IL-1 beta mais preferidas compreendem ou de preferência consistem em um polipeptídeo tendo uma seqüência

de aminoácido selecionada de qualquer um do grupo consistindo em SEQ ID NO:131 a SEQ ID NO:140.

Efeito agonístico/atividade biológica da IL-1: O termo "atividade biológica" ou "biologicamente ativo" conforme aqui usado com relação à IL-1 refere-se à habilidade da molécula de IL-1 em induzir a produção de IL-6 após administração sistêmica a animais, de preferência conforme mostrado no Exemplo 2E e no Exemplo 3E. Por atividade biológica da molécula de IL-1 se quer dizer também a habilidade em induzir a proliferação de tímócitos (Epps e outros, *Cytokine* 9(3):149-156 (1997), células T auxiliares D10.G4.1 T (Orencole e Dinarello, *Cytokine* 1(1):14-22 (1989), ou a habilidade em induzir a produção de IL-6 a partir de células MG64 ou HaCaT (Boraschi e outros, *J. Immunol.* 155:4719-4725 (1995) ou fibroblastos (Dinarello e outros, *Current Protocols in Immunology* 6.2.1-6-2-7 (2000)), ou a produção de IL-2 a partir de células de timoma EL-4 (Simon e outros, *J. Immunol. Methods* 84(1-2):85-94 (1985)), ou a habilidade em inibir o crescimento da linhagem de célula de melanoma humano A375 (Nakai e outros, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154:1189-1196 (1988)).

Ligado: O termo "ligado" ou "ligação" conforme aqui usado refere-se a todos os modos possíveis, de preferência interações químicas, através dos quais pelo menos um primeiro sítio de ligação e o pelo menos um segundo sítio de ligação são unidos. Interações químicas incluem interações covalentes e não-covalentes. Exemplos típicos de interações não-covalentes são interações iônicas, interações hidrofóbicas ou ligações hidrogênio, enquanto interações covalentes são baseadas, por meio de exemplo, em ligações covalentes tal como éster, éter, fosfoéter, amida, peptídeo, ligações de carbono-fósforo, ligações de carbono-enxofre tal como ligações tioéter ou imida. Em certas modalidades preferidas, o primeiro sítio de ligação e o segundo sítio de ligação são ligados através de pelo menos uma ligação covalente, de preferência através de pelo menos uma ligação não-peptídeo, e com mais preferência ainda através de ligações exclusivamente não-peptídeo. O termo "ligado" conforme aqui usado, no entanto, não deve se referir apenas a uma ligação direta do pelo menos um primeiro sítio de liga-

ção e o pelo menos um segundo sítio de ligação, mas também, alternativa-  
mente e de preferência, uma ligação indireta do pelo menos um primeiro sí-  
tio de ligação e do pelo menos um segundo sítio de ligação através de molé-  
cula(s) intermediária(s) e então tipicamente e de preferência usando pelo  
5 menos um, de preferência um, ligante com cruzamento hetero-bifuncional.  
Em outras modalidades preferidas o primeiro sítio de ligação e o segundo  
sítio de ligação são ligados através de pelo menos uma ligação covalente,  
de preferência através de pelo menos uma ligação peptídeo, e com mais  
preferência ainda através de ligação(ões) exclusivamente peptídeo. Em uma  
10 modalidade muito preferida o primeiro sítio de ligação e o segundo sítio e  
ligação são ligados exclusivamente por ligações peptídeo, de preferência  
através de fusão genética, ou diretamente ou, de preferência, através de  
uma ligação de aminoácido. Em uma modalidade preferida adicional o se-  
gundo sítio de ligação é ligado ao terminal C do dito primeiro sítio de ligação  
15 exclusivamente por ligações peptídeo, de preferência através de fusão gené-  
tica.

Ligante: Um "ligante", conforme aqui usado, ou associa o se-  
gundo sítio de ligação com a molécula de IL-1 ou já compreende, essencial-  
mente consiste em ou consiste no segundo sítio de ligação. De preferência,  
20 um "ligante", conforme aqui usado, já compreende o segundo sítio de liga-  
ção, tipicamente e de preferência – mas não necessariamente – como um  
resíduo de aminoácido, de preferência um resíduo de cisteína. Um "ligante"  
conforme aqui usado é também chamado "ligante de aminoácido", em parti-  
cular quando um ligante de acordo com a invenção contém pelo menos um  
25 resíduo de aminoácido. Deste modo, os termos "ligante" e "ligante de ami-  
noácido" são intercomutavelmente usados aqui. No entanto, isto não implica  
que tal ligante consista exclusivamente em resíduos de aminoácido, mesmo  
se um ligante consistindo em resíduos de aminoácido for uma modalidade  
preferida da presente invenção. Os resíduos de aminoácido do ligante são,  
30 de preferência, compostos de aminoácidos de ocorrência natural ou aminoá-  
cidos não-naturais conhecidos na técnica, todos L ou todos D ou misturas  
deles. Modalidades preferidas adicionais de um ligante de acordo com a

presente invenção são moléculas compreendendo um grupo sulfidril ou um resíduo cisteína e tais moléculas são, então, também compreendidas na presente invenção. Ligantes adicionais úteis para a presente invenção são moléculas compreendendo uma porção C1-C6 alquila, uma cicloalquila tal como uma ciclopentila ou cicloexila, uma cicloalquenila, arila ou heteroarila. Além disso, ligantes compreendendo de preferência uma porção C1-C6 alquila, cicloalquila (C5, C6), arila ou heteroarila e aminoácido(s) adicional(ais) podem ser também usados como ligantes para a presente invenção e devem ser compreendidos dentro do escopo da invenção. Associação do ligante com a molécula de IL-1 é de preferência por meio de pelo menos uma ligação covalente, com mais preferência por meio de pelo menos uma ligação peptídeo. No contexto de ligação por fusão genética, um ligante pode estar ausente ou de preferência é um ligante de aminoácido, com mais preferência um ligante de aminoácido consistindo exclusivamente em resíduos de aminoácido. Ligantes muito preferidos para fusão genética são ligantes de aminoácido flexíveis. No contexto de ligação por fusão genética, ligantes preferidos consistem em 1 a 20, com mais preferência 2 a 15, com mais preferência ainda de 2 a 10, com mais preferência ainda de 2 a 5 e com mais preferência de 3 aminoácidos. Ligantes muito preferidos para fusão genética compreendem ou de preferência consistem em GSG (SEQ ID NO:189).

Disposição de antígeno ordenada e repetitiva: Conforme aqui usado, o termo "disposição de antígeno ordenada e repetitiva" refere-se em geral a um padrão de repetição de antígeno ou, caracterizado por uma ordem típica e de preferência maior de uniformidade em disposição espacial dos antígenos com relação à partícula do tipo vírus, respectivamente. Em uma modalidade da invenção, o padrão de repetição pode ser um padrão geométrico. Certas modalidades da invenção, tal como antígenos acoplados à VLP de bacteriófagos de RNA, são típicas e exemplos preferidos de disposições de antígeno ordenadas e repetitivas adequadas que, além disso, possuem ordens paracristalinas estritamente repetitivas de antígenos, de preferência com espaçamento de 1 a 30 nanômetros, de preferência 2 a 15 nanômetros, com mais preferência ainda 2 a 10 nanômetros, novamente com

mais preferência 2 a 8 nanômetros, e com mais preferência ainda 1,6 a 7 nanômetros.

Embalado: O termo "embalado" conforme aqui usado refere-se ao estado de uma macromolécula polianiônica ou substâncias imunoestimuladoras em relação à VLP. O termo "embalado" conforme aqui usado inclui ligação que pode ser covalente, por exemplo, através de acoplamento químico, ou não-covalente, por exemplo, interações iônicas, interações hidrofóbicas, ligações hidrogênio, etc. O termo também inclui o confinamento, ou confinamento parcial, de uma macromolécula polianiônica. Deste modo, a macromolécula polianiônica ou substâncias imunoestimuladoras podem ser confinadas pela VLP sem a existência de uma ligação real, em particular de uma ligação covalente. Em modalidades preferidas, a pelo menos uma macromolécula polianiônica ou substâncias imunoestimuladoras são embaladas dentro da VLP, com mais preferência de uma maneira não-covalente. No caso das ditas substâncias imunoestimuladoras serem ácido nucléico, de preferência um DNA, o termo embalado implica que o dito ácido nucléico não é acessível à hidrólise de nucleases, de preferência não acessível a hidrólise de DNase (por exemplo, DNase I ou Benzonase), onde de preferência a dita acessibilidade é ensaiada conforme descrito nos Exemplos 11-17 do WO2003/024481A2.

Polipeptídeo: O termo "polipeptídeo" conforme aqui usado refere-se a uma molécula composta de monômeros (aminoácidos) linearmente ligados por ligações amida (também conhecidas como ligações peptídeo). Ele indica uma cadeia molecular de aminoácidos e não refere-se a um comprimento específico do produto. Deste modo, peptídeos, dipeptídeos, tripeptídeos, oligopeptídeos e proteínas são incluídos na definição de polipeptídeo. Modificações pós-traducionais do polipeptídeo, por exemplo, glicosilações, acetilações, fosforilações e similar são também compreendidas.

VLP recombinante: O termo "VLP recombinante", conforme aqui usado, refere-se a uma VLP que é obtida através de um processo que compreende pelo menos uma etapa de tecnologia de DNA recombinante. O termo "VLP recombinantemente produzida", conforme aqui usado, refere-se a

uma VLP que é obtida através de um processo que compreende pelo menos uma etapa de tecnologia de DNA recombinante. Então, os termos "VLP recombinante" e "VLP recombinantemente produzida" são intercomutavelmente usados aqui e devem ter significado idêntico.

5                    Partícula de vírus: O termo "partícula de vírus" conforme aqui usado refere-se à forma morfológica de um vírus. Em alguns tipos de vírus ela compreende um genoma circundado por uma proteína capsídeo; outras têm estruturas adicionais (por exemplo, envelopes, filamentos, etc.).

                    Partícula do tipo vírus (VLP), conforme aqui usado, refere-se a  
10 uma partícula de vírus não-replicativa ou não-infecciosa, de preferência uma não-replicativa e não-infecciosa, ou refere-se a uma estrutura não-replicativa ou não-infecciosa, de preferência uma não-replicativa e não-infecciosa lembrando uma partícula de vírus, de preferência um capsídeo de um vírus. O termo "não-replicativo", conforme aqui usado, refere-se a ser incapaz de re-  
15 plicação do genoma compreendido pela VLP. O termo "não-infeccioso", conforme aqui usado, refere-se a ser incapaz de entrar na célula hospedeiro. De preferência, uma partícula do tipo vírus de acordo com a invenção é não-replicativa e/ou não-infecciosa uma vez que ela não tem todo ou parte do genoma viral ou função de genoma. Em uma modalidade, uma partícula do  
20 tipo vírus é uma partícula de vírus, onde o genoma viral foi fisicamente ou quimicamente inativado. Tipicamente e com mais preferência uma partícula do tipo vírus não tem todos ou parte dos componentes replicativos e infecciosos do genoma viral. Uma partícula do tipo vírus de acordo com a invenção pode conter ácido nucléico distinto de seu genoma. Uma modalidade  
25 típica e preferida de uma partícula do tipo vírus de acordo com a presente invenção é um capsídeo viral tal como o capsídeo viral do vírus correspondente, bacteriófago, de preferência bacteriófago de RNA. O termo "capsídeo viral" ou "capsídeo" refere-se a uma montagem molecular composta de subunidades de proteína viral. Tipicamente, existem 60, 120, 180, 240, 300 e  
30 360 e mais de 360 subunidades de proteína viral. Tipicamente e de preferência, as interações dessas subunidades levam à formação de capsídeo viral ou estrutura do tipo capsídeo viral com uma organização repetitiva ine-



rente, onde a dita estrutura é, tipicamente, esférica ou tubular. Por exemplo, os capsídeos de bacteriófagos de RNA ou HBcAgs têm uma forma esférica de simetria icosaedral. O termo "estrutura do tipo capsídeo", conforme aqui usado, refere-se a uma montagem macromolecular composta de subunidades de proteína viral lembrando a morfologia do capsídeo no sentido acima definido, mas desviando da montagem simétrica típica enquanto mantendo um grau suficiente de ordem e repetitividade. Uma característica comum de partículas de vírus e partículas do tipo vírus é a disposição altamente ordenada e repetitiva de sua subunidade.

10 Partícula do tipo vírus de um bacteriófago de RNA: Conforme aqui usado, o termo "partícula do tipo vírus de um bacteriófago de RNA" refere-se a uma partícula do tipo vírus compreendendo, ou de preferência consistindo essencialmente em ou consistindo em proteínas de revestimento, mutantes ou fragmentos deles, de um bacteriófago de RNA. Em adição, partícula do tipo vírus de um bacteriófago de RNA lembrando a estrutura de um bacteriófago de RNA, sendo não-replicativa e/ou não-infecciosa, e sem pelo menos o gene ou genes codificando o mecanismo de replicação do bacteriófago de RNA, e tipicamente também sem o gene ou genes codificando a proteína ou proteínas responsáveis por ligação viral a ou entrada no hospedeiro. Esta definição deve, no entanto, também compreender partículas do tipo vírus de bacteriófagos de RNA, onde o gene ou genes acima mencionados estão ainda presentes, mas inativos e, então, também levando a partículas do tipo vírus não-replicativas e/ou não-infecciosas de um bacteriófago de RNA. VLPs preferidas derivadas de bacteriófagos de RNA exibem simetria icosaedral e consistem em 180 subunidades (monômeros). Métodos preferidos para tornar uma partícula do tipo vírus de um bacteriófago de RNA não-replicativa e/ou não-infecciosa é através de inativação física, química, tal como irradiação por UV, tratamento com formaldeído, tipicamente e de preferência através de manipulação genética.

30 Um, um ou uma: Quando o termo "um", um ou "uma" é usado na presente descrição, ele significa "pelo menos um" ou "um ou mais" a menos que de outro modo indicado.

A identidade de seqüência de aminoácido de polipeptídeos pode ser determinada convencionalmente usando programas de computador tal como o programa Bestfit. Quando usando Bestfit ou qualquer outro programa de alinhamento de seqüência, de preferência usando Bestfit, para determinar se uma seqüência particular é, por exemplo, 95% idêntica a uma seqüência de aminoácido de referência, os parâmetros são ajustados de modo que a porcentagem de identidade é calculada sobre o comprimento completo da seqüência de aminoácido de referência e que lacunas em homologia de até 5% do número total de resíduos de aminoácido na seqüência de referência são permitidas. Este método acima mencionado na determinação da porcentagem de identidade entre polipeptídeos é aplicável a todas as proteínas, polipeptídeos ou um fragmento deles revelados na presente invenção.

A presente invenção provê composições e métodos para aumento das respostas imunes contra IL-1 em um animal ou em humano. As composições da invenção compreendem: (a) uma partícula de núcleo com pelo menos um primeiro sítio de ligação, onde a dita partícula de núcleo é uma partícula do tipo vírus (VLP) ou uma partícula de vírus; e (b) pelo menos um antígeno com pelo menos um segundo sítio de ligação, onde o pelo menos um antígeno é uma molécula de IL-1, de preferência selecionada do grupo consistindo em proteína IL-1, fragmento de IL-1 maduro, peptídeo de IL-1 e muteína de IL-1, onde (a) e (b) são covalentemente ligados através do pelo menos um primeiro e o pelo menos um segundo sítio de ligação. De preferência, a dita molécula de IL-1 é ligada à partícula de núcleo, de modo a formar uma disposição de antígeno-VLP ordenada e repetitiva. Em modalidades preferidas da invenção, pelo menos 20, de preferência pelo menos 30, com mais preferência pelo menos 60, novamente com mais preferência pelo menos 120 e ainda com mais preferência pelo menos 180 moléculas de IL-1 são ligadas à partícula de núcleo.

Qualquer vírus conhecido na técnica tendo uma estrutura ordenada e repetitiva pode ser selecionado como uma VLP ou uma partícula de vírus da invenção. Vírus de DNA ou RNA ilustrativos, o revestimento ou proteína capsídeo dos quais pode ser usado para a preparação de VLPs, foram

revelados no WO2004/009124 na página 25, linhas 10-21, na página 26, linhas 11-28 e na página 28, linha 4 até a página 31, linha 4. Essas descrições são aqui incorporadas a título de referência.

Vírus ou partícula do tipo vírus pode ser produzido e purificado a partir de culturas celulares infectadas por vírus. O vírus ou partícula do tipo vírus resultante para propósito de vacina deve ser de preferência não-replicativo ou não-infeccioso, com mais preferência não-replicativo e não-infeccioso. Irradiação por UV, tratamento químico, tal como com formaldeído ou clorofórmio, são os métodos gerais conhecidos da pessoa versada na técnica para inativar vírus.

Em uma modalidade preferida, a partícula de núcleo é uma partícula de vírus, e onde de preferência a dita partícula de vírus é um bacteriófago, e onde ainda de preferência o dito bacteriófago é um bacteriófago de RNA, e onde com mais preferência ainda o dito bacteriófago de RNA é um bacteriófago de RNA selecionado de Q $\beta$ , fr, GA ou AP205.

Em uma modalidade preferida, a partícula de núcleo é uma VLP. Em uma modalidade preferida adicional, a VLP é uma VLP recombinante. Quase todos os vírus geralmente conhecidos foram seqüenciados e estão prontamente disponíveis para o público. O gene codificando a proteína de revestimento pode ser facilmente identificado por um versado na técnica. A preparação de VLPs ao recombinantemente expressar a proteína de revestimento em um hospedeiro está dentro do conhecimento comum de um versado na técnica.

Em uma modalidade preferida, a partícula do tipo vírus compreende, ou alternativamente consiste em, proteínas recombinantes, mutantes ou fragmentos deles, de um vírus selecionado do grupo consistindo em: a) bacteriófagos de RNA; b) bacteriófagos; c) vírus da Hepatite B, de preferência sua proteína capsídeo (Ulrich e outros, *Virus Res.* 50:141-182 (1998)) ou sua proteína de superfície (WO 92/11291); d) vírus do sarampo (Warnes e outros, *Gene* 160:173-178 (1995)); e) vírus *sindbis*; f) rotavírus (US 5.071.651 e US 5.374.426); g) vírus da doença do pé-e-da-boca (Twomey e outros, *Vaccine* 13:1603-1610 (1995)); h) vírus Norwalk (Jiang, X. e outros,

*Science* 250:1580-1583 (1990); Matsui, S.M. e outros, *J. Clin. Invest.* 87:1456-1461 (1991)); i) Alfavírus; j) retrovírus, de preferência sua proteína GAG (WO 96/30523); k) retrotransposon Ty, de preferência a proteína p1; l) vírus Papilloma humano (WO 91/15631); m) vírus *Polyoma*; n) vírus do mosaico do tabaco; e o) vírus *Flock House*.

VLP compreendendo mais de uma proteína recombinante diferente é geralmente referida, neste pedido, como VLP de mosaico. Em uma modalidade, a VLP é uma VLP de mosaico, onde a dita VLP de mosaico compreende, ou consiste em, mais de uma proteína recombinante, de preferência de duas proteínas recombinantes, com mais preferência de duas proteínas capsídeo recombinantes, mutantes ou fragmentos deles.

O termo "fragmento de uma proteína recombinante" ou o termo "fragmento de uma proteína de revestimento", conforme aqui usado, é definido como um polipeptídeo que é de pelo menos 70%, de preferência pelo menos 80%, com mais preferência pelo menos 90%, com mais preferência ainda pelo menos 95% de comprimento da proteína recombinante do tipo selvagem, ou da proteína de revestimento, respectivamente e que de preferência retém a capacidade de formação de VLP. De preferência, o fragmento é obtido através de pelo menos uma deleção interna, pelo menos um truncamento ou pelo menos uma combinação deles. Ainda de preferência, o fragmento é obtido através de no máximo 5, 4, 3 ou 2 deleções internas, por no máximo 2 truncamentos ou por exatamente uma combinação deles.

O termo "fragmento de uma proteína recombinante" ou "fragmento de uma proteína de revestimento" deve se referir ainda a um polipeptídeo, que tem pelo menos 80%, de preferência 90%, com mais preferência ainda 95% de identidade de seqüência de aminoácido com o "fragmento de uma proteína recombinante" ou "fragmento de uma proteína de revestimento", respectivamente, conforme acima definido e que é de preferência capaz de montagem em uma partícula do tipo vírus.

O termo "proteína de revestimento mutante" refere-se a um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido derivada da proteína recombinante do tipo selvagem, ou proteína de revestimento, respectivamente,

onde a seqüência de aminoácido é pelo menos 80%, de preferência pelo menos 85%, 90%, 95%, 97% ou 99% idêntica à seqüência do tipo selvagem e de preferência retém a habilidade de montagem em uma VLP.

Em uma modalidade preferida, a partícula do tipo vírus da invenção é do vírus da Hepatite B. A preparação de partículas do tipo vírus da Hepatite B foi revelada, *inter alia*, no WO 00/32227, no WO 01/85208 e no WO 01/056905. Todos os três documentos são explicitamente aqui incorporados a título de referência. Outras variantes de HBcAg adequadas para uso na prática da presente invenção foram reveladas nas páginas 34-39 do WO 01/056905.

Em uma modalidade preferida adicional da invenção, um resíduo de lisina é introduzido no polipeptídeo de HBcAg, para mediar a ligação de molécula de IL-1 à VLP de HBcAg. Em modalidades preferidas, VLPs e composições da invenção são preparadas usando um HBcAg compreendendo, ou alternativamente consistindo em, aminoácidos 1-144 ou 1-149, 1-185 da SEQ ID NO:1, que é modificado de modo que os aminoácidos nas posições 79 e 80 são substituídos com um peptídeo tendo uma seqüência de aminoácido de Gly-Gly-Lys-Gly-Gly (SEQ ID NO:170). Esta modificação muda a SEQ ID NO:1 para SEQ ID NO:2. Em modalidades preferidas adicionais, o resíduo de cisteína nas posições 48 e 110 da SEQ ID NO:2, ou seus fragmentos correspondentes, de preferência 1-144 ou 1-149, são mudados para serina. A invenção inclui ainda composições compreendendo mutantes de proteína de núcleo de Hepatite B tendo acima anotadas alterações de aminoácido correspondentes. A invenção inclui ainda composições e vacinas, respectivamente, compreendendo polipeptídeos de HBcAg que compreendem, ou alternativamente consistem em, seqüências de aminoácido que são pelo menos 80%, 90%, 95%, 97% ou 99% idênticas à SEQ ID NO:2.

Em uma modalidade preferida da invenção, a partícula do tipo vírus da invenção compreende, consiste essencialmente em, ou consiste alternativamente em, proteínas de revestimento recombinantes, mutantes ou fragmentos deles, de um bacteriófago de RNA. De preferência, o bacteriófago de RNA é selecionado do grupo consistindo em a) bacteriófago Q $\beta$ ; b)

bacteriófago R17; c) bacteriófago fr; d) bacteriófago GA; e) bacteriófago SP; f) bacteriófago MS2; g) bacteriófago M11; h) bacteriófago MX1; i) bacteriófago NL95; k) bacteriófago f2; l) bacteriófago PP7 e m) bacteriófago AP205.

Em uma modalidade preferida da invenção, a composição compreende proteína de revestimento, mutantes ou fragmentos deles, de bacteriófagos de RNA, onde a proteína de revestimento tem seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo em: (a) SEQ ID NO:3, referindo a Q $\beta$  CP; (b) uma mistura de SEQ ID NO:3 e SEQ ID NO:4 (proteína de Q $\beta$  A1); (c) SEQ ID NO:5 (proteína capsídeo R17); (d) SEQ ID NO:6 (proteína capsídeo fr); (e) SEQ ID NO:7 (proteína capsídeo GA); (f) SEQ ID NO:8 (proteína capsídeo SP); (g) uma mistura de SEQ ID NO:8 e SEQ ID NO:9; (h) SEQ ID NO:10 (proteína capsídeo MS2); (i) SEQ ID NO:11 (proteína capsídeo M11); (j) SEQ ID NO:12 (proteína capsídeo MX1); (k) SEQ ID NO:13 (proteína capsídeo NL95); (l) SEQ ID NO:14 (proteína capsídeo f2); (m) SEQ ID NO:15 (proteína capsídeo PP7); e (n) SEQ ID NO:21 (proteína capsídeo AP205).

Em uma modalidade preferida da invenção, a VLP é uma VLP de mosaico compreendendo ou alternativamente consistindo em mais de uma seqüência de aminoácido, de preferência duas seqüências de aminoácido, mutantes ou fragmentos deles, de um bacteriófago de RNA.

Em uma modalidade muito preferida, a VLP compreende ou consiste alternativamente em duas proteínas de revestimento diferentes de um bacteriófago de RNA, as ditas duas proteínas têm uma seqüência de aminoácido de CP de Q $\beta$  (SEQ ID NO:3) e CP de Q $\beta$  (SEQ ID NO:4) ou CP SP (SEQ ID NO:8) e CP SP A1 (SEQ ID NO:9).

Em modalidades preferidas da presente invenção, a partícula do tipo vírus da invenção compreende, ou alternativamente consiste essencialmente em, ou alternativamente consistem em, proteínas de revestimento recombinantes, mutantes ou fragmentos deles, do bacteriófago de RNA Q $\beta$ , fr, AP205 ou GA.

Em uma modalidade preferida, a VLP da invenção é uma VLP de bacteriófago de RNA Q $\beta$ . O capsídeo ou partícula do tipo vírus Q $\beta$  mos-

trou uma estrutura de capsídeo tipo fago icosaedral com um diâmetro de 25 nm e *quasi* simetria T=3. O capsídeo contém 180 cópias da proteína de revestimento, que são ligadas em pentâmeros e hexâmeros covalentes por pontes dissulfeto (Golmohammadi, R. e outros, *Structure* 4:543-5554 (1996)), levando a uma estabilidade notável do capsídeo de Q $\beta$ . Capsídeos ou VLPs feitos de proteína de revestimento de Q $\beta$  recombinante podem conter, no entanto, subunidades não ligadas por ligações dissulfeto a outras subunidades dentro do capsídeo, ou incompletamente ligadas. O capsídeo ou VLP de Q $\beta$  mostra resistência incomum a solventes orgânicos e agentes de desnaturação. Surpreendentemente, foi observado pela requerente que concentrações de DMSO e acetonitrila tão altas quanto 30% e concentrações de guanidina tão altas quanto 1 M não afetam a estabilidade do capsídeo. A estabilidade alta do capsídeo ou VLP de Q $\beta$  é uma característica vantajosa, em particular, para seu uso em imunização e vacinação de mamíferos e humanos de acordo com a presente invenção.

Partículas do tipo vírus preferidas adicionais de bacteriófagos de RNA, em particular de Q $\beta$  e fr de acordo com a presente invenção são reveladas no WO 02/056905, cuja descrição é aqui incorporada a título de referência em sua totalidade. O exemplo particular 18 do WO 02/056905 dava descrição detalhada de preparação de partículas de VLP a partir de Q $\beta$ .

Em outra modalidade preferida, uma VLP da invenção é uma VLP de bacteriófago de RNA AP205. Formas mutantes competentes em montagem de VLPs de AP205, incluindo proteína de revestimento de AP205 com a substituição de prolina no aminoácido 5 em treonina, podem ser também usadas na prática da invenção e leva a outras modalidades preferidas da invenção. O WO 2004/007538 descreve, em particular no Exemplo 1 e no Exemplo 2, como se obter VLP compreendendo proteínas de revestimento de AP205, e então em particular a expressão e purificação para elas. O WO 2004/007538 é aqui incorporado a título de referência. VLPs de AP205 são altamente imunogênicas e podem ser ligadas com molécula de IL-1 para tipicamente e de preferência gerar construtos de vacina mostrando a molécula de IL-1 orientada de uma maneira repetitiva.

Em uma modalidade preferida, a VLP da invenção compreende ou consiste em uma proteína de revestimento mutante de um vírus, de preferência um bacteriófago de RNA, onde a proteína de revestimento mutante foi modificada através da remoção de pelo menos um resíduo de lisina por meio de substituição e/ou por meio de deleção. Em outra modalidade preferida, a VLP da invenção compreende ou consiste em uma proteína de revestimento mutante de um vírus, de preferência um bacteriófago de RNA, onde a proteína de revestimento mutante foi modificada através da adição de pelo menos um resíduo de lisina por meio de substituição e/ou por meio de inserção. A deleção, substituição ou adição de pelo menos um resíduo de lisina permite variação do grau de acoplamento, isto é, da quantidade de molécula de IL-1 por subunidades da VLP de um vírus, de preferência de um bacteriófago de RNA, em particular para estar compatível e adaptar as necessidades da vacina.

Em uma modalidade preferida, as composições e vacinas da invenção têm uma densidade de antígeno sendo de a partir de 0,5 a 4,0. O termo "densidade de antígeno", conforme aqui usado, refere-se a um número médio de moléculas de IL-1 que é ligado por subunidade, de preferência por proteína de revestimento, da VLP, e então de preferência da VLP de um bacteriófago de RNA. Deste modo, este valor é calculado como uma média sobre todas as subunidades da VLP, de preferência da VLP do bacteriófago de RNA, na composição ou vacinas da invenção.

VLPs ou capsídeos da proteína de revestimento de Q $\beta$  mostram um número definido de resíduos de lisina em sua superfície, com uma topologia definida com três resíduos de lisina apontando em direção ao interior do capsídeo e interagindo com o RNA, e quatro outros resíduos de lisina expostos para o exterior do capsídeo. De preferência, o pelo menos um primeiro sítio de ligação é um resíduo de lisina, apontando ou estando no exterior da VLP.

Mutantes de Q $\beta$ , dos quais resíduos de lisina expostos são substituídos por argininas, podem ser usados para a presente invenção. Deste modo, em outra modalidade preferida da presente invenção, a partícula do



tipo vírus compreende, consiste essencialmente em ou consiste alternativa-  
mente em proteínas de revestimento de Q $\beta$  mutantes. De preferência essas  
proteínas de revestimento mutantes compreendem ou consistem alternati-  
vamente em uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo de a) Q $\beta$ -  
5 240 (SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:16, Lys13-Arg da SEQ ID NO:3); b) Q $\beta$ -243  
(SEQ ID NO:17, Asn10-Lys da SEQ ID NO:3); c) Q $\beta$ -250 (SEQ ID NO:18,  
Lys2-Arg da SEQ ID NO:3); d) Q $\beta$ -251 (SEQ ID NO:19, Lys16-Arg da SEQ  
ID NO:3); e) Q $\beta$ -259 (SEQ ID NO:30, Lys2-Arg, Lys16-Arg da SEQ ID NO:3).  
A construção, expressão e purificação das proteínas de revestimento mutan-  
10 tes de Q $\beta$ , VLPs e capsídeos de proteína de revestimento de Q $\beta$  mutante  
acima indicados, respectivamente, são descritos no WO 02/056905. Em par-  
ticular é então referido ao Exemplo 18 do pedido acima mencionado.

Em outra modalidade preferida da presente invenção, a partícula  
do tipo vírus compreende, ou consiste alternativamente essencialmente em,  
15 ou consiste alternativamente em proteína de revestimento mutante de Q $\beta$ ,  
ou mutantes ou fragmentos deles, e a proteína A1 correspondente. Em uma  
modalidade preferida adicional, a partícula do tipo vírus compreende, ou  
consiste alternativamente essencialmente em, ou alternativamente consiste  
em proteína de revestimento mutante com seqüência de aminoácido SEQ ID  
20 NO:16, 17, 18, 19 ou 20, e a proteína A1 correspondente.

Proteínas de revestimento de bacteriófago de RNA adicionais  
foram também mostradas se automontar quando da expressão em hospedeiro  
bacteriano (Kastepein, R.A. e outros, *Gene* 23:245-254 (1983), Ko-  
zlovskaya, T.M. e outros, *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* 287:452-455 (1986), A-  
25 dhin, M.R. e outros, *Virology* 170:238-242 (1989), Priano, C. e outros, *J. Mol. Biol.*  
249:283-297 (1995)). Em particular as propriedades biológicas e bio-  
químicas de GA (Ni, C.Z. e outros, *Protein Sci.* 5:2485-2493 (1996), Tars, K.  
e outros, *J. Mol. Biol.* 271:759-773 (1997)) e de fr (Pushko, P. e outros, *Prot. Eng.*  
6:883-891 (1993), Liljas e outros, *J. Mol. Biol.* 244:279-290 (1994)) fo-  
30 ram reveladas. A estrutura de cristal de vários bacteriófagos de RNA foi de-  
terminada (Golmohammadi, R. e outros, *Structure* 4:543-554 (1996)). Usan-  
do tal informação, resíduos expostos de superfície podem ser identificados

e, então, proteínas de revestimento de bacteriófago de RNA podem ser modificadas de modo que um ou mais resíduos de aminoácido reativos podem ser inseridos por meio de inserção ou substituição. Outra vantagem das VLPs derivadas de bacteriófagos de RNA é seu rendimento de expressão  
5 alto em bactérias que permite produção de grandes quantidades de material a custo acessível.

Em uma modalidade preferida, a composição da invenção compreende pelo menos um antígeno, de preferência um a quatro, de preferência um a três, com mais preferência ainda um a dois e com mais preferência  
10 exatamente um antígeno, onde o dito antígeno é uma molécula de IL-1, de preferência uma proteína de IL-1, um fragmento de IL-1, um fragmento maduro de IL-1, um peptídeo de IL-1 ou uma muteína de IL-1, onde a dita molécula de IL-1 compreende de preferência ou com mais preferência ainda consiste em um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido tendo pelo  
15 menos 80%, de preferência pelo menos 90%, com mais preferência pelo menos 95%, com mais preferência ainda pelo menos 99% e com mais preferência 100% de identidade de seqüência com qualquer uma das SEQ ID NO:36 a SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:130 a SEQ ID NO:140 e SEQ ID NO:163 a SEQ ID NO:165.

20 Em uma modalidade preferida adicional o dito antígeno é uma molécula de IL-1 derivada de um organismo selecionado do grupo consistindo em: (a) humanos; (b) primatas; (c) roedores; (d) cavalos; (e) ovelha; (f) gato; (g) gado; (h) porco; (i) coelho; (j) cachorro; (k) camundongo; e (l) rato. Com mais preferência a dita molécula de IL-1 é derivada de seres humanos,  
25 de preferência compreendendo ou consistindo com mais preferência em um polipeptídeo tendo pelo menos 80%, de preferência pelo menos 90%, com mais preferência pelo menos 95%, com mais preferência ainda pelo menos 99% e com mais preferência 100% de identidade de seqüência com qualquer uma das seqüências selecionadas do grupo consistindo em SEQ ID  
30 NO:36, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:63; SEQ ID NO:64, qualquer uma das SEQ ID NO:67 a 110 e uma das SEQ ID Nos:130-140 e SEQ ID NO:165.

Em uma modalidade preferida adicional a dita molécula de IL-1

derivada de rato ou camundongo, de preferência camundongo, onde a dita molécula de IL-1 de preferência compreende ou consiste com mais preferência ainda em um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido tendo pelo menos 80%, de preferência pelo menos 90%, com mais preferência pelo menos 95%, com mais preferência ainda pelo menos 99% e com mais preferência 100% de identidade de seqüência com qualquer uma SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:53; SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, qualquer uma da SEQ ID NO:111 a SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:163 e SEQ ID NO:164.

10 Em uma modalidade preferida adicional, a molécula de IL-1 é uma molécula de IL-1 alfa, de preferência uma proteína IL-1 alfa, um fragmento de IL-1 alfa, um fragmento maduro de IL-1 alfa, um peptídeo de IL-1 alfa ou uma muteína de IL-1 alfa, onde a dita molécula de IL-1 alfa compreende ou com mais preferência ainda consiste em um polipeptídeo tendo uma  
15 seqüência de aminoácido tendo pelo menos 80%, de preferência pelo menos 90%, com mais preferência pelo menos 95%, com mais preferência ainda pelo menos 99% e com mais preferência 100% de identidade de seqüência com qualquer uma das seqüências selecionadas do grupo consistindo sem SEQ ID NOs:36 a 48, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:65; SEQ ID NOs:67 a 88 e  
20 SEQ ID NO:165. Modalidades especificamente preferidas das moléculas de IL-1 alfa são moléculas de IL-1 alfa humana, de preferência proteínas IL-1 alfa humanas, fragmentos de IL-1 alfa humana ou fragmentos maduros de IL-1 alfa humana, onde as ditas moléculas de IL-1 alfa compreendem de preferência ou com mais preferência consistem em um polipeptídeo tendo uma  
25 seqüência de aminoácido tendo pelo menos 80%, de preferência pelo menos 90%, com mais preferência pelo menos 95%, com mais preferência ainda pelo menos 99% e com mais preferência 100% de identidade de seqüência com qualquer uma das SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:63 e SEQ ID NO:163, com mais preferência SEQ ID NO:63.

30 Em uma modalidade preferida adicional a dita molécula de IL-1 é uma molécula de IL-1 beta, de preferência uma proteína IL-1 beta, um fragmento de IL-1 beta, um fragmento maduro de IL-1 beta, um peptídeo de IL-1

beta ou uma muteína de IL-1 beta, onde a dita molécula de IL-1 beta compreende de preferência ou com mais preferência ainda consiste em um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido tendo pelo menos 80%, de preferência pelo menos 90%, com mais preferência pelo menos 95%, com mais preferência ainda pelo menos 99% e com mais preferência 100% de identidade de seqüência com qualquer uma das seqüências selecionadas do grupo consistindo em SEQ ID NOs:49 a 62, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66, SEQ ID NOs:89 a 116, SEQ ID NO:130 a SEQ ID NO:140, SEQ IE NO:164 e SEQ ID NO:165. As modalidades especificamente preferidas de moléculas de IL-1 beta são moléculas de IL-1 beta humanas, de preferência proteínas IL-1 beta humanas, fragmentos de IL-1 beta humana ou fragmentos maduros de IL-1 beta humana, onde as ditas moléculas de IL-1 beta compreendem de preferência ou com consistem com mais preferência ainda em um polipeptídeo tendo pelo menos 80%, de preferência pelo menos 90%, com mais preferência pelo menos 95%, com mais preferência ainda pelo menos 99% e com mais preferência 100% de identidade de seqüência com qualquer uma das SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:130 a SEQ ID NO:140 e SEQ ID NO:165, com mais preferência SEQ ID NO:64.

Em uma modalidade preferida adicional a dita molécula de IL-1 é uma proteína IL-1, um fragmento de IL-1 ou, de preferência, um fragmento maduro de IL-1, onde a dita proteína IL-1, fragmento de IL-1 ou fragmento maduro de IL-1 de preferência é capaz de se ligar ao receptor de IL-1 e, ainda com mais preferência, adicionalmente também compreender atividade biológica.

Em uma modalidade preferida adicional, a dita molécula de IL-1 é uma proteína IL-1, onde a dita proteína IL-1 compreende de preferência ou com mais preferência ainda consiste em um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido tendo pelo menos 80%, de preferência pelo menos 90%, com mais preferência pelo menos 95%, com mais preferência ainda pelo menos 99% e com mais preferência 100% de identidade de seqüência com qualquer uma das SEQ ID NO:36 a SEQ ID NO:62.

Em uma modalidade preferida adicional, a dita proteína IL-1 é

uma proteína IL-1 alfa, onde a dita proteína IL-1 alfa compreende de preferência ou com mais preferência ainda consiste em um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido tendo pelo menos 80%, de preferência pelo menos 90%, com mais preferência pelo menos 95%, com mais preferência ainda pelo menos 99% e com mais preferência 100% de identidade de seqüência com qualquer uma das seqüências selecionadas do grupo consistindo em SEQ ID NO:36 a SEQ ID NO:48. Com mais preferência, dita proteína IL-1 alfa é uma proteína IL-1 alfa, onde a dita proteína IL-1 alfa humana compreende de preferência ou com mais preferência ainda consiste em um polipeptídeo tendo pelo menos 80%, de preferência pelo menos 90%, com mais preferência pelo menos 95%, com mais preferência ainda pelo menos 99% e com mais preferência 100% de identidade de seqüência com a SEQ ID NO:36.

Em uma modalidade preferida adicional a dita proteína IL-1 é uma proteína IL-1 beta, onde a dita proteína IL-1 beta compreende de preferência ou com mais preferência consiste em um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido tendo pelo menos 80%, de preferência pelo menos 90%, com mais preferência pelo menos 95%, com mais preferência ainda pelo menos 99% e com mais preferência 100% de identidade de seqüência com qualquer uma das seqüências selecionadas do grupo consistindo em SEQ ID NO:49 a SEQ ID NO:62. Com mais preferência a dita proteína IL-1 beta é uma proteína IL-1 beta humana, onde a dita proteína IL-1 beta humana compreende de preferência ou com mais preferência ainda consiste em um polipeptídeo tendo pelo menos 80%, de preferência pelo menos 90%, com mais preferência pelo menos 95%, com mais preferência ainda pelo menos 99% e com mais preferência 100% de identidade de seqüência com a SEQ ID NO:49.

Em uma modalidade preferida adicional a dita molécula de IL-1 é um fragmento de IL-1, de preferência um fragmento maduro de IL-1, e onde o dito fragmento de IL-1 ou dito fragmento maduro de IL-1 de preferência é derivado de camundongo ou ser humano, com mais preferência ser humano. De preferência, o dito fragmento de IL-1 ou dito fragmento maduro de IL-1

compreende ou consiste com mais preferência ainda em um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido tendo pelo menos 80%, de preferência pelo menos 90%, com mais preferência pelo menos 95%, com mais preferência ainda pelo menos 99% e com mais preferência 100% de identidade de seqüência com qualquer uma das SEQ ID NO: 63 a SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:130 e SEQ ID NO:163 a SEQ ID NO:165.

Em uma modalidade preferida o dito fragmento maduro de IL-1 é um fragmento maduro de IL-1 alfa, onde o dito fragmento maduro de IL-1 alfa compreende de preferência atividade biológica e onde ainda o dito fragmento maduro de IL-1 alfa compreende ou consiste com mais preferência ainda em um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido tendo pelo menos 80%, de preferência pelo menos 90%, com mais preferência pelo menos 95%, com mais preferência ainda pelo menos 99% e com mais preferência 100% de identidade de seqüência com qualquer uma das SEQ ID NO:63 ou SEQ ID NO:65, com mais preferência SEQ ID NO:63.

Em uma modalidade preferida o dito fragmento maduro de IL-1 é um fragmento maduro de IL-1 beta, onde o dito fragmento maduro de IL-1 beta compreende de preferência atividade biológica e onde ainda o dito fragmento maduro de IL-1 beta compreende ou consiste com mais preferência ainda em um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido tendo pelo menos 80%, de preferência pelo menos 90%, com mais preferência pelo menos 95%, com mais preferência ainda pelo menos 99% e com mais preferência 100% de identidade de seqüência com qualquer uma das SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66 e SEQ ID NO:130, com mais preferência SEQ ID NO:64.

Em uma modalidade preferida adicional a dita molécula de IL-1 é um peptídeo de IL-1, onde o dito peptídeo de IL-1 é derivado de camundongo, rato ou humano, com mais preferência humano. De preferência, o dito peptídeo de IL-1 compreende ou consiste com mais preferência ainda em um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido tendo pelo menos 80%, de preferência pelo menos 90%, com mais preferência pelo menos 95%, com mais preferência ainda pelo menos 99% e com mais preferência

100% de identidade de seqüência com qualquer uma das SEQ ID NO:67 a SEQ ID NO:116.

Em uma modalidade preferida adicional a dita molécula de IL-1 é uma muteína de IL-1, onde de preferência a dita muteína de IL-1 compreende atividade biológica reduzida ou com mais preferência nenhuma, e onde ainda a dita muteína de IL-1 é capaz de se ligar ao receptor de IL-1. Em uma modalidade preferida adicional, a dita muteína de IL-1 compreende ou de preferência consiste em um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido que difere da seqüência de aminoácido de um fragmento maduro de IL-1 em 1 a 3, com mais preferência em 1 a 2, e com mais preferência em exatamente 1 resíduo de aminoácido. Em uma modalidade preferida adicional a dita muteína de IL-1 é uma muteína de IL-1 beta, de preferência uma muteína de IL-1 beta, com mais preferência uma muteína de IL-1 beta humana selecionada de SEQ ID NO:131 a SEQ ID NO:140.

A presente invenção provê um método de produção da composição da invenção compreendendo (a) provisão de uma VLP com pelo menos uma primeira ligação; (b) provisão de pelo menos um antígeno, onde o dito antígeno é uma molécula de IL-1, uma proteína de IL-1, um fragmento de IL-1, de preferência um fragmento maduro de IL-1, um peptídeo de IL-1 ou uma muteína de IL-1, com pelo menos um segundo sítio de ligação; e (c) combinação da dita VLP com o dito pelo menos um antígeno para produzir a dita composição, onde o dito pelo menos um antígeno e a dita VLP são ligados através dos primeiro e segundo sítios de ligação. Em uma modalidade preferida, a provisão do pelo menos um antígeno, isto é, molécula de IL-1, uma proteína de IL-1, um fragmento de IL-1, de preferência um fragmento maduro de IL-1, um peptídeo de IL-1 ou uma muteína de IL-1, com o pelo menos um segundo sítio de ligação é por meio de expressão, de preferência por meio de expressão em um sistema bacteriano, de preferência em *E. coli*. Geralmente um *tag* de purificação, tal como *tag His*, *tag Myc*, *tag Fc* ou *tag HA* é adicionado para facilitar o processo de purificação. Em outra abordagem particularmente os peptídeos de IL-1 ou muteínas de IL-1 com não mais do que 50 aminoácidos são quimicamente sintetizados.

Em uma modalidade preferida da invenção, a VLP com pelo menos um primeiro sítio de ligação é ligada à molécula de IL-1 com pelo menos um segundo sítio de ligação através de pelo menos uma ligação peptídeo. Um gene codificando uma molécula de IL-1, de preferência um fragmento maduro de IL-1, é ligado em estrutura, ou internamente ou de preferência ao terminal N ou C ao gene codificando a proteína de revestimento da VLP. Fusão pode ser também realizada inserindo seqüências de IL-1 em uma proteína de revestimento mutante onde parte da seqüência de proteína de revestimento foi deletada, que são referidos mais como mutantes de truncamento. Mutantes de truncamento podem ter terminal N ou C, ou deleções internas de parte da seqüência da proteína de revestimento. Por exemplo, para o HBcAg de VLP específica, os aminoácidos 79-80 são substituídos com epítipo estranho. A proteína de fusão deve de preferência reter a habilidade de montagem em uma VLP quando da expressão que pode ser examinada através de eletromicroscopia.

Resíduos de aminoácido de flaqueamento podem ser adicionados para aumentar a distância entre a proteína de revestimento e o epítipo estranho. Resíduos de glicina e serina são aminoácidos particularmente favorecidos para serem usados nas seqüências de flaqueamento. Tal seqüência de flaqueamento confere flexibilidade adicional, que pode diminuir o efeito de desestabilização potencial de fusão de uma seqüência estranha à seqüência de uma subunidade de VLP e diminuir a interferência com a montagem através da presença do epítipo estranho.

Em outras modalidades, a pelo menos uma molécula de IL-1, de preferência o fragmento maduro de IL-1, pode ser fundida a várias outras proteínas de revestimento virais, como exemplo, ao terminal C de uma forma truncada da proteína A1 de Q $\beta$  (Kozlovskaya, T.M. e outros, *Intervirology* 39:9-15 (1996)), ou ser inserida entre as posições 72 e 73 da extensão CP. Como outro exemplo, a IL-1 pode ser inserida entre os aminoácidos 2 e 3 da fr CP, levando a uma proteína de fusão de IL-1-fr CP (Pushko, P. e outros, *Prot. Eng.* 6:883-891 (1993)). Ainda, IL-1 pode ser fundida ao *hairpin*  $\beta$  protuberante N-terminal da proteína de revestimento de bacteriófago de RNA MS-2



(WO 92/13081). Alternativamente, a IL-1 pode ser fundida a uma proteína capsídeo de papilomavírus, de preferência à proteína capsídeo principal L1 de papilomavírus bovino tipo 1 (BPV-1) (Chackerian, B. e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:2373-2378 (1999), WO 00/23955. Substituição de amino-  
5 ácidos 130-136 de BPV-1 L1 com uma IL-1 é também uma modalidade da invenção. Modalidades adicionais de fusão de uma molécula de IL-1 à proteína de revestimento, mutantes ou fragmentos deles, a uma proteína de revestimento de um vírus foram reveladas no WO 2004/009124, página 62, linha 20 até página 68, linha 17 e aqui são incorporadas a título de referên-  
10 cia.

A US 5.698.424 descreve uma proteína de revestimento modificada de bacteriófago MS-2 capaz de formação de um capsídeo, onde a proteína de revestimento é modificada por uma inserção de um resíduo de cisteína na região *hairpin* N-terminal, e através de substituição de cada o dos  
15 resíduos cisteína localizados externo à região do *hairpin* N-terminal por um resíduo de aminoácido de não-cisteína. A cisteína inserida pode então ser ligada diretamente a uma espécie molecular desejada ser apresentada tal como um epítipo ou uma proteína antigênica.

É notado pela requerente, no entanto, que a presença de um  
20 resíduo de cisteína livre exposto no capsídeo pode levar à oligomerização de capsídeo por meio de formação de ponte dissulfeto. Além disso, ligação entre capsídeos e proteínas antigênicas por meio de ligações dissulfeto é lábil, em particular, para moléculas contendo porção sulfidril, e são, ainda, menos estáveis em soro do que, por exemplo, ligações tioéter (Martin, F.J. e  
25 Phapahadjopoulos D. (1982) *Irreversible Coupling of Immunoglobulin Fragments to Preformed Vesicles*, *J. Biol. Chem.* 257:286-288).

Deste modo, em uma modalidade muito preferida adicional da presente invenção, a associação ou ligação da VLP e pelo menos um antígeno, isto é, molécula de IL-1, não compreende uma ligação dissulfeto. Ainda preferido então, a pelo menos uma segunda ligação compreende, ou de  
30 preferência é, um grupo sulfidril. Além disso, novamente em uma modalidade muito preferida da presente invenção, a associação ou ligação da VLP

e da pelo menos uma molécula de IL-1 não compreende uma ligação enxofre-enxofre. Preferida mais então, a pelo menos uma segunda ligação compreende, ou de preferência é, um grupo sulfidril. Em uma modalidade muito preferida adicional, o dito pelo menos um primeiro sítio de ligação não é ou  
5 não compreende um grupo sulfidril. Em novamente uma modalidade muito preferida adicional, o dito pelo menos um sítio de ligação não é ou não compreende um grupo sulfidril de uma cisteína.

Em uma modalidade preferida adicional a dita pelo menos uma primeira ligação compreende um grupo amino e a dita primeira ligação compreende um grupo sulfidril.  
10

Em uma modalidade preferida adicional apenas um dos ditos segundos sítios de ligação se associa com o dito primeiro sítio de ligação através de pelo menos uma ligação covalente não-peptídeo levando a um tipo único e uniforme de ligação da dita molécula de IL-1 à dita partícula de  
15 núcleo, onde o dito apenas um segundo sítio de ligação que se associa com o dito primeiro sítio de ligação é um grupo sulfidril, e onde a dita molécula de IL-1 e a dita partícula de núcleo interagem através da dita associação para formar uma disposição de antígeno ordenada e repetitiva.

Em outra modalidade preferida, uma molécula de IL-1, de preferência uma proteína IL-1, com mais preferência um fragmento maduro de IL-1, com mais preferência ainda um fragmento maduro de IL-1 compreendendo ou consistindo nas seqüências de aminoácido SEQ ID NO:63 a SEQ ID NO:66, com mais preferência SEQ ID NO:63 ou SEQ ID NO:64, é fundida ou ao terminal N ou C, de preferência ao terminal C, de uma proteína de revestimento, mutantes ou fragmentos deles, de bacteriófago de RNA Ap205.  
25 VLPs compreendendo proteínas de fusão de proteína de revestimento de bacteriófago AP205 com um antígeno são geralmente reveladas no WO2006/032674A1 que é aqui incorporado a título de referência. Em uma modalidade preferida adicional, a proteína de fusão compreende ainda um  
30 ligante, onde o dito ligante é fundido à proteína de revestimento, fragmentos ou mutantes deles, de Ap205 e à molécula de IL-1. Em uma modalidade preferida adicional a dita molécula de IL-1 é fundida ao terminal C da dita prote-

ina de revestimento, fragmentos ou mutantes deles, de AP205 através do dito ligante.

Foi constatado que moléculas de IL-1, em particular proteínas IL-1 e fragmentos de IL-1 compreendendo pelo menos 100 e até 300 aminoácidos, tipicamente e de preferência cerca de 140 a 160 aminoácidos e com mais preferência cerca de 155 aminoácidos, podem ser fundidas à proteína de revestimento de bacteriófagos, de preferência à proteína de revestimento de AP205, enquanto mantendo a habilidade da proteína de revestimento em se automontar em uma VLP.

10 Dado o tamanho grande das proteínas IL-1, fragmentos de IL-1 e fragmentos maduros de IL-1 e também por razões estéricas, um sistema de expressão produzindo VLPs de mosaico compreendendo proteínas de revestimento AP205 fundidas a uma molécula de IL-1 bem como com subunidades de proteína de revestimento wt foi construído. Neste sistema, supressão do códon de parada dá a fusão da proteína de revestimento AP205-IL1, enquanto terminação apropriada dá a proteína de revestimento AP205 wt. Ambas proteínas são produzidas simultaneamente na célula e montam em uma VLP de mosaico. A vantagem de tal sistema é que proteínas grandes podem ser mostradas sem interferência com a montagem da VLP. Como o nível de incorporação de proteína de fusão AP205-IL-1 na VLP de mosaico é dependente do nível de supressão, AP205-IL-1 é expressa em células de *E. coli* já contendo um plasmídeo superexpressando um t-RNA supressor. Para supressão de opal, plasmídeo pISM3001 (Smiley, B.K., Minion, F.C. (1993) *Enhanced reathrough of opal (UGA) stop codons and production of Mycoplasma pneumonia P1 epitopes in Escherichia coli. Gene* 134, 33-40), que codifica um t-RNA supressor reconhecendo o códon de parada opal e introduzindo Trp, é usado. Supressão de terminação amber pode ser aumentada através do uso de plasmídeo pISM579, que superexpressa um t-RNA supressor reconhecendo o códon de parada amber e introduzindo Trp também.

25

30 O plasmídeo pISM579 foi gerado através de excisão do gene *trp176* de pISM3001 com endonuclease de restrição *EcoRI* e substituindo-o por um fragmento de *EcoRI* do plasmídeo pMY579 (presente de Michael Yarus) con-

tendo um gene supressor de t-RNA de amber. Este gene supressores de t-RNA é um mutante de trpT175 (Rafferty, L.A. e outros (1984) *J. Bacteriol.* 158:849-859) e difere de trpT em três posições: G33, A24 e T35. Expressão da proteína de fusão AP205-interleucina-1 alfa em uma linhagem de *E. coli* com supressão de amber supE ou glnV) tal como JM109 de *E. coli* pode gerar uma proporção de proteínas de fusão AP205-IL-1 com um Gln ao invés de Trp induzido no códon de parada amber, em adição a proteínas de fusão Ap205-IL-1 com um Trp introduzido no códon de parada amber. A identidade do aminoácido traduzido no códon de parada pode então depender da combinação de t-RNA supressor superexpresso, e fenótipo da linhagem. Conforme descrito por Miller, J.H. e outros ((1983) *J. Mol. Biol.* 164:59-71) e é bem conhecido na técnica, a eficiência de supressão é dependente do contexto. Em particular, o códon 3' do códon de parada e a primeira base 3' do códon de parada são particularmente importantes. Por exemplo, o códon de parada seguido por uma base purina são em geral bem suprimidos.

Então, em uma modalidade preferida a dita VLP é uma VLP de mosaico, onde a dita VLP de mosaico compreende ou consiste de preferência em pelo menos um, de preferência um, primeiro polipeptídeo e em pelo menos um, de preferência um, segundo polipeptídeo, onde o dito primeiro polipeptídeo é uma proteína capsídeo recombinante, mutante ou fragmentos dele, e onde o dito segundo polipeptídeo é um produto de fusão genética de uma proteína capsídeo recombinante, mutante ou fragmentos dele, de preferência do dito polipeptídeo, com uma molécula de IL-1. Em uma modalidade adicional o dito primeiro polipeptídeo é uma proteína capsídeo recombinante de bacteriófago AP205 ou um mutante ou fragmento dele. Em uma modalidade preferida adicional o dito primeiro polipeptídeo é selecionado de SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23. Em uma modalidade muito preferida o dito primeiro polipeptídeo é SEQ ID NO:21. VLPs de mosaico do bacteriófago AP205 compreendendo um antígeno são geralmente reveladas no WO2006/032674A1, em particular no parágrafo 7 da dita publicação. Em uma modalidade preferida adicional o dito segundo polipeptídeo é um produto de fusão genética de uma proteína capsídeo recombinante, mutante ou

fragmento dele, de preferência do dito polipeptídeo, com uma molécula de IL-1, onde a dita molécula de IL-1 é fundida ao terminal C da dita proteína capsídeo recombinante, mutante ou fragmento dele, de preferência através de um ligante de aminoácido. Em uma modalidade preferida adicional a dita molécula de IL-1 compreende ou de preferência consiste em 100 a 300 aminoácidos, tipicamente e de preferência cerca de 140 a 160 aminoácidos, e com mais preferência cerca de 155 aminoácidos. Em uma modalidade muito preferida, a razão molar do dito primeiro polipeptídeo e dito segundo polipeptídeo na dita VLP de mosaico é 10:1 a 5:1, de preferência 8:1 a 6:1, com mais preferência cerca de 7:1.

Em uma modalidade preferida da presente invenção, a composição compreende ou alternativamente consiste essencialmente em uma partícula do tipo vírus com pelo menos um primeiro sítio de ligação ligado a pelo menos um antígeno, isto é, uma molécula de IL-1, com pelo menos um segundo sítio de ligação através de pelo menos uma ligação covalente, onde de preferência a ligação covalente é uma ligação não-peptídeo. Em uma modalidade preferida da presente invenção, o sítio de ligação compreende, ou de preferência é, um grupo amino, de preferência o grupo amino de um resíduo lisina. Em outra modalidade preferida da presente invenção, o segundo sítio de ligação compreende ou de preferência é um grupo sulfidril, de preferência um grupo sulfidril de uma cisteína.

Em uma modalidade muito preferida da invenção, pelo menos um primeiro sítio de ligação é um grupo amino, de preferência um grupo amino de um resíduo lisina e pelo menos um segundo sítio e ligação é um grupo sulfidril, de preferência um grupo sulfidril de uma cisteína.

Em uma modalidade preferida da invenção, a molécula de IL-1 é ligada à VPL através de ligação com cruzamento química, tipicamente e de preferência usando um ligante com cruzamento hetero-bifuncional. Em modalidades preferidas, o ligante com cruzamento hetero-bifuncional contém um grupo funcional que pode reagir com os primeiros sítios de ligação, de preferência com o grupo amino, com mais preferência com os grupos amino de resíduo(s) de lisina da VLP e um grupo funcional adicional que pode rea-

gir com o segundo sítio de ligação preferido, isto é, um grupo sulfidril, de preferência de resíduo de cisteína(s) inerente de, ou artificialmente adicionado à molécula de IL-1, e opcionalmente também tornado disponível para reação através de redução. Vários ligantes com cruzamento hetero-bifuncionais são conhecidos na técnica. Esses incluem os ligantes com cruzamento SMPH (Pierce), Sulfo-MBS, Sulfo-EMCs, Sulfo-GMBS, sulfo-SIAB, Sulfo-SMPB, Sulfo SMCC, SVSB, SAI e outros ligantes com cruzamento disponíveis por exemplo da Pierce Chemical Company e tendo um grupo funcional reativo com relação a grupos amino e um grupo funcional reativo com relação a grupos sulfidril. Os ligantes com cruzamento acima mencionados levam todos à formação de uma ligação amida após reação com o grupo amino e uma ligação tioéter com os grupos sulfidril. Outra classe de ligantes com cruzamento adequados na prática da invenção é caracterizada pela introdução de uma ligação dissulfeto entre a molécula de IL-1 e a VPL quando do acoplamento. Ligantes com cruzamento preferidos pertencentes a esta classe incluem, por exemplo, SPD e Sulfo-LC-SPDP (Pierce).

Em uma modalidade preferida, a composição da invenção compreende ainda um ligante. Engenharia de um segundo sítio de ligação na molécula de IL-1 é conseguida através da associação de um ligante, de preferência contendo pelo menos um aminoácido adequado como segundo sítio de ligação de acordo com as descrições da presente invenção. Deste modo, em uma modalidade preferida da presente invenção, um ligante é associado à molécula de IL-1 por meio de pelo menos uma ligação covalente, de preferência, pelo menos uma, de preferência uma ligação peptídeo. De preferência, o ligante compreende o, ou alternativamente consiste no, segundo sítio de ligação. Em uma modalidade preferida adicional, o ligante compreende um grupo sulfidril, de preferência de um resíduo cisteína. Em outra modalidade preferida, o ligante de aminoácido é um resíduo de cisteína.

A seleção de um ligante será dependente da natureza da molécula de IL-1, de suas propriedades bioquímicas, tal como PI, distribuição de carga e glicosilação. Em geral, ligantes de aminoácido flexíveis são favorecidos. Em uma modalidade preferida adicional da presente invenção, o ligante

consiste em aminoácidos, onde ainda de preferência o ligante consiste em pelo menos um e no máximo 25, de preferência no máximo 20, com mais preferência no máximo 15 aminoácidos. Em uma modalidade preferida novamente da invenção, o ligante de aminoácido contém 1 a 10 aminoácidos.

- 5 Modalidades preferidas do ligante são selecionadas do grupo consistindo em: (a) CGC (SEQ IS NO:171); (b) ligante gama 1 N-terminal, de preferência CGDKTHTSPP (SEQ ID NO:172); (c) ligante gama 3 N-terminal, de preferência CGGPKSTPPGSSGGAP (SEQ ID NO:173); (d) regiões de impedimento Ig; (e) ligantes de glicina N-terminais, de preferência GCGGGG (SEQ ID NO:174); (f) (G)kC(G)n com n=0-12 e k=0,5 (SEQ ID NO:175); (g) ligantes de glicina-serina N-terminais, de preferência (GGGS)n, n=1-3 (SEQ ID NO:176) com uma cisteína adicional; (h) (G)kC(G)m(S)l(GGGGS)n com n=0-3, k=0,5, m=0-10, l=0-2 (SEQ ID NO:177); (i) GGC (SEQ ID NO:178); (k) GGC-NH2 (SEQ ID NO:179); (l) ligante gama-1 C-terminal, de preferência DKTHTSPPCG (SEQ ID NO:180); (m) ligante gama-3 C-terminal, de preferência PKSTPPGSSGGAPGGCG (SEQ ID NO:181); (n) ligantes de glicina C-terminais, de preferência GGGGCG (SEQ ID NO:182); (o) (G)nC(G)k com n=0-12 e k=0-5 (SEQ ID NO:183); (p) ligantes de glicina-serina C-terminais, de preferência (SGGG)n n=1-3 (SEQ ID NO:184 com uma cisteína adicional; (q) (G)m(S)l(GGGGS)n(G)oC(k) com n=0-3, k=0-5, m=0-10, l=0,2 e o=0-8 (SEQ ID NO:185). Em uma modalidade preferida adicional o ligante é adicionado ao N-terminal da molécula de IL-1. Em outra modalidade preferida invenção, o ligante é adicionado ao terminal C da molécula de IL-1.

Ligantes preferidos de acordo com a presente invenção são ligantes de glicina (G)n contendo ainda um resíduo de cisteína como segundo sítio de ligação, tal como ligante de glicina N-terminal (GCGGGG, SEQ ID NO:174) e ligante de glicina N-terminal (GGGGCG, SEQ ID NO:182). Modalidades preferidas adicionais são ligante de glicina-lisina C-terminais (GGKKGK, SEQ ID NO:186) e ligante de glicina-lisina N-terminal (CGKKGK, SEQ ID NO:187), GGCG (SEQ ID NO:188) e ligantes GGC (SEQ ID NO:178) ou GGC-NH2 (SEQ ID NO:179, "NH2" significa amidação) ou terminal C do peptídeo ou CGG (SEQ ID NO:171) em seu terminal. Em geral,

resíduos de lisina serão inseridos dentre os aminoácidos volumosos e a cisteína a serem usados como segundo sítio de ligação, para evitar impedimento estérico potencial do aminoácido mais volumoso na reação de acoplamento.

5                   Ligação da molécula de IL-1 à VLP usando um ligante com cruzamento hetero-bifuncional de acordo com os métodos preferidos descritos acima permite acoplamento da molécula de IL-1 à VLP de uma maneira orientada. Outros métodos de ligação da molécula de IL-1 à VLP incluem métodos onde a molécula de IL-1 é ligada com cruzamento à VPL, usando a  
10 carbodiimida EDC, e NHS. A molécula de IL-1 pode ser também primeiro tiolada através de reação, por exemplo, com SATA, SATP ou iminotiolano. A molécula de IL-1, após desproteção se requerido, pode então ser acoplada à VPL como segue. Após separação de reagente de tiolação em excesso, a molécula de IL-1 é reagida com a VLP, previamente ativada com um ligante  
15 com cruzamento hetero-bifuncional compreendendo uma porção reativa de cisteína, e então mostrando pelo menos um ou vários grupo funcionais reativos com relação a resíduos de cisteína, para os quais a molécula de IL-1 tiolada pode reagir, tal como acima descrito. Opcionalmente, quantidades baixas de um agente de redução são incluídas na mistura de reação. Em  
20 métodos adicionais, a molécula de IL-1 é ligada à VLP, usando um ligante com cruzamento homo-bifuncional tal como glutaraldeído, DSG, BM[PEO]4, BS3, (Pierce) ou outros ligantes com cruzamento homobifuncionais conhecidos com grupos funcionais com relação a grupos amina ou grupos carboxila da VLP.

25                   Em outras modalidades da presente invenção, a composição compreende ou alternativamente consiste essencialmente em uma partícula do tipo vírus ligada à molécula de IL-1 através de interações químicas, onde pelo menos uma dessas interações não é uma ligação covalente.

                  Ligação da VLP à molécula de IL-1 pode ser realizada através  
30 de biotinylação da VLP e expressando a molécula de IL-1 como uma proteína de fusão de estreptavidina.

                  Uma ou várias moléculas de antígeno, isto é, moléculas de IL-1,



podem ser ligadas a uma subunidade da VLP, de preferência de proteínas de revestimento de bacteriófago de RNA, de preferência através da exposição de resíduos de lisina das proteínas de revestimento de VLP de bacteriófago de RNA, se estericamente permissível. Uma característica específica das VLPs de bacteriófago de RNA e em particular da proteína de revestimento de VLP de Q $\beta$  é então a possibilidade de acoplar vários antígenos por subunidade. Isto permite a geração de uma disposição de antígeno densa.

Em modalidades muito preferidas da invenção, a molécula de IL-1 é ligada através de um resíduo de cisteína, tendo sido adicionado ou ao terminal N ou ao terminal C de, ou um resíduo de cisteína natural dentro de uma molécula de IL-1, a resíduos de lisina de proteínas de revestimento das VLPs de bacteriófago de RNA, e em particular à proteína de revestimento de Q $\beta$ .

Conforme acima descrito, quatro resíduos de lisina são expostos sobre a superfície da VLP da proteína de revestimento de Q $\beta$ . Tipicamente e de preferência esses resíduos são derivatizados quando da reação com uma molécula ligante de cruzamento. No caso onde nem todos os resíduos de lisina expostos podem ser acoplados a um antígeno, os resíduos de lisina que foram reagidos com o ligante de cruzamento são deixados com uma molécula de ligação com cruzamento ligada ao grupo  $\epsilon$ -amino após a etapa de derivatização. Isto leva ao desaparecimento de uma ou várias cargas positivas, que pode ser prejudicial para a solubilidade e estabilidade da VLP. Ao substituir alguns dos resíduos de lisina com arginina, como nos mutantes de proteína de revestimento de Q $\beta$  revelados, é prevenido o desaparecimento excessivo de cargas positivas uma vez que os resíduos de arginina não reagem com os ligantes com cruzamento preferidos. Além disso, substituição dos resíduos de lisina por resíduos arginina pode levar a disposições de antígeno mais definidas, uma vez que menos sítios estão disponíveis para reação com o antígeno.

Deste modo, resíduos de lisina expostos foram substituídos por argininas nos mutantes de proteína de revestimento de Q $\beta$  que seguem: Q $\beta$ -240 (Lys13-Arg; SEQ ID NO:16), Q $\beta$ -250 (Lys 2-Arg, Lys13-Arg; SEQ ID

NO:18), Q $\beta$ -259 (Lys 2-Arg, Lys16-Arg; SEQ ID NO:20) e Q $\beta$ -251 (Lys16-Arg, SEQ ID NO:19). Em uma modalidade adicional, foi revelada uma proteína de revestimento mutante de Q $\beta$  com um resíduo de lisina adicional de Q $\beta$ -243 (Asn 10-Lys; SEQ ID NO:17), adequada para obtenção de disposições de antígenos de densidade ainda maior.

Em uma modalidade preferida da invenção, a VLP de um bacteriófago de RNA é recombinantemente produzida por um hospedeiro e onde a dita VLP é essencialmente livre de RNA hospedeiro, de preferência ácidos nucleicos. Em uma modalidade preferida adicional, a composição compreende ainda pelo menos uma macromolécula polianiônica ligada a, de preferência embalada na ou encerrada na, VLP. Em ainda uma modalidade preferida, a macromolécula polianiônica é ácido poliglutâmico e/ou ácido poliaspártico.

Em outra modalidade preferida, a composição compreende ainda pelo menos uma substância imunoestimuladora ligada a, de preferência embalada na ou encerrada na, VLP. Em uma modalidade ainda adicional preferida, a substância imunoestimuladora é um ácido nucleico, de preferência DNA, com mais preferência um oligonucleotídeo contendo CpG não-metilado.

Essencialmente livre de RNA hospedeiro, de preferência ácidos nucleicos hospedeiro: O termo "essencialmente livre de RNA de hospedeiro, de preferência ácidos nucleicos hospedeiro" conforme aqui usado, refere-se à quantidade de RNA de hospedeiro, de preferência ácidos nucleicos hospedeiro, compreendidas pela VLP, quantidade que tipicamente e de preferência é menos do que 30  $\mu$ g, de preferência menos do que 20  $\mu$ , com mais preferência menos do que 10  $\mu$ g, com mais preferência ainda menos do que 8  $\mu$ g, com mais preferência ainda menos do que 6  $\mu$ g, com mais preferência ainda menos do que 4  $\mu$ g, com mais preferência menos do que 2  $\mu$ g, por mg da VLP. Hospedeiro, conforme usado dentro do contexto acima mencionado, refere-se ao hospedeiro onde a VLP é recombinantemente produzida. Métodos convencionais de determinação da quantidade de RNA, de preferência ácidos nucleicos, são conhecidos da pessoa versada na técnica. O método

típico e preferido para determinar a quantidade de RNA, de preferência ácidos nucleicos, de acordo com a presente invenção é descrito no Exemplo 17 do WO2006/037787A2. Condições idênticas, similares ou análogas são, tipicamente e de preferência, usadas para a determinação da quantidade de RNA, de preferência ácidos nucleicos, para composições da invenção compreendendo VLP outra que não de Q $\beta$ . As modificações das condições eventualmente necessárias estão dentro do conhecimento da pessoa versada na técnica. O valor numérico das quantidades determinadas deve tipicamente e de preferência ser entendido como compreendendo valores tendo um desvio de  $\pm 10\%$ , de preferência tendo um desvio de  $\pm 5\%$ , do valor numérico indicado.

Macromolécula polianiónica. O termo "macromolécula polianiónica", conforme aqui usado, refere-se a uma molécula de massa molecular relativa alta que compreende grupos repetitivos de carga negativa, cuja estrutura compreende essencialmente a repetição múltipla de unidades derivadas, atualmente ou conceitualmente, de moléculas de massa molecular relativa baixa. Uma macromolécula polianiónica deve ter um peso molecular de pelo menos 200 Dáltons, com mais preferência pelo menos 3000 Dáltons e com mais preferência ainda de pelo menos 5000 Dáltons. O termo "macromolécula polianiónica" conforme aqui usado, tipicamente e de preferência refere-se a uma molécula que não é capaz de ativação de receptores tipo *toll*. Deste modo, o termo "macromolécula polianiónica" tipicamente e de preferência exclui ligantes de receptores tipo *toll*, e com mais preferência ainda de preferência exclui ainda substâncias imunoestimuladoras tal como ligantes de receptores tipo *toll*, ácidos nucleicos imunoestimuladores e lipopolissacarídeos (LPS). Com mais preferência, o termo "macromolécula polianiónica" conforme aqui usado refere-se a uma molécula que não é capaz de indução de produção de citocina. Com mais preferência ainda, o termo "macromolécula polianiónica" exclui substâncias imunoestimuladoras. O termo "substância imunoestimuladora", conforme aqui usado, refere-se a uma molécula que é capaz de indução e/ou aumento da resposta imune especificamente contra o antígeno compreendido na presente invenção.

RNA de hospedeiro, de preferência ácidos nucléicos hospedeiro:  
O termo "RNA hospedeiro, de preferência ácidos nucléicos hospedeiro" ou o termo "RNA hospedeiro, de preferência ácidos nucléicos hospedeiro, com estrutura secundária", conforme aqui usado, refere-se ao RNA, ou de preferência ácidos nucléicos, que são originalmente sintetizados pelo hospedeiro. O RNA, de preferência ácidos nucléicos, pode, no entanto, sofrer mudanças químicas e/ou físicas durante o procedimento de redução ou eliminação da quantidade de RNA, de preferência ácidos nucléicos, tipicamente e de preferência por meio dos métodos da invenção, por exemplo, o tamanho do RNA, de preferência ácidos nucléicos, pode ser encurtado ou a sua estrutura secundária pode ser alterada. No entanto, mesmo tal RNA ou ácidos nucléicos resultantes são ainda considerados como RNA hospedeiro, ou ácidos nucléicos hospedeiro.

Métodos para determinar a quantidade de RNA e reduzir a quantidade de RNA compreendida pela VLP foram revelados no pedido de patente provisório US depositado pelo mesmo cessionário em 5 de outubro de 2004 e então o pedido em sua totalidade é aqui incorporado a título de referência. Redução ou eliminação da quantidade de RNA hospedeiro, de preferência nucléico hospedeiro, minimiza ou reduz as respostas de célula T indesejadas, tal com resposta de célula T inflamatória e resposta de célula T citotóxica, e outros efeitos colaterais indesejados, tal como febre, enquanto mantendo resposta de anticorpo forte especificamente contra IL-1.

Em uma modalidade preferida, a presente invenção provê um método de preparação das composições da invenção e VLP de um bacteriófago de RNA da invenção, onde a dita VLP é recombinantemente produzida por um hospedeiro e onde a dita VLP é essencialmente livre de RNA hospedeiro, de preferência ácidos nucléicos, compreendendo as etapas de: a) produção recombinantemente de uma partícula do tipo vírus (VLP) com pelo menos um primeiro sítio de ligação por um hospedeiro, onde a dita VLP compreende proteínas de revestimento, variantes ou fragmentos delas, de um bacteriófago de RNA; b) desmontagem da dita partícula do tipo vírus para as ditas proteínas revestidas, variantes ou fragmentos dela, do dito bacte-

riófago de RNA; c) purificação das ditas proteínas de revestimento, variantes ou fragmentos delas; d) remontagem das ditas proteínas de revestimento purificadas, variantes ou fragmentos delas, do dito bacteriófago de RNA para uma partícula do tipo vírus, onde a dita partícula do dito vírus é essencialmente livre de RNA hospedeiro, de preferência ácidos nucléico hospedeiro; e e) ligação de pelo menos um antígeno da invenção com pelo menos um segundo sítio de ligação à dita VLP obtida a partir da etapa d). Em uma modalidade preferida adicional, a remontagem das ditas proteínas de revestimento purificadas, variantes ou fragmentos delas, é realizada na presença de pelo menos uma macromolécula polianiônica.

Em um aspecto, a invenção provê uma vacina compreendendo a composição da invenção. Em uma modalidade preferida, a molécula de IL-1 que é ligada à VLP na composição de vacina pode ser de animal, de preferência de origem de mamífero ou humana. Em modalidades preferidas, a IL-1 da invenção é de origem humana, bovina, de cachorro, gato, camundongo, rato, porco ou cavalo.

Em outra modalidade preferida, a composição de vacina compreende ainda pelo menos um adjuvante. A administração do pelo menos um adjuvante pode por isso acontecer antes, contemporaneamente ou após a administração da composição da invenção. O termo "adjuvante" conforme aqui usado refere-se a estimuladores não-específicos da resposta imune ou substâncias que permitem a geração de um depósito no hospedeiro que quando combinado com a vacina e composição farmacêutica, respectivamente, da presente invenção pode prover uma resposta imune ainda mais aumentada.

Em outra modalidade preferida, a composição de vacina é destituída de adjuvante.

Uma característica vantajosa da presente invenção é a imunogenicidade alta da composição, mesmo na ausência de adjuvantes. A ausência de um adjuvante, ainda, minimiza a ocorrência de respostas de célula T inflamatórias indesejadas, representando uma preocupação com segurança na vacinação contra auto-antígenos. Então, a administração da vacina da

invenção a um paciente vai de preferência acontecer sem administração de pelo menos um adjuvante ao mesmo paciente antes da, contemporaneamente a ou após a administração da vacina.

5 A invenção revela ainda um método de imunização compreendendo administrar a vacina da presente invenção a um animal ou um humano. O animal é de preferência um mamífero, tal como gato, ovelha, porco, cavalo, bovino, cachorro, rato, camundongo e particularmente humano. A vacina pode ser administrada a um animal ou um humano através de vários métodos conhecidos na técnica, mas será normalmente administrada através de injeção, infusão, inalação, administração oral ou outros métodos físicos adequados. Os conjugados podem ser alternativamente administrados intramuscularmente, intravenosamente, transmucosalmente, transdermalmente, intranasalmente, intraperitonealmente ou subcutaneamente. Componentes de conjugados para administração incluem soluções e suspensões 10 aquosas estéreis (por exemplo, salina fisiológica) ou não-aquosas. Exemplos de solventes não-aquosos são propileno glicol, polietileno glicol, óleos vegetais tal como óleo de oliva, e ésteres orgânicos injetáveis, tal como oleato de etila. Veículos ou curativos oclusivos podem ser usados para aumentar a permeabilidade da pele e aumentar a absorção de antígeno.

20 As vacinas da invenção são ditas ser "farmacologicamente aceitáveis" se sua administração puder ser tolerada por um indivíduo recipiente. Ainda, as vacinas da invenção serão administradas em uma "quantidade terapeuticamente eficaz" (isto é, uma quantidade que produz um efeito fisiológico desejado). A natureza ou tipo de resposta imune não é um fator limitante da descrição. Sem a intenção de limitar a presente invenção pelo mecanismo de explicação que segue, a vacina da invenção pode induzir anticorpos que se ligam à IL-1 e então reduzindo sua concentração e/ou interferindo com sua função fisiológica ou patológica.

30 Em um aspecto, a invenção provê uma composição farmacêutica compreendendo a composição conforme ensinado na presente invenção e um veículo farmacêutico aceitável. Quando a vacina da invenção é administrada a um indivíduo, ela pode estar na forma que contém sais, tampões,

adjuvantes ou outras substâncias que são desejáveis para melhorar a eficácia do conjugado. Exemplos de materiais adequados para uso em preparação de composições farmacêuticas são providos em várias fontes incluindo *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Osol, A., Ed., Mack Publishing Co., (1990)).

A invenção ensina um processo para produção da composição da invenção compreendendo as etapas de: (a) provisão de uma VLP com pelo menos um primeiro sítio de ligação; (b) provisão de uma molécula de IL-1 com pelo menos um segundo sítio de ligação; e (c) combinação da dita VLP e da dita molécula de IL-1 para produzir uma composição, onde a dita molécula de IL-1 e a dita VLP são ligadas através dos primeiro e segundo sítios de ligação.

Em uma modalidade preferida adicional, a etapa de provisão de uma VLP com pelo menos um primeiro sítio de ligação compreende as etapas adicionais: (a) desmontagem da dita partícula do tipo vírus para as proteínas de revestimento, mutantes ou fragmentos deles, do dito bacteriófago de RNA; (b) purificação das ditas proteínas de revestimento, mutantes ou fragmentos deles; (c) remontagem das ditas proteínas de revestimento purificadas, mutantes ou fragmentos deles, do dito bacteriófago de RNA para uma partícula do tipo vírus, onde a dita partícula do tipo vírus é essencialmente livre de RNA hospedeiro, de preferência ácidos nucleicos hospedeiro. Em ainda uma modalidade preferida adicional, a remontagem das ditas proteínas de revestimento purificadas é realizada na presença de pelo menos uma macromolécula polianiônica.

A invenção provê um método de uso das composições da invenção para tratamento e/ou atenuação de doenças ou condições onde IL-1 exerce uma função patológica importante em um animal ou em ser humano.

A invenção provê ainda o uso das composições da invenção ou da vacina da invenção ou da composição farmacêutica da invenção para a fabricação de um medicamento para tratamento de uma doença em um animal, de preferência cachorro, gato, cavalo ou ser humano, com mais preferência ser humano, onde a dita doença é de preferência selecionada do gru-

po consistindo em: (a) doenças vasculares, de preferência da artéria coronária, aterosclerose e vasculite, com mais preferência aterosclerose; (b) doenças inflamatórias dependentes de IL-1 herdadas, de preferência Febre Mediterrânea Familiar (FMF), Síndrome Auto-inflamatória ao Frio Familiar (FCAS), Doença Inflamatória Multissistêmica de Início Neonatal (NOMID) e Síndrome Mucke Wells, com mais preferência Febre Mediterrânea Familiar (FMF); (c) doenças inflamatórias autoimunes crônicas, de preferência artrite reumatóide, artrite idiopática de início juvenil sistêmica, doença de Still de início adulto, psoríase, doença de Crohn e colite ulcerativa, de preferência artrite reumatóide; (d) doenças regenerativas do osso e cartilagem, de preferência gota, osteoporose e osteoartrite, com mais preferência osteoartrite; (e) doenças alérgicas, de preferência hipersensibilidade por contato, hipersensibilidade do tipo 1 e alergia, com mais preferência alergia; e (f) doenças neurológicas, de preferência doença de Alzheimer, epilepsia, doença de Parkinson e esclerose múltipla, com mais preferência esclerose múltipla.

A invenção provê ainda uso das composições da invenção ou da vacina da invenção ou da composição da invenção para a fabricação de um medicamento para tratamento de uma doença em um animal, de preferência cachorro, gato, cavalo ou ser humano, com mais preferência ser humano, onde a dita doença é uma doença vascular, de preferência doença da artéria coronária, aterosclerose e vasculite, com mais preferência aterosclerose, e onde o dito pelo menos um antígeno compreendido pela dita composição, dita vacina ou dita composição farmacêutica é uma molécula de IL-1 alfa da invenção, de preferência um fragmento maduro de IL-1 alfa, com mais preferência SEQ ID NO:63 ou uma muteína dela.

A invenção provê ainda o uso das composições da invenção ou da vacina da invenção ou da composição farmacêutica da invenção para a fabricação de um medicamento para tratamento de uma doença em um animal, de preferência cachorro, gato, cavalo ou ser humano, com mais preferência ser humano, onde a dita doença é selecionada do grupo consistindo em: (a) doenças inflamatórias dependentes de IL-1 herdadas, de preferência Febre Mediterrânea Familiar (FMF), Síndrome Auto-inflamatória ao Frio Fa-



miliar (FCAS), Doença Inflamatória Multissistêmica de Início Neonatal (NO-MID) e Síndrome Mucke Wells, com mais preferência Febre Mediterrânea Familiar (FMF); (b) doenças inflamatórias autoimunes crônicas, de preferência artrite reumatóide, artrite idiopática de início juvenil sistêmica, doença de Still de início adulto, psoríase, doença de Crohn e colite ulcerativa, de preferência artrite reumatóide; (c) doenças regenerativas do osso e cartilagem, de preferência gota, osteoporose e osteoartrite, com mais preferência osteoartrite; (d) doenças alérgicas, de preferência hipersensibilidade por contato, hipersensibilidade do tipo 1 e alergia, com mais preferência alergia; e (e) doenças neurológicas, de preferência doença de Alzheimer, epilepsia, doença de Parkinson e esclerose múltipla, com mais preferência esclerose múltipla, e onde o dito pelo menos um antígeno compreendido pela dita composição, dita vacina ou dita composição farmacêutica é uma molécula de IL-1 beta, de preferência um fragmento maduro de IL-1 beta, com mais preferência SEQ ID NO:64 ou uma muteína dela.

A invenção provê ainda o uso das composições da invenção ou da vacina da invenção ou da composição farmacêutica da invenção para a fabricação de um medicamento para tratamento de uma doença em um animal, de preferência cachorro, gato, cavalo ou ser humano, com mais preferência ser humano, onde a dita doença é uma doença inflamatória dependente de IL-1 herdada, de preferência Febre Mediterrânea Familiar (FMF); e onde o dito pelo menos um antígeno compreendido pela dita composição, dita vacina ou dita composição farmacêutica é uma molécula de IL-1 beta, de preferência um fragmento maduro de IL-1 beta, com mais preferência SEQ ID NO:64 ou uma muteína dela.

A invenção provê ainda o uso das composições da invenção ou da vacina da invenção ou da composição farmacêutica da invenção para a fabricação de um medicamento para tratamento de uma doença em um animal, de preferência ser humano, onde a dita doença é uma doença vascular, de preferência aterosclerose.

A invenção provê ainda uso das composições da invenção ou da vacina da invenção ou da composição farmacêutica da invenção para a fa-

bricação de um medicamento para tratamento de uma doença em um animal, de preferência ser humano, onde a dita doença é uma doença inflamatória dependente de IL-1, de preferência febre mediterrânea familiar (FMF).

5 A invenção provê ainda uso das composições da invenção ou da vacina da invenção ou da composição farmacêutica da invenção para a fabricação de um medicamento para tratamento de uma doença em um animal, de preferência ser humano, onde a dita doença é uma doença inflamatória auto-imune crônica, de preferência artrite reumatóide.

10 A invenção provê ainda uso das composições da invenção ou da vacina da invenção ou da composição farmacêutica da invenção para a fabricação de um medicamento para tratamento de uma doença em um animal, de preferência ser humano, onde a dita doença é uma doença degenerativa do osso e cartilagem, de preferência osteoartrite.

15 A invenção provê ainda o uso das composições da invenção ou da vacina da invenção ou da composição farmacêutica da invenção para a fabricação de um medicamento para tratamento de uma doença em um animal, de preferência ser humano, onde a dita doença é uma doença neurológica, de preferência esclerose múltipla.

20 A invenção provê ainda um método de tratamento de uma doença, o método compreendendo administrar a composição da invenção, a vacina da invenção ou a composição farmacêutica da invenção a um animal, de preferência cachorro, gato, cavalo ou ser humano, com mais preferência ser humano, onde a dita doença é de preferência selecionada do grupo consistindo em: (a) doenças vasculares, de preferência doença da artéria coronária, aterosclerose e vasculite, com mais preferência aterosclerose; (b) doenças inflamatórias dependentes de IL-1 herdadas, de preferência Febre Mediterrânea Familiar (FMF), Síndrome Auto-inflamatória ao Frio Familiar (FCAS), Doença Inflamatória Multissistêmica de Início Neonatal (NOMID) e Síndrome Mucke Wells, com mais preferência Febre Mediterrânea Familiar  
25 (FMF); (c) doenças inflamatórias auto-imunes crônicas, de preferência artrite reumatóide, artrite idiopática de início juvenil sistêmica, doença de Still de  
30 início adulto, psoríase, doença de Crohn e colite ulcerativa, com mais prefe-

rência artrite reumatóide; (d) doenças regenerativas do osso e cartilagem, de preferência gota, osteoporose e osteoartrite, com mais preferência osteoartrite; (e) doenças alérgicas, de preferência hipersensibilidade por contato, hipersensibilidade do tipo 1 e alergia, com mais preferência alergia; e (f) doenças neurológicas, de preferência doença de Alzheimer, epilepsia, doença de Parkinson e esclerose múltipla, com mais preferência esclerose múltipla.

A invenção provê ainda um método de tratamento de uma doença, o método compreendendo administrar a composição da invenção, a vacina da invenção ou a composição farmacêutica da invenção a um animal, de preferência cachorro, gato, cavalo ou ser humano, com mais preferência ser humano, onde a dita doença é uma doença vascular, de preferência doença da artéria coronária, aterosclerose e vasculite, com mais preferência aterosclerose e onde o dito pelo menos um antígeno compreendido pela dita composição, dita vacina ou dita composição farmacêutica é uma molécula de IL-1 alfa, de preferência um fragmento maduro de IL-1 alfa, com mais preferência SEQ ID NO:63 ou uma muteína dela.

A invenção provê ainda um método de tratamento de uma doença, o método compreendendo administrar a composição da invenção, a vacina da invenção ou a composição farmacêutica da invenção a um animal, de preferência cachorro, gato, cavalo ou ser humano, com mais preferência ser humano, onde a dita doença é de preferência selecionada do grupo consistindo em: (a) doenças inflamatórias dependentes de IL-1 herdadas, de preferência Febre Mediterrânea Familiar (FMF), Síndrome Auto-inflamatória ao Frio Familiar (FCAS), Doença Inflamatória Multissistêmica de Início Neonatal (NOMID) e Síndrome Mucke Wells, com mais preferência Febre Mediterrânea Familiar (FMF); (b) doenças inflamatórias auto-imunes crônicas, de preferência artrite reumatóide, artrite idiopática de início juvenil sistêmica, doença de Still de início adulto, psoríase, doença de Crohn e colite ulcerativa, com mais preferência artrite reumatóide; (c) doenças regenerativas do osso e cartilagem, de preferência gota, osteoporose e osteoartrite, com mais preferência osteoartrite; (d) doenças alérgicas, de preferência hipersensibilidade por contato, hipersensibilidade do tipo 1 e alergia, com mais preferên-

cia alergia; e (e) doenças neurológicas, de preferência doença de Alzheimer, epilepsia, doença de Parkinson e esclerose múltipla, com mais preferência esclerose múltipla, e onde o dito pelo menos um antígeno compreendido pela dita composição, dita vacina ou dita composição farmacêutica é uma molécula de IL-1 beta, de preferência um fragmento maduro de IL-1 beta, com mais preferência SEQ ID NO:64 ou uma muteína dela.

A invenção provê ainda um método de tratamento de uma doença, o método compreendendo administrar a composição da invenção, a vacina da invenção ou a composição farmacêutica da invenção a um animal, de preferência cachorro, gato, cavalo ou ser humano, com mais preferência ser humano, onde a dita doença é uma doença inflamatória dependente de IL-1 herdada, de preferência Febre Mediterrânea Familiar (FMF); e onde o dito pelo menos um antígeno compreendido pela dita composição, dita vacina ou dita composição farmacêutica é uma molécula de IL-1 beta, de preferência um fragmento maduro de IL-1 beta, com mais preferência SEQ ID NO:64 ou uma muteína dela.

A invenção provê ainda um método de tratamento de uma doença, o método compreendendo administração da composição da invenção, da vacina da invenção ou da composição farmacêutica da invenção a um animal, de preferência ser humano, onde a dita doença é uma doença vascular, de preferência aterosclerose.

A invenção provê ainda um método de tratamento de uma doença, o método compreendendo administrar a composição da invenção, a vacina da invenção ou a composição farmacêutica da invenção a um animal, de preferência ser humano, onde a dita doença é uma doença inflamatória dependente de IL-1, de preferência febre mediterrânea familiar (FMF).

A invenção provê ainda um método de tratamento de uma doença, o método compreendendo administrar a composição da invenção, a vacina da invenção ou a composição farmacêutica da invenção a um animal, de preferência ser humano, onde a dita doença é uma doença inflamatória auto-imune crônica, de preferência artrite reumatóide.

A invenção provê ainda um método de tratamento de uma doen-

ça, o método compreendendo administrar a composição da invenção, a vacina da invenção ou a composição farmacêutica da invenção a um animal, de preferência ser humano, onde a dita doença é uma doença degenerativa do osso e cartilagem, de preferência osteoartrite.

- 5 Todas as referências citadas aqui são incorporadas em sua totalidade a título de referência.

## EXEMPLOS

### EXEMPLO 1

#### **Clonagem, expressão e purificação de IL1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> e IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub>**

##### 10 **de murino**

A seqüência de nucleotídeo codificando os aminoácidos 117-270 de IL-1 $\alpha$  de murino foi amplificada através de PCR a partir de uma biblioteca de cDNA de macrófagos de murino ativados por TNF $\alpha$  usando oligonucleotídeos IL1 $\alpha$ 1 (5'-ATATATGCTAGCCCCTTACACCTACCAGAGTGATTTG-3';  
 15 SEQ ID NO:24) e IL-1 $\alpha$ 2 (5'-ATATATCTCGAGTGATATCTGGAAGTCTGTC ATAGAG-3'; SEQ ID NO:25). Usando a mesma biblioteca de cDNA, a seqüência de nucleotídeo codificando os aminoácidos 119-269 do precursor de IL-1 $\beta$  de murino foi amplificada com oligonucleotídeos IL-1 $\beta$ 1 (5'-ATA TATGCTAGCCCCCATTAGACAGCTGCACTACAGG-3'; SEQ ID NO:26) e  
 20 IL-1 $\beta$ 2 (5'-ATATATCTGGAGGGAAGACACAGATTCCATGGTGAAG-3'; SEQ ID NO:27). Ambos fragmentos de DNA foram digeridos com *NheI* e *XhoI* e clonados no vetor de expressão pModEC1 (SEQ ID NO:29).

O vetor pModEC1 (SEQ ID NO:29) é derivado de pET22b(+) (Novagen Inc.) e foi construído em duas etapas. Em uma primeira etapa o  
 25 sítio de clonagem múltiplo de pET22b(+) foi mudado pondo a seqüência original entre os sítios *NdeI* e *XhoI* com os iniciadorMCS-1F (5'-TATGGA TCCGGCTAGCGCTCGAGGGTTTAAACGGCGGCCGCAT-3'; SEQ ID NO: 30) e oligos iniciadorMCS-1R (5'-TCGAATGCGGCCGCGTTTAAACCCT CGAGCGCTAGCCGGATCCA-3'; SEQ ID NO:31) anelados (anelamento em  
 30 tampão de TrisHCl pH 8 a 15 mM). O plasmídeo resultante foi chamado pMod00, e tinha sítios de restrição *NdeI*, *BamHI*, *NheI*, *XhoI*, *PmeI* e *NotI* em seu sítio de clonagem múltiplo. O par anelado de oligos Bamhis6-EK-Nhe-F

(5'-GATCCACACCACCACCACCACCACGGTTCGGTGACGACGATGACAA  
 AGCGCTAGCCC-3'; SEQ ID NO:32) e Bamhis6-EKNhe-R (5'-TCGAGGGCT  
 AGCGCTTTGTCATCGTCGTCACCAGAACCGTGGTGGTGGTGGTGGT  
 G-3'; SEQ ID NO:33) e o par anelado de oligo1F-C-glicina-ligante (5'-TCG  
 5 AGGGTGGTGGTGGTGGTTGVGGTTAATAAGTTTAAACGC-3'; SEQ ID NO:  
 34) e oligo1R-C-glicina-ligante (5'-GGCCGCGTTATAAACTTATTAACCGCA  
 ACCACCACCACCACC-3'; SEQ ID NO:35) foram ligados juntos no plasmí-  
 deo pMod00 digerido com BamHI-NotI para se obter pModEC1, que codifica  
 um *tag* de hexa-histidina N-terminal, um sítio de clivagem de enterocidase e  
 10 um ligante glicina C-terminal contendo um resíduo cisteína.

A clonagem dos fragmentos mencionados acima em pModEC1  
 deu origem a plasmídeos pModEC1-His-EK-mIL1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> e pModEC1-His-  
 EK-mIL1 $\beta$ <sub>119-269</sub>, respectivamente. Esses plasmídeos codificam proteínas de  
 fusão consistindo em *tag* His N-terminal, um sítio de clivagem de enterocina-  
 15 se, a IL-1 $\alpha$  ou IL-1 $\beta$  de murino madura, respectivamente, e um ligante con-  
 tendo cisteína C-terminal (GGGGGCG, SEQ ID NO:28). Para expressão,  
 células de *Escherichia coli* BL21 abrigando também plasmídeo foram culti-  
 vadas a 37°C para um OD a 600 nm de 1,0 e então induzidas através da  
 adição de isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo em uma concentração de 1 mM.  
 20 As bactérias foram cultivadas por mais 4 horas a 37°C, coletadas através de  
 centrifugação e ressuspensas em 80 ml de tampão de lise (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 10  
 mM, NaCl a 30 mM, pH 7,0). As células foram então rompidas através de  
 sonificação e DNA e RNA celular foram digeridos por 30 minutos de incuba-  
 ção em temperatura ambiente com 64  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> a 2M e 10  $\mu$ l de Benzona-  
 25 se. Restos celulares foram removidos através de centrifugação (rotor SS34,  
 20000 rpm, 4°C, 60 min) e o lisato limpo foi aplicado a uma coluna de agaro-  
 se de Ni<sup>2+</sup>-NTA (Qiagen, Hilden, Alemanha). Após lavagem extensiva da co-  
 lona com tampão de lavagem (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 50 mM, NaCl a 300 mM, Imidazol  
 a 20 mM, pH 8,0) as proteínas foram eluídas com tampão de eluição  
 30 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 50 mM, NaCl a 300 mM, Imidazol a 200 mM, pH 8,0). Proteínas  
 purificadas foram dialisadas contra PBS pH 7,2, congeladas rapidamente em  
 nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até uso adicional.

## EXEMPLO 2

### **A. Acoplamento de IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> de camundongo a partículas do tipo vírus de Q $\beta$**

Uma solução contendo 1,3 mg/ml da proteína IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> de murino purificada do EXEMPLO 1 (SEQ ID NO:66) em PBS pH 7,2 foi incubada por 60 min em temperatura ambiente com uma quantidade equimolar de TCEP para redução do resíduo cisteína C-terminal.

Uma solução de 6 ml de 2 mg/ml de proteína capsídeo em PBS pH 7,2 foi então reagida por 60 min em temperatura ambiente com 131  $\mu$ l de uma solução SMPH (65 mM em DMSO). A solução de reação foi dialisada a 4°C contra três mudanças de 3 l de HEPES a 20 mM, NaCl a 150 mM pH 7,2 durante 24 horas. Setenta e cinco  $\mu$ l da solução de Q $\beta$  derivatizada e dialisada foram misturados com 117  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O e 308  $\mu$ l de proteína IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> de camundongo purificada e pré-reduzida e incubados durante a noite a 15°C para ligação com cruzamento química. Proteína não-acoplada foi removida através de filtragem de fluxo tangencial contra PBS usando membranas de éster de celulose com um corte de peso molecular de 300.000 Da.

Produtos acoplados foram analisados em um gel de SDS- poliacrilamida a 12% sob condições de redução. O gel tingido com Coomassie é mostrado na Figura 1. Várias faixas de peso molecular aumentado com relação ao monômero de capsídeo de Q $\beta$  são visíveis, demonstrando claramente a ligação com cruzamento bem sucedida da proteína IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> de camundongo ao capsídeo de Q $\beta$ .

### **B. Imunização de camundongo com proteína IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> de camundongo acoplada a capsídeo de Q $\beta$ (Q $\beta$ -mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub>)**

Cinco camundongos fêmea balb/c foram imunizados com Q $\beta$ -mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> (SEQ ID NO:66). Cinquenta  $\mu$ g de proteína total foram diluídos em PBS para 200  $\mu$ l e injetados subcutaneamente (100  $\mu$ l em dois lados ventrais) no dia 0 e no dia 21. Os camundongos foram sangrados retroorbitalmente nos dias 0, 21 e 35 e soros foram analisados usando ELISA específico de IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> de camundongo.

### **C. ELISA**

Placas de ELISA foram revestidas com proteína IL-1 $\beta$ <sub>119-260</sub> de camundongo em uma concentração de 1  $\mu$ g/ml. As placas foram bloqueadas e então incubadas com soros de camundongo serialmente diluídos dos dias 0, 21 e 35. Anticorpos ligados foram detectados com anticorpo IgG anticamundongo enzimaticamente marcado. Títulos de anticorpo de soros de camundongo foram calculados como a média daquelas diluições que levaram à densidade óptica médio máxima a 450 nm. O título de IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> anticamundongo médio foi 1:22262 no dia 21 e 1:309276 no dia 35. Isto demonstra que imunização com Q $\beta$  acoplado à proteína IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> de camundongo poderia superar a tolerância imunológica e produzir anticorpos de título alto que reconhecem IL-1<sub>119-269</sub> especificamente.

#### D. Neutralização de IL-1 $\beta$ *in vitro*

Soros de camundongos imunizados com Q $\beta$ -mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> (SEQ ID NO:66) foram então testados quanto à sua habilidade em inibir a ligação de proteína IL-1 $\beta$  de camundongo a seu receptor. Placas de ELISA foram então revestidas com uma proteína de fusão mIL-1receptorI-hFc recombinante em uma concentração de 1  $\mu$ g/ml e co-incubadas com diluições seriais de soros de camundongos que tinham sido imunizados ou com IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> de camundongo acoplada a capsídeo de Q $\beta$  ou com IL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> de camundongo acoplada a capsídeo de Q $\beta$  e 100 ng/ml de IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> de camundongo. Ligação de IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> à proteína de fusão mIL-1receptorI-hFc imobilizada foi detectada com um anticorpo de L-1 $\beta$  anticamundongo biotilado e estreptavidina conjugada à peroxidase do rábano de cavalo. Todos os soros de camundongos imunizados contra IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> de murino inibiram completamente a ligação de IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> de camundongo a seu receptor em concentrações de  $\geq 0,4\%$ , enquanto soros de camundongos imunizados contra IL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> de camundongo não mostraram nenhum efeito inibidor mesmo na concentração mais alta usada (3,3%). Esses dados demonstram que imunização com IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> de camundongo acoplado ao capsídeo de Q $\beta$  pode dar anticorpos que são capazes de neutralizar a interação de IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> de camundongo e seu receptor.

#### E. Neutralização *in vivo* de IL-1 $\beta$



A capacidade de neutralização *in vivo* dos anticorpos criados pela imunização com Q $\beta$ -mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> foi investigada em seguida. Quatro camundongos balb/c fêmea foram então imunizados duas vezes nos dias 0 e 14 com Q $\beta$ -mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> e quatro camundongos foram imunizados ao mesmo tempo com capsídeo de Q $\beta$  sozinho. No dia 21 todos os camundongos foram injetados intravenosamente com 1  $\mu$ g de IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> livre. Como leitura da atividade inflamatória da IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> injetada, amostras de soro foram analisadas 3 h após injeção para o aumento relativo na concentração da citocina pró-inflamatória IL-6. Camundongos imunizados com Q $\beta$  mostraram um aumento médio na concentração de IL-6 no soro de  $1,01 \pm 0,61$  ng/ml, enquanto camundongos imunizados com Q $\beta$ -mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> mostraram um aumento médio de apenas  $0,11 \pm 0,30$  ng/ml ( $p=0,04$ ). Como um controle no dia 28 todos os camundongos foram injetados com 1  $\mu$ g de mIL-1 $\alpha$ . Três horas após injeção camundongos imunizados com veículo de Q $\beta$  sozinho mostraram um aumento médio em concentrações de IL-6 o soro de  $40,24 \pm 8,06$  ng/ml, enquanto camundongos imunizados com Q $\beta$ -mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> mostraram um aumento de  $57,98 \pm 29,92$  ng/ml ( $p=0,30$ ). Esses dados indicam que os anticorpos produzidos pela imunização com Q $\beta$ -mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> eram capazes de neutralizar especificamente e eficientemente a atividade pró-inflamatória de IL-1 $\beta$ .

#### **F. Eficácia de Q $\beta$ -mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> em um modelo de camundongo de artrite reumatóide**

A eficácia de imunização de Q $\beta$ -mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> foi testada em um modelo de artrite induzida por colágeno de murino (CIA). Este modelo reflete a maioria dos aspectos imunológicos e histológicos de artrite reumatóide humana e é então rotineiramente usado para avaliar a eficácia de agentes antiinflamatórios. Camundongos DBA/1 machos foram imunizados subcutaneamente três vezes (dias 0, 14 e 28) com 50  $\mu$ g ou de Q $\beta$ -mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> ( $n=8$ ) ou Q $\beta$  sozinho ( $n=8$ ), e então injetados intradermalmente no dia 42 com 200  $\mu$ g de colágeno bovino tipo II misturado com adjuvante de Freund completo. Após uma injeção de reforço de 200  $\mu$ g de colágeno bovino tipo II misturado com adjuvante de Freund incompleto no dia 63 os camundongos

foram examinados em uma base diária quanto ao desenvolvimento de sintomas de artrite.

Um *score* clínico variando de 0 a 3 foi designado para cada membro de acordo com o grau de vermelhidão e inchaço observados, e a espessura do tornozelo de todos os membros traseiros foi medida. O *score* clínico foi designado durante 3 semanas consecutivas a cada membro de acordo com as definições que seguem: 0 normal, 1 eritema leve e/ou inchaço de dedos/pata, 2 eritema e inchaço se estendendo em toda a pata/junta, 3 inchaço forte, deformação da pata/junta, rigidez. *Scores* clínicos cumulativos de camundongos individuais foram calculados como a soma de *scores* clínicos de todos os quatro membros, resultando em um *score* cumulativo máximo possível por camundongo de 12.

Duas semanas após a segunda injeção de colágeno camundongos imunizados com Q $\beta$  mostraram um *score* clínico cumulativo médio de 4,44, enquanto camundongos imunizados com Q $\beta$ -mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> mostraram um *score* médio de apenas 1,06. Além disso, o aumento médio na espessura do tornozelo traseiro foi 18% para camundongos imunizados com Q $\beta$  e apenas 1% para camundongos que tinham sido imunizados com Q $\beta$ -mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub>. Como uma leitura adicional da reação inflamatória, níveis no soro de IL-6 foram determinados 1 semana após a segunda injeção de colágeno. Camundongos imunizados com Q $\beta$  tinham uma concentração de IL-6 no soro média de  $1,92 \pm 0,36$  enquanto camundongos imunizados com Q $\beta$ -mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> tinham uma concentração de IL-6 média de apenas  $0,79 \pm 0,16$  ( $p=0,01$ ). Tomados juntos, esses dados mostram que imunização com Q $\beta$ -mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> protege fortemente camundongos de inflamação e sinais clínicos de artrite em modelo de CIA.

### EXEMPLO 3

#### **A. Acoplamento de IL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> de camundongo a partículas do tipo vírus Q $\beta$**

Uma solução contendo 1,8 mg/ml da proteína IL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> purificada do EXEMPLO 1 (SEQ ID NO:65) em PBS pH 7,2 foi incubada por 60 min em temperatura ambiente com uma quantidade equimolar de TCEP para

redução do resíduo de cisteína C-terminal.

Uma solução de 6 ml de 2 mg/ml de proteína capsídeo de Q $\beta$  em PBS pH 7,2 foi então reagida por 60 minutos em temperatura ambiente com 131  $\mu$ l de uma solução de SMPH (65 mM em DMSO). A solução de reação foi dializada a 4°C contra três mudanças de 3 l de HPES a 20 mM, NaCl a 150 mM pH 7,2 durante 24 horas. Setenta e cinco  $\mu$ l da solução de Q $\beta$  derivatizada e dializada foram misturados com 192  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O e 233  $\mu$ l da proteína de camundongo IL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> purificada e pré-reduzida e incubados da noite para o dia a 15°C para ligação com cruzamento química. Proteína não-acoplada foi removida através de filtragem em fluxo tangencial contra PBS usando membranas de éster de celulose com um corte de peso molecular de 300.000 Da.

Produtos acoplados foram analisados em um gel de SDS- poliacrilamida a 12% sob condições de redução. O gel tingido com Coomassie é mostrado na Figura 2. Várias faixas de peso molecular alto com relação ao monômero de capsídeo de Q $\beta$  são visíveis, demonstrando claramente a ligação com cruzamento bem sucedida da proteína IL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> de camundongo ao capsídeo de Q $\beta$ .

#### **B. Imunização de camundongos com proteína IL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> acoplada ao capsídeo de Q $\beta$ (Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub>)**

Cinco camundongos balb/c fêmeas foram imunizadas com Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub>. Cinquenta  $\mu$ g de proteína total foram diluídos em PBS para 200  $\mu$ l e injetados subcutaneamente (100  $\mu$ l nos dois lados ventrais) no dia 0 e no dia 21. Os camundongos foram sangrados retroorbitalmente nos dias 0, 21 e 35, e soros foram analisados usando ELISA específico de IL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> de camundongo.

#### **C. ELISA**

Placas de ELISA foram revestidas com proteína IL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> de camundongo em uma concentração de 1  $\mu$ g/ml. As placas foram bloqueadas e então incubadas com soros de camundongo serialmente diluídos dos dias 0, 21 e 35. Anticorpos ligados foram detectados com anticorpo IgG anticamundongo enzimaticamente marcado. Títulos de anticorpo de soros de ca-

mundongo foram calculados como a média daquelas diluições que levaram à densidade óptica média máxima a 450 nm. O título de IL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> anticamundongo médio foi 1:9252 no dia 21 e 1:736912 no dia 35. Isto demonstra que imunização com Q $\beta$  acoplado à proteína IL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> de camundongo poderia superar a tolerância imunológica e produzir anticorpos de título alto que reconhecem especificamente IL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub>.

#### D. Neutralização de IL-1 $\alpha$ *in vitro*

Soros de camundongos imunizados com Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> foram então testados quanto à sua habilidade em inibir a ligação de proteína IL-1 $\alpha$  de camundongo a seu receptor. Placas de ELISA foram então revestidas com uma proteína de fusão mIL-1receptorI-hFc recombinante em uma concentração de 1  $\mu$ g/ml e co-incubadas com diluições seriais de soros de camundongos que tinham sido imunizados ou com IL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> de camundongo acoplada a capsídeo de Q $\beta$  ou com IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> de camundongo acoplada ao capsídeo de Q $\beta$  e 5 ng/ml de IL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> de camundongo. Ligação de IL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> à proteína de fusão mIL-1receptorI-hFc imobilizada foi detectada com um anticorpo de L-1 $\alpha$  anticamundongo biotinilado e estreptavidina conjugada à peroxidase do rábano de cavalo. Todos os soros de camundongos imunizados contra IL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> de murino inibiram completamente a ligação de IL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> de camundongo a seu receptor em concentrações de  $\geq 0,4\%$ , enquanto soros de camundongos imunizados contra IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> de camundongo não mostraram nenhum efeito inibidor significativo mesmo na concentração mais alta usada (3,3%). Esses dados demonstram que imunização com IL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> de camundongo acoplado ao capsídeo de Q $\beta$  pode dar anticorpos que são capazes de neutralizar a interação de IL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> de camundongo e seu receptor.

#### E. Neutralização de IL-1 $\alpha$ *in vivo*

A capacidade de neutralização *in vivo* dos anticorpos criados pela imunização com Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> foi investigada em seguida. Quatro camundongos balb/c fêmeas foram então imunizados duas vezes nos dias 0 e 14 com Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> e quatro camundongos foram imunizados ao mesmo tempo com capsídeo de Q $\beta$  sozinho. No dia 21 todos os camundon-

gos foram injetados intravenosamente com 1  $\mu\text{g}$  de IL-1 $\alpha_{117-270}$  livre. Como leitura da atividade inflamatória da IL-1 $\alpha_{117-270}$  injetada, amostras de soro foram analisadas 3 h após injeção para o aumento relativo na concentração da citocina pró-inflamatória IL-6. Camundongos imunizados com Q $\beta$  mostraram um aumento médio na concentração de IL-6 no soro de  $8,16 \pm 2,33$  ng/ml, enquanto camundongos imunizados com Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha_{117-270}$  mostraram um aumento médio de apenas  $0,15 \pm 0,27$  ng/ml ( $p=0,0005$ ). Como um controle no dia 28 todos os camundongos foram injetados com 1  $\mu\text{g}$  de mIL-1 $\beta$ . Três horas após injeção camundongos imunizados com veículo de Q $\beta$  sozinho mostraram um aumento médio em concentrações de IL-6 o soro de  $9,52 \pm 7,33$  ng/ml, enquanto camundongos imunizados com Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha_{117-270}$  mostraram um aumento de  $21,46 \pm 27,36$  ng/ml ( $p=0,43$ ). Esses dados indicam que os anticorpos produzidos pela imunização com Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha_{117-270}$  eram capazes de neutralizar especificamente e eficientemente a atividade pró-inflamatória de IL-1 $\alpha$ .

#### **F. Eficácia de Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha_{117-270}$ em um modelo de camundongo de artrite reumatóide**

A eficácia de imunização de Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha_{117-270}$  foi testada em um modelo de artrite induzida por colágeno de murino (CIA). Este modelo reflete a maioria dos aspectos imunológicos e histológicos de artrite reumatóide humana e é então rotineiramente usado para avaliar a eficácia de agentes antiinflamatórios. Camundongos DBA/1 machos foram imunizados subcutaneamente três vezes (dias 0, 14 e 28) com 50  $\mu\text{g}$  ou de Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha_{117-270}$  ( $n=8$ ) ou Q $\beta$  sozinho ( $n=8$ ), e então injetados intradermalmente no dia 42 com 200  $\mu\text{g}$  de colágeno bovino tipo II misturado com adjuvante de Freund completo. Após uma injeção de reforço de 200  $\mu\text{g}$  de colágeno bovino tipo II misturado com adjuvante de Freund incompleto no dia 63 os camundongos foram examinados em uma base diária quanto ao desenvolvimento de sintomas de artrite. Um *score* clínico conforme definido no EXEMPLO 2F foi designado para cada membro de acordo com o grau de vermelhidão e inchaço observados, e a espessura do tornozelo de todos os membros traseiros foi medida. Duas semanas após a segunda injeção de colágeno camun-

5        dongos imunizados com Q $\beta$  mostraram um *score* cumulativo clínico médio de 4,44, enquanto camundongos imunizados com Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha_{117-270}$  mostraram um *score* médio de apenas 2,31. Além disso, o aumento médio na espessura do tornozelo traseiro foi 18% para camundongos imunizados com Q $\beta$  e apenas 7% para camundongos que tinham sido imunizados com Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha_{117-270}$ . Como uma leitura adicional da reação inflamatória, níveis no soro de IL-6 foram determinados 1 semana após a segunda injeção de colágeno. Camundongos imunizados com Q $\beta$  tinham uma concentração de IL-6 no soro média de  $1,92 \pm 0,36$  enquanto camundongos imunizados com Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha_{117-270}$  tinham uma concentração de IL-6 média de apenas  $0,94 \pm 0,48$ . Tomados juntos, esses dados mostram que imunização com Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha_{117-270}$  protege fortemente camundongos de inflamação e sinais clínicos de artrite em modelo de CIA.

#### EXEMPLO 4

#### 15                    **Eficácia de Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha_{117-270}$ em um modelo de camundongo de aterosclerose**

Camundongos *ApoE*<sup>-1</sup> machos de sete a oito semanas de vida (The Jackson Laboratory, Bar Harbor ME) foram injetados subcutaneamente ou com 50  $\mu$ m de vacina Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha_{117-270}$  (n=13) ou com 50  $\mu$ B de Q $\beta$  (n=12) nos dias 0, 14, 28, 56, 105 e 133 (5 animais, nos grupos de Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha_{117-270}$  e 2 nos grupo Q $\beta$  receberam sua segunda dose de reforço no dia 33). Os camundongos foram alimentados inicialmente com uma dieta de comida normal, que foi substituída no dia 21 por uma dieta ocidental (20% de gordura, 0,15% de colesterol, Provimi Kliba AG, Suíça). Os camundongos foram sangrados em intervalos regulares por todo o experimento e a resposta de anticorpo contra IL-1alfa foi medida nos soros. O sacrifício foi no dia 159, e a aorta foi isolada e preparada essencialmente conforme descrito (Tangirala, R.K. e outros (1995) *J. Lipid. Res.* 36:2320-2328). Ainda, os corações foram removidos e congelados rapidamente em nitrogênio líquido para preparações histológica subsequente essencialmente conforme descrito por Paigen B. e outros (*Atherosclerosis* 1987;68:231-240) e Zhou X. e outros (*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001,21:108-114). Os animais foram sangrados

através de punção cardíaca e perfundidos com PBS. A aorta foi então ex-  
posta, o máximo possível do revestimento externo removido *in situ* e a aorta  
finalmente seccionada 2 mm a partir do coração. O coração foi seccionado  
no meio, e a parte superior foi imediatamente congelada em solução salina  
5 equilibrada de Hank em um tubo plástico em nitrogênio líquido. Seções seri-  
ais (7  $\mu$ m de espessura) foram cortadas em um criostat através da origem da  
aorta e coletadas quando do aparecimento de pelo menos duas cúspides de  
válvula, até desaparecimento das últimas cúspides de válvula. As seções  
foram fixadas em formalina, tingidas com *oil red O* e a carga de placa foi  
10 avaliada em 4-7 seções (3 seções em um animal do grupo Q $\beta$ ) por camun-  
dongo através de análise de imagem quantitativa. Uma área de placa média  
foi computada para cada animal a partir da área de placa de cada seção u-  
sada para a avaliação. Uma área de placa de grupo média foi computada  
para os grupos Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha_{117-270}$  e Q $\beta$  respectivamente. Análise estatística foi  
15 realizada com um teste t de *Student*.  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamen-  
te significativo.

Para avaliação de aterosclerose na aorta inteira, essas foram  
limpas mais de revestimento externo adicional em uma placa de petri de vi-  
dro cheia com PBS frio, e o arco foi seccionado 5 mm para baixo a partir da  
20 artéria subclaviana esquerda. A aorta foi cortada longitudinalmente, achata-  
da em uma superfície de cera preta e fixada da noite para o dia em 4% de  
formalina. Elas foram então tingidas da noite para o dia em *oil red O*. As pla-  
cas foram quantificadas com um *software* de imagem (Motic Image Plus 2.0)  
em fotografias digitais. A carga da placa foi expressa como a soma da super-  
25 fície de todas as placas da aorta tomada para a bifurcação ilíaca, dividida  
pela superfície total da aorta medida até a bifurcação ilíaca, em porcenta-  
gem. A diferença em média ou mediana da carga de placa entre os grupos  
Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha_{117-270}$  e Q $\beta$  foi analisada.

A resposta de anticorpo foi medida em um ELISA clássico, com  
30 IL-1alfa recombinante revestida na placa de ELISA. Ligação de anticorpos  
específicos foi detectada usando um conjugado de HRP anticamundongo de  
cabra. Os títulos contra IL-1alfa foram calculados como a recíproca da dilui-

ção do soro dando ligação médio máxima no ensaio. A especificidade da resposta foi avaliada medindo soro pré-imune. O título pré-imune estava abaixo da diluição de soro menor usada no ensaio, e foi dado este valor de diluição de soro mais baixo. Os resultados da medição da resposta de anticorpo nos animais imunizados com Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha_{117-270}$  são mostrados na Tabela 1, e demonstram claramente que imunização contra IL-1alfa de murino acoplada a Q $\beta$  leva a uma resposta de anticorpo específica forte e sustentada contra IL-1alfa, uma vez que quase nenhum título era detectável no soro pré-imune (d0). Ainda, indução de uma resposta de anticorpo específica para IL-1alfa levou a uma redução de 37% em área de placa na origem aórtica no grupo de Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha_{117-270}$  comparado com o grupo Q $\beta$  ( $292803 \pm 21272 \mu^2$  vs.  $464694 \pm 36545 \mu^2$ ,  $p=0,0005$ ). Ainda, uma redução de 31% na carga de placa média em aortas inteiras preparadas "en face" (5,7 vs. 8,3,  $p=0,06$ ) foi observada.

Esses dados demonstram que indução de anticorpos anti-IL-1alfa pela vacina de Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha_{117-270}$  inibiu o desenvolvimento de aterosclerose e então que a vacina de Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha_{117-270}$  é um tratamento eficaz para aterosclerose. Ainda, esses dados demonstram que IL-1alfa está envolvido na patogênese de aterosclerose.

**Tabela 1:** Média geométrica de título de anticorpo anti-IL1-alfa em camundongos *ApoE*<sup>-1-</sup> imunizados com Q $\beta$ IL1alfa (título de média geométrica  $\pm$  erro de desvio padrão da média)

	d0	d21	d28*	d56	d84	d105	d159
Média Geo $\pm$ SEM	<10000	225400 $\pm$ 93385	167867 $\pm$ 121345	522864 $\pm$ 106887	712061 $\pm$ 144922	621687 $\pm$ 184389	805370 $\pm$ 155764

\*Para 5 animais, os valores são do dia 33.

#### EXEMPLO 5

**Proteção de doença do intestino inflamatória induzida por TNBS através de imunização com Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha_{117-270}$  e/ou Q $\beta$ -mIL-1 $\beta_{119-269}$**

Camundongos SJL machos de oito semanas de vida (5 por grupo) são injetados subcutaneamente três vezes em intervalos de duas semanas ou com 50  $\mu$ g de Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha_{117-270}$  ou 50  $\mu$ g de Q $\beta$ -mIL-1 $\beta_{119-269}$ , ou uma mistura de 50  $\mu$ g de cada um de Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha_{117-270}$  e Q $\beta$ -mIL-1 $\beta_{119-269}$ . Como



um controle 5 camundongos são injetados no mesmo regime com VLPs de Q $\beta$  sozinho. Duas semanas após a última imunização, todos os camundongos são levemente anestesiados com Isoflurano e 1 mg de ácido trinitrobenzenossulfônico (TNBS) em 100  $\mu$ l de etanol a 50% é administrado intrate-

5 calmente através de um cateter de polietileno em uma distância de 4 cm do ânus. O peso do corpo é registrado diariamente como leitura de progressão de doença, e 7 dias após administração de TNBS todos os camundongos são sacrificados. O colo de cada camundongo é removido, um espécime de colo localizado 2 cm proximal ao ânus é fixado em formalina tamponada com

10 PBS e o grau de inflamação é classificado semiquantitativamente em seções transversais colônicas tingidas com hematoxilina e eosina de acordo com Neurath M.F. e outros (*JEM* (1995), 182:1281-1290).

Imunização ou com Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> ou Q $\beta$ -mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> sozinha, ou com uma combinação de Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> ou Q $\beta$ -mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> reduz

15 a perda de peso induzida por TNBS, conforme comparado com camundongos imunizados com Q $\beta$ . Ainda, exame histológico de seções transversais colônicas revela que os camundongos imunizados com Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> e/ou Q $\beta$ -mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> mostram uma infiltração de células inflamatórias acentuadamente reduzida no tecido colônico quando comparado com camundongos

20 imunizados com Q $\beta$ .

#### EXEMPLO 6

**Melhora de hipersensibilidade à Endotoxina em camundongos carregando uma versão truncada do gene MEFV através de imunização com Q $\beta$ -mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub>**

25 Febre Mediterrânea Familiar é um distúrbio inflamatório recessivamente herdado caracterizado por febre recorrente bem como peritonite, serosite, artrite e rachaduras na pele. Indivíduos afetados carregam uma mutação *missense* no gene MEFV, levando à expressão de uma proteína pirina truncada. Camundongos carregando uma mutação similar no gene

30 MEFV mostram uma atividade de caspase-1 aumentada, levando à superprodução de IL-1 $\beta$  madura e hipotermia e letalidade aumentadas após administração de LPS. Camundongos com truncamento de pirina homozigotos de

oito semanas de vida (5 por grupo) são imunizados três vezes em intervalos de duas semanas com 50 µg de Qβ-mIL-1α<sub>117-270</sub> ou 50 µg de VLPs de Qβ sozinho. Duas semanas após a última imunização todos os camundongos são injetados intraperitonealmente com uma mistura de 20 mg de D-Galactosamina e 0,01 µg/g de LPS. Camundongos imunizados com Qβ-mIL-1β<sub>119-269</sub> mostram uma hipotermia acentuadamente reduzida e uma letalidade reduzida em resposta à administração de LPS, quando comparados com controles imunizados com Qβ.

#### EXEMPLO 7

#### 10 **Comparação de imunização com Qβ-mIL-1α<sub>117-270</sub> ou Qβ-mIL-1β<sub>119-269</sub> a tratamento com Kineret® em um modelo de camundongo de artrite reumatóide**

Kineret® é (Anakinra, Amgen) é uma versão recombinante do antagonista de receptor de IL-1 humano, que é aprovado para o tratamento de artrite reumatóide humana. A fim de se obter um benefício clínico, quantida-  
 15 des relativamente altas (100 mg) têm que ser aplicadas através de via subcutânea em uma base diária. O modelo de artrite induzida por colágeno foi usado para comparar a eficácia de imunização com Qβ-mIL-1α<sub>117-270</sub> ou Qβ-mIL-1β<sub>119-269</sub> com aplicações diárias de doses diferentes de Kineret®.  
 20 Camundongos DBA/1 machos foram imunizados subcutaneamente três vezes (dias 0, 14 e 28) com 50 µg ou de Qβ-mIL-1α<sub>117-270</sub> (n=8), Qβ-mIL-1β<sub>119-269</sub> (n=8) ou Qβ sozinho (n=32), e então injetados intradermalmente no dia 42 com 200 µg de colágeno bovino tipo II misturado com adjuvante de Freund completo. A partir do dia 42, camundongos imunizados com Qβ-mIL-1α<sub>117-270</sub>  
 25 ou Qβ-mIL-1β<sub>119-269</sub> e um grupo de camundongos imunizados com Qβ (n=8) receberam injeções intraperitoneais diárias de 200 µl de PBS, enquanto três grupos imunizados com Qβ adicionais receberam injeções intraperitoneais diárias ou de 37,5 µg (n=8), 375 µg (n=8) ou 3,75 mg (n=8) de Kineret®. Uma injeção diária de 37,5 µg de Kineret® pró-camundongo corresponde aproxima-  
 30 damente a uma dose de 1,5 mg/kg, que está na faixa da quantidade eficaz recomendada para seres humanos (100 mg). Todos os camundongos foram reforçados no dia 63 através de injeção intradermal de 200 µg de co-

lágono bovino tipo II misturado com adjuvante de Freund, e examinados em uma base diária quanto ao desenvolvimento de sintomas de artrite.

Quatro semanas após a segunda injeção de colágeno, camundongos controle imunizados com Q $\beta$  mostraram um *score* clínico cumulativo médio (conforme definido no EXEMPLO 2F) de 3,75, enquanto camundongos imunizados com Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> ou Q $\beta$ -mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> mostraram *scores* médios de apenas 0,81 e 1,44, respectivamente (vide Tabela 2). Camundongos tratados com 37,5  $\mu$ g ou 375  $\mu$ g de Kineret<sup>®</sup> atingiram um *score* médio de 2,44 e 2,63, respectivamente, enquanto camundongos tratados com 3,75 mg de Kineret<sup>®</sup> permaneceram bastante assintomáticos, atingindo uma *score* máximo de apenas 0,19.

Como uma leitura adicional da reação inflamatória, a espessura do tornozelo traseiro de todos os animais foi medida em uma base regular. Quatro semanas após a segunda injeção de colágeno camundongos controle imunizados com Q $\beta$  mostraram um aumento médio em espessura de tornozelo traseiro de 16%, enquanto camundongos imunizados com Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> mostraram um aumento de 2% e camundongos imunizados com Q $\beta$ -mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> mostraram um aumento de 6%. Camundongos tratados ou com 37,5  $\mu$ g ou 375  $\mu$ g de Kineret<sup>®</sup> mostraram um aumento médio de 13% e 10%, respectivamente, enquanto camundongos tratados com 3,75 mg de Kineret<sup>®</sup> não mostraram nenhum aumento em espessura de tornozelo de modo algum.

Em conclusão foi surpreendentemente verificado que três injeções ou de Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> ou Q $\beta$ -mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> protegeram melhor do desenvolvimento de sintomas de artrite do que injeções diárias de Kineret<sup>®</sup> em quantidades correspondendo à dose humana ou até mesmo a dose humana dez vezes. Apenas aplicação da dose humana de 100 vezes de Kineret<sup>®</sup> mostrou um benefício aumentado com relação à vacinação de Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> ou Q $\beta$ -mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub>.

**Tabela 2:** Sintomas de doença clínicos em modelo de artrite induzida por colágeno

Tratamento	Score clínico médio dia 91	Aumento médio em espessura do tornozelo traseiro (%) dias 63-91
3x Q $\beta$ s.c. + PBS i.p. (200 $\mu$ l/dia)	3,75	16
3x Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha_{117-270}$ s.c. + PBS i.p. (200 $\mu$ l/dia)	0,81	2
3x Q $\beta$ -mIL-1 $\beta_{119-269}$ s.c. + PBS i.p. (200 $\mu$ l/dia)	1,44	6
3x Q $\beta$ s.c. + Kineret <sup>®</sup> i.p. (37,5 $\mu$ g/dia)	2,44	13
3x Q $\beta$ s.c. + Kineret <sup>®</sup> i.p. (375 $\mu$ g/dia)	2,63	10
3x Q $\beta$ s.c. + Kineret <sup>®</sup> i.p. (3,75 $\mu$ g/dia)	0,19	0

### EXEMPLO 8

**A. Clonagem, expressão e purificação de partículas do tipo vírus consistindo em proteína de revestimento AP205 geneticamente fundida à Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha_{117-270}$  (AP205\_ Q $\beta$ -mIL-1 $\alpha_{117-270}$ )**

Dado o tamanho grande de interleucina-1alfa e por razões estéticas, um sistema de expressão produzindo as chamadas partículas de mosaico, compreendendo proteínas de revestimento AP205 fundidas à interleucina-1alfa bem como subunidades de proteína de revestimento wt foi construído. Neste sistema, supressão do códon de parada dá a fusão de proteína de revestimento AP-205-interleucina-1alfa, enquanto terminação apropriada dá a proteína de revestimento AP205 wt. Ambas proteínas são produzidas simultaneamente na célula e montadas em uma partícula do tipo vírus do mosaico. Dois plasmídeos intermediários, pAP590 e pAP592, codificando o gene da proteína de revestimento AP205 terminado pelos códons supressores TAG (amber, pAP590) ou TGA (opal, pAP592) foram feitos. Uma seqüência ligante codificando o tripeptídeo Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO:189) foi adicionada a jusante e em estrutura do gene de proteína de revestimento.

Sítios Kpn2I e HindIII foram adicionados para clonagem de seqüências codificando seqüências de aminoácido estranhas no terminal C do ligante de aminoácido Gly-Ser-Gly, C-terminais para a proteína de revestimento AP205. Os construtos resultantes eram: AP590 (SEQ ID NO:117): gene da proteína de revestimento AP205 – códon amber – GSG(Kpn21 – HindIII); e AP592 (SEQ ID NO:118): gene de proteína de revestimento AP205 – códon

opal – GSG(Kpn2I – HindIII). Para construção de plasmídeo pAP590, um fragmento de PCR obtido com oligonucleotídeos p1.44 (5'-NNCCATGGC AAATAAGCCAATGCAACCG-3'; SEQ ID NO:19) e Pinc-36 (5'-GTAAGCTT AGATGCATTATCCGGATCCTCAAGCAGTAGTATCAGACGATACG-3'; SEQ ID NO:120) foi digerido com NcoI e HindIII, e clonado no vetor pQb185, que tinha sido digerido com as mesmas enzimas de restrição. pQb185 é um vetor derivado de vetor pGEM. Expressão dos genes clonados neste vetor é controlada pelo promotor *trp* (Kozlovská, T.M. e outros, *Gene* 137:133-37 (1993)). Similarmente, o plasmídeo pAP592 foi construído através de clonagem de um fragmento de PCR digerido com NcoI/HindIII obtido com oligonucleotídeo p1.44 e pINC-40 (5'-GTAAGCTTAGATGCATTATCCGGATCCTC AAGCGTAGTATCAGACGATACG-3'; SEQ ID NO:121) no mesmo vetor.

A seqüência codificando os aminoácidos 117-270 de IL-1 $\alpha$  de murino foi amplificada através de PCR a partir do plasmídeo pModEC1-His-EK-mIL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> (vide EXEMPLO 1), usando iniciadores pINC-34 (5'-GGTC CGGAGCGCTAGCCCCTTACAC-3'; SEQ ID NO:122) e pINC-35 (5'-GTAAG CTTATGCATTATGATATCTGGAAGTCTGTCATAGA-3'; SEQ ID NO:123), que adicionou sítios de restrição Kpn2I e HindIII às extremidades 5' e 3', respectivamente. O fragmento de DNA obtido foi digerido com Kpn2I e HindIII e clonado em ambos os vetores pAP590, criando o plasmídeo pAP594 (supressão de amber), e o vetor pPA592, criando o plasmídeo pAP596 (supressão de opal), respectivamente.

Para expressão de VLPs de AP205 de mosaico mostrando IL-1 $\alpha$  de murino em sua superfície, células JM109 de *E. coli* contendo plasmídeo pISM 579 ou pISM 3001 foram transformadas com plasmídeo pAP594 ou pAP596, respectivamente. O plasmídeo pISM579 foi gerado através de excisão do gene *trpT176* de pISM3001 com endonuclease de restrição *EcoRI* e substituindo-o por fragmento de *EcoRI* do plasmídeo pMY579 (presente de Michael Yarus) contendo um gene supressor de t-RNA amber. Este gene supressor de t-RNA é um mutante de *trpT175* (Raftery, L.A. e outros, (1984) *J. Bacteriol* 158:849-859) e difere de *trpT* em três posições: G33, A24 e T35. Cinco mililitros de meio líquido LB contendo 20  $\mu$ g/ml de ampicilina e

10 µg/ml de canamicina foram inoculados com uma colônia única e incubados a 37°C por 16-24 h sem agitação. O inóculo preparado foi diluído 50 x com meio M9 contendo 20 µg/ml de ampicilina e 10 µg/ml de Canamicina e incubado a 37°C da noite para o dia em um agitador. As células foram coletadas através de centrifugação.

Células (1 g, transformadas com plasmídeo pAP594 e contendo pISM579) foram lisadas através de ultrassonificação em tampão de lise (Tris-HCl a 20 mM, EDTA a 5 mM, NaCl a 150 mM, pH 7,8, Tween 20 a 0,1%). O lisato foi limpo através de centrifugação, e os restos celulares foram lavados com tampão de lise. Sobrenadante agrupado foi carregado em uma coluna Sepharose CL-4B eluída em tampão TEM (Tris-HCl a 20 mM, EDTA a 5 mM, NaCl a 150 mM, pH 7,8). A presença de capsídeos no lisato limpo e sobrenadante de lavagem foi confirmada através de eletroforese de gel de agarose (TAE a 1%, gel tingido com brometo de etídio e detecção UV). Dois picos eluíram da coluna conforme determinado através de análise SDS-PAGE ou UV-espectrométrica do espalhamento de luz a 310 nm. Frações do segundo pico, contendo os capsídeos, foram agrupadas e carregadas em uma coluna Sepharose CL-6B. Frações de pico da coluna CL-6B foram agrupadas e concentradas usando uma unidade de filtro centrífugo (Amicon Ultra 15 MWCO 30000, Millipore). A proteína foi purificada mais através de uma rodada adicional de filtração em gel em uma coluna CL-4B e as frações de pico resultantes foram agrupadas e concentradas em uma unidade de filtro centrífugo como acima. O tampão foi trocado para HEPES a 10 mM, pH 7,5, e glicerol foi adicionado para uma concentração final de 50%.

Purificação de AP205\_mIL-1 $\alpha_{117-270}$  do plasmídeo pAP596 foi realizada essencialmente conforme descrito para pAP594 acima, com a inclusão de uma etapa de purificação de gradiente de sacarose adicional após a última coluna CL-4B. A proteína foi posta em camada em um gradiente preparado com as soluções de sacarose que seguem: 9 ml 36%, 3 ml 30%, 6ml 25%, 8 ml 20%, 6 ml 15%, 6 ml 10% e 3 ml 5% de sacarose. As frações foram identificadas através de espectroscopia UV e frações agrupadas con-

tendo os capsídeos foram concentradas em uma unidade de filtro centrífugo como acima, e o tampão trocado para HEPES a 10 mM, pH 7,5. Glicerol foi finalmente adicionado para uma concentração final de 50%.

#### **B. Imunização de camundongos com AP205\_mIL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub>**

5 Quatro camundongos balb/c fêmeas foram imunizados com AP205\_mIL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub>. Vinte e cinco  $\mu$ g de proteína total foram diluídos em PBS para 200  $\mu$ l e injetados subcutaneamente (100  $\mu$ l em dois lados ventrais) no dia 0, dia 4 e dia 28. Os camundongos foram sangrados retroorbitalmente nos dias 0, 14, 28 e 35 e soros foram analisados usando ELISA  
10 específico de IL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> de camundongo.

#### **C. ELISA**

Placas de ELISA foram revestidas com proteína IL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> de camundongo em uma concentração de 1  $\mu$ g/ml. As placas foram bloqueadas e então incubadas com soros de camundongo serialmente diluídos dos dias  
15 14, 28 e 35. Anticorpos ligados foram detectados com anticorpo IgG anticamundongo enzimaticamente marcado. Títulos de anticorpo de soros de camundongo foram calculados como a média daquelas diluições que levaram à densidade óptica média máxima a 450 nm. O título de IL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> anticamundongo médio foi 1:4412 no dia 14, 1:27955 no dia 28 e 1:34824 no dia  
20 35. Isto demonstra que imunização com AP205\_mIL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> poderia superar a tolerância imunológica e produzir anticorpos de título alto que reconhecem especificamente IL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub>.

#### **D. Neutralização de IL-1 $\alpha$ *in vitro***

Soros de camundongos imunizados com AP205\_mIL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub>  
25 foram testados quanto à sua habilidade em inibir a ligação de proteína IL-1 $\alpha$  de camundongo a seu receptor. Placas de ELISA foram então revestidas com uma proteína de fusão mIL-1receptorI-hFc recombinante em uma concentração de 1  $\mu$ g/ml e co-incubadas com diluições seriais de soros de camundongos que tinham sido imunizados ou com AP205\_mIL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> ou  
30 com AP205 sozinho e 100 ng/ml de IL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> de camundongo. Ligação de IL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> à proteína de fusão mIL-1receptorI-hFc imobilizada foi detectada com um anticorpo de L-1 $\alpha$  anticamundongo biotilado e estreptavidina con-

jugada à peroxidase do rábano de cavalo. Todos os soros de camundongos imunizados com AP205\_mIL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> inibiram completamente a ligação de IL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> de camundongo a seu receptor em concentrações de  $\geq 3,3\%$ , enquanto soros de camundongos imunizados com AP205 não mostraram nenhum efeito inibidor significativo em nenhuma concentração usada. Esses dados demonstram que imunização com AP205\_mIL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> pode dar anticorpos que são capazes de neutralizar a interação de IL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> de camundongo com seu receptor.

#### **E. Neutralização de IL-1 $\alpha$ *in vivo***

10 A capacidade de neutralização *in vivo* dos anticorpos criados pela imunização com AP205\_mIL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> foi investigada em seguida. Quatro camundongos balb/c fêmeas foram então imunizados três vezes nos dias 0, 14 e 28 com AP205\_mIL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> e quatro camundongos foram imunizados ao mesmo tempo com AP205 sozinho. No dia 42 todos os camundongos foram injetados intravenosamente com 1  $\mu$ g de IL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> de murino livre. Como leitura da atividade inflamatória da IL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> injetada, amostras de soro foram retiradas antes e 3 h após injeção e analisadas quanto ao aumento relativo na concentração de citocina pró-inflamatória IL-6. Camundongos imunizados com AP205 mostraram um aumento médio na concentração de IL-6 no soro de  $12,92 \pm 3,95$  ng/ml, enquanto camundongos imunizados com AP205\_mIL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> mostraram um aumento médio de apenas  $0,06 \pm 0,05$  ng/ml ( $p=0,01$ ). Esses dados indicam que os anticorpos produzidos pela imunização com AP205\_mIL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> eram capazes de neutralizar especificamente e eficientemente a atividade pró-inflamatória de IL-1 $\alpha$ .

#### **F. Eficácia de AP205\_mIL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> em um modelo de camundongo de artrite reumatóide**

25 A eficácia de imunização de AP205\_mIL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> foi testada em um modelo de artrite induzida por colágeno de murino (CIA). Camundongos DBA/1 machos foram imunizados subcutaneamente três vezes (dias 0, 14 e 30 28) com 50  $\mu$ g ou de AP205\_mIL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> ( $n=8$ ) ou AP205 sozinho ( $n=8$ ), e então injetados intradermalmente no dia 42 com 200  $\mu$ g de colágeno bovino tipo II misturado com adjuvante de Freund completo. Após uma injeção de



reforço de 200 µg de colágeno bovino tipo II misturado com adjuvante de Freund incompleto no dia 63 os camundongos foram examinados em uma base diária quanto ao desenvolvimento de sintomas de artrite. Um *score* clínico variando de 0 a 3 foi designado para cada membro de acordo com o grau de vermelhidão e inchaço observados, e a espessura do tornozelo de todos os membros traseiros foi medida. Duas semanas após a segunda injeção de colágeno camundongos imunizados com Q $\beta$  mostraram um *score* cumulativo clínico médio de 5,81, enquanto camundongos imunizados com Q $\beta$  AP205\_mIL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> mostraram um *score* médio de apenas 2,06. Além disso, o aumento médio na espessura do tornozelo traseiro foi 19% para camundongos imunizados com AP205 e apenas 9% para camundongos que tinham sido imunizados com AP205\_mIL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub>. Tomados juntos, esses dados mostram que imunização com AP205\_mIL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> protege fortemente camundongos de inflamação e sinais clínicos de artrite em modelo de CIA.

#### 15 EXEMPLO 9

##### **A. Clonagem e expressão de partículas do tipo vírus consistindo em proteína de revestimento AP205 geneticamente fundida à IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> de camundongo (AP205\_mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub>)**

Clonagem, expressão e purificação de partículas do tipo vírus consistindo em proteína de revestimento AP205 geneticamente fundida à IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> são realizadas essencialmente conforme descrito para AP205\_mIL-1 $\alpha$ <sub>117-270</sub> no EXEMPLO 8. A seqüência de interleucina 1 beta de murino foi amplificada a partir do plasmídeo pModEC1-His-EK-mIL1 $\beta$ <sub>119-269</sub> para interleucina 1 beta de murino usando iniciadores pINC-75 (5'-GATCCGGAGGTG GTGTCCCCATTAGACAGCT-3', SEQ ID NO:192) e pINC-77 (5'-GTAAGCTTA GGAAGACACAGATTCCAT-3', SEQ ID NO:193). Esses iniciadores amplificam um gene interleucina-1 beta de murino com sítios 5' Kpn2I e 3' Hind III, e codificando adicionalmente a seqüência de aminoácido Gly-Gly no terminal N de interleucina 1 beta de murino. O fragmento mur-IL-1 $\beta$  obtido foi digerido com Kpn2I e HindIII e clonado nos mesmos sítios de restrição no vetor pAP590 (supressão de amber) criando o plasmídeo pAP630. JM109 de *E. coli* contendo plasmídeo pISM579, provendo supressão de amber, foi trans-

formado com o plasmídeo pAP630. 5 ml de meio líquido LB com 20 µg/ml de ampicilina e 10 µg/ml de canamicina foram inoculados com uma colônia única, e incubados a 37°C por 16-24 h sem agitação. O inócuo preparado foi diluído 50x com meio M9 contendo 20 µg/ml de ampicilina e 10 µg/ml de canamicina e incubados a 37°C da noite para o dia em um agitador. As células foram coletadas através de centrifugação.

**B. Clonagem e expressão de partículas do tipo vírus consistindo em proteína de revestimento AP205 geneticamente fundida a IL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> humana (AP205\_hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub>)**

A seqüência de interleucina 1 beta humana foi amplificada do plasmídeo pET42T-hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> codificando interleucina 1 beta humana usando iniciadores pINC-74 (5'-GA TCC GGA GGT GGT GCC CCT GTA CGA TCA CTG AAC TG-3', SEQ ID NO:194) e pINC-76 (5'-GTATGCATTAGGAA GACACAAATTGCATGGTGAAGTC-3, SEQ ID NO:195), introduzindo um sítio 5' *Kpn2I* e 3' *Mph11031*, respectivamente. O fragmento de IL-1 $\beta$  humana obtido foi digerido com *Kpn2I* e *Mph11031* e clonado nos mesmos sítios de restrição no vetor pAP590 (supressão de amber) criando o plasmídeo pAP649. JM109 de *E. coli* contendo plasmídeo pISM 579 (provendo supressão de amber), foi transformado com plasmídeo pAP649. 5 mL de meio líquido LB com 20 µg/ml de ampicilina e 10 µg/ml de canamicina foram inoculados com uma colônia única, e incubados a 37°C por 16-24 h sem agitação. O inócuo preparado foi diluído 50x com meio M9 contendo 20 µg/ml de ampicilina e 10 µg/ml de canamicina e incubados a 37°C da noite para o dia em um agitador. Células foram coletadas através de centrifugação.

**C. Imunização de camundongos com AP205\_mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub>**

Quatro camundongos balb/c fêmeas são imunizados com AP205\_mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub>. Vinte e cinco µg de proteína total são diluídos em PBS para 200 µl e injetados subcutaneamente (100 µl em dois lados ventrais) nos dias 0, dia 14 e dia 28. Os camundongos são sangrados retroorbitalmente nos dias 0, 14, 28 e 36 e soros são analisados usando ELISA específico de AP205\_mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub>.

**D. ELISA**

Placas de ELISA foram revestidas com proteína IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> de camundongo em uma concentração de 1  $\mu$ g/ml. As placas são bloqueadas e então incubadas com soros de camundongo serialmente diluídos dos dias 0, 14, 28 e 35. Anticorpos ligados são detectados com anticorpo IgG anticamundongo enzimaticamente marcado. Títulos de anticorpo de soros de camundongo são calculados como a média daquelas diluições que levaram à densidade óptica média máxima a 450 nm. Imunização com AP205\_mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> dá um título de IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> anti-camundongo específico alto. Isto demonstra que imunização com AP205\_mIL-1 $\alpha$ <sub>119-269</sub> poderia superar a tolerância imunológica e produzir anticorpos de título alto que reconhecem especificamente IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub>.

#### **E. Neutralização de IL-1 $\beta$ *in vitro***

Soros de camundongos imunizados com AP205\_mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> foram testados quanto à sua habilidade em inibir a ligação de proteína IL-1 $\beta$  de camundongo a seu receptor. Placas de ELISA foram então revestidas com uma proteína de fusão mIL-1receptorI-hFc recombinante em uma concentração de 1  $\mu$ g/ml e co-incubadas com diluições seriadas de soros de camundongos imunizados ou com AP205\_mIL-1 $\alpha$ <sub>119-269</sub> ou com AP205 sozinho e 100 ng/ml de IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> de camundongo. Ligação de IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> à proteína de fusão mIL-1receptorI-hFc imobilizada é detectada com um anticorpo de L-1 $\beta$  anticamundongo biotilado e estreptavidina conjugada à peroxidase do rábano de cavalo. Todos os soros de camundongos imunizados com AP205\_mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> inibiram fortemente a ligação de IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> de camundongo a seu receptor, enquanto soros de camundongos imunizados com AP205 sozinho não mostraram nenhum efeito inibidor. Esses dados demonstram que imunização com AP205\_mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> pode dar anticorpos que são capazes de neutralizar a interação de IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> de camundongo e seu receptor.

#### **F. Neutralização de IL-1 $\beta$ *in vivo***

A capacidade de neutralização *in vivo* dos anticorpos criados pela imunização com AP205\_mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> foi investigada em seguida. Quatro camundongos balb/c fêmeas são então imunizados três vezes nos dias 0,

14 e 28 com AP205\_mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> e quatro camundongos são imunizados ao mesmo tempo com AP205 sozinho. No dia 35 todos os camundongos são injetados intravenosamente com 1  $\mu$ g de mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> livre. Como leitura da atividade inflamatória da mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> injetada, amostras de soro são retiradas antes e 3 h após injeção e analisadas quanto ao aumento relativo na concentração de citocina pró-inflamatória IL-6. Camundongos imunizados com AP205 mostraram um aumento médio na concentração de citocina pró-inflamatória IL-6. Camundongos imunizados com AP205 mostram um aumento forte em concentrações de IL-6 no soro, enquanto camundongos imunizados com AP205\_mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> mostram apenas um aumento muito pequeno. Esses dados indicam que os anticorpos produzidos pela imunização com AP205\_mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> são capazes de neutralizar especificamente e eficientemente a atividade pró-inflamatória de IL-1B.

#### 15 **G. Eficácia de AP205\_mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> em um modelo de camundongo de artrite reumatóide**

A eficácia de imunização de AP205\_mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> foi testada em um modelo de artrite induzida por colágeno de murino (CIA). Camundongos DBA/1 machos foram imunizados subcutaneamente três vezes (dias 0, 14 e 28) com 50  $\mu$ g ou de AP205\_mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> (n=8) ou AP205 sozinho (n=8), e então injetados intradermalmente no dia 42 com 200  $\mu$ g de colágeno bovino tipo II misturado com adjuvante de Freund completo. Após uma injeção de reforço de 200  $\mu$ g de colágeno bovino tipo II misturado com adjuvante de Freund incompleto no dia 63 os camundongos foram examinados em uma base diária quanto ao desenvolvimento de sintomas de artrite. Um *score* clínico variando de 0 a 3 é designado para cada membro de acordo com o grau de vermelhidão e inchaço observados, e a espessura do tornozelo de todos os membros traseiros foi medida. Duas semanas após a segunda injeção de colágeno camundongos imunizados com AP205\_mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> mostram um *score* clínico médio fortemente reduzido quando comparados com camundongos imunizados com AP205. Além disso, camundongos imunizados com AP205\_mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> mostram apenas um pequeno aumento em espessura de tornozelo traseiro, enquanto camundongos imunizados com AP-205 mos-

tram um aumento forte em espessura de tornozelo traseiro. Tomados juntos, esses dados mostram que imunização com AP205\_mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> protege fortemente camundongos de inflamação e sinais clínicos de artrite em modelo de CIA.

## 5 EXEMPLO 10

### A. Clonagem, expressão e purificação de IL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> humana

A seqüência de nucleotídeo codificando os aminoácidos 116-269 de IL-1 $\beta$  humana (hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub>) foi amplificada através de PCR a partir de uma biblioteca de cDNA de tecido de fígado humano usando oligonucleotídeos HIL-1 (5'-ATATATGATATCCCTGTACGATCACTGAACTGCACG-3'; SEQ ID NO:124) e HIL-2 (5'-ATATATCTCGAGGGAAGACACAAATTGCATGGTGAAG-3'; SEQ ID NO:125), digerida com XhoI e EcoRV e clonada no vetor de expressão pET42T(+).

Plasmídeo pET-42T(+) foi construído substituindo a região integral entre o promotor T7 e o terminador T7 de pET-42a(+) (Novagen) em duas etapas por novas seqüências ligantes, que facilita a expressão de uma proteína de interesse como uma fusão com um *tag* C-terminal (SEQ ID NO:190) compreendendo um His-*tag* e um ligante contendo cisteína. Em uma primeira etapa o plasmídeo pET-42a(+) foi digerido com as enzimas de restrição NdeI e AvrII, liberando um fragmento de 958 pb entre o promotor T7 e o terminador T7 composto de GST-*tag*, S-*tag*, dois His-*tag* e o sítio de clonagem múltiplo. O fragmento de 4972 pb residual contendo a estrutura principal do vetor de pET-42a(+) foi isolado e ligado aos oligonucleotídeos complementares anelados 42-1 (5'-TATGGATATCGAATTCAAGCTTCTGCAGCTGCTCGAGTAATTGATTAC-3'; SEQ ID NO:126) e 42-2 (5'-CTAGGTAATCAATTACTIONCGAGCAGCTGCAGAAGCTTGAATTCGATATCCA-3'-SEQ ID NO:127), dando origem ao plasmídeo pET-42S(+). Na segunda etapa o plasmídeo pET-42S(+) foi linearizado através de digestão com enzimas de restrição XhoI e AvrII, e ligado aos oligonucleotídeos anelados complementares 42T-1 (5'-TCGAGCACCACCACCACCACGGTGGTTGCTAA TAATAATTGATTAATAC-3'; SEQ ID NO:128) e 42T-2 (5'-CTAGGTATTAA

TCAATTATTATTAGCAACCACCGTGGTGGTGGTGGTGGTGC-3'; SEQ ID NO:129), resultando em plasmídeo pET-42T(+).

A clonagem do fragmento de hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> acima mencionado em pET-42T(+) deu origem ao plasmídeo pET42T-1 $\beta$ <sub>116-269</sub>. Este plasmídeo codifica uma proteína de fusão correspondendo à IL-1 $\beta$  humana madura e um His-tag e um ligante contendo cisteína C-terminal (GGC, SEQ ID NO:178). Deste modo, a proteína de fusão consiste em SEQ ID NO:190 C-terminalmente fundida à SEQ ID NO:165. O resíduo alanina original na posição 117 de IL-1 $\beta$  humana foi mudado para isoleucina nesta proteína de fusão. Expressão e purificação de proteína IL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> foram realizadas essencialmente conforme descrito para a proteína mL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> de murino no EXEMPLO 1.

#### **B. Clonagem, expressão e purificação de muteínas de IL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> humana**

Através de mutagênese direcionada ao sítio do plasmídeo PET42T-hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub>, vetores de expressão para dez proteínas de fusão IL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> humanas mutantes diferentes foram construídos. Para este objetivo, o Quik-Change<sup>®</sup> Site directed mutagenesis kit (Stratagene) foi usado de acordo com as instruções do fabricante. Os vetores de expressão para essas proteínas IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> mutantes são listados na Tabela 3 junto com os pares de oligonucleotídeo usados para sua construção. Expressão e purificação das muteínas de IL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> humana diferentes foram realizadas conforme descrito no EXEMPLO 1.

**Tabela 3:** Visão geral de muteínas de IL-1, vetores de expressão e oligonucleotídeos usados para sua construção

Vetor de expressão	Sequência de muteína (sem tag de purificação)	Par de oligonucleotídeo
pET42T-hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> (R4D)	hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> (R4D) (SEQ-ID No:131)	R4D-1 (5'-CATATGGATATCCCTGTAGA CTCACTGAAC TGCACGCTC-3'; SEQ-ID No:143); R4D-2 (5'-GAGCGTGCAG TTCAGTGAGT CTACAGGGAT ATCCATATG-3'; SEQ-ID No:144)
pET42T-hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> (L6A)	hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> (L6A) (SEQ-ID No:132)	L6A-1(5'-GATATCCCTGTACGATCAGC TAACTGCACGCTCCGGGAC-3'; SEQ-ID No:145); L6A-2 (5'-GTCCCGGAGC GTGCAGTTAG CTGATCGTAC AGGGATATC-3'; SEQ-ID No:146)
pET42T-hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> (T9G)	hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> (T9G) (SEQ-ID No:133)	T9G-1(5'-GTACGATCAC TGAAGTGGG TCTCCGGGAC TCACAGC-3'; SEQ-ID No: 147) T9G-2 (5'-GCTGTGAGTC CCGGAGACCG CAGTTCAGTG ATCGTAC-3'; SEQ-ID No: 148)
pET42T-hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> (R11G)	hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> (R11G) (SEQ-ID No:134)	R11G-1 (5'-GAACTGCACG CTCGGGGACT CACAGC-3'; SEQ-ID No:149) R11G-2 (5'-GCTGTGAGTC CCCGAGCGTG CAGTTC-3'; SEQ-ID NO:150)
pET42T-hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> (D54R)	hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> (D54R) (SEQ-ID NO:135)	D54R-1 (5'- CAAGGAGAAGAAAGTAATCGCAAATACC GTGGC CTTG-3'; SEQ-ID NO:151 D54R-2 (5'- CAAGGCCACAGGTATTTTGCATTACTTT TTCTCCT TG-3'; SEQ-ID NO:152)
pET42T-hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> (D145K)	hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> (D145K) (SEQ-ID NO: 136)	D145K-1 (5'- GCGGCCAGGATATAACTAAATTCACCATG AATTTG TGTC-3'; SEQ-ID NO:161) D145K-2 (5'- GACACAAATTGCATGGTGAATTTAGTTATA CCTGG CCGC-3'; SEQ-ID NO:162)
pET42T-hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> ( $\Delta$ EE <sup>50,51</sup> )	hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> ( $\Delta$ EE50,51)  (SEQ-ID NO: 137)	EE-1 (5'- CATGTCCTTTGTACAAGGAAGTAATGACA AATACC TGTG-3'; SEQ-ID NO:153) EE-2 (5'-

## Continuação

		CACAGGTATTTTGTCACTTCTCCTTGTA- CAAAGGAC ATG-3'; SEQ-ID NO:154)
pET42T-hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> ( $\Delta$ SND <sup>52-54</sup> )	hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> ( $\Delta$ SND52-54)  (SEQ-ID NO:138)	SND-1 (5'- CTTTGTACAAGGAGAAGAAAAATACCTG TGGCCTT G-3'; SEQ-ID NO:155) SND-2 (5'- CAAGGCCACAGGTATTTTTCTTCTCCTT GTACAAAG -3'; SEQ-ID NO:156)
pET42T-hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> (K63S/K65S)	hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> (K63S/K65S)  (SEQ-ID NO: 139)	K6365S-1 (5'- GTGGCCTTGGGCCTCAGCGAAAGCAATC TGTACCTG TCCTG-3'; SEQ-ID NO:157) K6365S-2 (5'- CAGGACAGGTACAGATTGCTTTCGCTGAG GCCCAAG GCCAC-3'; SEQ-IDNO:158)
pET42T-hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> (Q126A1E128A)	hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> (Q126A1E128A)  (SEQ-ID NO:140)	QE-1 (5'- GTACATCAGCACCTCTGCAGCAGCAAAC ATGCCCGT CTTC-3'; SEQ-ID NO:159) QE-2 (5'- GAAGACGGGCATGTTTGCTGCTGCAGAG GTGCTGAT GTAC-3'; SEQ-ID NO: 160)

EXEMPLO 11**Atividade biológica de IL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> humana e muteínas de IL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> humana**

- 5 Três camundongos fêmea C3H/HeJ por grupo são injetados intravenosamente com 10  $\mu$ g ou de proteína IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> humana do tipo selvagem ou uma das muteínas de proteína IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> humana do EXEMPLO 10. Amostras de soro são retiradas antes e 3 h após injeção e analisadas quanto
- 10 camundongos injetados com a proteína IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> humana do tipo selvagem mostram um aumento forte em concentrações de IL-6 no soro, enquanto camundongos injetados com qualquer uma das proteínas de muteína de IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> humana mostram apenas um aumento leve ou nenhum aumento de modo algum.

15 EXEMPLO 12**A. Acoplamento de IL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> humana e muteínas de IL-**



### **IL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> humana a partículas do tipo vírus**

Ligação com cruzamento química da proteína IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> humana do tipo selvagem e as muteínas de IL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> humana do EXEMPLO 10 a partículas do tipo vírus Q $\beta$  foi realizada essencialmente conforme descrito no EXEMPLO 2A.

### **B. Imunização de camundongos com IL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> e muteínas de IL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> acopladas a capsídeo Q $\beta$**

Quatro camundongos balb/c fêmeas por grupo foram imunizados com Q $\beta$  acoplada ou à proteína hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> do tipo selvagem ou uma das proteínas de muteína de hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub>. Cinquenta  $\mu$ g de proteína total foram diluídos em PBS para 200  $\mu$ l e injetados subcutaneamente (100  $\mu$ l em dois lados ventrais) nos dias 0, 14 e 28. Os camundongos foram sangrados retroorbitalmente no dia 35, e soros foram analisados usando ELISAs específicos ou para a respectiva muteína de IL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> humana usada como imunógeno ou a proteína IL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> humana do tipo selvagem.

### **C. ELISA**

Placas de ELISA foram revestidas ou com a proteína hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> do tipo selvagem ou a respectiva muteína de hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> em uma concentração de 1  $\mu$ g/ml. As placas foram bloqueadas e então incubadas com soros de camundongo serialmente diluídos do dia 35. Anticorpos ligados foram detectados com anticorpo IgG anticamundongo enzimaticamente marcados. Títulos de anticorpo de soros de camundongo foram calculados como a média daquelas diluições que levaram à densidade óptica médio máxima a 450 nm, e são mostrados na Tabela 4.

**Tabela 4:** Títulos de IgG específico anti-hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> (tipo selvagem e muteína) criado pela imunização com vacinas de Q $\beta$ -hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> ou muteína de Q $\beta$ -hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub>.

Vacina	Título de IgG do tipo selvagem anti-hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> médio ( $\pm$ SD)	Título de IgG de muteína anti-hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> médio ( $\pm$ SD)
Q $\beta$ -hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub>	253325 $\pm$ 184813	-/-
Q $\beta$ -hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> (R4D)	231879 $\pm$ 115475	160666 $\pm$ 79478
Q $\beta$ -hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> (L6A)	120224 $\pm$ 7658	89377 $\pm$ 1-7965
Q $\beta$ -hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> (T9G)	261249 $\pm$ 153716	224809 $\pm$ 131823
Q $\beta$ -hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> (R11 G)	278342 $\pm$ 50296	279290 $\pm$ 47232
Q $\beta$ -hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> (D54R)	269807 $\pm$ 122351	206516 $\pm$ 90998
Q $\beta$ -hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> (D145K)	78365 $\pm$ 26983	93241 $\pm$ 28856
Q $\beta$ -hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> ( $\Delta$ EE <sup>50,51</sup> )	287625 $\pm$ 143835	229862 $\pm$ 140169
Q $\beta$ -hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> ( $\Delta$ SND <sup>52-54</sup> )	68895 $\pm$ 14267	106116 $\pm$ 25295
Q $\beta$ -hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> (K62S/K65S)	403712 $\pm$ 402594	244552 $\pm$ 173597
Q $\beta$ -hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> (Q126A/E128A)	195165 $\pm$ 71436	170434 $\pm$ 86831

- 5 Imunização com Q $\beta$ -hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> induziu títulos altos de anticorpos IgG contra hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub>. Além disso, vacinação com qualquer uma das vacinas de muteína de Q $\beta$ -hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> induziu títulos de IgG altos contra ambas a muteína de hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> usada como imunógeno e a proteína hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> do tipo selvagem.

#### D. Neutralização de IL-1 $\beta$ humana *in vivo*

- 10 Soros de camundongos imunizados com Q $\beta$  acoplado ou à proteína hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> do tipo selvagem ou a uma das muteínas de hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> foram testados quanto à sua habilidade em inibir a ligação de proteína IL-1 $\beta$  humana a seu receptor. Placas de ELISA foram então revestidas com uma proteína de fusão IL-1receptorI-hFc humana em uma concentração de 1
- 15  $\mu$ g/ml e co-incubadas com diluições seriais dos soros acima mencionados e 100 ng/ml de proteína hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub>. Ligação de hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> à proteína de fusão IL-1receptorI-hFc humana imobilizada foi detectada com um anticorpo IL-1 $\beta$  anti-humano biotilado e estreptavidina conjugada à peroxidase do rábano de cavalo. Todos os soros criados contra vacinas de muteína de Q $\beta$ -
- 20 hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> inibiram completamente a ligação de 100 ng/ml de hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> do tipo selvagem a hIL-1R1 em concentrações no soro  $\geq$ 3,3%.

### E. Neutralização de IL-1 $\beta$ *in vivo*

A capacidade de neutralização *in vivo* dos anticorpos criados pela imunização com Q $\beta$  acoplada o ou proteína hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> do tipo selvagem ou a uma das muteínas de hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> é investigada. Três camundongos C3H/HeJ fêmeas por grupo são então imunizados três vezes nos dias 0, 5 14 e 28 com 50  $\mu$ g de qualquer vacina. No dia 35 todos os camundongos imunizados são injetados intravenosamente com 1  $\mu$ g de hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> do tipo selvagem livre. Como um controle três camundongos puros (*naïve*) são injetados ao mesmo tempo com a mesma quantidade de hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> do tipo 10 selvagem. Como leitura da atividade inflamatória da Q $\beta$ -hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> injetada, amostras de soro são retiradas imediatamente antes e 3 horas após injeção e analisadas quanto ao aumento relativo na concentração da citocina pró-inflamatória IL-6. Enquanto camundongos puros mostram um aumento forte em concentrações no soro 3 h após injeção de hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub>, todos os ca- 15 mundongos imunizados com Q $\beta$  acoplado à proteína hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> do tipo selvagem ou a uma das muteínas de -hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> não mostram nenhum aumento de IL-6 no soro, indicando que a hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> injetada é eficientemente neutralizada pelos anticorpos induzidos pelas vacinas.

#### EXEMPLO 13

### 20 **Melhora de inflamação induzida por MSU através da imunização com Q $\beta$ -mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub>**

Gota é um distúrbio inflamatório doloroso causado pela precipitação de cristais de urato monossódico (MSU) em juntas e tecidos periarticulares. Cristais de MSU foram mostrados ativar a então chamada *inflammasome* NALP3, resultando na produção de IL-1 $\beta$ a ativa, que é principal- 25 mente responsável pela iniciação e promoção da resposta inflamatória característica da doença. Camundongos C57BL/6 (5 por grupo) são imunizados subcutaneamente três vezes em intervalos de duas semanas com 50  $\mu$ g de Q $\beta$ -hIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> ou 50  $\mu$ g de VLPs de Q $\beta$  sozinho. Uma semana após a 30 última imunização todos os camundongos foram provocados intraperitonealmente com 1,5 mg de cristais de MSU. Seis horas após a provocação os camundongos são sacrificados e números de neutrófilos bem como as con-

centrações dos quimioatraentes de neutrófilo KC e MIP-2 são medidos em exudatos peritoneais. Camundongos imunizados com Q $\beta$ -mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> mostram neutrofilia e concentrações de MIP-2 e KC acentuadamente reduzidas, quando comparados com controles imunizados com Q $\beta$ .

#### 5 EXEMPLO 14

##### **Melhora de encefalite auto-imune experimental através da imunização com Q $\beta$ -mIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub>**

Em um modelo de camundongo para esclerose múltipla, camundongos C57BL/6 (8 por grupo) são imunizados subcutaneamente três vezes em intervalos de duas semanas com 50  $\mu$ g de Q $\beta$ -hIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> ou 50  $\mu$ g de VLPs de Q $\beta$  sozinho. Uma semana após a última imunização, todos os camundongos são injetados subcutaneamente com 100  $\mu$ g de peptídeo MOG (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK, SEQ ID NO:191) misturado com adjuvante de Freund completo. No mesmo dia e dois dias depois todos os camundongos são injetados intraperitonealmente com 400 ng de toxina *pertussis*. Os camundongos são classificados em uma base diária quanto ao desenvolvimento de sintomas neurológicos de acordo com o esquema que segue: 0, nenhuma doença clínica; 0,5, final da cauda fraco; 1, cauda completamente fraca; 1,5, cauda fraca e fraqueza do membro traseiro (caminhar instável e apoio pobre das patas traseiras); 2, paralisia do membro traseiro parcial unilateral; 2,5, paralisia do membro traseiro parcial bilateral; 3, paralisia do membro traseiro bilateral completa; 3,5, paralisia do membro traseiro bilateral completa e paralisia do membro frontal unilateral; 4, paralisia total dos membros traseiros e frontais. Camundongos imunizados com Q $\beta$ -hIL-1 $\beta$ <sub>119-269</sub> mostram sintomas clínicos claramente reduzidos quando comparado com camundongos imunizados com Q $\beta$ .

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Cytos Biotechnology AG  
 Bachmann, Martin  
 Spohn, Gunther

<120> COMPOSIÇÃO CONTENDO CONJUGADOS DE INTERLEUCINA-1, SEUS USOS, PROCESSO DE PRODUÇÃO, VACINA E MÉTODO DE IMUNIZAÇÃO

<130> P1051PC00

<150> 60/721,106

<151> 2005-09-28

<160> 195

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 185

<212> PRT

<213> Vírus da Hepatite B

<400> 1

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu  
 1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp  
 20 25 30

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys  
 35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu  
 50 55 60

Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Asn Asn Leu Glu Asp Pro Ala  
 65 70 75 80

Ser Arg Asp Leu Val Val Asn Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys  
 85 90 95

Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg  
 100 105 110

Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr  
 115 120 125

Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro  
 130 135 140

Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Asp Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg  
 145 150 155 160

Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg  
 165 170 175

Arg Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys  
 180 185

<210> 2

<211> 188

<212> PRT

<213> Vírus da Hepatite B

<400> 2

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu  
 1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp  
 20 25 30

Thr Ala Ala Ala Leu Tyr Arg Asp Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys  
                   35                                  40                                  45  
 Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Asp  
           50                                  55                                  60  
 Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Thr Asn Leu Glu Asp Gly Gly  
 65                                  70                                  75                                  80  
 Lys Gly Gly Ser Arg Asp Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Val  
                                   85                                  90                                  95  
 Gly Leu Lys Phe Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr  
                   100                                  105                                  110  
 Phe Gly Arg Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp  
           115                                  120                                  125  
 Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser  
           130                                  135                                  140  
 Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Asp Arg Gly Arg Ser  
 145                                  150                                  155                                  160  
 Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro  
                                   165                                  170                                  175  
 Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys  
                   180                                  185

<210> 3

<211> 132

<212> PRT

<213> Bacteriófago Qbeta

<400> 3

Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly Lys  
 1                  5                                  10                                  15  
 Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val  
                   20                                  25                                  30  
 Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val  
           35                                  40                                  45  
 Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val  
           50                                  55                                  60  
 Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys  
 65                                  70                                  75                                  80  
 Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Ala Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe  
                                   85                                  90                                  95  
 Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu  
                   100                                  105                                  110  
 Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu  
           115                                  120                                  125  
 Asn Pro Ala Tyr  
           130

<210> 4

<211> 329

<212> PRT

<213> Bacteriófago Qbeta

<400> 4

Met Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly  
 1 5 10 15  
 Lys Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly  
 20 25 30  
 Val Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg  
 35 40 45  
 Val Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys  
 50 55 60  
 Val Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser  
 65 70 75 80  
 Cys Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Ala Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser  
 85 90 95  
 Phe Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu  
 100 105 110  
 Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln  
 115 120 125  
 Leu Asn Pro Ala Tyr Trp Thr Leu Leu Ile Ala Gly Gly Gly Ser Gly  
 130 135 140  
 Ser Lys Pro Asp Pro Val Ile Pro Asp Pro Pro Ile Asp Pro Pro Pro  
 145 150 155 160  
 Gly Thr Gly Lys Tyr Thr Cys Pro Phe Ala Ile Trp Ser Leu Glu Glu  
 165 170 175  
 Val Tyr Glu Pro Pro Thr Lys Asn Arg Pro Trp Pro Ile Tyr Asn Ala  
 180 185 190  
 Val Glu Leu Gln Pro Arg Glu Phe Asp Val Ala Leu Lys Asp Leu Leu  
 195 200 205  
 Gly Asn Thr Lys Trp Arg Asp Trp Asp Ser Arg Leu Ser Tyr Thr Thr  
 210 215 220  
 Phe Arg Gly Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Ile Asp Leu Asp Ala Thr Tyr  
 225 230 235 240  
 Leu Ala Thr Asp Gln Ala Met Arg Asp Gln Lys Tyr Asp Ile Arg Glu  
 245 250 255  
 Gly Lys Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asn Ile Glu Arg Phe Ile Tyr Leu  
 260 265 270  
 Lys Ser Ile Asn Ala Tyr Cys Ser Leu Ser Asp Ile Ala Ala Tyr His  
 275 280 285  
 Ala Asp Gly Val Ile Val Gly Phe Trp Arg Asp Pro Ser Ser Gly Gly  
 290 295 300  
 Ala Ile Pro Phe Asp Phe Thr Lys Phe Asp Lys Thr Lys Cys Pro Ile  
 305 310 315 320  
 Gln Ala Val Ile Val Val Pro Arg Ala  
 325

<210> 5  
 <211> 129  
 <212> PRT  
 <213> Bacteriófago R17

&lt;400&gt; 5

Ala Ser Asn Phe Thr Gln Phe Val Leu Val Asn Asp Gly Gly Thr Gly  
1 5 10 15

Asn Val Thr Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu Trp  
20 25 30

Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser Val  
35 40 45

Arg Gln Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu Val  
50 55 60

Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val Glu Leu Pro Val Ala  
65 70 75 80

Ala Trp Arg Ser Tyr Leu Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Ile Phe Ala  
85 90 95

Thr Asn Ser Asp Cys Glu Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu Leu  
100 105 110

Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly Ile  
115 120 125

Tyr

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 130

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacteriófago fr

&lt;400&gt; 6

Met Ala Ser Asn Phe Glu Glu Phe Val Leu Val Asp Asn Gly Gly Thr  
1 5 10 15

Gly Asp Val Lys Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu  
20 25 30

Trp Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser  
35 40 45

Val Arg Gln Ser Ser Ala Asn Asn Arg Lys Tyr Thr Val Lys Val Glu  
50 55 60

Val Pro Lys Val Ala Thr Gln Val Gln Gly Gly Val Glu Leu Pro Val  
65 70 75 80

Ala Ala Trp Arg Ser Tyr Met Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Val Phe  
85 90 95

Ala Thr Asn Asp Asp Cys Ala Leu Ile Val Lys Ala Leu Gln Gly Thr  
100 105 110

Phe Lys Thr Gly Asn Pro Ile Ala Thr Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly  
115 120 125

Ile Tyr  
130

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 130

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacteriófago GA

&lt;400&gt; 7

Met Ala Thr Leu Arg Ser Phe Val Leu Val Asp Asn Gly Gly Thr Gly  
1 5 10 15



Asn Val Thr Val Val Pro Val Ser Asn Ala Asn Gly Val Ala Glu Trp  
 20 25 30  
 Leu Ser Asn Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Arg Val Thr Ala Ser Tyr  
 35 40 45  
 Arg Ala Ser Gly Ala Asp Lys Arg Lys Tyr Ala Ile Lys Leu Glu Val  
 50 55 60  
 Pro Lys Ile Val Thr Gln Val Val Asn Gly Val Glu Leu Pro Gly Ser  
 65 70 75 80  
 Ala Trp Lys Ala Tyr Ala Ser Ile Asp Leu Thr Ile Pro Ile Phe Ala  
 85 90 95  
 Ala Thr Asp Asp Val Thr Val Ile Ser Lys Ser Leu Ala Gly Leu Phe  
 100 105 110  
 Lys Val Gly Asn Pro Ile Ala Glu Ala Ile Ser Ser Gln Ser Gly Phe  
 115 120 125

Tyr Ala  
 130

<210> 8

<211> 132

<212> PRT

<213> Bacteriófago SP

<400> 8

Met Ala Lys Leu Asn Gln Val Thr Leu Ser Lys Ile Gly Lys Asn Gly  
 1 5 10 15

Asp Gln Thr Leu Thr Leu Thr Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly  
 20 25 30

Val Ala Ser Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg  
 35 40 45

Val Thr Val Ser Val Ala Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Phe Lys  
 50 55 60

Val Gln Ile Lys Leu Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Arg Asp Ala Cys  
 65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Phe Ala Asp Val Thr Leu Ser Phe  
 85 90 95

Thr Ser Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Leu Ile Arg Thr Glu Leu  
 100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Asp Pro Leu Ile Val Asp Ala Ile Asp Asn Leu  
 115 120 125

Asn Pro Ala Tyr  
 130

<210> 9

<211> 329

<212> PRT

<213> Bacteriófago SP

<400> 9

Ala Lys Leu Asn Gln Val Thr Leu Ser Lys Ile Gly Lys Asn Gly Asp  
 1 5 10 15

Gln Thr Leu Thr Leu Thr Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val  
 20 25 30

Ala Ser Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val  
 35 40 45  
 Thr Val Ser Val Ala Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Phe Lys Val  
 50 55 60  
 Gln Ile Lys Leu Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Arg Asp Ala Cys Asp  
 65 70 75 80  
 Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Phe Ala Asp Val Thr Leu Ser Phe Thr  
 85 90 95  
 Ser Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Leu Ile Arg Thr Glu Leu Ala  
 100 105 110  
 Ala Leu Leu Ala Asp Pro Leu Ile Val Asp Ala Ile Asp Asn Leu Asn  
 115 120 125  
 Pro Ala Tyr Trp Ala Ala Leu Leu Val Ala Ser Ser Gly Gly Gly Asp  
 130 135 140  
 Asn Pro Ser Asp Pro Asp Val Pro Val Val Pro Asp Val Lys Pro Pro  
 145 150 155 160  
 Asp Gly Thr Gly Arg Tyr Lys Cys Pro Phe Ala Cys Tyr Arg Leu Gly  
 165 170 175  
 Ser Ile Tyr Glu Val Gly Lys Glu Gly Ser Pro Asp Ile Tyr Glu Arg  
 180 185 190  
 Gly Asp Glu Val Ser Val Thr Phe Asp Tyr Ala Leu Glu Asp Phe Leu  
 195 200 205  
 Gly Asn Thr Asn Trp Arg Asn Trp Asp Gln Arg Leu Ser Asp Tyr Asp  
 210 215 220  
 Ile Ala Asn Arg Arg Arg Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Ile Asp Leu Asp  
 225 230 235 240  
 Ala Thr Ala Met Gln Ser Asp Asp Phe Val Leu Ser Gly Arg Tyr Gly  
 245 250 255  
 Val Arg Lys Val Lys Phe Pro Gly Ala Phe Gly Ser Ile Lys Tyr Leu  
 260 265 270  
 Leu Asn Ile Gln Gly Asp Ala Trp Leu Asp Leu Ser Glu Val Thr Ala  
 275 280 285  
 Tyr Arg Ser Tyr Gly Met Val Ile Gly Phe Trp Thr Asp Ser Lys Ser  
 290 295 300  
 Pro Gln Leu Pro Thr Asp Phe Thr Gln Phe Asn Ser Ala Asn Cys Pro  
 305 310 315 320  
 Val Gln Thr Val Ile Ile Ile Pro Ser  
 325  
 <210> 10  
 <211> 130  
 <212> PRT  
 <213> Bacteriófago MS2  
 <400> 10  
 Met Ala Ser Asn Phe Thr Gln Phe Val Leu Val Asp Asn Gly Gly Thr  
 1 5 10 15  
 Gly Asp Val Thr Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu  
 20 25 30

Trp Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser  
35 40 45

Val Arg Gln Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu  
50 55 60

Val Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val Glu Leu Pro Val  
65 70 75 80

Ala Ala Trp Arg Ser Tyr Leu Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Ile Phe  
85 90 95

Ala Thr Asn Ser Asp Cys Glu Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu  
100 105 110

Leu Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly  
115 120 125

Ile Tyr  
130

<210> 11  
<211> 133  
<212> PRT  
<213> Bacteriófago M11  
<400> 11

Met Ala Lys Leu Gln Ala Ile Thr Leu Ser Gly Ile Gly Lys Lys Gly  
1 5 10 15

Asp Val Thr Leu Asp Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly  
20 25 30

Val Ala Ala Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg  
35 40 45

Val Thr Ile Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys  
50 55 60

Val Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ser Cys Thr Ala Ser Gly Thr  
65 70 75 80

Cys Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Tyr Ser Asp Val Thr Phe Ser  
85 90 95

Phe Thr Gln Tyr Ser Thr Val Glu Glu Arg Ala Leu Val Arg Thr Glu  
100 105 110

Leu Gln Ala Leu Leu Ala Asp Pro Met Leu Val Asn Ala Ile Asp Asn  
115 120 125

Leu Asn Pro Ala Tyr  
130

<210> 12  
<211> 133  
<212> PRT  
<213> Bacteriófago MX1  
<400> 12

Met Ala Lys Leu Gln Ala Ile Thr Leu Ser Gly Ile Gly Lys Asn Gly  
1 5 10 15

Asp Val Thr Leu Asn Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly  
20 25 30

Val Ala Ala Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg  
35 40 45

Val Thr Ile Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys  
50 55 60

Val Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ser Cys Thr Ala Ser Gly Thr  
65 70 75 80

Cys Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser  
85 90 95

Phe Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Leu Val Arg Thr Glu  
100 105 110

Leu Lys Ala Leu Leu Ala Asp Pro Met Leu Ile Asp Ala Ile Asp Asn  
115 120 125

Leu Asn Pro Ala Tyr  
130

<210> 13

<211> 330

<212> PRT

<213> Bacteriófago NL95

<400> 13

Met Ala Lys Leu Asn Lys Val Thr Leu Thr Gly Ile Gly Lys Ala Gly  
1 5 10 15

Asn Gln Thr Leu Thr Leu Thr Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly  
20 25 30

Val Ala Ser Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg  
35 40 45

Val Thr Val Ser Val Ala Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys  
50 55 60

Val Gln Ile Lys Leu Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Lys Asp Ala Cys  
65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Gly Ser Arg Asp Val Thr Leu Ser Phe  
85 90 95

Thr Ser Tyr Ser Thr Glu Arg Glu Arg Ala Leu Ile Arg Thr Glu Leu  
100 105 110

Ala Ala Leu Leu Lys Asp Asp Leu Ile Val Asp Ala Ile Asp Asn Leu  
115 120 125

Asn Pro Ala Tyr Trp Ala Ala Leu Leu Ala Ala Ser Pro Gly Gly Gly  
130 135 140

Asn Asn Pro Tyr Pro Gly Val Pro Asp Ser Pro Asn Val Lys Pro Pro  
145 150 155 160

Gly Gly Thr Gly Thr Tyr Arg Cys Pro Phe Ala Cys Tyr Arg Arg Gly  
165 170 175

Glu Leu Ile Thr Glu Ala Lys Asp Gly Ala Cys Ala Leu Tyr Ala Cys  
180 185 190

Gly Ser Glu Ala Leu Val Glu Phe Glu Tyr Ala Leu Glu Asp Phe Leu  
195 200 205

Gly Asn Glu Phe Trp Arg Asn Trp Asp Gly Arg Leu Ser Lys Tyr Asp  
210 215 220

Ile Glu Thr His Arg Arg Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Val Asp Leu Asp  
225 230 235 240

Ala Ser Val Met Gln Ser Asp Glu Tyr Val Leu Ser Gly Ala Tyr Asp  
 245 250 255

Val Val Lys Met Gln Pro Pro Gly Thr Phe Asp Ser Pro Arg Tyr Tyr  
 260 265 270

Leu His Leu Met Asp Gly Ile Tyr Val Asp Leu Ala Glu Val Thr Ala  
 275 280 285

Tyr Arg Ser Tyr Gly Met Val Ile Gly Phe Trp Thr Asp Ser Lys Ser  
 290 295 300

Pro Gln Leu Pro Thr Asp Phe Thr Arg Phe Asn Arg His Asn Cys Pro  
 305 310 315 320

Val Gln Thr Val Ile Val Ile Pro Ser Leu  
 325 330

<210> 14

<211> 129

<212> PRT

<213> Bacteriófago f2

<400> 14

Ala Ser Asn Phe Thr Gln Phe Val Leu Val Asn Asp Gly Gly Thr Gly  
 1 5 10 15

Asn Val Thr Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu Trp  
 20 25 30

Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser Val  
 35 40 45

Arg Gln Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu Val  
 50 55 60

Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val Glu Leu Pro Val Ala  
 65 70 75 80

Ala Trp Arg Ser Tyr Leu Asn Leu Glu Leu Thr Ile Pro Ile Phe Ala  
 85 90 95

Thr Asn Ser Asp Cys Glu Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu Leu  
 100 105 110

Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly Ile  
 115 120 125

Tyr

<210> 15

<211> 128

<212> PRT

<213> Bacteriófago PP7

<400> 15

Met Ser Lys Thr Ile Val Leu Ser Val Gly Glu Ala Thr Arg Thr Leu  
 1 5 10 15

Thr Glu Ile Gln Ser Thr Ala Asp Arg Gln Ile Phe Glu Glu Lys Val  
 20 25 30

Gly Pro Leu Val Gly Arg Leu Arg Leu Thr Ala Ser Leu Arg Gln Asn  
 35 40 45

Gly Ala Lys Thr Ala Tyr Arg Val Asn Leu Lys Leu Asp Gln Ala Asp  
 50 55 60

Val Val Asp Cys Ser Thr Ser Val Cys Gly Glu Leu Pro Lys Val Arg  
65 70 75 80

Tyr Thr Gln Val Trp Ser His Asp Val Thr Ile Val Ala Asn Ser Thr  
85 90 95

Glu Ala Ser Arg Lys Ser Leu Tyr Asp Leu Thr Lys Ser Leu Val Ala  
100 105 110

Thr Ser Gln Val Glu Asp Leu Val Val Asn Leu Val Pro Leu Gly Arg  
115 120 125

<210> 16

<211> 132

<212> PRT

<213> Bacteriófago Qbeta

<400> 16

Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Arg Asp Gly Lys  
1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val  
20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val  
35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val  
50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys  
65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe  
85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu  
100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu  
115 120 125

Asn Pro Ala Tyr  
130

<210> 17

<211> 132

<212> PRT

<213> Bacteriófago Qbeta

<400> 17

Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Lys Ile Gly Lys Asp Gly Lys  
1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val  
20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val  
35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val  
50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys  
65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe  
85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu  
 100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu  
 115 120 125

Asn Pro Ala Tyr  
 130

<210> 18

<211> 132

<212> PRT

<213> Bacteriófago Qbeta

<400> 18

Ala Arg Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Arg Asp Gly Lys  
 1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val  
 20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val  
 35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val  
 50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys  
 65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe  
 85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu  
 100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu  
 115 120 125

Asn Pro Ala Tyr  
 130

<210> 19

<211> 132

<212> PRT

<213> Bacteriófago Qbeta

<400> 19

Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly Arg  
 1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val  
 20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val  
 35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val  
 50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys  
 65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe  
 85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu  
 100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu  
 115 120 125

Asn Pro Ala Tyr  
 130

<210> 20

<211> 132

<212> PRT

<213> Bacteriófago Qbeta

<400> 20

Ala Arg Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly Arg  
 1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val  
 20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val  
 35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val  
 50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys  
 65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe  
 85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu  
 100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu  
 115 120 125

Asn Pro Ala Tyr  
 130

<210> 21

<211> 131

<212> PRT

<213> Bacteriófago AP205

<400> 21

Met Ala Asn Lys Pro Met Gln Pro Ile Thr Ser Thr Ala Asn Lys Ile  
 1 5 10 15

Val Trp Ser Asp Pro Thr Arg Leu Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ser Leu  
 20 25 30

Leu Arg Gln Arg Val Lys Val Gly Ile Ala Glu Leu Asn Asn Val Ser  
 35 40 45

Gly Gln Tyr Val Ser Val Tyr Lys Arg Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gly  
 50 55 60

Cys Ala Asp Ala Cys Val Ile Met Pro Asn Glu Asn Gln Ser Ile Arg  
 65 70 75 80

Thr Val Ile Ser Gly Ser Ala Glu Asn Leu Ala Thr Leu Lys Ala Glu  
 85 90 95

Trp Glu Thr His Lys Arg Asn Val Asp Thr Leu Phe Ala Ser Gly Asn  
 100 105 110

Ala Gly Leu Gly Phe Leu Asp Pro Thr Ala Ala Ile Val Ser Ser Asp  
 115 120 125



Thr Thr Ala  
130

<210> 22

<211> 131

<212> PRT

<213> Bacteriófago AP205

<400> 22

Met Ala Asn Lys Thr Met Gln Pro Ile Thr Ser Thr Ala Asn Lys Ile  
1 5 10 15

Val Trp Ser Asp Pro Thr Arg Leu Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ser Leu  
20 25 30

Leu Arg Gln Arg Val Lys Val Gly Ile Ala Glu Leu Asn Asn Val Ser  
35 40 45

Gly Gln Tyr Val Ser Val Tyr Lys Arg Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gly  
50 55 60

Cys Ala Asp Ala Cys Val Ile Met Pro Asn Glu Asn Gln Ser Ile Arg  
65 70 75 80

Thr Val Ile Ser Gly Ser Ala Glu Asn Leu Ala Thr Leu Lys Ala Glu  
85 90 95

Trp Glu Thr His Lys Arg Asn Val Asp Thr Leu Phe Ala Ser Gly Asn  
100 105 110

Ala Gly Leu Gly Phe Leu Asp Pro Thr Ala Ala Ile Val Ser Ser Asp  
115 120 125

Thr Thr Ala  
130

<210> 23

<211> 131

<212> PRT

<213> Bacteriófago AP205

<400> 23

Met Ala Asn Lys Pro Met Gln Pro Ile Thr Ser Thr Ala Asp Lys Ile  
1 5 10 15

Val Trp Ser Asp Pro Thr Arg Leu Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ser Leu  
20 25 30

Leu Arg Gln Arg Val Lys Val Gly Ile Ala Glu Leu Asn Asn Val Ser  
35 40 45

Gly Gln Tyr Val Ser Val Tyr Lys Arg Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gly  
50 55 60

Cys Ala Asp Ala Cys Val Ile Met Pro Asn Glu Asn Gln Ser Ile Arg  
65 70 75 80

Thr Val Ile Ser Gly Ser Ala Glu Asn Leu Ala Thr Leu Lys Ala Glu  
85 90 95

Trp Glu Thr His Lys Arg Asn Val Asp Thr Leu Phe Ala Ser Gly Asn  
100 105 110

Ala Gly Leu Gly Phe Leu Asp Pro Thr Ala Ala Ile Val Ser Ser Asp  
115 120 125

Thr Thr Ala  
130

<210> 24  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência artificial  
 <220>  
 <223> Iniciador de PCR  
 <400> 24  
 atatatgcta gcccttaca cctaccagag tgatttg 37

<210> 25  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência artificial  
 <220>  
 <223> Iniciador de PCR  
 <400> 25  
 atatatctcg agtgatatct ggaagtctgt catagag 37

<210> 26  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência artificial  
 <220>  
 <223> Iniciador de PCR  
 <400> 26  
 atatatgcta gccccatta gacagctgca ctacagg 37

<210> 27  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência artificial  
 <220>  
 <223> Iniciador de PCR  
 <400> 27  
 atatatctcg agggaagaca cagattccat ggtgaag 37

<210> 28  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Seqüência artificial  
 <220>  
 <223> Seqüência sintetizada  
 <400> 28  
 Gly Gly Gly Gly Gly Cys Gly  
 1 5

<210> 29  
 <211> 5473  
 <212> DNA  
 <213> Seqüência artificial  
 <220>  
 <223> Vetor de clonagem  
 <400> 29  
 acatcgtata acgttactgg tttcacattc accaccctga attgactctc ttccggggcgc 60  
 tatcatgcca taccgcgaaa ggttttgctc cattcagatgg tgtccgggat ctcgacgctc 120  
 tcccttatgc gactcctgca ttaggaagca gccagtagt aggttgaggc cgttgagcac 180  
 cgccgccgca aggaatggtg catgcaagga gatggcgccc aacagtcccc cggccacggg 240  
 gcctgccacc ataccacgc cgaaacaagc gctcatgagc ccgaagtggc gagccccgac 300  
 ttccccatcg gtgatgtcgg cgatataggc gccagcaacc gcacctgtgg cgccggtgat 360  
 gccggccacg atgcgtccgg cgtagaggat cgagatctcg atccccgcaa attaatacga 420  
 ctactatag gggaattgtg agcggataac aattccccctc tagaaataat tttgtttaac 480  
 ttaagaagg agatatacat atggatccac accaccacca ccaccacggt tctggtgacg 540  
 acgatgaaa agcgcctagc ctcgaggggtg gtgggtggtg ttgctggttaa taagtttaaa 600  
 cgccggccgca tgcaccacca ccaccaccac tgagatccgg ctgctaacia agccccgaaag 660  
 gaagctgagt tggctgctgc caccgctgag caataactag cataaccctc tggggcctct 720  
 aaacgggtct tgagggggtt tttgctgaaa ggaggaacta tatccggatt ggcgatggg 780  
 acgcgcctcg tagcggcgca ttaagcgcgg cgggtgtggt ggttacgctc agcgtgaccg 840

ctacacttgc	cagcgcctta	gogcccgtc	ctttcgcttt	cttcccttcc	tttctcgcca	900
cgttcgcgg	ctttccccgt	caagctctaa	atcgggggct	ccctttaggg	ttccgattta	960
gtgctttacg	gcacctcgac	ccccaaaaac	ttgattaggg	tgatggttca	cgtagtgggc	1020
catcgcctgt	atagacgggt	tttcgcctt	tgacgttggga	gtccacgttc	tttaatatgt	1080
gactcttggt	ccaaactgga	acaacactca	accctatctc	ggtctattct	tttgatttat	1140
aagggatttt	gccgatttcg	gcctattgggt	taaaaaatga	gctgatttaa	caaaaattta	1200
acgcgaatth	taacaaaata	ttaacgttta	caatttcagg	tgccactttt	cggggaaatg	1260
tgccgcggaac	ccctatttgt	ttatttttct	aaatacattc	aaatatgtat	ccgctcatga	1320
gacaataaacc	ctgataaatg	cttcaataat	attgaaaaag	gaagagtatg	agtattcaac	1380
atttccgtgt	cgcccttatt	cccttttttg	cggcattttg	ccttctgtgt	tttgctcacc	1440
cagaaccggt	ggtgaaagta	aaagatgctg	aagatcagtt	gggtgcacga	gtgggttaca	1500
tcgaactgga	tctcaacagc	ggtaagatcc	ttgagagttt	tcgccccgaa	gaacgttttc	1560
caatgatgag	cactttttaa	gttctgctat	gtggcgcggt	attatcccgt	attgacgccg	1620
ggcaagagca	actcggctgc	cgcatacact	attctcagaa	tgacttggtt	gagtactcac	1680
cagtcacaga	aaagcatctt	acggatggca	tgacagtaag	agaattatgc	agtgtcgcca	1740
taaccatgag	tgataaacct	gcccgaact	tacttctgac	aacgatcgga	ggaccgaagg	1800
agctaaccgc	ttttttgcac	aacatggggg	atcatgtaac	tcgccttgat	cgttgggaac	1860
cggagctgaa	tgaagccata	ccaaacgacg	agcgtgacac	cacgatgcct	gcagcaatgg	1920
caacaacggt	gcgcaacta	ttaactggcg	aactacttac	tctagcttcc	cggcaacaat	1980
taatagactg	gatggaggcg	gataaagttg	caggaccact	tctgcgctcg	gcccttccgg	2040
ctggctggtt	tattgctgat	aaatctggag	ccgggtgagc	tggtctctgc	ggtatcattg	2100
cagcactggg	gccagatggt	aagccctccc	gtatcgtagt	tatctacacg	acggggagt	2160
aggcaactat	ggatgaacga	aatagacaga	tcgctgagat	aggtgcctca	ctgattaacc	2220
attggttaact	gtcagaccaa	gtttactcat	atatacttta	gattgattta	aaacttcatt	2280
tttaatttaa	aaggatctag	gtgaagatcc	tttttgataa	tctcatgacc	aaaatccctt	2340
aacgtgagtt	ttcgttccac	tgagcgtcag	accctgtaga	aaagatcaaa	ggatcttctt	2400
gagatccttt	ttttctgcgc	gtaatctgct	gcttgcaaac	aaaaaaacca	ccgctaccag	2460
cggtggtttg	tttgccggat	caagagctac	caactctttt	tccgaaggta	actggcttca	2520
gcagagcgca	gataccaaat	actgtccttc	tagtgtagcc	gtagttagcc	caccacttca	2580
agaactctgt	agcaccgcct	acatacctcg	ctctgctaata	cctgtttacca	gtggctgctg	2640
ccagtggcga	taagtctgtg	cttaccgggt	tggaactcaag	acgatagtta	ccggataagg	2700
cgcagcggtc	gggctgaaac	gggggttctg	gcacacagcc	cagcttggag	cgaacgacct	2760
acaccgaact	gagataccta	cagcgtgagc	tatgagaaag	cgccacgctt	cccgaaggga	2820
gaaaggcgga	caggtatccg	gtaagcgcca	gggtcggaac	aggagagcgc	acgagggagc	2880
ttccaggggg	aaacgcctgg	tatctttata	gtcctgtcgg	gtttccgccac	ctctgacttg	2940
agcgtcgatt	tttgtgatgc	tcgtcagggg	ggcggagcct	atggaaaaac	gccagcaacg	3000
cggccttttt	acggttctctg	gccttttctg	ggccttttgc	tcacatgttc	tttctctcgt	3060
tatccctga	ttctgtggt	aaccgttata	ccgcctttga	gtgagctgat	accgtctgcc	3120
gcagccgaac	gaccgagcgc	agcaggtcag	tgagcagga	agcggaaagag	cgctctgctc	3180
ggtattttct	ccttacgcat	ctgtgcggta	tttcacaccg	catatatggt	gcactctcag	3240
tacaatctgc	tctgatgccg	catagttaag	ccagtataca	ctccgctatc	gctacgtgac	3300
tggtcatgag	ctgcgccccg	acaccgcca	acaccgctg	acgcgcccctg	acgggcttgt	3360
ctgctcccgg	catccgctta	cagacaagct	gtgaccgtct	ccgggagctg	catgtgtcag	3420
aggtttttac	cgctatcacc	gaaacgcgcg	aggcagctgc	ggtaaagctc	atcagcttgg	3480
tcgtgaagcg	atccacagat	gtctgcctgt	tcactccgct	ccagctcgtt	gagttcttcc	3540
agaagcggtta	atgtctggct	tctgataaag	cgggccatgt	taagggcggt	ttttctctgt	3600
ttggtcactg	atgctctcgt	gtaaggggga	tttctgttca	tggggggtaat	gataccgatg	3660
aaacgagaga	ggatgctcac	gatacgggtt	actgatgatg	aacatgcccg	gttactggaa	3720
cgttgtgagg	gtaaacact	ggcggatggt	atgcggcggg	accagagaaa	aatcactcag	3780
ggtcaatgcc	agcgttctgt	taatacagat	gtaggtgttc	cacagggtag	ccagcagcat	3840
ctcgcgatgc	agatccggaa	cataatgggt	cagggcgctg	acttccgcgt	ttccagactt	3900
tacgaaacac	ggaaccgaa	gaccattcat	gtttgtgctc	aggtcgcaga	cgttttgcag	3960
cagcagtcgc	ttcacgttgc	ctcgcgtatc	ggtgattcat	tctgctaacc	agtaaggcaa	4020
ccccgccagc	ctagccgggt	cctcaacgac	aggagcacga	tcatgcgcac	ccgtggggcc	4080
gccatgccgg	cgataatggc	ctgcttctcg	ccgaaacggt	tggtggcggg	accagtgcag	4140
aaggcttgag	cgagggcgtg	caagattccg	aataccgcaa	gcgacaggcc	gatcatcgtc	4200
gcgctccagc	gaaagcggtc	ctcgcgaaa	atgaccagaa	gcgctgcggg	cacctgtcct	4260
accagttgca	tgataaagaa	gacagtcata	agtgcggcga	cgatagtcat	gccccgcgcc	4320
caccggaacg	agctgactgg	ggtgaaggct	ctcaagggca	tcggtcgaga	tccccgtgcc	4380
taatgagtga	gctaacttac	attaattgct	ttgcgctcac	tgcccgcttt	ccagtgcggga	4440
aacctgtcgt	gccagctgca	ttaatgaatc	ggccaacgcg	cggggagagg	cggtttgcgt	4500
attgggcgcc	aggggtggtt	ttcttttcac	cagtgcagcg	ggcaacagct	gattgcccct	4560
caccgcctgg	ccctgagaga	gttgacgcaa	gcggtccacg	ctggtttgcc	ccagcagggc	4620
aaaatcctgt	ttgatgggtg	ttaacggcgg	gatataacat	gagctgtcct	cggtatcgtc	4680
gataccccact	cccagatgat	ccgcaccaac	gcgcagccc	gactcggtaa	tgccctgcgat	4740
tgcccccagc	gccatctgat	cgctggcaac	cagcatcgca	gtgggaacga	tgccctcatt	4800
cagcatttgc	atggtttggt	gaaaaccgga	catggcactc	cagtcgcctt	ccggttccgc	4860

tatcggctga atttgattgc gagtgagata tttatgccag ccagccagac gcagacgcgc 4920  
 cgagacagaa cttaatgggc ccgctaacag cgcgatttgc tggtgaccca atgcgaccag 4980  
 atgtccacag cccagtcgcg taccgtcttc atgggagaaa ataatactgt tgatgggtgt 5040  
 ctggtcagag acatcaagaa ataacgccgg aacattagtg caggcagctt ccacagcaat 5100  
 ggcatacctgg tcatccagcg gatagttaat gatcagccca ctgacgcggt gcgcgagaag 5160  
 attgtgcacc gccgctttac aggcttogac gccgcttcgt tctaccatcg acaccaccac 5220  
 gctggcacc agttgatcgg cgcgagattt aatcgccgcg acaatttgcg acggcgcgtg 5280  
 cagggccaga ctggaggtgg caacgccaat cagcaacgac tgtttgcccg ccagttggtg 5340  
 tgccacgcgg ttgggaatgt aattcagctc cgccatcgcc gtttccactt tttcccgcgt 5400  
 tttcgcagaa acgtggctgg cctggttcac cacgcgggaa acggtctgat aagagacacc 5460  
 ggcatactct gcg 5473

<210> 30

<211> 43

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR

<400> 30

tatggatccg gctagcgcgc gagggtttaa acggcggccg cat 43

<210> 31

<211> 45

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR

<400> 31

tcgaatgcgg ccgcccgttta aaccctcgag cgctagccgg atcca 45

<210> 32

<211> 58

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCT

<400> 32

gatccacacc accaccacca ccacggttct ggtgacgacg atgacaaagc gctagccc 58

<210> 33

<211> 58

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR

<400> 33

tcgagggcta gcgctttgtc atcgtcgtca ccagaaccgt ggtggtggtg gtggtgtg 58

<210> 34

<211> 42

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR

<400> 34

tcgagggtgg tgggtggtg tgccggttaa aagtttaaac gc 42

<210> 35

<211> 42

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador de PCR

<400> 35

ggccgcggtt aaacttatta accgcaacca ccaccaccac cc 42

<210> 36

<211> 271  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 36  
 Met Ala Lys Val Pro Asp Met Phe Glu Asp Leu Lys Asn Cys Tyr Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Asn Glu Glu Asp Ser Ser Ser Ile Asp His Leu Ser Leu Asn Gln  
 20 25 30  
 Lys Ser Phe Tyr His Val Ser Tyr Gly Pro Leu His Glu Gly Cys Met  
 35 40 45  
 Asp Gln Ser Val Ser Leu Ser Ile Ser Glu Thr Ser Lys Thr Ser Lys  
 50 55 60  
 Leu Thr Phe Lys Glu Ser Met Val Val Val Ala Thr Asn Gly Lys Val  
 65 70 75 80  
 Leu Lys Lys Arg Arg Leu Ser Leu Ser Gln Ser Ile Thr Asp Asp Asp  
 85 90 95  
 Leu Glu Ala Ile Ala Asn Asp Ser Glu Glu Glu Ile Ile Lys Pro Arg  
 100 105 110  
 Ser Ser Pro Phe Ser Phe Leu Ser Asn Val Lys Tyr Asn Phe Met Arg  
 115 120 125  
 Ile Ile Lys Tyr Glu Phe Ile Leu Asn Asp Ala Leu Asn Gln Ser Ile  
 130 135 140  
 Ile Arg Ala Asn Asp Gln Tyr Leu Thr Ala Ala Ala Leu His Asn Leu  
 145 150 155 160  
 Asp Glu Ala Val Lys Phe Asp Met Gly Ala Tyr Lys Ser Ser Lys Asp  
 165 170 175  
 Asp Ala Lys Ile Thr Val Ile Leu Arg Ile Ser Lys Thr Gln Leu Tyr  
 180 185 190  
 Val Thr Ala Gln Asp Glu Asp Gln Pro Val Leu Leu Lys Glu Met Pro  
 195 200 205  
 Glu Ile Pro Lys Thr Ile Thr Gly Ser Glu Thr Asn Leu Leu Phe Phe  
 210 215 220  
 Trp Glu Thr His Gly Thr Lys Asn Tyr Phe Thr Ser Val Ala His Pro  
 225 230 235 240  
 Asn Leu Phe Ile Ala Thr Lys Gln Asp Tyr Trp Val Cys Leu Ala Gly  
 245 250 255  
 Gly Pro Pro Ser Ile Thr Asp Phe Gln Ile Leu Glu Asn Gln Ala  
 260 265 270  
  
 <210> 37  
 <211> 271  
 <212> PRT  
 <213> Macaca mulatta  
 <400> 37  
 Met Ala Lys Val Pro Asp Met Phe Glu Asp Leu Lys Asn Cys Tyr Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Asn Glu Glu Asp Ser Ser Ser Ile Asp His Leu Ser Leu Asn Gln  
 20 25 30

Lys Ser Phe Tyr Asp Val Ser Tyr Gly Pro Leu His Glu Gly Cys Met  
 35 40 45  
 Asp Gln Ser Val Ser Leu Ser Ile Ser Glu Ile Ser Lys Thr Ser Lys  
 50 55 60  
 Leu Thr Phe Lys Gln Ser Met Val Val Val Ser Thr Asn Gly Lys Val  
 65 70 75 80  
 Leu Lys Lys Arg Arg Leu Ser Leu Ser Gln Ser Ile Thr Asp Asn Asn  
 85 90 95  
 Leu Glu Ala Ile Ala Asn Asp Ser Glu Glu Glu Ile Ile Lys Pro Arg  
 100 105 110  
 Ser Ala Pro Phe Ser Phe Leu Ser Asn Met Thr Tyr His Phe Ile Arg  
 115 120 125  
 Ile Ile Lys His Glu Phe Ile Leu Asn Asp Thr Leu Asn Gln Thr Ile  
 130 135 140  
 Ile Arg Ala Asn Asp Gln His Leu Thr Ala Ala Ala Ile His Asn Leu  
 145 150 155 160  
 Asp Glu Ala Val Lys Phe Asp Met Gly Ala Tyr Thr Ser Ser Lys Asp  
 165 170 175  
 Asp Thr Lys Val Pro Val Ile Leu Arg Ile Ser Lys Thr Gln Leu Tyr  
 180 185 190  
 Val Ser Ala Gln Asp Glu Asp Gln Pro Val Leu Leu Lys Glu Met Pro  
 195 200 205  
 Glu Ile Asn Lys Thr Ile Thr Gly Ser Glu Thr Asn Phe Leu Phe Phe  
 210 215 220  
 Trp Glu Thr His Gly Thr Lys Asn Tyr Phe Ile Ser Val Ala His Pro  
 225 230 235 240  
 Asn Leu Phe Ile Ala Thr Lys His Asp Asn Trp Val Cys Leu Ala Lys  
 245 250 255  
 Gly Leu Pro Ser Ile Thr Asp Phe Gln Ile Leu Glu Asn Gln Ala  
 260 265 270  
 <210> 38  
 <211> 270  
 <212> PRT  
 <213> Equus caballus  
 <400> 38  
 Met Ala Lys Val Pro Asp Leu Phe Glu Asp Leu Lys Asn Cys Tyr Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Asn Glu Asp Tyr Ser Ser Glu Ile Asp His Leu Ser Leu Thr Gln  
 20 25 30  
 Lys Ser Phe Tyr Asp Ala Ser Tyr Asp Pro Leu Pro Glu Asp Cys Met  
 35 40 45  
 Asp Thr Phe Met Ser Leu Ser Thr Ser Glu Thr Ser Lys Thr Ser Lys  
 50 55 60  
 Leu Asn Phe Lys Glu Ser Val Val Leu Val Ala Ala Asn Gly Lys Thr  
 65 70 75 80  
 Leu Lys Lys Arg Arg Leu Ser Leu Asn Gln Phe Ile Thr Asn Asp Asp  
 85 90 95

Leu Glu Ala Ile Ala Asn Asp Pro Glu Glu Gly Ile Ile Arg Pro Arg  
 100 105 110  
 Ser Val His Tyr Asn Phe Gln Ser Asn Thr Lys Tyr Asn Phe Met Arg  
 115 120 125  
 Ile Val Asn His Gln Cys Thr Leu Asn Asp Ala Leu Asn Gln Ser Val  
 130 135 140  
 Ile Arg Asp Thr Ser Gly Gln Tyr Leu Ala Thr Ala Ala Leu Asn Asn  
 145 150 155 160  
 Leu Asp Asp Ala Val Lys Phe Asp Met Gly Ala Tyr Thr Ser Glu Glu  
 165 170 175  
 Asp Ser Gln Leu Pro Val Thr Leu Arg Ile Ser Lys Thr Arg Leu Phe  
 180 185 190  
 Val Ser Ala Gln Asn Glu Asp Glu Pro Val Leu Leu Lys Glu Met Pro  
 195 200 205  
 Asp Thr Pro Lys Thr Ile Lys Asp Glu Thr Asn Leu Leu Phe Phe Trp  
 210 215 220  
 Glu Arg His Gly Ser Lys Asn Tyr Phe Lys Ser Val Ala His Pro Lys  
 225 230 235 240  
 Leu Phe Ile Ala Thr Lys Gln Gly Lys Leu Val His Met Ala Arg Gly  
 245 250 255  
 Gln Pro Ser Ile Thr Asp Phe Gln Ile Leu Asp Asn Gln Phe  
 260 265 270  
 <210> 39  
 <211> 268  
 <212> PRT  
 <213> Ovis aries  
 <400> 39  
 Met Ala Lys Val Pro Asp Leu Phe Glu Asp Leu Lys Asn Cys Tyr Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Asn Glu Asp Tyr Ser Ser Glu Ile Asp His Leu Ser Leu Asn Gln  
 20 25 30  
 Lys Ser Phe Tyr Asp Ala Ser Tyr Glu Pro Leu Arg Glu Asp His Met  
 35 40 45  
 Asn Lys Phe Met Ser Leu Asp Thr Ser Glu Thr Ser Lys Thr Ser Arg  
 50 55 60  
 Leu Ser Phe Lys Glu Asn Val Val Met Met Thr Ala Asn Gly Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Leu Lys Lys Arg Arg Leu Ser Leu Asn Gln Phe Ile Thr Asp Asp Asp  
 85 90 95  
 Leu Glu Ala Ile Ala Asn Asp Thr Glu Glu Glu Ile Ile Lys Pro Arg  
 100 105 110  
 Ser Ala His Tyr Ser Phe Gln Ser Asn Val Lys Tyr Asn Phe Met Arg  
 115 120 125  
 Val Ile His Gln Glu Cys Ile Leu Asn Asp Ala Leu Asn Gln Ser Ile  
 130 135 140  
 Ile Arg Asp Met Ser Gly Pro Tyr Leu Thr Ala Ala Thr Leu Asn Asn  
 145 150 155 160

Leu Glu Glu Ala Val Lys Phe Asp Met Val Ala Tyr Val Ser Glu Glu  
                                   165                                  170                                  175

Asp Ser Gln Leu Pro Val Thr Leu Arg Ile Ser Lys Thr Gln Leu Phe  
                                   180                                  185                                  190

Val Ser Ala Gln Asn Glu Asp Glu Pro Val Leu Leu Lys Glu Met Pro  
                                   195                                  200                                  205

Glu Thr Pro Lys Ile Ile Lys Asp Glu Thr Asn Leu Leu Phe Phe Trp  
                                   210                                  215                                  220

Glu Lys His Gly Ser Met Asp Tyr Phe Lys Ser Val Ala His Pro Lys  
                                   225                                  230                                  235                                  240

Leu Phe Ile Ala Thr Lys Gln Glu Lys Leu Val His Met Ala Ser Gly  
                                   245                                  250                                  255

Pro Pro Ser Ile Thr Asp Phe Gln Ile Leu Glu Lys  
                                   260                                  265

<210> 40  
 <211> 270  
 <212> PRT  
 <213> Felis catus  
 <400> 40

Met Ala Lys Val Pro Asp Leu Phe Glu Asp Leu Lys Asn Cys Tyr Ser  
   1                                  5                                  10                                  15

Glu Asn Glu Glu Tyr Ser Ser Glu Ile Asp His Leu Thr Leu Asn Gln  
                                   20                                  25                                  30

Lys Ser Phe Tyr Asp Ala Ser Tyr Asp Pro Leu His Glu Asp Cys Thr  
                                   35                                  40                                  45

Asp Lys Phe Met Ser Pro Ser Thr Ser Glu Thr Ser Lys Thr Pro Gln  
                                   50                                  55                                  60

Leu Thr Leu Lys Lys Ser Val Val Met Val Ala Ala Asn Gly Lys Ile  
   65                                  70                                  75

Leu Lys Lys Arg Arg Leu Ser Leu Asn Gln Phe Leu Thr Ala Asp Asp  
                                   85                                  90                                  95

Leu Glu Ala Ile Ala Asn Glu Val Glu Glu Glu Ile Met Lys Pro Arg  
                                   100                                  105                                  110

Ser Val Ala Pro Asn Phe Tyr Ser Ser Glu Lys Tyr Asn Tyr Gln Lys  
                                   115                                  120                                  125

Ile Ile Lys Ser Gln Phe Ile Leu Asn Asp Asn Leu Ser Gln Ser Val  
                                   130                                  135                                  140

Ile Arg Lys Ala Gly Gly Lys Tyr Leu Ala Ala Ala Ala Leu Gln Asn  
   145                                  150                                  155                                  160

Leu Asp Asp Ala Val Lys Phe Asp Met Gly Ala Tyr Thr Ser Lys Glu  
                                   165                                  170                                  175

Asp Ser Lys Leu Pro Val Thr Leu Arg Ile Ser Lys Thr Arg Leu Phe  
                                   180                                  185                                  190

Val Ser Ala Gln Asn Glu Asp Glu Pro Val Leu Leu Lys Glu Met Pro  
                                   195                                  200                                  205

Glu Thr Pro Lys Thr Ile Arg Asp Glu Thr Asn Leu Leu Phe Phe Trp  
                                   210                                  215                                  220



Glu Arg His Gly Ser Lys Asn Tyr Phe Lys Ser Val Ala His Pro Lys  
 225 230 235 240  
 Leu Phe Ile Ala Thr Gln Glu Glu Gln Leu Val His Met Ala Arg Gly  
 245 250 255  
 Leu Pro Ser Val Thr Asp Phe Gln Ile Leu Glu Thr Gln Ser  
 260 265 270  
 <210> 41  
 <211> 268  
 <212> PRT  
 <213> Bos taurus  
 <400> 41  
 Met Ala Lys Val Pro Asp Leu Phe Glu Asp Leu Lys Asn Cys Tyr Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Asn Glu Asp Tyr Ser Ser Glu Ile Asp His Leu Ser Leu Asn Gln  
 20 25 30  
 Lys Ser Phe Tyr Asp Ala Ser Tyr Glu Pro Leu Arg Glu Asp Gln Met  
 35 40 45  
 Asn Lys Phe Met Ser Leu Asp Thr Ser Glu Thr Ser Lys Thr Ser Lys  
 50 55 60  
 Leu Ser Phe Lys Glu Asn Val Val Met Val Ala Ala Ser Gly Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Leu Lys Lys Arg Arg Leu Ser Leu Asn Gln Phe Ile Thr Asp Asp Asp  
 85 90 95  
 Leu Glu Ala Ile Ala Asn Asn Thr Glu Glu Glu Ile Ile Lys Pro Arg  
 100 105 110  
 Ser Ala His Tyr Ser Phe Gln Ser Asn Val Lys Tyr Asn Phe Met Arg  
 115 120 125  
 Val Ile His Gln Glu Cys Ile Leu Asn Asp Ala Leu Asn Gln Ser Ile  
 130 135 140  
 Ile Arg Asp Met Ser Gly Pro Tyr Leu Thr Ala Thr Thr Leu Asn Asn  
 145 150 155 160  
 Leu Glu Glu Ala Val Lys Phe Asp Met Val Ala Tyr Val Ser Glu Glu  
 165 170 175  
 Asp Ser Gln Leu Pro Val Thr Leu Arg Ile Ser Lys Thr Gln Leu Phe  
 180 185 190  
 Val Ser Ala Gln Asn Glu Asp Glu Pro Val Leu Leu Lys Glu Met Pro  
 195 200 205  
 Glu Thr Pro Lys Ile Ile Lys Asp Glu Thr Asn Leu Leu Phe Phe Trp  
 210 215 220  
 Glu Lys His Gly Ser Met Asp Tyr Phe Lys Ser Val Ala His Pro Lys  
 225 230 235 240  
 Leu Phe Ile Ala Thr Lys Gln Glu Lys Leu Val His Met Ala Ser Gly  
 245 250 255  
 Pro Pro Ser Ile Thr Asp Phe Gln Ile Leu Glu Lys  
 260 265  
 <210> 42  
 <211> 270

<212> PRT  
 <213> Sus scrofa  
 <400> 42  
 Met Ala Lys Val Pro Asp Leu Phe Glu Asp Leu Lys Asn Cys Tyr Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Asn Glu Glu Tyr Ser Ser Asp Ile Asp His Leu Ser Leu Asn Gln  
 20 25 30  
 Lys Ser Phe Tyr Asp Ala Ser Tyr Glu Pro Leu Pro Gly Asp Gly Met  
 35 40 45  
 Asp Lys Phe Met Pro Leu Ser Thr Ser Lys Thr Ser Lys Thr Ser Arg  
 50 55 60  
 Leu Asn Phe Lys Asp Ser Val Val Met Ala Ala Ala Asn Gly Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Leu Lys Lys Arg Arg Leu Ser Leu Asn Gln Phe Ile Thr Asp Asp Asp  
 85 90 95  
 Leu Glu Ala Ile Ala Asn Asp Thr Glu Glu Glu Ile Ile Lys Pro Arg  
 100 105 110  
 Ser Ala Thr Tyr Ser Phe Gln Ser Asn Met Lys Tyr Asn Phe Met Arg  
 115 120 125  
 Val Ile Asn His Gln Cys Ile Leu Asn Asp Ala Arg Asn Gln Ser Ile  
 130 135 140  
 Ile Arg Asp Pro Ser Gly Gln Tyr Leu Met Ala Ala Val Leu Asn Asn  
 145 150 155 160  
 Leu Asp Glu Ala Val Lys Phe Asp Met Ala Ala Tyr Thr Ser Asn Asp  
 165 170 175  
 Asp Ser Gln Leu Pro Val Thr Leu Arg Ile Ser Glu Thr Arg Leu Phe  
 180 185 190  
 Val Ser Ala Gln Asn Glu Asp Glu Pro Val Leu Leu Lys Glu Leu Pro  
 195 200 205  
 Glu Thr Pro Lys Thr Ile Lys Asp Glu Thr Ser Leu Leu Phe Phe Trp  
 210 215 220  
 Glu Lys His Gly Asn Met Asp Tyr Phe Lys Ser Ala Ala His Pro Lys  
 225 230 235 240  
 Leu Phe Ile Ala Thr Arg Gln Glu Lys Leu Val His Met Ala Pro Gly  
 245 250 255  
 Leu Pro Ser Val Thr Asp Phe Gln Ile Leu Glu Asn Gln Ser  
 260 265 270

<210> 43  
 <211> 268  
 <212> PRT  
 <213> Oryctolagus cuniculus  
 <400> 43  
 Met Ala Lys Val Pro Asp Leu Phe Glu Asp Leu Lys Asn Cys Phe Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Asn Glu Glu Tyr Ser Ser Ala Ile Asp His Leu Ser Leu Asn Gln  
 20 25 30  
 Lys Ser Phe Tyr Asp Ala Ser Tyr Glu Pro Leu His Glu Asp Cys Met  
 35 40 45

Asn Lys Val Val Ser Leu Ser Thr Ser Glu Thr Ser Val Ser Pro Asn  
 50 55 60  
 Leu Thr Phe Gln Glu Asn Val Val Ala Val Thr Ala Ser Gly Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Leu Lys Lys Arg Arg Leu Ser Leu Asn Gln Pro Ile Thr Asp Val Asp  
 85 90 95  
 Leu Glu Thr Asn Val Ser Asp Pro Glu Glu Gly Ile Ile Lys Pro Arg  
 100 105 110  
 Ser Val Pro Tyr Thr Phe Gln Arg Asn Met Arg Tyr Lys Tyr Leu Arg  
 115 120 125  
 Ile Ile Lys Gln Glu Phe Thr Leu Asn Asp Ala Leu Asn Gln Ser Leu  
 130 135 140  
 Val Arg Asp Thr Ser Asp Gln Tyr Leu Arg Ala Ala Pro Leu Gln Asn  
 145 150 155 160  
 Leu Gly Asp Ala Val Lys Phe Asp Met Gly Val Tyr Met Thr Ser Lys  
 165 170 175  
 Glu Asp Ser Ile Leu Pro Val Thr Leu Arg Ile Ser Gln Thr Pro Leu  
 180 185 190  
 Phe Val Ser Ala Gln Asn Glu Asp Glu Pro Val Leu Leu Lys Glu Met  
 195 200 205  
 Pro Glu Thr Pro Arg Ile Ile Thr Asp Ser Glu Ser Asp Ile Leu Phe  
 210 215 220  
 Phe Trp Glu Thr Gln Gly Asn Lys Asn Tyr Phe Lys Ser Ala Ala Asn  
 225 230 235 240  
 Pro Gln Leu Phe Ile Ala Thr Lys Pro Glu His Leu Val His Met Ala  
 245 250 255  
 Arg Gly Leu Pro Ser Met Thr Asp Phe Gln Ile Ser  
 260 265  
 <210> 44  
 <211> 265  
 <212> PRT  
 <213> Canis familiaris  
 <400> 44  
 Met Ala Lys Val Pro Asp Leu Phe Glu Asp Leu Lys Asn Cys Tyr Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Asn Glu Glu Tyr Ser Ser Glu Ile Asp His Leu Ser Leu Asn Gln  
 20 25 30  
 Lys Ser Phe Tyr Asp Met Ser Cys Asp Pro Leu His Glu Asp Cys Met  
 35 40 45  
 Ser Leu Ser Thr Ser Glu Ile Ser Lys Thr Ser Gln Leu Thr Phe Lys  
 50 55 60  
 Glu Asn Val Val Val Val Ala Ala Asn Gly Lys Ile Leu Lys Lys Arg  
 65 70 75 80  
 Arg Leu Ser Leu Ser Gln Phe Ile Thr Asp Asp Asp Leu Glu Gly Ile  
 85 90 95  
 Ala Asn Asp Thr Glu Glu Val Ile Met Lys Pro Arg Ser Val Ala Tyr  
 100 105 110

Asn Phe His Asn Asn Glu Lys Tyr Asn Tyr Ile Arg Ile Ile Lys Ser  
 115 120 125  
 Gln Phe Ile Leu Asn Asp Asn Leu Asn Gln Ser Ile Val Arg Gln Thr  
 130 135 140  
 Gly Gly Asn Tyr Leu Met Thr Ala Ala Leu Gln Asn Leu Asp Asp Ala  
 145 150 155 160  
 Val Lys Phe Asp Met Gly Ala Tyr Thr Ser Glu Asp Ser Lys Leu Pro  
 165 170 175  
 Val Thr Leu Arg Ile Ser Lys Thr Arg Leu Phe Val Ser Ala Gln Asn  
 180 185 190  
 Glu Asp Glu Pro Val Leu Leu Lys Glu Met Pro Glu Thr Pro Lys Thr  
 195 200 205  
 Ile Arg Asp Glu Thr Asn Leu Leu Phe Phe Trp Glu Arg His Gly Ser  
 210 215 220  
 Lys His Tyr Phe Lys Ser Val Ala Gln Pro Lys Leu Phe Ile Ala Thr  
 225 230 235 240  
 Gln Glu Arg Lys Leu Val His Met Ala Arg Gly Gln Pro Ser Ile Thr  
 245 250 255  
 Asp Phe Arg Leu Leu Glu Thr Gln Pro  
 260 265  
 <210> 45  
 <211> 270  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 45  
 Met Ala Lys Val Pro Asp Leu Phe Glu Asp Leu Lys Asn Cys Tyr Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Asn Glu Asp Tyr Ser Ser Ala Ile Asp His Leu Ser Leu Asn Gln  
 20 25 30  
 Lys Ser Phe Tyr Asp Ala Ser Tyr Gly Ser Leu His Glu Thr Cys Thr  
 35 40 45  
 Asp Gln Phe Val Ser Leu Arg Thr Ser Glu Thr Ser Lys Met Ser Asn  
 50 55 60  
 Phe Thr Phe Lys Glu Ser Arg Val Thr Val Ser Ala Thr Ser Ser Asn  
 65 70 75 80  
 Gly Lys Ile Leu Lys Lys Arg Arg Leu Ser Phe Ser Glu Thr Phe Thr  
 85 90 95  
 Glu Asp Asp Leu Gln Ser Ile Thr His Asp Leu Glu Glu Thr Ile Gln  
 100 105 110  
 Pro Arg Ser Ala Pro Tyr Thr Tyr Gln Ser Asp Leu Arg Tyr Lys Leu  
 115 120 125  
 Met Lys Leu Val Arg Gln Lys Phe Val Met Asn Asp Ser Leu Asn Gln  
 130 135 140  
 Thr Ile Tyr Gln Asp Val Asp Lys His Tyr Leu Ser Thr Thr Trp Leu  
 145 150 155 160  
 Asn Asp Leu Gln Gln Glu Val Lys Phe Asp Met Tyr Ala Tyr Ser Ser  
 165 170 175

Gly Gly Asp Asp Ser Lys Tyr Pro Val Thr Leu Lys Ile Ser Asp Ser  
 180 185 190  
 Gln Leu Phe Val Ser Ala Gln Gly Glu Asp Gln Pro Val Leu Leu Lys  
 195 200 205  
 Glu Leu Pro Glu Thr Pro Lys Leu Ile Thr Gly Ser Glu Thr Asp Leu  
 210 215 220  
 Ile Phe Phe Trp Lys Ser Ile Asn Ser Lys Asn Tyr Phe Thr Ser Ala  
 225 230 235 240  
 Ala Tyr Pro Glu Leu Phe Ile Ala Thr Lys Glu Gln Ser Arg Val His  
 245 250 255  
 Leu Ala Arg Gly Leu Pro Ser Met Thr Asp Phe Gln Ile Ser  
 260 265 270  
 <210> 46  
 <211> 270  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus  
 <400> 46  
 Met Ala Lys Val Pro Asp Leu Phe Glu Asp Leu Lys Asn Cys Tyr Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Asn Glu Glu Tyr Ser Ser Ala Ile Asp His Leu Ser Leu Asn Gln  
 20 25 30  
 Lys Ser Phe Tyr Asp Ala Ser Tyr Gly Ser Leu His Glu Asn Cys Thr  
 35 40 45  
 Asp Lys Phe Val Ser Leu Arg Thr Ser Glu Thr Ser Lys Met Ser Thr  
 50 55 60  
 Phe Thr Phe Lys Glu Ser Arg Val Val Val Ser Ala Thr Ser Asn Lys  
 65 70 75 80  
 Gly Lys Ile Leu Lys Lys Arg Arg Leu Ser Phe Asn Gln Pro Phe Thr  
 85 90 95  
 Glu Asp Asp Leu Glu Ala Ile Ala His Asp Leu Glu Glu Thr Ile Gln  
 100 105 110  
 Pro Arg Ser Ala Pro His Ser Phe Gln Asn Asn Leu Arg Tyr Lys Leu  
 115 120 125  
 Ile Arg Ile Val Lys Gln Glu Phe Ile Met Asn Asp Ser Leu Asn Gln  
 130 135 140  
 Asn Ile Tyr Val Asp Met Asp Arg Ile His Leu Lys Ala Ala Ser Leu  
 145 150 155 160  
 Asn Asp Leu Gln Leu Glu Val Lys Phe Asp Met Tyr Ala Tyr Ser Ser  
 165 170 175  
 Gly Gly Asp Asp Ser Lys Tyr Pro Val Thr Leu Lys Val Ser Asn Thr  
 180 185 190  
 Gln Leu Phe Val Ser Ala Gln Gly Glu Asp Lys Pro Val Leu Leu Lys  
 195 200 205  
 Glu Ile Pro Glu Thr Pro Lys Leu Ile Thr Gly Ser Glu Thr Asp Leu  
 210 215 220  
 Ile Phe Phe Trp Glu Lys Ile Asn Ser Lys Asn Tyr Phe Thr Ser Ala  
 225 230 235 240

Ala Phe Pro Glu Leu Leu Ile Ala Thr Lys Glu Gln Ser Gln Val His  
245 250 255

Leu Ala Arg Gly Leu Pro Ser Met Ile Asp Phe Gln Ile Ser  
260 265 270

<210> 47

<211> 152

<212> PRT

<213> Gorilla gorilla

<400> 47

Lys Asn Cys Tyr Ser Glu Asn Glu Glu Asp Ser Ser Ser Ile Asp His  
1 5 10 15

Leu Ser Leu Asn Gln Lys Ser Phe Tyr His Val Thr Tyr Gly Pro Leu  
20 25 30

His Glu Gly Cys Met Asp Gln Ser Val Ser Leu Ser Ile Ser Glu Thr  
35 40 45

Ser Lys Thr Ser Lys Leu Thr Phe Lys Glu Ser Met Val Val Val Ala  
50 55 60

Thr Asn Gly Lys Val Leu Lys Lys Arg Arg Leu Ser Leu Ser Gln Ser  
65 70 75 80

Ile Thr Asp Asp Asp Leu Glu Ala Ile Ala Asn Asp Ser Glu Glu Glu  
85 90 95

Ile Ile Lys Pro Arg Ser Ala Pro Phe Ser Phe Leu Ser Asn Val Lys  
100 105 110

Tyr Asn Phe Met Arg Ile Ile Lys Asn Glu Phe Ile Leu Asn Asp Ala  
115 120 125

Leu Asn Gln Ser Ile Ile Arg Ala Asn Asp Gln Tyr Leu Thr Ala Ala  
130 135 140

Ala Leu His Asn Leu Asp Glu Ala  
145 150

<210> 48

<211> 204

<212> PRT

<213> Cavia porcellus

<400> 48

Phe Glu Asp Leu Lys Asn Cys Tyr Ser Glu Asn Glu Glu Tyr Ala Ser  
1 5 10 15

Ala Ile Asp His Leu Ser Leu Asn Gln Lys Ser Phe Tyr Asp Thr Asn  
20 25 30

Tyr Asp Pro Leu His Glu Asn Arg Val Asp Glu Pro Val Ser Pro Asn  
35 40 45

Pro Tyr Glu Asn Ser Glu Glu Ser Asn Phe Thr Leu Glu Asp Ser Ser  
50 55 60

Asp Ser Ser Ala Val Val Leu Thr Ser Ala His Gly Glu Val Leu Lys  
65 70 75 80

Lys Arg Arg Leu Ser Leu Asn Gln Thr Met Ser Asn Glu Asp Leu Glu  
85 90 95

Ala Ile Ala Asn Asp Ser Glu Glu Glu Ile Ile Glu Pro Trp Ser Val  
100 105 110

Pro Tyr Ser Phe Gln Ser Asn Leu Lys Phe Lys Tyr Gln Arg Ser Ile  
 115 120 125  
 Lys Lys Gly Ala Val Ile Thr Asp Ala Met His Gln Ser Leu Ile Arg  
 130 135 140  
 Glu Ser Asn Gly Gln His Leu Lys Ala Met His Val Val Asp Arg Lys  
 145 150 155 160  
 His Glu Val Lys Phe Asp Ile Asp Gly Tyr Val Ser Thr Ala Thr Arg  
 165 170 175  
 Ile Arg Pro Val Thr Leu Lys Ile Ser Lys Thr Gln Leu Tyr Val Cys  
 180 185 190  
 Ala Gln Glu Glu Gly Gln Pro Val Leu Leu Lys Glu  
 195 200  
 <210> 49  
 <211> 269  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 49  
 Met Ala Glu Val Pro Glu Leu Ala Ser Glu Met Met Ala Tyr Tyr Ser  
 1 5 10 15  
 Gly Asn Glu Asp Asp Leu Phe Phe Glu Ala Asp Gly Pro Lys Gln Met  
 20 25 30  
 Lys Cys Ser Phe Gln Asp Leu Asp Leu Cys Pro Leu Asp Gly Gly Ile  
 35 40 45  
 Gln Leu Arg Ile Ser Asp His His Tyr Ser Lys Gly Phe Arg Gln Ala  
 50 55 60  
 Ala Ser Val Val Val Ala Met Asp Lys Leu Arg Lys Met Leu Val Pro  
 65 70 75 80  
 Cys Pro Gln Thr Phe Gln Glu Asn Asp Leu Ser Thr Phe Phe Pro Phe  
 85 90 95  
 Ile Phe Glu Glu Glu Pro Ile Phe Phe Asp Thr Trp Asp Asn Glu Ala  
 100 105 110  
 Tyr Val His Asp Ala Pro Val Arg Ser Leu Asn Cys Thr Leu Arg Asp  
 115 120 125  
 Ser Gln Gln Lys Ser Leu Val Met Ser Gly Pro Tyr Glu Leu Lys Ala  
 130 135 140  
 Leu His Leu Gln Gly Gln Asp Met Glu Gln Gln Val Val Phe Ser Met  
 145 150 155 160  
 Ser Phe Val Gln Gly Glu Glu Ser Asn Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu  
 165 170 175  
 Gly Leu Lys Glu Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Leu Lys Asp Asp  
 180 185 190  
 Lys Pro Thr Leu Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys  
 195 200 205  
 Lys Lys Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Ile Asn Asn  
 210 215 220  
 Lys Leu Glu Phe Glu Ser Ala Gln Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr  
 225 230 235 240

Ser Gln Ala Glu Asn Met Pro Val Phe Leu Gly Gly Thr Lys Gly Gly  
 245 250 255

Gln Asp Ile Thr Asp Phe Thr Met Gln Phe Val Ser Ser  
 260 265

<210> 50

<211> 193

<212> PRT

<213> Pan troglodytes

<400> 50

Met Leu Val Pro Cys Pro Gln Thr Phe Gln Glu Asn Asp Leu Ser Thr  
 1 5 10 15

Phe Phe Pro Phe Ile Phe Glu Glu Glu Pro Ile Phe Phe Asp Thr Trp  
 20 25 30

Glu Asn Glu Ala Tyr Val His Asp Ala Pro Val Arg Ser Leu Asn Cys  
 35 40 45

Thr Leu Arg Asp Ser Gln Gln Lys Ser Leu Val Met Ser Gly Pro Tyr  
 50 55 60

Glu Leu Lys Ala Leu His Leu Gln Gly Gln Asp Met Glu Gln Gln Val  
 65 70 75 80

Val Phe Ser Met Ser Phe Val Gln Gly Glu Glu Ser Asn Asp Lys Ile  
 85 90 95

Pro Val Ala Leu Gly Leu Lys Glu Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val  
 100 105 110

Leu Lys Asp Asp Lys Pro Thr Leu Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys  
 115 120 125

Asn Tyr Pro Lys Lys Lys Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile  
 130 135 140

Glu Ile Asn Asn Lys Leu Glu Phe Glu Ser Ala Gln Phe Pro Asn Trp  
 145 150 155 160

Tyr Ile Ser Thr Ser Gln Ala Glu Asn Met Pro Val Phe Leu Gly Gly  
 165 170 175

Thr Lys Gly Gly Gln Asp Ile Thr Asp Phe Thr Met Gln Phe Val Ser  
 180 185 190

Ser

<210> 51

<211> 269

<212> PRT

<213> Macaca mulatta

<400> 51

Met Ala Glu Val Pro Glu Leu Ala Ser Glu Met Met Ala Tyr Tyr Ser  
 1 5 10 15

Gly Asn Glu Asp Asp Leu Phe Phe Asp Val Asp Gly Pro Lys Gln Met  
 20 25 30

Lys Cys Ser Phe Gln Asp Leu Asp Leu Cys Pro Leu Gly Gly Gly Ile  
 35 40 45

Gln Leu Gln Ile Ser His Glu His Tyr Asn Glu Gly Phe Arg Gln Ala  
 50 55 60



Val Ser Val Val Val Ala Met Glu Lys Leu Arg Lys Met Leu Val Pro  
 65 70 75 80  
 Cys Pro Gln Ile Phe Gln Asp Asn Asp Leu Ser Thr Leu Ile Pro Phe  
 85 90 95  
 Ile Phe Glu Glu Glu Pro Val Phe Leu Asp Thr Arg Asn Asn Asp Ala  
 100 105 110  
 Cys Val His Asp Ala Pro Val Arg Ser Leu His Cys Thr Leu Arg Asp  
 115 120 125  
 Ala Gln Leu Lys Ser Leu Val Met Ser Gly Pro Tyr Glu Leu Lys Ala  
 130 135 140  
 Leu His Leu Gln Gly Gln Asp Leu Glu Gln Gln Val Val Phe Ser Met  
 145 150 155 160  
 Ser Phe Val Gln Gly Glu Glu Ser Asn Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu  
 165 170 175  
 Gly Leu Lys Ala Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Leu Lys Asp Asp  
 180 185 190  
 Lys Pro Thr Leu Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys  
 195 200 205  
 Lys Lys Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Ile Asn Asn  
 210 215 220  
 Lys Leu Glu Phe Glu Ser Ala Gln Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr  
 225 230 235 240  
 Ser Gln Ala Glu Asn Met Pro Val Phe Leu Gly Gly Thr Arg Gly Gly  
 245 250 255  
 Gln Asp Ile Thr Asp Phe Thr Met Gln Phe Val Ser Ser  
 260 265

<210> 52

<211> 268

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 52

Met Ala Thr Val Pro Glu Leu Thr Ser Glu Met Met Ala Tyr His Ser  
 1 5 10 15  
 Gly Asn Glu Asn Asp Leu Phe Phe Glu Ala Asp Gly Pro Asn Tyr Met  
 20 25 30  
 Lys Ser Cys Phe Gln Asp Leu Asp Leu Cys Cys Pro Asp Glu Gly Ile  
 35 40 45  
 Gln Leu Arg Ile Ser Cys Gln Pro Tyr Asn Lys Ser Phe Arg Gln Val  
 50 55 60  
 Leu Ser Val Val Val Ala Leu Glu Lys Leu Arg Gln Lys Ala Val Pro  
 65 70 75 80  
 Cys Pro Gln Ala Phe Gln Asp Asp Gly Leu Arg Thr Phe Phe Ser Leu  
 85 90 95  
 Ile Phe Glu Glu Glu Pro Val Leu Cys Asn Thr Trp Asp Asp Tyr Ser  
 100 105 110  
 Leu Glu Cys Asp Ala Val Arg Ser Leu His Cys Arg Leu Gln Asp Ala  
 115 120 125

Gln Gln Lys Ser Leu Val Leu Ser Gly Thr Tyr Glu Leu Lys Ala Leu  
130 135 140

His Leu Asn Ala Glu Asn Leu Asn Gln Gln Val Val Phe Ser Met Ser  
145 150 155 160

Phe Val Gln Gly Glu Glu Ser Asn Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu Gly  
165 170 175

Leu Arg Gly Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Met Lys Asp Asp Lys  
180 185 190

Pro Thr Leu Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Asn Arg Tyr Pro Lys Lys  
195 200 205

Lys Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Ile Lys Asp Lys  
210 215 220

Leu Glu Phe Glu Ser Ala Gln Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser  
225 230 235 240

Gln Thr Glu Tyr Met Pro Val Phe Leu Gly Asn Asn Ser Gly Gly Gln  
245 250 255

Asp Leu Ile Asp Phe Ser Met Glu Phe Val Ser Ser  
260 265

<210> 53

<211> 269

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 53

Met Ala Thr Val Pro Glu Leu Asn Cys Glu Met Pro Pro Phe Asp Ser  
1 5 10 15

Asp Glu Asn Asp Leu Phe Phe Glu Val Asp Gly Pro Gln Lys Met Lys  
20 25 30

Gly Cys Phe Gln Thr Phe Asp Leu Gly Cys Pro Asp Glu Ser Ile Gln  
35 40 45

Leu Gln Ile Ser Gln Gln His Ile Asn Lys Ser Phe Arg Gln Ala Val  
50 55 60

Ser Leu Ile Val Ala Val Glu Lys Leu Trp Gln Leu Pro Val Ser Phe  
65 70 75 80

Pro Trp Thr Phe Gln Asp Glu Asp Met Ser Thr Phe Phe Ser Phe Ile  
85 90 95

Phe Glu Glu Glu Pro Ile Leu Cys Asp Ser Trp Asp Asp Asp Asp Asn  
100 105 110

Leu Leu Val Cys Asp Val Pro Ile Arg Gln Leu His Tyr Arg Leu Arg  
115 120 125

Asp Glu Gln Gln Lys Ser Leu Val Leu Ser Asp Pro Tyr Glu Leu Lys  
130 135 140

Ala Leu His Leu Asn Gly Gln Asn Ile Asn Gln Gln Val Ile Phe Ser  
145 150 155 160

Met Ser Phe Val Gln Gly Glu Pro Ser Asn Asp Lys Ile Pro Val Ala  
165 170 175

Leu Gly Leu Lys Gly Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Met Lys Asp  
180 185 190

Gly Thr Pro Thr Leu Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Gln Tyr Pro  
 195 200 205  
 Lys Lys Lys Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Val Lys  
 210 215 220  
 Ser Lys Val Glu Phe Glu Ser Ala Glu Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser  
 225 230 235 240  
 Thr Ser Gln Ala Glu His Lys Pro Val Phe Leu Gly Asn Asn Ser Gly  
 245 250 255  
 Gln Asp Ile Ile Asp Phe Thr Met Glu Ser Val Ser Ser  
 260 265  
 <210> 54  
 <211> 268  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus  
 <400> 54  
 Met Ala Thr Val Pro Glu Leu Asn Cys Glu Ile Ala Ala Phe Asp Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Glu Asn Asp Leu Phe Phe Glu Ala Asp Arg Pro Gln Lys Ile Lys  
 20 25 30  
 Asp Cys Phe Gln Ala Leu Asp Leu Gly Cys Pro Asp Glu Ser Ile Gln  
 35 40 45  
 Leu Gln Ile Ser Gln Gln His Leu Asp Lys Ser Phe Arg Lys Ala Val  
 50 55 60  
 Ser Leu Ile Val Ala Val Glu Lys Leu Trp Gln Leu Pro Met Ser Cys  
 65 70 75 80  
 Pro Trp Ser Phe Gln Asp Glu Asp Pro Ser Thr Phe Phe Ser Phe Ile  
 85 90 95  
 Phe Glu Glu Glu Pro Val Leu Cys Asp Ser Trp Asp Asp Asp Asp Leu  
 100 105 110  
 Leu Val Cys Asp Val Pro Ile Arg Gln Leu His Cys Arg Leu Arg Asp  
 115 120 125  
 Glu Gln Gln Lys Cys Leu Val Leu Ser Asp Pro Cys Glu Leu Lys Ala  
 130 135 140  
 Leu His Leu Asn Gly Gln Asn Ile Ser Gln Gln Val Val Phe Ser Met  
 145 150 155 160  
 Ser Phe Val Gln Gly Glu Thr Ser Asn Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu  
 165 170 175  
 Gly Leu Lys Gly Leu Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Met Lys Asp Gly  
 180 185 190  
 Thr Pro Thr Leu Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Gln Tyr Pro Lys  
 195 200 205  
 Lys Lys Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Val Lys Thr  
 210 215 220  
 Lys Val Glu Phe Glu Ser Ala Gln Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr  
 225 230 235 240  
 Ser Gln Ala Glu His Arg Pro Val Phe Leu Gly Asn Ser Asn Gly Arg  
 245 250 255

Asp Ile Val Asp Phe Thr Met Glu Pro Val Ser Ser  
260 265

<210> 55

<211> 268

<212> PRT

<213> Equus caballus

<400> 55

Met Ala Ala Val Pro Asp Thr Ser Asp Met Met Thr Tyr Cys Ser Gly  
1 5 10 15

Asn Glu Asn Asp Leu Phe Phe Glu Glu Asp Gly Pro Lys Gln Met Lys  
20 25 30

Gly Ser Phe Gln Asp Leu Asp Leu Ser Ser Met Gly Asn Gly Gly Ile  
35 40 45

Gln Leu Gln Phe Ser His Gln Leu Tyr Asn Lys Thr Phe Lys His Val  
50 55 60

Val Ser Ile Ile Val Ala Met Glu Lys Leu Lys Lys Ile Pro Val Pro  
65 70 75 80

Cys Ser Gln Ala Phe Gln Asp Asp Asp Leu Arg Ser Leu Phe Ser Val  
85 90 95

Ile Phe Glu Glu Glu Pro Ile Ile Cys Asp Asn Trp Asp Asp Asp Tyr  
100 105 110

Val Cys Asp Ala Ala Val His Ser Val Asn Cys Arg Leu Arg Asp Ile  
115 120 125

Tyr His Lys Ser Leu Val Leu Ser Gly Ala Cys Glu Leu Gln Ala Val  
130 135 140

His Leu Asn Gly Glu Asn Thr Asn Gln Gln Val Val Phe Cys Met Ser  
145 150 155 160

Phe Val Gln Gly Glu Glu Glu Thr Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu Gly  
165 170 175

Leu Lys Glu Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Gly Met Lys Asp Gly Lys  
180 185 190

Pro Thr Leu Gln Leu Glu Thr Val Asp Pro Asn Thr Tyr Pro Lys Arg  
195 200 205

Lys Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Met Glu Ile Lys Gly Asn  
210 215 220

Val Glu Phe Glu Ser Ala Met Tyr Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser  
225 230 235 240

Gln Ala Glu Lys Lys Pro Val Phe Leu Gly Asn Thr Arg Gly Gly Arg  
245 250 255

Asp Ile Thr Asp Phe Ile Met Glu Ile Thr Ser Ala  
260 265

<210> 56

<211> 267

<212> PRT

<213> Felis catus

<400> 56

Met Ala Pro Val Pro Glu Leu Thr Ser Glu Met Met Ala Tyr Tyr Ser  
1 5 10 15

Asp Glu Asn Asp Leu Phe Phe Glu Ala Asp Gly Pro Glu Lys Met Lys  
                   20                                  25  30  
 Gly Ser Leu Gln Asn Leu Ser His Ser Phe Leu Gly Asp Glu Gly Ile  
                   35                                  40  45  
 Gln Leu Gln Ile Ser His Gln Pro Asp Asn Lys Ser Leu Arg His Ala  
                   50                                  55  60  
 Val Ser Val Ile Val Ala Met Glu Lys Leu Lys Lys Ile Ser Phe Ala  
   65                                  70  75  80  
 Cys Ser Gln Pro Leu Gln Asp Glu Asp Leu Lys Ser Leu Phe Cys Cys  
                   85                                  90  95  
 Ile Phe Glu Glu Glu Pro Ile Ile Cys Asp Thr Trp Asp Asp Gly Phe  
                   100                                  105  110  
 Val Cys Asp Ala Ala Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Thr Phe Arg Asp Ile  
                   115                                  120  125  
 Ser Gln Lys Ser Leu Val Leu Ser Gly Ser Tyr Glu Leu Arg Ala Leu  
   130                                  135  140  
 His Leu Asn Gly Gln Asn Met Asn Gln Gln Val Val Phe Arg Met Ser  
   145                                  150  155  160  
 Phe Val His Gly Glu Glu Asn Ser Lys Lys Ile Pro Val Val Leu Cys  
                   165                                  170  175  
 Ile Lys Lys Asn Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Met Lys Asp Gly Lys  
                   180                                  185  190  
 Pro Thr Leu Gln Leu Glu Met Leu Asp Pro Lys Val Tyr Pro Lys Lys  
                   195                                  200  205  
 Lys Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Thr Glu Ile Lys Gly Asn  
   210                                  215  220  
 Val Glu Phe Glu Ser Ser Gln Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser  
   225                                  230  235  240  
 Gln Ala Glu Glu Met Pro Val Phe Leu Gly Asn Thr Lys Gly Gly Gln  
                   245                                  250  255  
 Asp Ile Thr Asp Phe Ile Met Glu Ser Ala Ser  
                   260                                  265  
  
 <210> 57  
 <211> 267  
 <212> PRT  
 <213> Sus scrofa  
 <400> 57  
 Met Ala Thr Val Pro Glu Pro Ala Lys Glu Val Met Ala Asn Asn Gly  
   1                  5                                  10  15  
 Asp Asn Asn Asn Asp Leu Leu Phe Glu Ala Asp Gly Pro Lys Glu Met  
                   20                                  25  30  
 Lys Cys Arg Thr Gln Asn Leu Asp Leu Ser Pro Leu Gly Asp Gly Ser  
                   35                                  40  45  
 Ile Gln Leu Gln Ile Ser His Gln Leu Cys Asn Glu Ser Ser Arg Pro  
   50                                  55  60  
 Met Val Ser Val Ile Val Ala Lys Glu Glu Pro Met Asn Pro Ser Ser  
   65                                  70  75  80

Gln Val Val Cys Asp Asp Asp Pro Lys Ser Ile Phe Ser Ser Val Phe  
85 90 95

Glu Glu Glu Pro Ile Val Leu Glu Lys His Ala Asn Gly Phe Leu Cys  
100 105 110

Asp Ala Thr Pro Val Gln Ser Val Asp Cys Lys Leu Gln Asp Lys Asp  
115 120 125

Glu Lys Ala Leu Val Leu Ala Gly Pro His Glu Leu Lys Ala Leu His  
130 135 140

Leu Leu Lys Gly Asp Leu Lys Arg Glu Val Val Phe Cys Met Ser Phe  
145 150 155 160

Val Gln Gly Asp Asp Ser Asp Asp Lys Ile Pro Val Thr Leu Gly Ile  
165 170 175

Lys Gly Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Met Lys Asp Asp Thr Pro  
180 185 190

Thr Leu Gln Leu Glu Asp Val Asp Pro Lys Ser Tyr Pro Lys Arg Asp  
195 200 205

Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Tyr Lys Thr Glu Ile Lys Asn Arg Val  
210 215 220

Glu Phe Glu Ser Ala Leu Tyr Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Gln  
225 230 235 240

Ala Glu Gln Lys Pro Val Phe Leu Gly Asn Ser Lys Gly Arg Gln Asp  
245 250 255

Ile Thr Asp Phe Thr Met Glu Val Leu Ser Pro  
260 265

<210> 58

<211> 266

<212> PRT

<213> *Cavia porcellus*

<400> 58

Met Ala Ala Val Pro Glu Leu Ser Ser Glu Val Thr Ala Tyr His Ser  
1 5 10 15

Asp Glu Asn Glu Leu Phe Phe Glu Val Asp Gly Pro Asn Lys Met Gln  
20 25 30

Tyr Cys Phe Gln Asp Arg Asp Leu Cys Ser Leu Asp Glu Gly Ile Lys  
35 40 45

Leu Gln Ile Ser His Gln His Phe Asn Lys Ser Phe Arg Gln Thr Val  
50 55 60

Ser Leu Ile Val Ala Val Glu Lys Leu Arg Lys Lys Leu Ala Pro Cys  
65 70 75 80

Thr Trp Ala Phe Gln Asp Asp Asp Leu Arg Pro Leu Leu Pro Phe Ile  
85 90 95

Phe Glu Glu Glu Pro Ile Val Cys Asp Thr Trp Asp Glu Glu Tyr Glu  
100 105 110

Ser Asp Thr Pro Val Pro Ser Arg Asn Cys Thr Leu His Asp Ile Gln  
115 120 125

His Lys Arg Leu Val Leu Ser Asp Pro Cys Glu Leu Lys Ala Leu His  
130 135 140

Leu Asn Gly Asp Asn Leu Asn Arg Gln Val Val Phe Ser Met Ser Phe  
 145 150 155 160  
 Val Gln Gly Glu Arg Ser Asp Asn Lys Met Pro Val Ala Leu Gly Leu  
 165 170 175  
 Lys Gly Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Met Lys Asp Gly Lys Pro  
 180 185 190  
 Val Leu Gln Leu Glu Ser Val Asp Gly Lys Gln Tyr Pro Lys Lys Lys  
 195 200 205  
 Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Thr Ser Lys Ser Thr Val  
 210 215 220  
 Glu Phe Glu Ser Ala Gln Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Gln  
 225 230 235 240  
 Ala Glu His Lys Pro Val Phe Leu Gly Asn Asn Asn Gly Gln Asp Ile  
 245 250 255  
 Ile Asp Phe Lys Leu Glu Leu Val Ser Ser  
 260 265  
 <210> 59  
 <211> 266  
 <212> PRT  
 <213> Bos taurus  
 <400> 59  
 Met Ala Thr Val Pro Glu Pro Ile Asn Glu Met Met Ala Tyr Tyr Ser  
 1 5 10 15  
 Asp Glu Asn Glu Leu Leu Phe Glu Ala Asp Asp Pro Lys Gln Met Lys  
 20 25 30  
 Ser Cys Ile Gln His Leu Asp Leu Gly Ser Met Gly Asp Gly Asn Ile  
 35 40 45  
 Gln Leu Gln Ile Ser His Gln Phe Tyr Asn Lys Ser Phe Arg Gln Val  
 50 55 60  
 Val Ser Val Ile Val Ala Met Glu Lys Leu Arg Asn Ser Ala Tyr Ala  
 65 70 75 80  
 His Val Phe His Asp Asp Asp Leu Arg Ser Ile Leu Ser Phe Ile Phe  
 85 90 95  
 Glu Glu Glu Pro Val Ile Phe Glu Thr Ser Ser Asp Glu Phe Leu Cys  
 100 105 110  
 Asp Ala Pro Val Gln Ser Ile Lys Cys Lys Leu Gln Asp Arg Glu Gln  
 115 120 125  
 Lys Ser Leu Val Leu Ala Ser Pro Cys Val Leu Lys Ala Leu His Leu  
 130 135 140  
 Leu Ser Gln Glu Met Asn Arg Glu Val Val Phe Cys Met Ser Phe Val  
 145 150 155 160  
 Gln Gly Glu Glu Arg Asp Asn Lys Ile Pro Val Ala Leu Gly Ile Lys  
 165 170 175  
 Asp Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Lys Lys Gly Asp Thr Pro Thr  
 180 185 190  
 Leu Gln Leu Glu Glu Val Asp Pro Lys Val Tyr Pro Lys Arg Asn Met  
 195 200 205

Glu Lys Arg Phe Val Phe Tyr Lys Thr Glu Ile Lys Asn Thr Val Glu  
210 215 220

Phe Glu Ser Val Leu Tyr Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Gln Ile  
225 230 235 240

Glu Glu Arg Pro Val Phe Leu Gly His Phe Arg Gly Gly Gln Asp Ile  
245 250 255

Thr Asp Phe Arg Met Glu Thr Leu Ser Pro  
260 265

<210> 60

<211> 266

<212> PRT

<213> Ovis aries

<400> 60

Met Ala Thr Val Pro Glu Pro Ile Asn Glu Val Met Ala Tyr Tyr Ser  
1 5 10 15

Asp Glu Asn Glu Leu Leu Phe Glu Val Asp Gly Pro Lys Gln Met Lys  
20 25 30

Ser Cys Thr Gln His Leu Asp Leu Gly Ser Met Gly Asp Gly Asn Ile  
35 40 45

Gln Leu Gln Ile Ser His Gln Leu Tyr Asn Lys Ser Phe Arg Gln Val  
50 55 60

Val Ser Val Ile Val Ala Met Glu Lys Leu Arg Ser Arg Ala Tyr Glu  
65 70 75 80

His Val Phe Arg Asp Asp Asp Leu Arg Ser Ile Leu Ser Phe Ile Phe  
85 90 95

Glu Glu Glu Pro Val Ile Phe Glu Thr Ser Ser Asp Glu Leu Leu Cys  
100 105 110

Asp Ala Ala Val Gln Ser Val Lys Cys Lys Leu Gln Asp Arg Glu Gln  
115 120 125

Lys Ser Leu Val Leu Asp Ser Pro Cys Val Leu Lys Ala Leu His Leu  
130 135 140

Pro Ser Gln Glu Met Ser Arg Glu Val Val Phe Cys Met Ser Phe Val  
145 150 155 160

Gln Gly Glu Glu Arg Asp Asn Lys Ile Pro Val Ala Leu Gly Ile Arg  
165 170 175

Asp Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Lys Lys Gly Asp Thr Pro Thr  
180 185 190

Leu Gln Leu Glu Glu Val Asp Pro Lys Val Tyr Pro Lys Arg Asn Met  
195 200 205

Glu Lys Arg Phe Val Phe Tyr Lys Thr Glu Ile Lys Asn Thr Val Glu  
210 215 220

Phe Glu Ser Val Leu Tyr Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Gln Ile  
225 230 235 240

Glu Glu Lys Pro Val Phe Leu Gly Arg Phe Arg Gly Gly Gln Asp Ile  
245 250 255

Thr Asp Phe Arg Met Glu Thr Leu Ser Pro  
260 265



<210> 61  
 <211> 267  
 <212> PRT  
 <213> Gallus gallus  
 <400> 61  
 Met Ala Phe Val Pro Asp Leu Asp Val Leu Glu Ser Ser Ser Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Glu Thr Phe Tyr Gly Pro Ser Cys Leu Cys Leu Gln Lys Lys Pro  
 20 25 30  
 Arg Leu Asp Ser Glu His Thr Thr Val Asp Val Gln Val Thr Val Arg  
 35 40 45  
 Lys Gly Arg Gly Ala Arg Ser Phe Arg Arg Ala Ala Val Leu Val Val  
 50 55 60  
 Ala Met Thr Lys Leu Leu Arg Arg Pro Arg Ser Arg Asp Phe Ala Asp  
 65 70 75 80  
 Ser Asp Leu Ser Ala Leu Leu Glu Glu Val Phe Glu Pro Val Thr Phe  
 85 90 95  
 Gln Arg Leu Glu Ser Ser Tyr Ala Gly Ala Pro Ala Phe Arg Tyr Thr  
 100 105 110  
 Arg Ser Gln Ser Phe Asp Ile Phe Asp Ile Asn Gln Lys Cys Phe Val  
 115 120 125  
 Leu Glu Ser Pro Thr Gln Leu Val Ala Leu His Leu Gln Gly Pro Ser  
 130 135 140  
 Ser Ser Gln Lys Val Arg Leu Asn Ile Ala Leu Tyr Arg Pro Arg Gly  
 145 150 155 160  
 Pro Arg Gly Ser Ala Gly Thr Gly Gln Met Pro Val Ala Leu Gly Ile  
 165 170 175  
 Lys Gly Tyr Lys Leu Tyr Met Ser Cys Val Met Ser Gly Thr Glu Pro  
 180 185 190  
 Thr Leu Gln Leu Glu Glu Ala Asp Val Met Arg Asp Ile Asp Ser Val  
 195 200 205  
 Glu Leu Thr Arg Phe Ile Phe Tyr Arg Leu Asp Ser Pro Thr Glu Gly  
 210 215 220  
 Thr Thr Arg Phe Glu Ser Ala Ala Phe Pro Gly Trp Phe Ile Cys Thr  
 225 230 235 240  
 Ser Leu Gln Pro Arg Gln Pro Val Gly Ile Thr Asn Gln Pro Asp Gln  
 245 250 255  
 Val Asn Ile Ala Thr Tyr Lys Leu Ser Gly Arg  
 260 265  
 <210> 62  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> Canis familiaris  
 <400> 62  
 Gly Pro Gly Gly Ser Asn Val Lys Cys Cys Cys Gln Asp Leu Asn His  
 1 5 10 15  
 Ser Ser Leu Val Asp Glu Gly Ile Gln Leu Gln Val Ser His Gln Leu  
 20 25 30

Cys Asn Lys Ser Leu Arg His Phe Val Ser Val Ile Val Ala Leu Glu  
35 40 45

Lys Leu Lys Lys Pro Cys Pro Gln Val Leu Gln Glu Asp Asp Leu Lys  
50 55 60

Ser Ile Phe Cys Tyr Ile Phe Glu Glu Glu Pro Ile Ile Cys Lys Thr  
65 70 75 80

Asp Ala Asp Asn Phe Met Ser Asp Ala Ala Met Gln Ser Val Asp Cys  
85 90 95

Lys Leu Gln Asp Ile Ser His Lys Tyr Leu Val Leu Ser Asn Ser Tyr  
100 105 110

Glu Leu Arg Ala Leu His Leu Asn Gly Glu Asn Val Asn Lys Ala  
115 120 125

<210> 63

<211> 153

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Leu Ser Asn Val Lys Tyr Asn Phe Met Arg Ile Ile Lys Tyr Glu Phe  
1 5 10 15

Ile Leu Asn Asp Ala Leu Asn Gln Ser Ile Ile Arg Ala Asn Asp Gln  
20 25 30

Tyr Leu Thr Ala Ala Ala Leu His Asn Leu Asp Glu Ala Val Lys Phe  
35 40 45

Asp Met Gly Ala Tyr Lys Ser Ser Lys Asp Asp Ala Lys Ile Thr Val  
50 55 60

Ile Leu Arg Ile Ser Lys Thr Gln Leu Tyr Val Thr Ala Gln Asp Glu  
65 70 75 80

Asp Gln Pro Val Leu Leu Lys Glu Met Pro Glu Ile Pro Lys Thr Ile  
85 90 95

Thr Gly Ser Glu Thr Asn Leu Leu Phe Phe Trp Glu Thr His Gly Thr  
100 105 110

Lys Asn Tyr Phe Thr Ser Val Ala His Pro Asn Leu Phe Ile Ala Thr  
115 120 125

Lys Gln Asp Tyr Trp Val Cys Leu Ala Gly Gly Pro Pro Ser Ile Thr  
130 135 140

Asp Phe Gln Ile Leu Glu Asn Gln Ala  
145 150

<210> 64

<211> 153

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Ala Pro Val Arg Ser Leu Asn Cys Thr Leu Arg Asp Ser Gln Gln Lys  
1 5 10 15

Ser Leu Val Met Ser Gly Pro Tyr Glu Leu Lys Ala Leu His Leu Gln  
20 25 30

Gly Gln Asp Met Glu Gln Gln Val Val Phe Ser Met Ser Phe Val Gln  
35 40 45

Gly Glu Glu Ser Asn Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu Gly Leu Lys Glu  
 50 55 60  
 Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Leu Lys Asp Asp Lys Pro Thr Leu  
 65 70 75 80  
 Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys Lys Lys Met Glu  
 85 90 95  
 Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Ile Asn Asn Lys Leu Glu Phe  
 100 105 110  
 Glu Ser Ala Gln Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Gln Ala Glu  
 115 120 125  
 Asn Met Pro Val Phe Leu Gly Gly Thr Lys Gly Gly Gln Asp Ile Thr  
 130 135 140  
 Asp Phe Thr Met Gln Phe Val Ser Ser  
 145 150  
 <210> 65  
 <211> 183  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 65  
 Met Asp Pro His His His His His His Gly Ser Gly Asp Asp Asp Asp  
 1 5 10 15  
 Lys Ala Leu Ala Pro Tyr Thr Tyr Gln Ser Asp Leu Arg Tyr Lys Leu  
 20 25 30  
 Met Lys Leu Val Arg Gln Lys Phe Val Met Asn Asp Ser Leu Asn Gln  
 35 40 45  
 Thr Ile Tyr Gln Asp Val Asp Lys His Tyr Leu Ser Thr Thr Trp Leu  
 50 55 60  
 Asn Asp Leu Gln Gln Glu Val Lys Phe Asp Met Tyr Ala Tyr Ser Ser  
 65 70 75 80  
 Gly Gly Asp Asp Ser Lys Tyr Pro Val Thr Leu Lys Ile Ser Asp Ser  
 85 90 95  
 Gln Leu Phe Val Ser Ala Gln Gly Glu Asp Gln Pro Val Leu Leu Lys  
 100 105 110  
 Glu Leu Pro Glu Thr Pro Lys Leu Ile Thr Gly Ser Glu Thr Asp Leu  
 115 120 125  
 Ile Phe Phe Trp Lys Ser Ile Asn Ser Lys Asn Tyr Phe Thr Ser Ala  
 130 135 140  
 Ala Tyr Pro Glu Leu Phe Ile Ala Thr Lys Glu Gln Ser Arg Val His  
 145 150 155 160  
 Leu Ala Arg Gly Leu Pro Ser Met Thr Asp Phe Gln Ile Ser Leu Glu  
 165 170 175  
 Gly Gly Gly Gly Gly Cys Gly  
 180

<210> 66  
 <211> 180  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 66

Met Asp Pro His His His His His His Gly Ser Gly Asp Asp Asp Asp  
 1 5 10 15

Lys Ala Leu Ala Pro Ile Arg Gln Leu His Tyr Arg Leu Arg Asp Glu  
 20 25 30

Gln Gln Lys Ser Leu Val Leu Ser Asp Pro Tyr Glu Leu Lys Ala Leu  
 35 40 45

His Leu Asn Gly Gln Asn Ile Asn Gln Gln Val Ile Phe Ser Met Ser  
 50 55 60

Phe Val Gln Gly Glu Pro Ser Asn Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu Gly  
 65 70 75 80

Leu Lys Gly Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Met Lys Asp Gly Thr  
 85 90 95

Pro Thr Leu Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Gln Tyr Pro Lys Lys  
 100 105 110

Lys Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Val Lys Ser Lys  
 115 120 125

Val Glu Phe Glu Ser Ala Glu Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser  
 130 135 140

Gln Ala Glu His Lys Pro Val Phe Leu Gly Asn Asn Ser Gly Gln Asp  
 145 150 155 160

Ile Ile Asp Phe Thr Met Glu Ser Val Ser Ser Leu Glu Gly Gly Gly  
 165 170 175

Gly Gly Cys Gly  
 180

<210> 67

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Met Arg Ile Ile Lys Tyr Glu Phe Ile Leu Asn Asp  
 1 5 10

<210> 68

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

Arg Ile Ile Lys Tyr Glu  
 1 5

<210> 69

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Tyr Glu Phe Ile Leu Asn Asp Ala Leu Asn  
 1 5 10

<210> 70

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

Asn Asp Ala Leu Asn Gln Ser Ile Ile Arg Ala Asn  
 1 5 10

<210> 71  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 71  
 Thr Ala Ala Ala Leu His Asn Leu Asp Glu  
 1 5 10

<210> 72  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 72  
 Thr Ala Ala Ala Leu His Asn Leu Asp Glu Ala Val  
 1 5 10

<210> 73  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 73  
 Ala Val Lys Phe Asp Met Gly Ala Tyr Lys  
 1 5 10

<210> 74  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 74  
 Ala Tyr Lys Ser Ser Lys Asp Asp Ala Lys Ile  
 1 5 10

<210> 75  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 75  
 Ser Ser Lys Asp Asp Ala Lys Ile Thr Val Ile Leu Arg Ile Ser Lys  
 1 5 10 15

Thr Gln Leu Tyr Val Thr Ala Gln Asp Glu Asp Gln Pro Val Leu  
 20 25 30

<210> 76  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 76  
 Val Ile Leu Arg Ile Ser Lys Thr Gln Leu Tyr Val Thr  
 1 5 10

<210> 77  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 77  
 Val Ile Leu Arg Ile Ser Lys Thr Gln Leu Tyr Val Thr Ala Gln Asp  
 1 5 10 15

Glu Asp Gln Pro Val Leu  
 20

<210> 78  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 78  
 Thr Gln Leu Tyr Val Thr Ala Gln Asp Glu Asp Gln Pro Val Leu Leu  
 1 5 10 15

Lys Glu Met Pro  
 20

<210> 79  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 79

Pro Val Leu Leu Lys Glu Met Pro Glu Ile Pro Lys Thr Ile Thr Gly  
 1 5 10 15

Ser Glu Thr Asn Leu  
 20

<210> 80  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 80

Glu Met Pro Glu Ile Pro Lys Thr Ile Thr Gly Ser Glu Thr  
 1 5 10

<210> 81  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 81

Lys Thr Ile Thr Gly Ser Glu Thr Asn Leu Leu Phe  
 1 5 10

<210> 82  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 82

Pro Lys Thr Ile Thr Gly Ser Glu Thr Asn Leu Leu Phe Phe Trp Glu  
 1 5 10 15

Thr His Gly Thr Lys  
 20

<210> 83  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 83

Gly Ser Glu Thr Asn Leu Leu Phe Phe Trp  
 1 5 10

<210> 84  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 84

Leu Phe Ile Ala Thr Lys Gln Asp Tyr Trp Val Cys  
 1 5 10

<210> 85  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 85

Phe Ile Ala Thr Lys Gln Asp Tyr Trp Val Cys Leu Ala  
1 5 10

<210> 86

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Ile Ala Thr Lys Gln Asp Tyr Trp Val Cys Leu Ala Gly Gly Pro Pro  
1 5 10 15

Ser Ile

<210> 87

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

Lys Gln Asp Tyr Trp  
1 5

<210> 88

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Gln Ile Leu Glu Asn Gln Ala  
1 5

<210> 89

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

Ala Pro Val Arg Ser Leu  
1 5

<210> 90

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

Ala Pro Val Arg Ser Leu Asn Cys Thr Leu Arg Asp  
1 5 10

<210> 91

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

Leu Asn Cys Thr Leu Arg Asp Ser Gln Gln  
1 5 10

<210> 92

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

Arg Asp Ser Gln Gln Lys Ser Leu Val Met Ser Gly  
1 5 10

<210> 93

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

Lys Ala Leu His Leu Gln Gly Gln Asp Met Glu Gln  
 1 5 10

<210> 94

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

Lys Ala Leu His Leu Gln Gly Gln Asp Met Glu Gln Gln Val  
 1 5 10

<210> 95

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

Gln Val Val Phe Ser Met Ser Phe Val Gln  
 1 5 10

<210> 96

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

Phe Val Gln Gly Glu Glu Ser Asn Asp Lys Ile  
 1 5 10

<210> 97

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

Gly Glu Glu Ser Asn Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu Gly Leu Lys Glu  
 1 5 10 15

Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Leu Lys Asp Asp Lys Pro Thr Leu  
 20 25 30

<210> 98

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 98

Val Ala Leu Gly Leu Lys Glu Lys Asn Leu Tyr Leu Ser  
 1 5 10

<210> 99

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 99

Val Ala Leu Gly Leu Lys Glu Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Leu  
 1 5 10 15

Lys Asp Asp Lys Pro Thr Leu  
 20

<210> 100

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 100

Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Leu Lys Asp Asp Lys Pro Thr Leu  
 1 5 10 15

Gln Leu Glu Ser Val  
 20



<210> 101  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 101  
 Pro Thr Leu Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys Lys  
 1 5 10 15

Lys Met Glu Lys  
 20

<210> 102  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 102  
 Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys Lys Lys Met  
 1 5 10

<210> 103  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 103  
 Lys Asn Tyr Pro Lys Lys Lys Met Glu Lys Arg Phe  
 1 5 10

<210> 104  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 104  
 Lys Lys Lys Met Glu Lys Arg Phe Val Phe  
 1 5 10

<210> 105  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 105  
 Lys Lys Lys Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Ile Asn  
 1 5 10 15

Asn Lys

<210> 106  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 106  
 Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Gln Ala Glu Asn Met Pro Val Phe  
 1 5 10

<210> 107  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 107  
 Tyr Ile Ser Thr Ser Gln Ala Glu Asn Met Pro Val Phe Leu Gly  
 1 5 10 15

<210> 108  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 108

Ile Ser Thr Ser Gln Ala Glu Asn Met Pro Val Phe Leu Gly Gly Thr  
 1 5 10 15

Lys Gly Gly Gln Asp Ile  
 20

<210> 109

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 109

Gln Ala Glu Asn Met Pro  
 1 5

<210> 110

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 110

Thr Met Gln Phe Val Ser Ser  
 1 5

<210> 111

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 111

Val Pro Ile Arg Gln Leu His Tyr Arg Leu Arg Asp  
 1 5 10

<210> 112

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 112

Lys Ala Leu His Leu Asn Gly Gln Asn Ile Asn Gln Gln Val  
 1 5 10

<210> 113

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 113

Tyr Ile Ser Thr Ser Gln Ala Glu His Lys Pro Val Phe Leu Gly  
 1 5 10 15

<210> 114

<211> 20

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 114

Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Met Lys Asp Gly Thr Pro Thr Leu Gln  
 1 5 10 15

Leu Glu Ser Val  
 20

<210> 115

<211> 20

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 115

Pro Thr Leu Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Gln Tyr Pro Lys Lys  
 1 5 10 15

Lys Met Glu Lys  
 20

<210> 116  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus  
 <400> 116  
 Ile Ser Thr Ser Gln Ala Glu His Arg Pro Val Phe Leu Gly Asn Ser  
 1 5 10 15  
  
 Asn Gly Arg Asp Ile Val  
 20  
  
 <210> 117  
 <211> 421  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
 <400> 117  
 atggcaaata agccaatgca accgatcaca tctacagcaa ataaaattgt gtggtcggat 60  
 ccaactcgtt tatcaactac attttcagca agtctgttac gccaacgtgt taaagttggt 120  
 atagccgaac tgaataatgt ttcagggtcaa tatgtatctg tttataagcg tcttcgacct 180  
 aaaccggaag gttgtgcaga tgcctgtgtc attatgccga atgaaaacca atccattcgc 240  
 acagtgattt cagggtcagc cgaaaacttg gctaccttaa aagcagaatg ggaaactcac 300  
 aaacgtaacg ttgacacact cttcgcgagc ggcaacgccg gtttgggttt ccttgaccct 360  
 actgcggtta tcgtatcgtc tgatactact gcttagggat ccggataatg catctaagct 420  
 t 421  
  
 <210> 118  
 <211> 421  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
 <400> 118  
 atggcaaata agccaatgca accgatcaca tctacagcaa ataaaattgt gtggtcggat 60  
 ccaactcgtt tatcaactac attttcagca agtctgttac gccaacgtgt taaagttggt 120  
 atagccgaac tgaataatgt ttcagggtcaa tatgtatctg tttataagcg tcttcgacct 180  
 aaaccggaag gttgtgcaga tgcctgtgtc attatgccga atgaaaacca atccattcgc 240  
 acagtgattt cagggtcagc cgaaaacttg gctaccttaa aagcagaatg ggaaactcac 300  
 aaacgtaacg ttgacacact cttcgcgagc ggcaacgccg gtttgggttt ccttgaccct 360  
 actgcggtta tcgtatcgtc tgatactact gcttagggat ccggataatg catctaagct 420  
 t 421  
  
 <210> 119  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2)  
 <223> n is a, c, g, ou t  
 <400> 119  
 nncatggca aataagcaa tgcaaccg 28  
  
 <210> 120  
 <211> 52  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
 <400> 120  
 gtaagcttag atgcattatc cggatcccta agcagtagta tcagacgata cg 52  
  
 <210> 121

<211> 52  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
 <400> 121  
 gtaagcttag atgcattatc cggatcctca agcagtagta tcagacgata cg 52

<210> 122  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
 <400> 122  
 ggtecgagc gctagcccct tacac 25

<210> 123  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
 <400> 123  
 gtaagcttat gcattatgat atctggaagt ctgtcataga 40

<210> 124  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
 <400> 124  
 atatatgata tcctgtacg atcactgaac tgcacg 36

<210> 125  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
 <400> 125  
 atatatctcg aggaagaca caaattgcat ggtgaag 37

<210> 126  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
 <400> 126  
 tatggatc gaattcaagc ttctgcagct gctcgagtaa ttgattac 48

<210> 127  
 <211> 50  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
 <400> 127  
 ctaggtaatc aattactcga gcagctgcag aagcttgaat tcgatatcca 50

<210> 128  
 <211> 52  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>

<223> Sequência sintetizada  
 <400> 128  
 tcgagcacca ccaccaccac cacggtgggt gctaataata attgattaat ac 52

<210> 129  
 <211> 52  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
 <400> 129  
 ctaggtatta atcaattatt attagcaacc accgtgggtg tggtgggtgt gc 52

<210> 130  
 <211> 166  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 130  
 Met Asp Ile Pro Val Arg Ser Leu Asn Cys Thr Leu Arg Asp Ser Gln  
 1 5 10 15  
 Gln Lys Ser Leu Val Met Ser Gly Pro Tyr Glu Leu Lys Ala Leu His  
 20 25 30  
 Leu Gln Gly Gln Asp Met Glu Gln Gln Val Val Phe Ser Met Ser Phe  
 35 40 45  
 Val Gln Gly Glu Glu Ser Asn Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu Gly Leu  
 50 55 60  
 Lys Glu Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Leu Lys Asp Asp Lys Pro  
 65 70 75 80  
 Thr Leu Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys Lys Lys  
 85 90 95  
 Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Ile Asn Asn Lys Leu  
 100 105 110  
 Glu Phe Glu Ser Ala Gln Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Gln  
 115 120 125  
 Ala Glu Asn Met Pro Val Phe Leu Gly Gly Thr Lys Gly Gly Gln Asp  
 130 135 140  
 Ile Thr Asp Phe Thr Met Gln Phe Val Ser Ser Leu Glu His His His  
 145 150 155 160  
 His His His Gly Gly Cys  
 165

<210> 131  
 <211> 155  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 131  
 Met Asp Ile Pro Val Asp Ser Leu Asn Cys Thr Leu Arg Asp Ser Gln  
 1 5 10 15  
 Gln Lys Ser Leu Val Met Ser Gly Pro Tyr Glu Leu Lys Ala Leu His  
 20 25 30  
 Leu Gln Gly Gln Asp Met Glu Gln Gln Val Val Phe Ser Met Ser Phe  
 35 40 45  
 Val Gln Gly Glu Glu Ser Asn Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu Gly Leu  
 50 55 60

Lys Glu Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Leu Lys Asp Asp Lys Pro  
65 70 75 80

Thr Leu Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys Lys Lys  
85 90 95

Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Ile Asn Asn Lys Leu  
100 105 110

Glu Phe Glu Ser Ala Gln Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Gln  
115 120 125

Ala Glu Asn Met Pro Val Phe Leu Gly Gly Thr Lys Gly Gly Gln Asp  
130 135 140

Ile Thr Asp Phe Thr Met Gln Phe Val Ser Ser  
145 150 155

<210> 132

<211> 155

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 132

Met Asp Ile Pro Val Arg Ser Ala Asn Cys Thr Leu Arg Asp Ser Gln  
1 5 10 15

Gln Lys Ser Leu Val Met Ser Gly Pro Tyr Glu Leu Lys Ala Leu His  
20 25 30

Leu Gln Gly Gln Asp Met Glu Gln Gln Val Val Phe Ser Met Ser Phe  
35 40 45

Val Gln Gly Glu Glu Ser Asn Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu Gly Leu  
50 55 60

Lys Glu Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Leu Lys Asp Asp Lys Pro  
65 70 75 80

Thr Leu Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys Lys Lys  
85 90 95

Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Ile Asn Asn Lys Leu  
100 105 110

Glu Phe Glu Ser Ala Gln Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Gln  
115 120 125

Ala Glu Asn Met Pro Val Phe Leu Gly Gly Thr Lys Gly Gly Gln Asp  
130 135 140

Ile Thr Asp Phe Thr Met Gln Phe Val Ser Ser  
145 150 155

<210> 133

<211> 155

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 133

Met Asp Ile Pro Val Arg Ser Leu Asn Cys Gly Leu Arg Asp Ser Gln  
1 5 10 15

Gln Lys Ser Leu Val Met Ser Gly Pro Tyr Glu Leu Lys Ala Leu His  
20 25 30

Leu Gln Gly Gln Asp Met Glu Gln Gln Val Val Phe Ser Met Ser Phe  
35 40 45

Val Gln Gly Glu Glu Ser Asn Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu Gly Leu  
 50 55 60

Lys Glu Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Leu Lys Asp Asp Lys Pro  
 65 70 75 80

Thr Leu Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys Lys Lys  
 85 90 95

Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Ile Asn Asn Lys Leu  
 100 105 110

Glu Phe Glu Ser Ala Gln Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Gln  
 115 120 125

Ala Glu Asn Met Pro Val Phe Leu Gly Gly Thr Lys Gly Gly Gln Asp  
 130 135 140

Ile Thr Asp Phe Thr Met Gln Phe Val Ser Ser  
 145 150 155

<210> 134

<211> 155

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 134

Met Asp Ile Pro Val Arg Ser Leu Asn Cys Thr Leu Gly Asp Ser Gln  
 1 5 10 15

Gln Lys Ser Leu Val Met Ser Gly Pro Tyr Glu Leu Lys Ala Leu His  
 20 25 30

Leu Gln Gly Gln Asp Met Glu Gln Gln Val Val Phe Ser Met Ser Phe  
 35 40 45

Val Gln Gly Glu Glu Ser Asn Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu Gly Leu  
 50 55 60

Lys Glu Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Leu Lys Asp Asp Lys Pro  
 65 70 75 80

Thr Leu Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys Lys Lys  
 85 90 95

Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Ile Asn Asn Lys Leu  
 100 105 110

Glu Phe Glu Ser Ala Gln Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Gln  
 115 120 125

Ala Glu Asn Met Pro Val Phe Leu Gly Gly Thr Lys Gly Gly Gln Asp  
 130 135 140

Ile Thr Asp Phe Thr Met Gln Phe Val Ser Ser  
 145 150 155

<210> 135

<211> 155

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 135

Met Asp Ile Pro Val Arg Ser Leu Asn Cys Thr Leu Arg Asp Ser Gln  
 1 5 10 15

Gln Lys Ser Leu Val Met Ser Gly Pro Tyr Glu Leu Lys Ala Leu His  
 20 25 30

Leu Gln Gly Gln Asp Met Glu Gln Gln Val Val Phe Ser Met Ser Phe  
35 40 45

Val Gln Gly Glu Glu Ser Asn Arg Lys Ile Pro Val Ala Leu Gly Leu  
50 55 60

Lys Glu Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Leu Lys Asp Asp Lys Pro  
65 70 75 80

Thr Leu Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys Lys Lys  
85 90 95

Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Ile Asn Asn Lys Leu  
100 105 110

Glu Phe Glu Ser Ala Gln Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Gln  
115 120 125

Ala Glu Asn Met Pro Val Phe Leu Gly Gly Thr Lys Gly Gly Gln Asp  
130 135 140

Ile Thr Asp Phe Thr Met Gln Phe Val Ser Ser  
145 150 155

<210> 136

<211> 155

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 136

Met Asp Ile Pro Val Arg Ser Leu Asn Cys Thr Leu Arg Asp Ser Gln  
1 5 10 15

Gln Lys Ser Leu Val Met Ser Gly Pro Tyr Glu Leu Lys Ala Leu His  
20 25 30

Leu Gln Gly Gln Asp Met Glu Gln Gln Val Val Phe Ser Met Ser Phe  
35 40 45

Val Gln Gly Glu Glu Ser Asn Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu Gly Leu  
50 55 60

Lys Glu Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Leu Lys Asp Asp Lys Pro  
65 70 75 80

Thr Leu Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys Lys Lys  
85 90 95

Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Ile Asn Asn Lys Leu  
100 105 110

Glu Phe Glu Ser Ala Gln Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Gln  
115 120 125

Ala Glu Asn Met Pro Val Phe Leu Gly Gly Thr Lys Gly Gly Gln Asp  
130 135 140

Ile Thr Lys Phe Thr Met Gln Phe Val Ser Ser  
145 150 155

<210> 137

<211> 153

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 137

Met Asp Ile Pro Val Arg Ser Leu Asn Cys Thr Leu Arg Asp Ser Gln  
1 5 10 15



Gln Lys Ser Leu Val Met Ser Gly Pro Tyr Glu Leu Lys Ala Leu His  
                   20                                  25                                  30  
 Leu Gln Gly Gln Asp Met Glu Gln Gln Val Val Phe Ser Met Ser Phe  
                   35                                  40                                  45  
 Val Gln Gly Ser Asn Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu Gly Leu Lys Glu  
                   50                                  55                                  60  
 Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Leu Lys Asp Asp Lys Pro Thr Leu  
  65                                  70                                  75                                  80  
 Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys Lys Lys Met Glu  
                                   85                                  90                                  95  
 Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Ile Asn Asn Lys Leu Glu Phe  
                                  100                                 105                                 110  
 Glu Ser Ala Gln Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Gln Ala Glu  
                   115                                 120                                 125  
 Asn Met Pro Val Phe Leu Gly Gly Thr Lys Gly Gly Gln Asp Ile Thr  
  130                                 135                                 140  
 Asp Phe Thr Met Gln Phe Val Ser Ser  
  145                                 150

<210> 138

<211> 152

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 138

Met Asp Ile Pro Val Arg Ser Leu Asn Cys Thr Leu Arg Asp Ser Gln  
  1                                  5                                  10                                  15

Gln Lys Ser Leu Val Met Ser Gly Pro Tyr Glu Leu Lys Ala Leu His  
                   20                                  25                                  30

Leu Gln Gly Gln Asp Met Glu Gln Gln Val Val Phe Ser Met Ser Phe  
                   35                                  40                                  45

Val Gln Gly Glu Glu Lys Ile Pro Val Ala Leu Gly Leu Lys Glu Lys  
                   50                                  55                                  60

Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Leu Lys Asp Asp Lys Pro Thr Leu Gln  
  65                                  70                                  75                                  80

Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys Lys Lys Met Glu Lys  
                                   85                                  90                                  95

Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Ile Asn Asn Lys Leu Glu Phe Glu  
                                  100                                 105                                 110

Ser Ala Gln Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Gln Ala Glu Asn  
                   115                                 120                                 125

Met Pro Val Phe Leu Gly Gly Thr Lys Gly Gly Gln Asp Ile Thr Asp  
  130                                 135                                 140

Phe Thr Met Gln Phe Val Ser Ser  
  145                                 150

<210> 139

<211> 155

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 139

Met Asp Ile Pro Val Arg Ser Leu Asn Cys Thr Leu Arg Asp Ser Gln  
1 5 10 15

Gln Lys Ser Leu Val Met Ser Gly Pro Tyr Glu Leu Lys Ala Leu His  
20 25 30

Leu Gln Gly Gln Asp Met Glu Gln Gln Val Val Phe Ser Met Ser Phe  
35 40 45

Val Gln Gly Glu Glu Ser Asn Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu Gly Leu  
50 55 60

Ser Glu Ser Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Leu Lys Asp Asp Lys Pro  
65 70 75 80

Thr Leu Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys Lys Lys  
85 90 95

Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Ile Asn Asn Lys Leu  
100 105 110

Glu Phe Glu Ser Ala Gln Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Gln  
115 120 125

Ala Glu Asn Met Pro Val Phe Leu Gly Gly Thr Lys Gly Gly Gln Asp  
130 135 140

Ile Thr Asp Phe Thr Met Gln Phe Val Ser Ser  
145 150 155

<210> 140

<211> 155

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 140

Met Asp Ile Pro Val Arg Ser Leu Asn Cys Thr Leu Arg Asp Ser Gln  
1 5 10 15

Gln Lys Ser Leu Val Met Ser Gly Pro Tyr Glu Leu Lys Ala Leu His  
20 25 30

Leu Gln Gly Gln Asp Met Glu Gln Gln Val Val Phe Ser Met Ser Phe  
35 40 45

Val Gln Gly Glu Glu Ser Asn Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu Gly Leu  
50 55 60

Lys Glu Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Leu Lys Asp Asp Lys Pro  
65 70 75 80

Thr Leu Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys Lys Lys  
85 90 95

Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Ile Asn Asn Lys Leu  
100 105 110

Glu Phe Glu Ser Ala Gln Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Ala  
115 120 125

Ala Ala Asn Met Pro Val Phe Leu Gly Gly Thr Lys Gly Gly Gln Asp  
130 135 140

Ile Thr Asp Phe Thr Met Gln Phe Val Ser Ser  
145 150 155

<210> 141

<211> 39

<212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
 <400> 141  
 atatatcata tgctgagcaa tgtgaaatac aactttatg 39

<210> 142  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
 <400> 142  
 atatatctcg agcgcctggt tttccagtat ctgaaag 37

<210> 143  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
 <400> 143  
 catatggata tcctgtaga ctactgaac tgcacgctc 39

<210> 144  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
 <400> 144  
 gagcgtgcag ttcagtgagt ctacaggat atccatag 39

<210> 145  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
 <400> 145  
 gatattcctg tacgatcagc taactgcagc ctccgggac 39

<210> 146  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
 <400> 146  
 gtcccggagc gtgcagttag ctgatcgtac agggatatc 39

<210> 147  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
 <400> 147  
 gtacgatcac tgaactgcgg tctccgggac tcacagc 37

<210> 148  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada

<400> 148 gctgtgagtc ccggagaccg cagttcagtg atcgtac	37
<210> 149 <211> 26 <212> DNA <213> Sequência artificial <220> <223> Sequência sintetizada <400> 149 gaactgcacg ctcggggact cacagc	26
<210> 150 <211> 26 <212> DNA <213> Sequência artificial <220> <223> Sequência sintetizada <400> 150 gctgtgagtc cccgagcgtg cagttc	26
<210> 151 <211> 39 <212> DNA <213> Sequência artificial <220> <223> Sequência sintetizada <400> 151 caaggagaag aaagtaatcg caaatacct gtggccttg	39
<210> 152 <211> 39 <212> DNA <213> Sequência artificial <220> <223> Sequência sintetizada <400> 152 caaggccaca ggtattttgc gattactttc ttctccttg	39
<210> 153 <211> 40 <212> DNA <213> Sequência artificial <220> <223> Sequência sintetizada <400> 153 catgtccttt gtacaaggaa gtaatgacaa aatacctgtg	40
<210> 154 <211> 40 <212> DNA <213> Sequência artificial <220> <223> Sequência sintetizada <400> 154 cacaggtatt ttgtcattac ttcttgtac aaaggacatg	40
<210> 155 <211> 37 <212> DNA <213> Sequência artificial <220> <223> Sequência sintetizada <400> 155 ctttgtacaa ggagaagaaa aatacctgt ggccttg	37
<210> 156	

<211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
 <400> 156  
 caaggccaca ggtatttttt cttctccttg tacaaag 37

<210> 157  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
 <400> 157  
 gtggccttgg gcctcagcga aagcaatctg tacctgtcct g 41

<210> 158  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
 <400> 158  
 caggacaggt acagattgct ttcgctgagg cccaaggcca c 41

<210> 159  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
 <400> 159  
 gtacatcagc acctctgcag cagcaaacat gcccgctctc 40

<210> 160  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
 <400> 160  
 gaagacgggc atgtttgctg ctgcagaggt gctgatgtac 40

<210> 161  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
 <400> 161  
 gcggccagga tataactaaa ttcacatgc aatttgtgtc 40

<210> 162  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
 <400> 162  
 gacacaaatt gcatggtgaa ttagttata tcttgccgc 40

<210> 163  
 <211> 154  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 163

Pro Tyr Thr Tyr Gln Ser Asp Leu Arg Tyr Lys Leu Met Lys Leu Val  
 1 5 10 15  
 Arg Gln Lys Phe Val Met Asn Asp Ser Leu Asn Gln Thr Ile Tyr Gln  
 20 25 30  
 Asp Val Asp Lys His Tyr Leu Ser Thr Thr Trp Leu Asn Asp Leu Gln  
 35 40 45  
 Gln Glu Val Lys Phe Asp Met Tyr Ala Tyr Ser Ser Gly Gly Asp Asp  
 50 55 60  
 Ser Lys Tyr Pro Val Thr Leu Lys Ile Ser Asp Ser Gln Leu Phe Val  
 65 70 75 80  
 Ser Ala Gln Gly Glu Asp Gln Pro Val Leu Leu Lys Glu Leu Pro Glu  
 85 90 95  
 Thr Pro Lys Leu Ile Thr Gly Ser Glu Thr Asp Leu Ile Phe Phe Trp  
 100 105 110  
 Lys Ser Ile Asn Ser Lys Asn Tyr Phe Thr Ser Ala Ala Tyr Pro Glu  
 115 120 125  
 Leu Phe Ile Ala Thr Lys Glu Gln Ser Arg Val His Leu Ala Arg Gly  
 130 135 140  
 Leu Pro Ser Met Thr Asp Phe Gln Ile Ser  
 145 150

<210> 164

<211> 151

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 164

Pro Ile Arg Gln Leu His Tyr Arg Leu Arg Asp Glu Gln Gln Lys Ser  
 1 5 10 15  
 Leu Val Leu Ser Asp Pro Tyr Glu Leu Lys Ala Leu His Leu Asn Gly  
 20 25 30  
 Gln Asn Ile Asn Gln Gln Val Ile Phe Ser Met Ser Phe Val Gln Gly  
 35 40 45  
 Glu Pro Ser Asn Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu Gly Leu Lys Gly Lys  
 50 55 60  
 Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Met Lys Asp Gly Thr Pro Thr Leu Gln  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Gln Tyr Pro Lys Lys Lys Met Glu Lys  
 85 90 95  
 Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Val Lys Ser Lys Val Glu Phe Glu  
 100 105 110  
 Ser Ala Glu Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Gln Ala Glu His  
 115 120 125  
 Lys Pro Val Phe Leu Gly Asn Asn Ser Gly Gln Asp Ile Ile Asp Phe  
 130 135 140  
 Thr Met Glu Ser Val Ser Ser  
 145 150

<210> 165

<211> 155

<212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 165  
 Met Asp Ile Pro Val Arg Ser Leu Asn Cys Thr Leu Arg Asp Ser Gln  
 1 5 10 15  
 Gln Lys Ser Leu Val Met Ser Gly Pro Tyr Glu Leu Lys Ala Leu His  
 20 25 30  
 Leu Gln Gly Gln Asp Met Glu Gln Gln Val Val Phe Ser Met Ser Phe  
 35 40 45  
 Val Gln Gly Glu Glu Ser Asn Asp Lys Ile Pro Val Ala Leu Gly Leu  
 50 55 60  
 Lys Glu Lys Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Val Leu Lys Asp Asp Lys Pro  
 65 70 75 80  
 Thr Leu Gln Leu Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys Lys Lys  
 85 90 95  
 Met Glu Lys Arg Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu Ile Asn Asn Lys Leu  
 100 105 110  
 Glu Phe Glu Ser Ala Gln Phe Pro Asn Trp Tyr Ile Ser Thr Ser Gln  
 115 120 125  
 Ala Glu Asn Met Pro Val Phe Leu Gly Gly Thr Lys Gly Gly Gln Asp  
 130 135 140  
 Ile Thr Asp Phe Thr Met Gln Phe Val Ser Ser  
 145 150 155  
 <210> 166  
 <211> 569  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 166  
 Met Lys Val Leu Leu Arg Leu Ile Cys Phe Ile Ala Leu Leu Ile Ser  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Glu Ala Asp Lys Cys Lys Glu Arg Glu Glu Lys Ile Ile Leu  
 20 25 30  
 Val Ser Ser Ala Asn Glu Ile Asp Val Arg Pro Cys Pro Leu Asn Pro  
 35 40 45  
 Asn Glu His Lys Gly Thr Ile Thr Trp Tyr Lys Asp Asp Ser Lys Thr  
 50 55 60  
 Pro Val Ser Thr Glu Gln Ala Ser Arg Ile His Gln His Lys Glu Lys  
 65 70 75 80  
 Leu Trp Phe Val Pro Ala Lys Val Glu Asp Ser Gly His Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Val Arg Asn Ser Ser Tyr Cys Leu Arg Ile Lys Ile Ser Ala Lys  
 100 105 110  
 Phe Val Glu Asn Glu Pro Asn Leu Cys Tyr Asn Ala Gln Ala Ile Phe  
 115 120 125  
 Lys Gln Asn Leu Pro Val Ala Gly Asp Gly Gly Leu Val Cys Pro Tyr  
 130 135 140  
 Met Glu Phe Phe Lys Asn Glu Asn Asn Glu Leu Pro Lys Leu Gln Trp  
 145 150 155 160

Tyr Lys Asp Cys Lys Pro Leu Leu Leu Asp Asn Ile His Phe Ser Gly  
 165 170 175  
 Val Lys Asp Arg Leu Ile Val Met Asn Val Ala Glu Lys His Arg Gly  
 180 185 190  
 Asn Tyr Thr Cys His Ala Ser Tyr Thr Tyr Leu Gly Lys Gln Tyr Pro  
 195 200 205  
 Ile Thr Arg Val Ile Glu Phe Ile Thr Leu Glu Glu Asn Lys Pro Thr  
 210 215 220  
 Arg Pro Val Ile Val Ser Pro Ala Asn Glu Thr Met Glu Val Asp Leu  
 225 230 235 240  
 Gly Ser Gln Ile Gln Leu Ile Cys Asn Val Thr Gly Gln Leu Ser Asp  
 245 250 255  
 Ile Ala Tyr Trp Lys Trp Asn Gly Ser Val Ile Asp Glu Asp Asp Pro  
 260 265 270  
 Val Leu Gly Glu Asp Tyr Tyr Ser Val Glu Asn Pro Ala Asn Lys Arg  
 275 280 285  
 Arg Ser Thr Leu Ile Thr Val Leu Asn Ile Ser Glu Ile Glu Ser Arg  
 290 295 300  
 Phe Tyr Lys His Pro Phe Thr Cys Phe Ala Lys Asn Thr His Gly Ile  
 305 310 315 320  
 Asp Ala Ala Tyr Ile Gln Leu Ile Tyr Pro Val Thr Asn Phe Gln Lys  
 325 330 335  
 His Met Ile Gly Ile Cys Val Thr Leu Thr Val Ile Ile Val Cys Ser  
 340 345 350  
 Val Phe Ile Tyr Lys Ile Phe Lys Ile Asp Ile Val Leu Trp Tyr Arg  
 355 360 365  
 Asp Ser Cys Tyr Asp Phe Leu Pro Ile Lys Ala Ser Asp Gly Lys Thr  
 370 375 380  
 Tyr Asp Ala Tyr Ile Leu Tyr Pro Lys Thr Val Gly Glu Gly Ser Thr  
 385 390 395 400  
 Ser Asp Cys Asp Ile Phe Val Phe Lys Val Leu Pro Glu Val Leu Glu  
 405 410 415  
 Lys Gln Cys Gly Tyr Lys Leu Phe Ile Tyr Gly Arg Asp Asp Tyr Val  
 420 425 430  
 Gly Glu Asp Ile Val Glu Val Ile Asn Glu Asn Val Lys Lys Ser Arg  
 435 440 445  
 Arg Leu Ile Ile Ile Leu Val Arg Glu Thr Ser Ser Phe Ser Trp Leu  
 450 455 460  
 Gly Gly Ser Ser Glu Glu Gln Ile Ala Met Tyr Asn Ala Leu Val Gln  
 465 470 475 480  
 Asp Gly Ile Lys Val Val Leu Leu Glu Leu Glu Lys Ile Gln Asp Tyr  
 485 490 495  
 Glu Lys Met Pro Glu Ser Ile Lys Phe Ile Lys Gln Lys His Gly Ala  
 500 505 510



Ile Arg Trp Ser Gly Asp Phe Thr Gln Gly Pro Gln Ser Ala Lys Thr  
 515 520 525  
 Arg Phe Trp Lys Asn Val Arg Tyr His Met Pro Val Gln Arg Arg Ser  
 530 535 540  
 Pro Ser Ser Lys His Gln Leu Leu Ser Pro Ala Thr Lys Glu Lys Leu  
 545 550 555 560  
 Gln Arg Glu Ala His Val Pro Leu Gly  
 565  
 <210> 167  
 <211> 398  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 167  
 Met Leu Arg Leu Tyr Val Leu Val Met Gly Val Ser Ala Phe Thr Leu  
 1 5 10 15  
 Gln Pro Ala Ala His Thr Gly Ala Ala Arg Ser Cys Arg Phe Arg Gly  
 20 25 30  
 Arg His Tyr Lys Arg Glu Phe Arg Leu Glu Gly Glu Pro Val Ala Leu  
 35 40 45  
 Arg Cys Pro Gln Val Pro Tyr Trp Leu Trp Ala Ser Val Ser Pro Arg  
 50 55 60  
 Ile Asn Leu Thr Trp His Lys Asn Asp Ser Ala Arg Thr Val Pro Gly  
 65 70 75 80  
 Glu Glu Glu Thr Arg Met Trp Ala Gln Asp Gly Ala Leu Trp Leu Leu  
 85 90 95  
 Pro Ala Leu Gln Glu Asp Ser Gly Thr Tyr Val Cys Thr Thr Arg Asn  
 100 105 110  
 Ala Ser Tyr Cys Asp Lys Met Ser Ile Glu Leu Arg Val Phe Glu Asn  
 115 120 125  
 Thr Asp Ala Phe Leu Pro Phe Ile Ser Tyr Pro Gln Ile Leu Thr Leu  
 130 135 140  
 Ser Thr Ser Gly Val Leu Val Cys Pro Asp Leu Ser Glu Phe Thr Arg  
 145 150 155 160  
 Asp Lys Thr Asp Val Lys Ile Gln Trp Tyr Lys Asp Ser Leu Leu Leu  
 165 170 175  
 Asp Lys Asp Asn Glu Lys Phe Leu Ser Val Arg Gly Thr Thr His Leu  
 180 185 190  
 Leu Val His Asp Val Ala Leu Glu Asp Ala Gly Tyr Tyr Arg Cys Val  
 195 200 205  
 Leu Thr Phe Ala His Glu Gly Gln Gln Tyr Asn Ile Thr Arg Ser Ile  
 210 215 220  
 Glu Leu Arg Ile Lys Lys Lys Lys Glu Glu Thr Ile Pro Val Ile Ile  
 225 230 235 240  
 Ser Pro Leu Lys Thr Ile Ser Ala Ser Leu Gly Ser Arg Leu Thr Ile  
 245 250 255  
 Pro Cys Lys Val Phe Leu Gly Thr Gly Thr Pro Leu Thr Thr Met Leu  
 260 265 270

Trp Trp Thr Ala Asn Asp Thr His Ile Glu Ser Ala Tyr Pro Gly Gly  
 275 280 285  
 Arg Val Thr Glu Gly Pro Arg Gln Glu Tyr Ser Glu Asn Asn Glu Asn  
 290 295 300  
 Tyr Ile Glu Val Pro Leu Ile Phe Asp Pro Val Thr Arg Glu Asp Leu  
 305 310 315 320  
 His Met Asp Phe Lys Cys Val Val His Asn Thr Leu Ser Phe Gln Thr  
 325 330 335  
 Leu Arg Thr Thr Val Lys Glu Ala Ser Ser Thr Phe Ser Trp Gly Ile  
 340 345 350  
 Val Leu Ala Pro Leu Ser Leu Ala Phe Leu Val Leu Gly Gly Ile Trp  
 355 360 365  
 Met His Arg Arg Cys Lys His Arg Thr Gly Lys Ala Asp Gly Leu Thr  
 370 375 380  
 Val Leu Trp Pro His His Gln Asp Phe Gln Ser Tyr Pro Lys  
 385 390 395  
 <210> 168  
 <211> 576  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 168  
 Met Glu Asn Met Lys Val Leu Leu Gly Leu Ile Cys Leu Met Val Pro  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Ser Leu Glu Ile Asp Val Cys Thr Glu Tyr Pro Asn Gln Ile  
 20 25 30  
 Val Leu Phe Leu Ser Val Asn Glu Ile Asp Ile Arg Lys Cys Pro Leu  
 35 40 45  
 Thr Pro Asn Lys Met His Gly Asp Thr Ile Ile Trp Tyr Lys Asn Asp  
 50 55 60  
 Ser Lys Thr Pro Ile Ser Ala Asp Arg Asp Ser Arg Ile His Gln Gln  
 65 70 75 80  
 Asn Glu His Leu Trp Phe Val Pro Ala Lys Val Glu Asp Ser Gly Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Tyr Cys Ile Val Arg Asn Ser Thr Tyr Cys Leu Lys Thr Lys Val  
 100 105 110  
 Thr Val Thr Val Leu Glu Asn Asp Pro Gly Leu Cys Tyr Ser Thr Gln  
 115 120 125  
 Ala Thr Phe Pro Gln Arg Leu His Ile Ala Gly Asp Gly Ser Leu Val  
 130 135 140  
 Cys Pro Tyr Val Ser Tyr Phe Lys Asp Glu Asn Asn Glu Leu Pro Glu  
 145 150 155 160  
 Val Gln Trp Tyr Lys Asn Cys Lys Pro Leu Leu Leu Asp Asn Val Ser  
 165 170 175  
 Phe Phe Gly Val Lys Asp Lys Leu Leu Val Arg Asn Val Ala Glu Glu  
 180 185 190  
 His Arg Gly Asp Tyr Ile Cys Arg Met Ser Tyr Thr Phe Arg Gly Lys

195						200									205
Gln Tyr Pro Val Thr Arg	Val Ile Gln Phe Ile Thr	Ile Asp Glu Asn													
210						215				220					
Lys Arg Asp Arg Pro Val	Ile Leu Ser Pro Arg Asn	Glu Thr Ile Glu													
225					230				235						240
Ala Asp Pro Gly Ser Met	Ile Gln Leu Ile Cys Asn	Val Thr Gly Gln													
				245				250						255	
Phe Ser Asp Leu Val Tyr	Trp Lys Trp Asn Gly Ser	Glu Ile Glu Trp													
				260				265						270	
Asn Asp Pro Phe Leu Ala	Glu Asp Tyr Gln Phe Val	Glu His Pro Ser													
				275				280						285	
Thr Lys Arg Lys Tyr Thr	Leu Ile Thr Thr Leu Asn	Ile Ser Glu Val													
				290				295						300	
Lys Ser Gln Phe Tyr Arg	Tyr Pro Phe Ile Cys Val	Val Lys Asn Thr													
305					310				315						320
Asn Ile Phe Glu Ser Ala	His Val Gln Leu Ile Tyr	Pro Val Pro Asp													
				325				330							335
Phe Lys Asn Tyr Leu Ile	Gly Gly Phe Ile Ile Leu	Thr Ala Thr Ile													
				340				345						350	
Val Cys Cys Val Cys Ile	Tyr Lys Val Phe Lys Val	Asp Ile Val Leu													
				355				360						365	
Trp Tyr Arg Asp Ser Cys	Ser Gly Phe Leu Pro Ser	Lys Ala Ser Asp													
				370				375						380	
Gly Lys Thr Tyr Asp Ala	Tyr Ile Leu Tyr Pro Lys	Thr Leu Gly Glu													
385					390				395						400
Gly Ser Phe Ser Asp Leu	Asp Thr Phe Val Phe Lys	Leu Leu Pro Glu													
				405				410							415
Val Leu Glu Gly Gln Phe	Gly Tyr Lys Leu Phe Ile	Tyr Gly Arg Asp													
				420				425						430	
Asp Tyr Val Gly Glu Asp	Thr Ile Glu Val Thr Asn	Glu Asn Val Lys													
				435				440						445	
Lys Ser Arg Arg Leu Ile	Ile Ile Leu Val Arg Asp	Met Gly Gly Phe													
				450				455						460	
Ser Trp Leu Gly Gln Ser	Ser Glu Glu Gln Ile Ala	Ile Tyr Asn Ala													
465					470				475						480
Leu Ile Gln Glu Gly Ile	Lys Ile Val Leu Leu Glu	Leu Glu Lys Ile													
				485				490							495
Gln Asp Tyr Glu Lys Met	Pro Asp Ser Ile Gln Phe	Ile Lys Gln Lys													
				500				505						510	
His Gly Val Ile Cys Trp	Ser Gly Asp Phe Gln Glu	Arg Pro Gln Ser													
				515				520						525	
Ala Lys Thr Arg Phe Trp	Lys Asn Leu Arg Tyr Gln	Met Pro Ala Gln													
				530				535						540	
Arg Arg Ser Pro Leu Ser	Lys His Arg Leu Leu Thr	Leu Asp Pro Val													
545					550				555						560

Arg Asp Thr Lys Glu Lys Leu Pro Ala Ala Thr His Leu Pro Leu Gly  
                                   565                                  570                                  575

<210> 169  
 <211> 410  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 169

Met Phe Ile Leu Leu Val Leu Val Thr Gly Val Ser Ala Phe Thr Thr  
 1                                  5                                  10                                  15

Pro Thr Val Val His Thr Gly Lys Val Ser Glu Ser Pro Ile Thr Ser  
                                   20                                  25                                  30

Glu Lys Pro Thr Val His Gly Asp Asn Cys Gln Phe Arg Gly Arg Glu  
                                   35                                  40                                  45

Phe Lys Ser Glu Leu Arg Leu Glu Gly Glu Pro Val Val Leu Arg Cys  
                                   50                                  55                                  60

Pro Leu Ala Pro His Ser Asp Ile Ser Ser Ser Ser His Ser Phe Leu  
 65                                  70                                  75                                  80

Thr Trp Ser Lys Leu Asp Ser Ser Gln Leu Ile Pro Arg Asp Glu Pro  
                                   85                                  90                                  95

Arg Met Trp Val Lys Gly Asn Ile Leu Trp Ile Leu Pro Ala Val Gln  
                                   100                                  105                                  110

Gln Asp Ser Gly Thr Tyr Ile Cys Thr Phe Arg Asn Ala Ser His Cys  
                                   115                                  120                                  125

Glu Gln Met Ser Val Glu Leu Lys Val Phe Lys Asn Thr Glu Ala Ser  
                                   130                                  135                                  140

Leu Pro His Val Ser Tyr Leu Gln Ile Ser Ala Leu Ser Thr Thr Gly  
 145                                  150                                  155                                  160

Leu Leu Val Cys Pro Asp Leu Lys Glu Phe Ile Ser Ser Asn Ala Asp  
                                   165                                  170                                  175

Gly Lys Ile Gln Trp Tyr Lys Gly Ala Ile Leu Leu Asp Lys Gly Asn  
                                   180                                  185                                  190

Lys Glu Phe Leu Ser Ala Gly Asp Pro Thr Arg Leu Leu Ile Ser Asn  
                                   195                                  200                                  205

Thr Ser Met Asp Asp Ala Gly Tyr Tyr Arg Cys Val Met Thr Phe Thr  
 210                                  215                                  220

Tyr Asn Gly Gln Glu Tyr Asn Ile Thr Arg Asn Ile Glu Leu Arg Val  
 225                                  230                                  235                                  240

Lys Gly Thr Thr Thr Glu Pro Ile Pro Val Ile Ile Ser Pro Leu Glu  
                                   245                                  250                                  255

Thr Ile Pro Ala Ser Leu Gly Ser Arg Leu Ile Val Pro Cys Lys Val  
                                   260                                  265                                  270

Phe Leu Gly Thr Gly Thr Ser Ser Asn Thr Ile Val Trp Trp Leu Ala  
                                   275                                  280                                  285

Asn Ser Thr Phe Ile Ser Ala Ala Tyr Pro Arg Gly Arg Val Thr Glu  
 290                                  295                                  300

Gly Leu His His Gln Tyr Ser Glu Asn Asp Glu Asn Tyr Val Glu Val



<220>  
 <223> Seqüência sintetizada  
 <400> 174  
 Gly Cys Gly Gly Gly Gly  
 1 5

<210> 175  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Seqüência artificial  
 <220>  
 <223> Seqüência sintetizada

<220>  
 <221> REPETIÇÃO  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ocorre de 0 a 5 vezes  
 <220>  
 <221> REPETIÇÃO  
 <222> (3)..(3)  
 <223> ocorre de 0 a 12 vezes  
 <400> 175  
 Gly Cys Gly  
 1

<210> 176  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Seqüência artificial  
 <220>  
 <223> Seqüência sintetizada

<220>  
 <221> REPETIÇÃO  
 <222> (1)..(5)  
 <223> ocorre 1 a 3 vezes  
 <400> 176  
 Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5

<210> 177  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Seqüência artificial  
 <220>  
 <223> Seqüência sintetizada

<220>  
 <221> REPETIÇÃO  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ocorre de 0 a 5 vezes  
 <220>  
 <221> REPETIÇÃO  
 <222> (3)..(3)  
 <223> ocorre de 0 a 10 vezes  
 <220>  
 <221> REPETIÇÃO  
 <222> (4)..(4)  
 <223> ocorre de 0 a 2 vezes  
 <220>  
 <221> REPETIÇÃO  
 <222> (5)..(9)  
 <223> ocorre de 0 a 3 vezes  
 <400> 177  
 Gly Cys Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
 1 5

<210> 178  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
 <400> 178  
 Gly Gly Cys  
 1

<210> 179  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> -NH2 (amidado)  
 <400> 179  
 Gly Gly Cys  
 1

<210> 180  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
 <400> 180  
 Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Gly  
 1                    5                    10

<210> 181  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
 <400> 181  
 Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala Pro Gly Gly  
 1                    5                    10                    15

Cys Gly

<210> 182  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
 <400> 182  
 Gly Gly Gly Gly Cys Gly  
 1                    5

<210> 183  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada

<220>  
 <221> REPETIÇÃO

<222> (1)..(1)  
 <223> ocorre de 0 a 12 vezes  
 <220>  
 <221> REPETIÇÃO  
 <222> (3)..(3)  
 <223> ocorre de 0 a 5 vezes  
 <400> 183  
 Gly Cys Gly  
 1

<210> 184  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada

<220>  
 <221> REPETIÇÃO  
 <222> (1)..(5)  
 <223> ocorre 1 a 3 vezes  
 <400> 184  
 Ser Gly Gly Gly Gly  
 1 5

<210> 185  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada

<220>  
 <221> REPETIÇÃO  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ocorre de 0 a 10 vezes  
 <220>

<221> REPETIÇÃO  
 <222> (2)..(2)  
 <223> ocorre de 0 a 2 vezes  
 <220>

<221> REPETIÇÃO  
 <222> (3)..(7)  
 <223> ocorre de 0 a 3 vezes  
 <220>

<221> REPETIÇÃO  
 <222> (8)..(8)  
 <223> ocorre de 0 a 8 vezes  
 <220>

<221> REPETIÇÃO  
 <222> (10)..(10)  
 <223> ocorre de 0 a 5 vezes  
 <400> 185  
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Cys Gly  
 1 5 10

<210> 186  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
 <400> 186  
 Gly Gly Lys Lys Gly Cys  
 1 5

<210> 187



<211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
 <400> 187  
 Cys Gly Lys Lys Gly Gly  
 1 5

<210> 188  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
 <400> 188  
 Gly Gly Cys Gly  
 1

<210> 189  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
 <400> 189  
 Gly Ser Gly  
 1

<210> 190  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
 <400> 190  
 Leu Glu His His His His His His Gly Gly Cys  
 1 5 10

<210> 191  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Sequência sintetizada  
 <400> 191  
 Met Glu Val Gly Trp Tyr Arg Ser Pro Phe Ser Arg Val Val His Leu  
 1 5 10 15

Tyr Arg Asn Gly Lys  
20

<210> 192  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial  
<220>  
<223> Sequência sintetizada  
<400> 192  
gatccggagg tgggtgtcccc attagacagc t 31

<210> 193  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial  
<220>  
<223> Sequência sintetizada  
<400> 193  
gtaagcttag gaagacacag attccat 27

<210> 194  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial  
<220>  
<223> Sequência sintetizada  
<400> 194  
gatccggagg tgggtgccct gtacgatcac tgaactg 37

<210> 195  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial  
<220>  
<223> Sequência sintetizada  
<400> 195  
gtatgcatta ggaagacaca aattgcatgg tgaagtc 37

## REIVINDICAÇÕES

1. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende:

(a) uma partícula semelhante a vírus (VLP) com pelo menos um primeiro sítio de ligação; e

5 (b) pelo menos um antígeno com pelo menos um segundo sítio de ligação;

em que o dito pelo menos um antígeno é uma molécula de IL-1 e em que (a) e (b) são ligados através do dito pelo menos um primeiro e dito pelo menos um segundo sítio de ligação.

10 2. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a dita molécula de IL-1 é selecionada do grupo consistindo em:

(a) proteína IL-1;

(b) fragmento maduro de IL-1;

15 (c) fragmento de IL-1;

(d) peptídeo de IL-1; e

(e) muteína de IL-1.

3. Composição de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que a dita molécula de IL-1 é derivada de um humano.

20 4. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que a dita molécula de IL-1 é uma molécula de IL-1 beta.

25 5. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que a dita molécula de IL-1 é uma molécula de IL-1 alfa.

6. Composição de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que a dita molécula de IL-1 beta é selecionada do grupo consistindo em:

(a) proteína IL-1 beta;

30 (b) fragmento maduro de IL-1 beta;

(c) fragmento de IL-1 beta;

(d) peptídeo de IL-1 beta; e

(e) muteína de IL-1 beta.

7. Composição de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que a dita molécula de IL-1 alfa é selecionada do grupo consistindo em:

- 5
- (a) proteína IL-1 alfa;
  - (b) fragmento maduro de IL-1 alfa;
  - (c) fragmento de IL-1 alfa;
  - (d) peptídeo de IL-1 alfa; e
  - (e) muteína de IL-1 alfa.

10 8. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que a dita molécula de IL-1 é uma proteína IL-1 beta compreendendo ou preferivelmente consistindo em uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo em:

- 15
- (a) IL-1 beta humana (SEQ ID NO:49);
  - (b) qualquer uma de SEQ ID NO:50 a SEQ ID NO:62; e
  - (c) uma seqüência de aminoácido que é pelo menos 80%, ou preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95% ou mais preferivelmente pelo menos 99% idêntica a qualquer uma das SEQ ID NO:49 a SEQ ID NO:62.

20 9. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que a dita molécula de IL-1 é um fragmento maduro de IL-1 beta compreendendo ou preferivelmente consistindo em uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo em:

- 25
- (a) IL-1 beta humana 117-269 (SEQ ID NO:64);
  - (b) IL-1 beta humana 116-269 (SEQ ID NO:165);
  - (c) IL-1 beta de camundongo 119-269s (SEQ ID NO:164); e
  - (d) uma seqüência de aminoácido que é pelo menos 80%, ou preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95% ou mais preferivelmente pelo menos 99% idêntica a qualquer uma das SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:165 e SEQ ID NO:164.
- 30

10. Composição de acordo com qualquer uma das reivindica-

ções 1 a 4, caracterizada pelo fato de que a dita molécula de IL-1 é um peptídeo de IL-1 beta compreendendo ou preferivelmente consistindo em uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo em:

- 5                   (a) qualquer uma das SEQ ID NO:89 a SEQ ID NO:116; e  
                  (b) uma seqüência de aminoácido que é pelo menos 80%, ou preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95% ou mais preferivelmente pelo menos 99% idêntica a qualquer uma das SEQ ID NO:89 a SEQ ID NO:116.

10                   11. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que a dita molécula de IL-1 é uma muteína de IL-1 beta.

                  12. Composição de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que a dita muteína de IL-1 beta compreende ou preferivelmente consiste em um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido, em que a dita seqüência de aminoácido difere de qualquer uma de SEQ ID NO:64 e SEQ ID NO: 165 em 1 a 6, preferivelmente 1 a 5, mais preferivelmente 1 a 4, mais preferivelmente ainda 1 a 3, mais preferivelmente ainda 1 a 2 e mais preferivelmente em exatamente 1 resíduo(s) de aminoácido, em que preferivelmente o(s) dito(s) resíduo(s) de aminoácido é/são trocados por um outro resíduo de aminoácido.

                  13. Composição de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que a dita muteína de IL-1 beta compreende ou preferivelmente consiste em um polipeptídeo de SEQ ID NO:131 a SEQ ID NO: 140.

25                   14. Composição de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que a dita IL-1 beta muteína é hIL-1 $\beta$ <sub>116-269</sub> (D145K) (SEQ ID NO:136).

                  15. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 e 5, caracterizada pelo fato de que a dita molécula de IL-1 é uma proteína IL-1 alfa compreendendo ou preferivelmente consistindo em uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo em:

- 30                   (a) IL-1 alfa humana (SEQ ID NO:36);

- (b) qualquer uma de SEQ ID NO:37 a SEQ ID NO:48; e
- (c) uma seqüência de aminoácido que é pelo menos 80%, ou preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95% ou mais preferivelmente pelo menos 99% idêntica a qualquer uma das SEQ ID NO:36 a SEQ ID NO:48.

5

16. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 e 5, caracterizada pelo fato de que a dita molécula de IL-1 é um fragmento maduro de IL-1 alfa compreendendo ou preferivelmente consistindo em uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo em:

10

- (a) IL-1 alfa humana 119-271 (SEQ ID NO:63);
- (b) IL-1 alfa de camundongo 117-270s (SEQ ID NO:163); e
- (c) uma seqüência de aminoácido que é pelo menos 80%, ou preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95% ou mais preferivelmente pelo menos 99% idêntica a qualquer uma das SEQ ID NO:63 a SEQ ID NO:163.

15

17. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 e 5, caracterizada pelo fato de que a dita molécula de IL-1 é um peptídeo de IL-1 alfa compreendendo ou preferivelmente consistindo em uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo consistindo em:

20

- (a) qualquer uma das SEQ ID NO:67 a SEQ ID NO:88; e
- (b) uma seqüência de aminoácido que é pelo menos 80%, ou preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95% ou mais preferivelmente pelo menos 99% idêntica a qualquer uma das SEQ ID NO:67 a SEQ ID NO:88.

25

18. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 e 5, caracterizada pelo fato de que a dita molécula de IL-1 é uma muteína IL-1 alfa.

30

19. Composição de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato de que a dita muteína de IL-1 alfa compreende ou preferivel-

mente consiste em um polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácido, em que a dita seqüência de aminoácido difere de qualquer uma de SEQ ID NO:63, SEQ ID NO: 65 e SEQ ID NO: 163 em 1 a 6, preferivelmente 1 a 5, mais preferivelmente 1 a 4, mais preferivelmente ainda 1 a 3, mais preferi-  
5 velmente ainda 1 a 2 e mais preferivelmente em exatamente 1 resíduo(s) de aminoácido, em que preferivelmente o(s) dito(s) resíduo(s) de aminoácido é/são trocados por um outro resíduo de aminoácido.

20. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizada pelo fato de que a dita VLP é uma VLP de um  
10 RNA de bacteriófago.

21. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizada pelo fato de que a dita VLP compreende, ou alternativamente consiste em, proteínas de revestimento recombinantes, mu-  
tantes ou fragmentos deles, de um RNA de bacteriófago.

15 22. Composição de acordo com a reivindicação 20 ou 21, caracterizada pelo fato de que o dito RNA de bacteriófago é um RNA de bacteriófago selecionado dentre Q□ e AP205.

23. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizada pelo fato de que a dita VLP compreende proteí-  
20 nas de revestimento recombinantes de Q□ de RNA de bacteriófago.

24. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizada pelo fato de que a dita VLP compreende a proteí-  
na de revestimento de SEQ ID NO:3.

25 25. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, caracterizada pelo fato de que o dito primeiro sítio de ligação é ligado ao dito segundo sítio de ligação através de pelo menos uma ligação covalente, em que preferivelmente a dita ligação covalente é uma ligação não-peptídeo.

30 26. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, caracterizada pelo fato de que o dito primeiro sítio de ligação compreende, ou preferivelmente é, um grupo amino, preferivelmente um grupo amino de uma lisina.

27. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 26, caracterizada pelo fato de que o dito segundo sítio de ligação compreende, ou preferivelmente é, um grupo sulfidril, preferivelmente um grupo sulfidril de uma cisteína.

5 28. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 27, caracterizada pelo fato de que o dito primeiro sítio de ligação é, um grupo amino de uma lisina, e em que o dito segundo sítio de ligação é um grupo sulfidril de uma cisteína.

10 29. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 28, caracterizada pelo fato de que o dito primeiro sítio de ligação não é um grupo sulfidril.

30. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 29, caracterizada pelo fato de que a dita ligação da dita VLP e o dito pelo menos um antígeno não compreende uma ligação dissulfeto.

15 31. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 30, caracterizada pelo fato de que apenas um dos ditos segundos sítios de ligação se associa com o dito primeiro sítio de ligação através de pelo menos uma ligação covalente não-peptídeo levando a um tipo único e uniforme de ligação da dita molécula de IL-1 à dita partícula semelhante a  
20 vírus, em que o dito apenas um segundo sítio de ligação que se associa com o dito primeiro sítio de ligação é um grupo sulfidril, e em que a dita molécula de IL-1 e dita partícula semelhante a vírus interagem através da dita associação para formarem uma disposição de antígeno ordenada e repetitiva.

25 32. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, caracterizada pelo fato de que o dito antígeno é fundido ao terminal N ou C da proteína de revestimento, mutantes ou fragmentos deles, de AP205.

30 33. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 32, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um ligante, em que o dito ligante é associado à molécula de IL-1 por meio de pelo menos uma ligação covalente, e em que o dito ligante compreende, ou alternativamente consiste no dito segundo sítio de ligação.



34. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 33, caracterizada pelo fato de que a dita molécula de IL-1 é SEQ ID NO:64 ou uma muteína derivada dela.

5 35. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 33, caracterizada pelo fato de que a dita molécula de IL-1 é SEQ ID NO:63 ou uma muteína derivada dela.

36. Vacina, caracterizada pelo fato de que compreende, ou alternativamente consiste na, composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 35.

10 37. Vacina de acordo com a reivindicação 36, caracterizada pelo fato de que a dita vacina é destituída de um adjuvante.

38. Uso da vacina, como definida na reivindicação 36 ou 37, em um método de imunização, caracterizado pelo fato de que compreende administrar a dita vacina a um animal ou humano.

15 39. Uso de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que uma quantidade terapêuticamente eficaz da dita vacina é administrada ao dito animal ou dito humano.

40. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende:

20 (a) a composição, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 35, ou a vacina, como definida na reivindicação 36 ou 37; e

(b) um veículo farmacêuticamente aceitável.

25 41. Processo de produção da composição, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 35, ou da vacina, como definida na reivindicação 36 ou 37, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) provisão de uma VLP com pelo menos um primeiro sítio de ligação;

30 (b) provisão de pelo menos um antígeno, em que o dito antígeno é uma molécula de IL-1, uma proteína IL-1, um fragmento maduro de IL-1, um peptídeo de IL-1 ou uma muteína de IL-1, com pelo menos um segundo sítio de ligação; e

(c) ligação da dita VLP e dito pelo menos um antígeno para produzir a dita composição ou dita vacina, em que o dito pelo menos um antígeno e dita VLP são ligados através do dito pelo menos um primeiro e dito pelo menos um segundo sítio de ligação.

5

42. Medicamento, caracterizado pelo fato de que contém a composição, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 35, a vacina, como definida na reivindicação 36 ou 37, e/ou a composição farmacêutica como definida na reivindicação 40.

10

43. Medicamento útil no tratamento de uma doença, caracterizado pelo fato de que contém a composição, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 35, a vacina, como definida na reivindicação 36 ou 37, e/ou a composição farmacêutica, como definida na reivindicação 40, em que a dita doença é preferivelmente selecionada do grupo consistindo em:

15

- (a) doenças vasculares;
- (b) doenças inflamatórias dependentes de IL-1 herdadas;
- (c) doenças inflamatórias auto-imunes crônicas;
- (d) doenças degenerativas do osso e cartilagem;
- (e) doenças alérgicas; e
- (f) doença neurológica;

20

em um animal, preferivelmente em um ser humano.

44. Medicamento de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que a dita doença é uma doença vascular, em que a dita doença vascular é aterosclerose.

25

45. Medicamento de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que a dita doença é uma doença inflamatória dependente de IL-1 herdada, em que a dita doença inflamatória dependente de IL-1 herdada é febre mediterrânea familiar (FMF).

30

46. Medicamento de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que a dita doença é uma doença inflamatória auto-imune crônica, em que a dita doença inflamatória auto-imune crônica é artrite idiopática de início juvenil sistêmica ou artrite reumatóide.

47. Medicamento de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que a dita doença é uma doença degenerativa do osso e cartilagem, em que a dita doença degenerativa do osso ou cartilagem é gota ou osteoartrite.

5                    48. Medicamento de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que a dita doença é uma doença neurológica, em que a dita doença neurológica é esclerose múltipla.

## RESUMO

Patente de Invenção: **"COMPOSIÇÃO CONTENDO CONJUGADOS DE INTERLEUCINA-1, VACINA, USO DA VACINA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DA COMPOSIÇÃO OU DA VACINA, BEM COMO MEDICAMENTO"**.

A presente invenção pertence aos campos de Biologia molecular, Virologia, Imunologia e Medicina. A invenção provê uma composição compreendendo uma disposição de antígeno ordenada e repetitiva, onde o antígeno é uma proteína IL-1, uma muteína de IL-1 ou um fragmento de IL-1.

10 Mais especificamente, a invenção provê uma composição compreendendo uma partícula do tipo vírus, e pelo menos uma proteína IL-1, muteína de IL-1 ou pelo menos um fragmento de IL-1 ligado a ela. A invenção também provê um processo para produção da composição. As composições da invenção são úteis na produção de vacinas para o tratamento de doenças inflamatórias e doenças auto-imunes crônicas, doenças genéticas e doenças cardiovasculares.

15 A composição da invenção induz eficientemente respostas imunes, em particular respostas de anticorpo. Ainda, as composições da invenção são particularmente úteis para induzir eficientemente respostas imunes auto-específicas dentro do contexto indicado.