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

(11) PI 0619595-4 B1

(22) Data do Depósito: 04/12/2006

(45) Data de Concessão: 15/09/2020

(54) Título: ANTICORPO NEUTRALIZANTE, SEQUÊNCIA DE DNA ISOLADA, VETOR DE CLONAGEM OU EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UM ANTICORPO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, USO DE UM ANTICORPO NEUTRALIZANTE HUMANIZADO

(51) Int.Cl.: C07K 16/24.

(30) Prioridade Unionista: 09/12/2005 US 60/748926.

(73) Titular(es): UCB PHARMA S.A.

(72) Inventor(es): RICHARD EVAN GELINAS; MITRA CHOUDHURY SINGHAL; YI ZHANG; ANDREW GEORGE POPPLEWELL; RALPH ADAMS.

(86) Pedido PCT: PCT GB2006004518 de 04/12/2006

(87) Publicação PCT: WO 2007/066082 de 14/06/2007

(85) Data do Início da Fase Nacional: 09/06/2008

(57) Resumo: ANTICORPO NEUTRALIZANTE, EPÍTOPO, SEQUÊNCIA DE DNA ISOLADA, VETOR DE CLONAGEM OU EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UM ANTICORPO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, USO DE UM ANTICORPO NEUTRALIZANTE HUMANIZADO OU COMPLETAMENTE HUMANO. A invenção se refere a moléculas de anticorpo tendo especificidade para determinantes antigênicos de IL-6, usos terapêuticos das moléculas de anticorpo e métodos para produzir ditas moléculas de anticorpo.

“ANTICORPO NEUTRALIZANTE, SEQUÊNCIA DE DNA ISOLADA, VETOR DE CLONAGEM OU EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UM ANTICORPO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, USO DE UM ANTICORPO NEUTRALIZANTE HUMANIZADO”

[0001] A presente invenção se refere a moléculas de anticorpo tendo especificidade para determinantes antigênicos de IL-6. A presente invenção também se refere aos usos terapêuticos das moléculas de anticorpo e métodos para produzir as moléculas de anticorpo.

[0002] IL-6 é uma citocina multifuncional pleiotrópica produzida por uma variedade de tipos celulares. Ela foi originalmente identificada como um fator de diferenciação de célula B (BSF-2) que induziu a maturação final de células B em células produtoras de anticorpo (Hirano et al., 1986 Nature 324, 73-76). IL-6 mostrou desempenhar um papel central em regulação imune, inflamação, hematopoiese e oncogênese. Dentro do sistema imune, IL-6 induz produção de anticorpo de célula B aumentando a quantidade de imunoglobulina policlonal. Ela também induz expressão de receptor de interleucina-2 (IL-2) em células T (Nomo et al., 1987, Immunol. letters, 15, 3, 249-253) e promove produção de IL-2 em células T ativadas com isso induzindo tanto o crescimento como a diferenciação de células T citotóxicas (Okada et al., 1988 J Immunol, 141, 5, 1543-1549). IL-6 também é conhecida por determinar a diferenciação de monócitos em macrófagos (Chomarat P et al., 2000 Nature Immunol.,6, 510-514).

[0003] A função de IL-6 não é restrita à resposta imune pois ela atua em hematopoiese, trombopoiese, formação de osteoclasto, obtenção de resposta hepática de fase aguda resultando na elevação de proteína C-reativa (CRP) e proteína amilóide A de soro (SAA). Ela é conhecida por ser um fator de crescimento para queratinócitos epidérmicos, células mesangiais renais, células de mieloma e plasmacitoma (Grossman et al., 1989 Prot Natl Acad Sci., 86, (16) 63676371; Horii et al., 1989, J Immunol, 143, 12, 3949-3955; Kawano et aL, 1988, Nature 332, 6159, 83-85). IL-6 é produzida por uma ampla variedade de tipos celulares incluindo monócitos/ macrófagos, fibroblastos, queratinócitos epidérmicos, células endoteliais

vasculares, células mesangiais renais, células gliais, condrócitos, células T e B e algumas células tumorosas (Akira et al., 1990, FASEB J., 4, 11, 2860-2867). Exceto para células tumorosas que produzem constitutivamente IL-6, células normais não expressam IL-6 a menos que apropriadamente estimuladas.

[0004] IL-6 é uma glicoproteína, uma molécula de 184 aminoácidos com um peso molecular de 21 a 28 kD dependendo de modificações pós-traducionais. Variantes de processamento alternativas são encontradas em alguns tipos celulares (Kishimoto et al., 1995, Blood, 86, 4, 1243-1254). O complexo de receptor de IL-6 (IL-6R) é compreendido de duas proteínas de membrana funcionalmente diferentes, uma cadeia de ligação específica de IL-6 de 80kD (gp80) e uma cadeia de transdução de sinal de 130kD (gp130). Embora IL-6 não possa se ligar diretamente a gp130, ela pode se ligar a IL-6R para gerar um complexo ternário de alta afinidade de EL6/IL-6R1 gp 130. O IL-6R se liga a IL-6 com baixa afinidade, entretanto, IL-6R não tem um domínio de transdução de sinal intracelular portanto esta ligação sozinha não leva a ativação celular. Similarmente, expressão em superfície celular de IL-6R não significa que a célula é responsiva a estimulação por IL-6. Clivagem proteolítica leva à liberação de IL-6R solúvel (sIL-6R; sgp80) que pode se ligar a IL-6 circulante e aumentar a meia-vida de IL-6. Para ativação celular, IL-6 primeiro se liga ou a IL-6R ligada à célula ou sIL-6R; o complexo heterodimérico IL-6/IL-6R então se associa com glicoproteína de superfície celular gp130. O heterocomplexo tripartite resultante se liga a outro IL-6/IL-6R/gp130 e sinal de transdução segue (Bravo and Heath 2000, EMBO J., 19, (11), 2399-2411; Boulanger et al., 2003, Science, 300, 5628, 2101-2104), por isso tanto IL-6R ligado à célula como solúvel contribuem para ativação celular. Sinalização de IL-6 através de IL-6R ligado à célula foi denominada sinalização cis enquanto que ativação celular através de IL-6R solúvel foi descrita como sinalização trans. Células expressando gp130 mas não IL-6R podem ser estimuladas por IL-6 através de sIL-6R.

[0005] Anticorpos neutralizantes murinos para IL-6 humana são conhecidos por serem capazes de interferir na ligação de IL-6 humana ao IL-6R (sítio 1) ou a gp130 (sítios 2 e 3) (Kalai et al., 1997, Eur.J.Biochem.249, 690-700; Brakenhoff et al., 1990,

Journal of Immunology, 145, 561-568; Wendling et al., 1993, Journal of Rheumatology, 29, 259-262).

[0006] Patente Norte-Americana 5.856.135 descreve anticorpos humanos reformatados para IL-6 humana que bloqueiam ligação de IL-6 a IL-6R. Estes anticorpos foram derivados de um anticorpo monoclonal de camundongo SK2 no qual as regiões determinantes de complementaridade (CDR's) da região variável do anticorpo de camundongo SK2 são transplantadas nas regiões variáveis de um anticorpo humano.

[0007] Também são conhecidos auto-anticorpos humanos neutralizantes para IL-6 (Hansen et al, Eur. J. Immunol, 1995, 25, 348-354).

[0008] Um anticorpo anti-IL-6 murino/humano quimérico de sítio I foi descrito em W02004039826 para uso em terapia.

[0009] Um anticorpo monoclonal de receptor anti-IL-6 humano humanizado está em testes clínicos de fase III para o tratamento de artrite reumatóide (Kishimoto, 2005, Annu Rev Immunol. 23:121). Também foi relatado que o mesmo anticorpo é eficaz em um estudo de fase II de doença de Crohn. Eficácia também foi demonstrada tanto com anticorpos anti-IL-6 como anti-IL-6R em doença tipo lúpus em camundongos NZB/W F_1 (Fink et al., 1994 J. Clin. Invest. 94, 585; Mihara et aL,1998, Clin. Exp. Immunol. 112, 397). Um anticorpo neutralizante para o receptor de IL-6 murina suprimiu colite em um modelo de transferência adotiva de doença (Yamamoto et al., 2000 Journal of Immunology, 164, 4878; Atreya et al., 2000 Nature Med 6, 583). O último estudo também demonstrou eficácia com um anticorpo anti-receptor no modelo de camundongo IL-10 nocaute de colite e no modelo TNBS de inflamação de intestino.

[0010] Foi identificado agora um anticorpo anti-IL-6 neutralizante de alta afinidade que é particularmente eficaz in vivo, por exemplo no modelo in vivo descrito neste lugar, em particular, um anticorpo neutralizante tendo especificidade para IL-6 humana, tendo uma cadeia pesada compreendendo a sequência gH13 dada na SEQ ID NO:11 e uma cadeia leve compreendendo a sequência gL10 dada na SEQ ID NO:13.

[0011] Os resíduos em domínios variáveis de anticorpo são convencionalmente numerados de acordo com um sistema desenvolvido por Kabat et al. Este sistema é descrito em Kabat et al., 1987, in Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (daqui por diante "Kabat et al. (supra)"). Este sistema de numeração é usado no presente relatório exceto onde indicado de outra maneira.

[0012] As designações de resíduo de Kabat nem sempre correspondem diretamente com a numeração linear dos resíduos de aminoácidos. A sequência de aminoácidos linear atual pode conter menos aminoácidos ou aminoácidos adicionais do que na numeração estrita de Kabat correspondendo a um encurtamento de, ou inserção em, um componente estrutural, quer arcabouço ou região determinante de complementaridade (CDR), da estrutura básica de domínio variável. A correta numeração de resíduos de Kabat pode ser determinada para um dado anticorpo por alinhamento de resíduos de homologia na sequência do anticorpo com uma sequência numerada de Kabat "padrão".

[0013] Os CDRs do domínio variável de cadeia pesada são localizados em resíduos 31-35 (CDR-H1), resíduos 50-65 (CDR-H2) e resíduos 95-102 (CDR-H3) de acordo com o sistema de numeração de Kabat. Entretanto, de acordo com Chothia (Chothia, C. and Lesk, A.M. J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987)), a alça equivalente a CDR-H1 se pro10nga de resíduo 26 a resíduo 32. Assim 'CDR-H1', como usado neste lugar, compreende resíduos 26 a 35, como descrito por uma combinação do sistema de numeração de Kabat e definição de sequência topológica de Chothia.

[0014] Os CDRs do domínio variável de cadeia leve são localizados em resíduos 24-34 (CDR-L1), resíduos 50-56 (CDR-L2) e resíduos 89-97 (CDR-L3) de acordo com o sistema de numeração de Kabat.

[0015] Como usado neste lugar, o termo 'anticorpo neutralizante' descreve um anticorpo que é capaz de neutralizar a atividade biológica de sinalização de IL-6, por exemplo bloqueando a ligação de sítio 3 de IL-6 ao receptor gp130.

[0016] Anticorpos para uso na presente invenção podem ser obtidos usando

qualquer método adequado conhecido na técnica. O polipeptídeo IL-6 ou células expressando o polipeptídeo podem ser usados para produzir anticorpos que reconhecem especificamente IL-6. O polipeptídeo IL-6 pode ser o polipeptídeo `maduro' ou um fragmento biologicamente ativo ou derivado deste. Preferivelmente o polipeptídeo 1L-6 é o polipeptídeo maduro. Polipeptídeos IL-6 podem ser preparados por processos bem conhecidos na técnica a partir de células hospedeiras geneticamente modificadas compreendendo sistemas de expressão ou eles podem ser recuperados a partir de fontes biológicas naturais. No presente pedido, o termo "polipeptídeos" inclui peptídeos, polipeptídeos e proteínas. Estes são usados permutavelmente a menos que de outra maneira especificado. O polipeptídeo IL-6 em algumas instâncias pode ser parte de uma proteína maior tal como uma proteína de fusão por exemplo fundida a uma etiqueta de afinidade. Anticorpos gerados contra o polipeptídeo IL-6 podem ser obtidos, onde imunização de um animal é necessária, administrando os polipeptídeos a um animal, preferivelmente um animal não humano, usando protocolos bem conhecidos e de rotina, veja por exemplo Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986. Muitos animais de sangue quente, tal como coelhos, camundongos, ratos, ovelha, vacas ou porcos podem ser imunizados. Entretanto, camundongos, coelhos, porcos e ratos geralmente são preferidos.

[0017] Anticorpos para uso na presente invenção incluem anticorpos inteiros e fragmentos funcionalmente ativos ou derivados destes e podem ser, mas não são limitados a, anticorpos monoclonais, humanizados, completamente humanos ou quiméricos.

[0018] Anticorpos monoclonais podem ser preparados por qualquer método conhecido na técnica tal como a técnica de hibridoma (Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256:495-497), a técnica de trioma, a técnica de hibridoma de célula B humana (Kozbor et al., 1983, Immunology Today, 4:72) e a técnica de hibridoma de EBV (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp77-96, Alan R Liss, Inc., 1985).

[0019] Anticorpos para uso na invenção também podem ser gerados usando

métodos de anticorpo de único linfócito clonando e expressando cDNAs de região variável de imunoglobulina gerados a partir de linfócitos únicos selecionados para a produção de anticorpos específicos por exemplo pelos métodos descritos por Babcook, J. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(15):7843-78481; W092/02551; W02004/051268 e Pedido de Patente Internacional número W02004/106377.

[0020] Anticorpos humanizados (os quais incluem anticorpos enxertados com CDR) são moléculas de anticorpo de espécie não humana tendo uma ou mais regiões determinantes de complementaridade (CDRs) da espécie não humana e uma região de arcabouço de uma molécula de imunoglobulina humana (veja, e.g. Patente Norte-Americana 5.585.089; W091/09967). Será percebido que pode ser apenas necessário transferir os resíduos determinantes de especificidade das CDRs ao invés da CDR inteira (veja por exemplo, Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34). Anticorpos humanizados podem opcionalmente compreender adicionalmente um ou mais resíduos de arcabouço derivados da espécie não humana da qual os CDRs foram derivados.

[0021] Anticorpos quiméricos são aqueles anticorpos codificados por genes de imunoglobulina que foram geneticamente modificados de forma que os genes de cadeia leve e pesada são compostos de segmentos de gene de imunoglobulina pertencendo a espécies diferentes.

[0022] Os anticorpos para uso na presente invenção também podem ser gerados usando vários métodos de apresentação em fago conhecido na técnica e incluem aqueles descritos por Brinkman et al. (in J. Immunol. Methods, 1995, 182: 41-50), Ames et al. (J. Immunol. Methods, 1995, 184:177186), Kettleborough et al. (Eur. J. Immunol. 1994, 24:952-958), Persic et al. (Gene, 1997 187 9-18), Burton et al. (Advances in Immunology, 1994, 57:191-280) e WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; e Patente Norte-Americana 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780,225; 5.658.727; 5.733.743 e 5.969.108.

[0023] Anticorpos totalmente humanos são aqueles anticorpos nos quais as regiões variáveis e as regiões constantes (onde presentes) tanto da cadeia pesada como da leve são todas de origem humana, ou substancialmente idênticas a sequências de origem humana, não necessariamente do mesmo anticorpo. Exemplos de anticorpos totalmente humanos podem incluir anticorpos produzidos por exemplo pelos métodos de apresentação em fago descritos acima e anticorpos produzidos por camundongos nos quais os genes de parte variável e constante de imunoglobulina murina foram substituídos por suas contrapartes humanas eg. como descrito em termos gerais em Patente Européia 0546073 Bl, Patente Norte-Americana 5.545.806, Patente Norte-Americana 5.569.825, Patente Norte-Americana 5.625.126, Patente Norte-Americana 5.633.425, Patente Norte-Americana 5.661.016, Patente Norte-Americana 5.770.429, EP 0438474 B1 e EP 0463151 B1.

[0024] Um anticorpo neutralizante tendo especificidade para IL-6 humana, pode compreender uma cadeia pesada, em que o domínio variável da cadeia pesada compreende pelo menos uma de uma CDR tendo a sequência dada em SEQ ID NO:5 para CDR-H1, uma CDR tendo a sequência dada em SEQ ID NO:6 para CDR-H2 e uma CDR tendo a sequência dada em SEQ ID NO:7 para CDR-H3.

[0025] Um anticorpo neutralizante tendo especificidade para IL-6 humana, pode compreender uma cadeia pesada, caracterizado pelo fato de que pelo menos dois de CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 do domínio variável da cadeia pesada são selecionados a partir dos seguintes: a sequência dada em SEQ ID NO:5 para CDR-H1, a sequência dada em SEQ ID NO:6 para CDR-H2 e a sequência dada em SEQ ID NO:7 para CDR-113. Por exemplo, o anticorpo pode compreender uma cadeia pesada caracterizado pelo fato de que CDR-H1 tem a sequência dada em SEQ ID NO:5 e CDR-H2 tem a sequência dada em SEQ ID NO:6. Alternativamente, o anticorpo pode compreender uma cadeia pesada caracterizado pelo fato de que CDR-H1 tem a sequência dada em SEQ ID NO:5 e CDR-H3 tem a sequência dada em SEQ ID NO:7, ou o anticorpo pode compreender uma cadeia pesada caracterizado pelo fato de que CDR-H2 tem a sequência dada em SEQ ID NO:6 e

CDR-H3 tem a sequência dada em SEQ ID NO:7. Para a rejeição de dúvida, é entendido que todas as permutações estão incluídas.

[0026] Um anticorpo neutralizante tendo especificidade para IL-6 humana é fornecido compreendendo uma cadeia pesada, em que o domínio variável da cadeia pesada compreende a sequência dada em SEQ ID NO:5 para CDR-H1, a sequência dada em SEQ ID NO:6 para CDR-H2 e a sequência dada em SEQ ID NO:7 para CDR-H3.

[0027] Um anticorpo neutralizante tendo especificidade para IL-6 humana, pode compreender uma cadeia leve, caracterizado pelo fato de que o domínio variável da cadeia leve compreende pelo menos uma de uma CDR tendo a sequência dada em SEQ ID NO:8 para CDR-L1, uma CDR tendo a sequência dada em SEQ ID NO:9 para CDR-L2 e uma CDR tendo a sequência dada em SEQ ID NO:10 para CDR-L3.

[0028] Um anticorpo neutralizante tendo especificidade para IL-6 humana, pode compreender uma cadeia leve, caracterizado pelo fato de que pelo menos duas de CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 do domínio variável da cadeia leve são selecionados a partir dos seguintes: a sequência dada em SEQ ID NO:8 para CDR-L1, a sequência dada em SEQ ID NO:9 para CDR-L2 e a sequência dada em SEQ ID NO:10 para CDR-L3. Por exemplo, o anticorpo pode compreender uma cadeia leve caracterizada pelo fato de que CDR-L1 tem a sequência dada em SEQ ID NO:8 e CDR-L2 tem a sequência dada em SEQ ID NO:9. Alternativamente, o anticorpo pode compreender uma cadeia leve caracterizada pelo fato de que CDR-L1 tem a sequência dada em SEQ ID NO:8 e CDR-L3 tem a sequência dada em SEQ ID NO:10, ou o anticorpo pode compreender uma cadeia leve caracterizada pelo fato de que CDR-L2 tem a sequência dada em SEQ ID NO:9 e CDR-L3 tem a sequência dada em SEQ ID NO:10. Para a rejeição de dúvida, é entendido que todas as permutações estão incluídas.

[0029] Um anticorpo neutralizante tendo especificidade para IL-6 humana é provido compreendendo uma cadeia leve, caracterizado pelo fato de que o domínio variável compreende a sequência dada em SEQ ID NO:8 para CDR-L1, a sequência dada em SEQ ID NO:9 para CDR-L2 e a sequência dada em SEQ ID NO:10 para

CDR-L3.

[0030] Será percebido que uma ou mais substituições, adições e/ou deleções de aminoácidos podem ser feitas às CDRs fornecidas pela presente invenção sem alterar significantemente a capacidade do anticorpo de se ligar a IL-6 e neutralizar atividade de IL-6. O efeito de quaisquer substituições, adições e/ou deleções de aminoácidos pode ser prontamente testado por alguém versado na técnica, por exemplo usando os métodos descritos nos Exemplos para determinar ligação e neutralização de IL-6. Por conseguinte, em um exemplo um anticorpo tendo especificidade para IL-6 humana compreende uma ou mais CDRs selecionadas a partir de CDRH-1 (SEQ ID NO:5), CDRH-2 (SEQ ID NO:6), CDRH-3 (SEQ ID NO:7), CDRL-1 (SEQ ID NO:8), CDRL-2 (SEQ ID NO:9) e CDRL-3 (SEQ ID NO:10) nas quais um ou mais aminoácidos em uma ou mais das CDRs foi substituído por outro aminoácido.

[0031] As moléculas de anticorpo podem compreender uma cadeia leve complementar ou uma cadeia pesada complementar, respectivamente.

[0032] O anticorpo de acordo com a presente invenção compreende uma cadeia pesada, caracterizado pelo fato de que o domínio variável da cadeia pesada compreende a sequência dada em SEQ ID NO:5 para CDR-H1, a sequência dada em SEQ ID NO:6 para CDR-H2 e a sequência dada em SEQ ID NO:7 para CDR-H3 e uma cadeia leve caracterizado pelo fato de que o domínio variável da cadeia leve compreende a sequência dada em SEQ ID NO:8 para CDR-L1, a sequência dada em SEQ ID NO:9 para CDR-L2 e a sequência dada em SEQ ID NO:10 para CDR-L3.

[0033] O anticorpo tendo especificidade para IL-6 humana pode compreender uma cadeia pesada, caracterizado pelo fato de que o domínio variável da cadeia pesada compreende a sequência dada em SEQ ID NO:5 para CDR-H1, a sequência dada em SEQ ID NO:6 para CDRH-2 e a sequência dada em SEQ ID NO:7 para CDRH-3 e uma cadeia leve caracterizado pelo fato de que o domínio variável da cadeia leve compreende a sequência dada em SEQ ID NO:8 para CDR-L1, a sequência dada em SEQ ID NO:9 para CDR-L2 e a sequência dada em SEQ ID NO:10 para CDR-L3 nas quais um ou mais aminoácidos em uma ou mais das CDRs

foi substituído por outro aminoácido.

[0034] O anticorpo pode compreender uma cadeia pesada, em que o domínio variável da cadeia pesada compreende a sequência dada em SEQ ID NO:2 ou uma sequência tendo pelo menos 70%, 80%, 90%, 95% ou 98% de identidade ou similaridade com a mesma.

[0035] "Identidade", como usado neste lugar, indica que em qualquer posição particular nas sequências alinhadas, o resíduo de aminoácido é idêntico entre as sequências. "Similaridade", como usado neste lugar, indica que, em qualquer posição particular nas sequências alinhadas, o resíduo de aminoácido é de um tipo similar entre as sequências. Por exemplo, leucina pode ser substituída por isoleucina ou valina. Outros aminoácidos que podem ser freqüentemente substituídos por um outro incluem mas não são limitados a:

- fenilalanina, tirosina e triptofano (aminoácidos tendo cadeias laterais aromáticas);
- lisina, arginina e histidina (aminoácidos tendo cadeias laterais básicas);
- aspartato e glutamato (aminoácidos tendo cadeias laterais ácidas);
- asparagina e glutamina (aminoácidos tendo cadeias laterais amidas); e
- cisteína e metionina (aminoácidos tendo cadeias laterais contendo enxofre). Graus de identidade e similaridade podem ser prontamente calculados (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; e Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991).

[0036] O anticorpo pode compreender uma cadeia leve, em que o domínio variável da cadeia leve compreende a sequência dada em SEQ ID NO:4 ou uma sequência tendo pelo menos 70%, 80%, 90%, 95% ou 98% de identidade ou similaridade com a mesma.

[0037] Um anticorpo pode compreender uma cadeia pesada, caracterizado pelo fato de que o domínio variável da cadeia pesada compreende a sequência dada em SEQ ID NO:2 e uma cadeia leve, caracterizado pelo fato de que o domínio variável da cadeia leve compreende a sequência dada em SEQ ID NO:4.

[0038] O anticorpo pode compreender uma cadeia pesada e uma cadeia leve, caracterizado pelo fato de que o domínio variável da cadeia pesada compreende uma sequência tendo pelo menos 60% de identidade ou similaridade com a sequência dada em SEQ ID NO:2 e o domínio variável da cadeia leve compreende uma sequência tendo pelo menos 60% de identidade ou similaridade com a sequência dada em SEQ ID NO:4. Preferivelmente, o anticorpo compreende uma cadeia pesada, caracterizado pelo fato de que o domínio variável da cadeia leve compreende uma sequência tendo pelo menos 70%, 80%, 90%, 95% ou 98% de identidade ou similaridade com a sequência dada em SEQ ID NO:2 e uma cadeia leve, caracterizado pelo fato de que o domínio variável da cadeia leve compreende uma sequência tendo pelo menos 70%, 80%, 90%, 95% ou 98% de identidade ou similaridade com a sequência dada em SEQ ID NO:4.

[0039] Um anticorpo de rato é revelado, no qual o domínio variável da cadeia pesada compreende a sequência dada em SEQ ID NO:2, e o domínio variável da cadeia leve compreende a sequência dada em SEQ ID NO:4. Este anticorpo de rato é referido neste lugar como '132E09' ou como o anticorpo "doador". As sequências completas de nucleotídeos e aminoácidos do domínio variável da cadeia pesada de anticorpo de rato 132E09 são fornecidas em SEQ ID NOS: 1 e 2 respectivamente. As sequências completas de nucleotídeos e aminoácidos do domínio variável da cadeia leve de anticorpo de rato 132E09 são fornecidas em SEQ ID NOS: 3 e 4 respectivamente. As CDRs dadas em SEQ ID NOS: 5, 6, 7, 8, 9 e 10 são derivadas do anticorpo de rato 132E09.

[0040] Além disso, o anticorpo pode ser um anticorpo enxertado com CDR. Como usado neste lugar, o termo 'anticorpo enxertado com CDR' se refere a um anticorpo caracterizado pelo fato de que a cadeia pesada e/ou leve contém uma ou mais CDRs (incluindo, se desejado, uma ou mais CDRs modificadas) de um

anticorpo doador (e.g. um anticorpo de rato) enxertado em um arcabouço de região variável de cadeia pesada e/ou leve de um anticorpo aceptor (e.g. um anticorpo humano). Para uma revisão, veja Vaughan et al, Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998. Preferivelmente uma ou mais das CDRs foram obtidas a partir do anticorpo de rato 132E09 (SEQ ID NOS:5, 6, 7, 8, 9 e 10). Em uma forma de realização ao invés da CDR inteira ser transferida, apenas um ou mais dos resíduos determinantes de especificidade de qualquer uma das CDRs descritas neste lugar acima são transferidos para o arcabouço de anticorpo humano (veja por exemplo, Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34). Em uma forma de realização apenas os resíduos determinantes de especificidade de uma ou mais das CDRs descritas neste lugar acima são transferidos para o arcabouço de anticorpo humano. Em outra forma de realização apenas os resíduos determinantes de especificidade de cada uma das CDRs descritas neste lugar acima são transferidos para o arcabouço de anticorpo humano.

[0041] Quando as CDRs ou resíduos determinantes de especificidade são enxertados, qualquer sequência apropriada de arcabouço de região variável aceptora pode ser usada levando em consideração a classe/tipo do anticorpo doador do qual as CDRs são derivadas, incluindo regiões de arcabouço de rato, camundongo, primata e humano. Tal anticorpo enxertado com CDR tem pelo menos um domínio variável compreendendo regiões de arcabouço aceptoras humanas assim como uma ou mais das CDRs derivadas do anticorpo doador como referido acima. Assim, é fornecido um anticorpo neutralizante enxertado com CDR caracterizado pelo fato de que o domínio variável compreende regiões de arcabouço aceptoras humanas e não humanas, preferivelmente CDRs doadoras de rato.

[0042] Exemplos de arcabouços humanos que podem ser usados na presente invenção são KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEL LAY e POM (Kabat et al., supra). Por exemplo, KOL e NEWM podem ser usados para a cadeia pesada, REI pode ser usado para a cadeia leve e EU, LAY e POM podem ser usados tanto para a cadeia pesada como para a cadeia leve. Alternativamente, sequências de linhagem germinativa humana podem ser usadas; as sequências destas estão disponíveis em:

http://vbase.mrccpe.cam.ac.uk/

[0043] Em um anticorpo enxertado com CDR, as cadeias pesada e leve aceptoras não necessariamente precisam ser derivadas do mesmo anticorpo e podem, se desejado, compreender cadeias compostas tendo regiões de arcabouço derivadas de cadeias diferentes.

[0044] A região de arcabouço preferida para a cadeia pesada do anticorpo enxertado com CDR é derivada da sequência VH3 de subgrupo humano 1-4 3-72 junto com JH4 (mostrado em Figura 2; SEQ ID NOS:19 e 20). Por conseguinte, é fornecido um anticorpo neutralizante enxertado com CDR compreendendo pelo menos um CDR doador não humano caracterizado pelo fato de que a região de arcabouço de cadeia pesada é derivada da sequência de subgrupo humano 1-4 3-72 junto com JH4. A sequência de JH4 humano é como segue: (YFDY)WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:20). O motivo YFDY é parte de CDR-H3 e não é parte de arcabouço 4 (Ravetch, . et al., 1981, Cell, 27, 583-591). A sequência doadora é a sequência 132E09 VH (SEQ ID N0:2) mostrada em Figura 2 e as CDRs doadoras (SEQ ID NOs: 5, 6 e 7) estão sublinhadas.

[0045] A região de arcabouço preferida para a cadeia leve do anticorpo enxertado com CDR é derivada da sequência VK1 de subgrupo de linhagem germinativa humana 2-1-(1) 012 junto com JK2 mostrado em Figura 2 (SEQ ID N0:21 e 22). Por conseguinte, é fornecido um anticorpo neutralizante enxertado com CDR compreendendo pelo menos um CDR doador não humana caracterizado pelo fato de que a região de arcabouço de cadeia leve é derivada da sequência de subgrupo humano VK1 2-1-(1) 012 junto com JK2. A sequência JK2 é como segue: (YT)FGQGTKLEIKR (SEQ ID N0:22). O motivo YT é parte de CDR-L3 e não é parte de arcabouço 4 (Hieter, PA., et al., 1982, J. Biol. Chem., 257, 1516-1522). A sequência doadora é a sequência 132E09 VL (SEQ ID N0:4) mostrada em Figura 2 e as CDRs doadoras (SEQ ID NOs 8, 9 e 10) estão sublinhadas.

[0046] Também, em um anticorpo enxertado com CDR, as regiões de arcabouço não precisam ter exatamente a mesma sequência que aquelas do anticorpo aceptor. Por exemplo, resíduos incomuns podem ser trocados por resíduos que ocorrem mais

freqüentemente para aquela classe ou tipo de cadeia aceptora. Alternativamente, resíduos selecionados nas regiões de arcabouço aceptor podem ser trocados de forma que eles correspondam ao resíduo encontrado na mesma posição no anticorpo doador (veja Reichmann et al., 1998, Nature, 332, 323-324). Tais mudanças devem ser mantidas no mínimo necessário para recuperar a afinidade do anticorpo doador. Um protocolo para selecionar resíduos nas regiões de arcabouço aceptor que podem precisar ser trocados é apresentado em WO 91/09967.

[0047] Em um anticorpo enxertado com molécula de CDR da presente invenção, se a cadeia pesada aceptora tem a sequência VH3 humana 1-4 3-72 junto com JH4, então as regiões de arcabouço aceptor da cadeia pesada compreendem, em adição a um ou mais CDRs doadores, um resíduo doador em pelo menos posição 49 (de acordo com Kabat et al.,(supra)). Por conseguinte, é fornecido um anticorpo enxertado com CDR, caracterizado pelo fato de que pelo menos o resíduo em posição 49 do domínio variável da cadeia pesada é um resíduo doador.

[0048] Em um anticorpo enxertado com molécula de CDR de acordo com a presente invenção, se a cadeia leve aceptora tem a sequência VK1 de subgrupo humano 2-1-(1) 012 junto com JK2, então nenhum resíduo doador é usado nas regiões de arcabouço aceptor da cadeia leve e apenas um ou mais CDRs doadores são transferidos.

[0049] Resíduos doadores são resíduos do anticorpo doador, i.e. o anticorpo dos quais os CDRs foram originalmente derivados, que no caso da presente invenção é o anticorpo de rato 132E09.

[0050] Por conseguinte, a presente invenção fornece um anticorpo no qual a região variável de cadeia pesada compreende a sequência de gHl3 (Figura 2; SEQ ID NO:11).

[0051] Em uma forma de realização da presente invenção, o anticorpo compreende uma cadeia pesada, caracterizado pelo fato de que o domínio variável da cadeia pesada compreende uma sequência tendo pelo menos 60% de identidade ou similaridade com a sequência dada em SEQ ID NO:11. Preferivelmente, o anticorpo compreende uma cadeia pesada, caracterizado pelo fato de que o domínio

variável da cadeia pesada compreende uma sequência tendo pelo menos 70%, 80%, 90%, 95% ou 98% de identidade ou similaridade com a sequência dada em SEQ ID NO:11.

[0052] Em adição, a presente invenção fornece um anticorpo no qual a região variável de cadeia leve compreende a sequência de gL10 (Figura 2; SEQ ID NO:13).

[0053] Em uma forma de realização da presente invenção, o anticorpo compreende uma cadeia leve, caracterizado pelo fato de que o domínio variável da cadeia leve compreende uma sequência tendo pelo menos 60% de identidade ou similaridade com a sequência dada em SEQ ID NO:13. Preferivelmente, o anticorpo compreende uma cadeia leve, caracterizado pelo fato de que o domínio variável da cadeia leve compreende uma sequência tendo pelo menos 70%, 80%, 90%, 95% ou 98% de identidade ou similaridade com a sequência dada em SEQ ID NO:13.

[0054] Preferivelmente um anticorpo enxertado com CDR de acordo com a presente invenção compreende uma cadeia pesada compreendendo a sequência de gH13 (SEQ ID NO:11) e uma cadeia leve compreendendo a sequência de gL10 (SEQ ID NO:13).

[0055] Em uma forma de realização da presente invenção, o anticorpo compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve, caracterizado pelo fato de que o domínio variável da cadeia pesada compreende uma sequência tendo pelo menos 60% de identidade ou similaridade com a sequência dada em SEQ ID NO:11 e o domínio variável da cadeia leve compreende uma sequência tendo pelo menos 60% de identidade ou similaridade com a sequência dada em SEQ ID NO:13. Preferivelmente, o anticorpo compreende uma cadeia pesada, caracterizado pelo fato de que o domínio variável da cadeia leve compreende uma sequência tendo pelo menos 70%, 80%, 90%, 95% ou 98% de identidade ou similaridade com a sequência dada em SEQ ID NO:11 e uma cadeia leve, caracterizado pelo fato de que o domínio variável da cadeia leve compreende uma sequência tendo pelo menos 70%, 80%, 90%, 95% ou 98% de identidade ou similaridade com a sequência dada em SEQ ID NO:13.

[0056] As moléculas de anticorpo da presente invenção podem compreender

uma molécula completa de anticorpo tendo cadeias pesada e leve de comprimento completo ou um fragmento destas e podem ser, mas não são limitados a Fab, Fab modificado, Fab', $F(ab')_2$, Fv, anticorpos de domínio único, scFv, anticorpos bi, tri ou tetravalentes, Bis-scFv, diacorpos, triacorpos, tetracorpos e fragmentos de ligação de epítopo de qualquer dos acima (veja por exemplo Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136; Adair and Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217). Os métodos para criar e fabricar estes fragmentos de anticorpo são bem conhecidos na técnica (veja por exemplo Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181). Outros fragmentos de anticorpo para uso na presente invenção incluem os fragmentos Fab e Fab' descritos em pedidos de patente Internacional W02005/003169, W02005/003170 e W02005/003171. Anticorpos multivalentes podem compreender múltiplas especificidades ou podem ser monoespecíficos (veja por exemplo WO 92/22853 and W005/113605).

[0057] Os domínios de região constante da molécula de anticorpo da presente invenção, se presentes, podem ser selecionados levando em consideração a função proposta da molécula de anticorpo, e em particular as funções efetoras que podem ser requeridas. Por exemplo, os domínios de região constante podem ser domínios humanos IgA, IgD, IgE, IgG ou IgM. Em particular, domínios de região constante de IgG humana podem ser usados, especialmente dos isotipos IgG1 e IgG3 quando a molécula de anticorpo é pretendida para usos terapêuticos e funções efetoras de anticorpo são requeridas. Alternativamente, isotipos IgG2 e IgG4 podem ser usados quando a molécula de anticorpo é pretendida para propósitos terapêuticos e funções efetoras de anticorpo não são requeridas, e.g. simplesmente para bloquear atividade de IL-6. Será percebido que variantes de sequência destes domínios de região constante também podem ser usadas. Por exemplo moléculas de IgG nas quais a serina em posição 241 foi trocada para prolina como descrito em Angal et al., Molecular Immunology, 1993, 30 (1), 105-108 podem ser usadas. Particularmente preferido é o domínio constante de IgG4 compreendendo esta mudança. Também será entendido por alguém versado na técnica que anticorpos podem passar por

uma variedade de modificações pós-traducionais. O tipo e grau destas modificações freqüentemente dependem da linhagem de célula hospedeira usada para expressar o anticorpo assim como as condições de cultura. Tais modificações podem incluir variações em glicosilação, oxidação de metionina, formação de dicetopiperizina, isomerização de aspartato e desamidação de asparagina. Uma modificação freqüente é a perda de um resíduo básico carboxi-terminal (tal como lisina ou arginina) devido à ação de carboxipeptidases (como descrito em Harris, RJ. Journal of Chromatography 705:129-134, 1995). Por conseguinte, a lisina C-terminal da cadeia pesada de anticorpo de SEQ ID NO: 16 pode estar ausente.

[0058] Em uma forma de realização preferida o anticorpo fornecido pela presente invenção é um anticorpo neutralizante tendo especificidade para IL-6 humana no qual a região constante de cadeia pesada compreende a região constante de IgG4 humana na qual a serina em posição 241 foi substituída por prolina como descrito em Angal et al., supra. Por conseguinte, a presente invenção fornece um anticorpo no qual a cadeia pesada compreende ou consiste da sequência dada em SEQ ID NO:16. Preferivelmente a região constante de cadeia leve é cKappa.

[0059] Em uma forma de realização a presente invenção fornece um anticorpo no qual a cadeia pesada compreende ou consiste da sequência dada em SEQ ID NO:16 e a cadeia leve compreende ou consiste da sequência dada em SEQ ID NO:18.

[0060] Em uma forma de realização da invenção, o anticorpo compreende uma cadeia pesada, caracterizado pelo fato de que a cadeia pesada compreende uma sequência tendo pelo menos 60% de identidade ou similaridade com a sequência dada em SEQ ID NO:16. Preferivelmente, o anticorpo compreende uma cadeia pesada, caracterizado pelo fato de que a cadeia pesada compreende uma sequência tendo pelo menos 70%, 80%, 90%, 95% ou 98% de identidade ou similaridade com a sequência dada em SEQ ID NO:16.

[0061] Em uma forma de realização da invenção, o anticorpo compreende uma cadeia leve, caracterizado pelo fato de que a cadeia leve compreende uma sequência tendo pelo menos 60% de identidade ou similaridade com a sequência

dada em SEQ ID NO:18. Preferivelmente, o anticorpo compreende uma cadeia leve, caracterizado pelo fato de que a cadeia leve compreende uma sequência tendo pelo menos 70%, 80%, 90%, 95% ou 98% de identidade ou similaridade com a sequência dada em SEQ ID NO:18.

[0062] Em uma forma de realização da invenção, o anticorpo compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve, caracterizado pelo fato de que a cadeia pesada compreende uma sequência tendo pelo menos 60% de identidade ou similaridade com a sequência dada em SEQ ID NO:16 e a cadeia leve compreende uma sequência tendo pelo menos 60% de identidade ou similaridade com a sequência dada em SEQ ID NO:18. Preferivelmente, o anticorpo compreende uma cadeia pesada, caracterizado pelo fato de que a cadeia pesada compreende uma sequência tendo pelo menos 70%, 80%, 90%, 95% ou 98% de identidade ou similaridade com a sequência dada em SEQ ID NO:16 e uma cadeia leve, caracterizado pelo fato de que a cadeia leve compreende uma sequência tendo pelo menos 70%, 80%, 90%, 95% ou 98% de identidade ou similaridade com a sequência dada em SEQ ID NO:18.

[0063] Também fornecida é uma região específica ou epítopo de IL-6 humana que é ligado por um anticorpo de acordo com a presente invenção, em particular um anticorpo compreendendo qualquer um de CDR-H1 (SEQ ID NO:5), CDR-H2 (SEQ ID NO:6), CDR-H3 (SEQ ID NO:7), CDR-L1 (SEQ ID NO:8), CDR-L2 (SEQ ID NO:9) ou CDR-L3 (SEQ ID NO:10), por exemplo, anticorpo 132E09 ou anticorpos compreendendo a sequência de região variável de cadeia pesada gH13 (SEQ ID NO:11) e/ou a sequência de região variável de cadeia leve gL10 (SEQ ID NO:13).

[0064] Esta região específica ou epítopo do polipeptídeo IL-6 humano pode ser identificado por qualquer método adequado de mapeamento de epítopo conhecido na técnica em combinação com qualquer um dos anticorpos fornecidos pela presente invenção. Exemplos de tais métodos incluem triar peptídeos de comprimentos variados derivados de IL-6 para ligar ao anticorpo da presente invenção com o menor fragmento que pode se ligar especificamente ao anticorpo contendo a sequência do epítopo reconhecido pelo anticorpo. Os peptídeos IL-6

podem ser produzidos sinteticamente ou por digestão proteolítica do polipeptídeo IL-6. Peptídeos que se ligam ao anticorpo podem ser identificados por, por exemplo, análise espectrométrica de massa. Em outro exemplo, espectroscopia RMN pode ser usada para identificar o epítopo ligado por um anticorpo da presente invenção, como descrito nos Exemplos neste lugar. Uma vez identificado, o fragmento epitópico que se liga a um anticorpo da presente invenção pode ser usado, se requerido, como um imunogene para obter anticorpos neutralizantes adicionais que se ligam ao mesmo epítopo.

[0065] Em um exemplo, o epítopo de IL-6 humana ligado por um anticorpo da presente invenção compreende pelo menos resíduos de aminoácidos S47, C50, E93, R104, F105, E106, T149, K150, A153, Q156, Q159 e S169 de IL-6 humana (numeração de resíduos de acordo com Boulanger et al., Science, 300, 2101-2104).

[0066] Em um exemplo, o epítopo de IL-6 humana ligado por um anticorpo da presente invenção compreende resíduos de aminoácidos S47, C50, E93, R104, F105, E106, T149, K150, A153, Q156, Q159 e S169 e um ou mais resíduos selecionados a partir de C44, S53, A58, V96, Q152, Q154, N155, W157, T163, L165, e E172.

[0067] Em um exemplo, o epítopo de IL-6 humana ligado por um anticorpo da presente invenção compreende resíduos de aminoácidos C44, S47, C50, S53, A58, E93, V96, R104, F105, E106, T149, K150, Q152, A153, Q154, N155, Q156, W157, Q159, T163, L165, 5169 e E172.

[0068] Um anticorpo neutralizante tendo especificidade para IL-6 humana pode se ligar a um epítopo de IL-6 humana madura que compreende resíduos de aminoácidos S47, C50, E93, R104, F105, E106, T149, K150, A153, Q156, Q159 e S 169.

[0069] Um anticorpo neutralizante tendo especificidade para IL-6 humana pode se ligar a um epítopo de IL-6 humana madura que compreende resíduos de aminoácidos S47, C50, E93, R104, F105, E106, T149, K150, A153, Q156, Q159 e 5169 e um ou mais resíduos selecionados a partir de C44, S53, A58, V96, Q152, Q154, N155, W157, T163, L165, e E172

[0070] Um anticorpo neutralizante tendo especificidade para IL-6 humana pode se ligar a um epítopo de IL-6 humana madura que compreende resíduos de aminoácidos C44, S47, C50, S53, A58, E93, V96, R104, F105, E106, T149, K150, Q152, A153, Q154, N155, Q156, W157, Q159, T163, L165, 5169 e E172.

[0071] Será percebido que os resíduos denominados acima também podem ser numerados baseado na numeração de aminoácidos do precursor não processado de IL-6 (Swiss Prot número de Acesso P05231). Usando esta numeração os resíduos numerados acima de acordo com Boulanger et al., supra como C44, S47, C50, S53, A58, E93, V96, R104, F105, E106, T149, K150, Q152, A153, Q154, N155, Q156, W157, Q159, T163, L165, 5169 e E172 se tornam C72, S75, C78, S81, A86, E121, V124, R132, F133, E134, T177, K178, Q180, A181, Q182, N183, Q184, W185, Q187, T191, L193, 5197 e E200 respectivamente.

[0072] Preferivelmente um anticorpo da presente invenção bloqueia a ligação do receptor gp130 a sítio 3 de IL-6 humana.

[0073] Anticorpos que bloqueiam transversalmente a ligação dos anticorpos da presente invenção a IL-6 podem ser similarmente úteis para neutralizar atividade de IL-6.

[0074] As moléculas de anticorpo da presente invenção preferivelmente têm uma alta afinidade de ligação para IL-6 humana, preferivelmente picomolar. Afinidade pode ser medida usando qualquer método adequado conhecido na técnica, incluindo BIAcore como descrito nos Exemplos neste lugar. Preferivelmente afinidade é medida usando IL-6 humana recombinante como descrito nos Exemplos neste lugar. Preferivelmente uma molécula de anticorpo de acordo com a presente invenção tem uma afinidade de ligação para IL-6 humana de menos do que 500pM. Preferivelmente uma molécula de anticorpo de acordo com a presente invenção tem uma afinidade de ligação para IL-6 humana de menos do que 50pM. Por conseguinte, em uma forma de realização uma molécula de anticorpo da presente invenção tem uma afinidade de ligação de entre cerca de 1 e cerca de 500pM. Em uma forma de realização a molécula de anticorpo da presente invenção tem uma afinidade de ligação de entre cerca de 1 e cerca de 50 pM. Preferivelmente a

molécula de anticorpo da presente invenção tem uma afinidade de ligação para IL-6 humana de entre cerca de 1 e cerca de 20pM. Em uma forma de realização o anticorpo da presente invenção tem uma afinidade de ligação para IL-6 humana de entre 8 e 12pM. Será percebido que a afinidade de anticorpos fornecidos pela presente invenção pode ser alterada usando qualquer método adequado conhecido na técnica. A presente invenção, portanto, também se refere a variantes das moléculas de anticorpo da presente invenção, que têm uma afinidade melhorada para IL-6 humana. Tais variantes podem ser obtidas por diversos protocolos de maturação de afinidade incluindo mutar os CDRs (Yang et al., J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), embaralhamento de cadeia (Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), uso de linhagens que causam mutação de E. coli (Low et al., J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), embaralhamento de DNA (Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), apresentação em fago (Thompson et al., J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) e PCR sexual (Crameri et al., Nature, 391, 288-291, 1998). Vaughan et al. (supra) discutem estes métodos de maturação de afinidade.

[0075] As moléculas de anticorpo da presente invenção preferivelmente neutralizam atividade de IL-6, por exemplo nos ensaios in vitro e in vivo descritos nos Exemplos. Em uma forma de realização estes anticorpos se ligam a 3 de IL-6 humana.

[0076] Em uma forma de realização a presente invenção fornece um anticorpo neutralizante tendo especificidade para IL-6 humana que é capaz de inibir a atividade de 0,038nM de IL-6 humana em 50% em uma concentração de menos do que 100pM dita atividade inibidora sendo medida na proliferação induzida por IL-6 de células T1165. Em uma forma de realização a concentração de anticorpo que inibe IL-6 em 50% é menor do que 50pM, mais preferivelmente menor do que 20pM. Preferivelmente a IL-6 humana usada no ensaio é IL-6 humana recombinante. Em uma forma de realização o anticorpo neutralizante é um anticorpo humanizado ou totalmente humano.

[0077] Em outra forma de realização a presente invenção fornece um anticorpo neutralizante tendo especificidade para IL-6 humana que é capaz de inibir a

atividade de 3,84nM de IL-6 humana em 50% em uma concentração de menos do que 1nM dita atividade inibidora sendo medida na produção de MCP-1 por HUVECs em resposta a IL-6 humana e sIL-6R. Preferivelmente a IL-6 humana usada no ensaio é IL-6 humana recombinante. Em uma forma de realização o anticorpo neutralizante é um anticorpo humanizado ou totalmente humano.

[0078] Se desejado um anticorpo de acordo com a presente invenção pode ser conjugado a uma ou mais molécula(s) efetora(s). Será percebido que em uma forma de realização a molécula efetora pode compreender uma única molécula efetora ou duas ou mais de tais moléculas ligadas de maneira a formar uma única unidade que pode ser acoplada os anticorpos da presente invenção. Onde se é desejado obter um fragmento de anticorpo ligado a uma molécula efetora, isto pode ser preparado por procedimentos químicos ou de DNA recombinante padrão nos quais o fragmento de anticorpo é ligado ou diretamente ou através de um agente de acoplamento à molécula efetora. Técnicas para conjugar tais moléculas efetoras a anticorpos são bem conhecidas na técnica (veja, Hellstrom et al., Controlled Drug Delivery, 2nd Ed., Robinson et al., eds., 1987, pp. 623-53; Thorpe et al., 1982 , Immunol. Rev., 62:119-58 e Dubowchik et al., 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123). Procedimentos químicos particulares incluem, por exemplo, aqueles descritos em WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 e W003031581. Alternativamente, onde a molécula efetora é uma proteína ou polipeptídeo a ligação pode ser atingida usando procedimentos de DNA recombinante, por exemplo como descrito em WO 86/01533 e EP0392745.

[0079] O termo molécula efetora como usado neste lugar inclui, por exemplo, agentes antineoplásicos, drogas, toxinas, proteínas biologicamente ativas, por exemplo enzimas, outro anticorpo ou fragmentos de anticorpo, polímeros sintéticos ou naturalmente ocorrentes, ácidos nucléicos e fragmentos destes e.g. DNA, RNA e fragmentos destes, radionuclídeos, particularmente radioiodo, radioisótopos, metais quelados, nanopartículas e grupos repórter tal como compostos fluorescentes ou compostos que podem ser detectados por espectroscopia RMN ou ESR.

[0080] Exemplos de moléculas efetoras podem incluir citotoxinas ou agentes

citotóxicos incluindo qualquer agente que é prejudicial a (e.g. mata) células. Exemplos incluem combrestatinas, dolastatinas, epotilonas, estaurosporina, maitansinoidas, espongistatinas, rizoxina, halicondrinas, roridinas, hemiasterlinas, taxol, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etoposida, tenoposida, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina dione, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1- dehidrotestosterona, glucocorticóides, procaina, tetracaina, lidocaina, propranolol, e puromicina e análogos ou homólogos destes.

[0081] Moléculas efetoras também incluem, mas não são limitados a, antimetabólitos (e.g. metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (e.g. mecloretamina, tioepa clorambucil, melfalan, carmustina (BSNU) e lomustina (CCNU), ciclotosfamida, bussulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, e cis-diclorodiamina platina (II) (DDP) cisplatina), antraciclinas (e.g. daunorubicina (anteriormente daunomicina) e doxorubicina), antibióticos (e.g. dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramicina (AMC), calicheamicinas ou duocarmicinas), e agentes antimitóticos (e.g. vincristina e vinblastina).

[0082] Outras moléculas efetoras podem incluir radionuclídeos quelados tal como ^{111}In e 90Y, Lu^{177}, Bismuto ^{213}, Califórnio^{252}, Irídio^{192} e Tungstênio^{188}/Rênio^{188}; ou drogas tal como mas não limitado a, alquilfosfocolinas, inibidores de topoisomerase I, taxóides e suramina.

[0083] Outras moléculas efetoras incluem proteínas, peptídeos e enzimas. Enzimas de interesse incluem, mas não são limitadas a, enzimas proteolíticas, hidrolases, liases, isomerases, transferases. Proteínas, polipeptídeos e peptídeos de interesse incluem, mas não são limitados a, imunoglobulinas, toxinas tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, ou toxina de difteria, uma proteína tal como insulina, fator de necrose tumoral, a-interferon, p-interferon, fator de crescimento de nervo, fator de crescimento derivado de plaqueta ou ativador de plasminogênio de tecido, um agente trombótico ou um agente antiangiogênico, e.g. angiostatina ou endostatina, ou, um modificador de resposta biológica tal como a

linfocina, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), fator estimulante de colônia de macrófago granulócito (GM-CSF), fator estimulante de colônia de granulócito (G-CSF), fator de crescimento de nervo (NGF) ou outro fator de crescimento e imunoglobulinas.

[0084] Outras moléculas efetoras podem incluir substâncias detectáveis úteis por exemplo em diagnose. Exemplos de substâncias detectáveis incluem várias enzimas, grupos prostéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes, materiais bioluminescentes, nuclídeos radioativos, metais que emitem posítron (para uso em tomografia de emissão de posítron), e íons metálicos paramagnéticos não radioativos. Veja geralmente Patente Norte-Americana No. 4.741.900 para íons metálicos que podem ser conjugados a anticorpos para uso como diagnósticos. Enzimas adequadas incluem peroxidase de rábano, fosfatase alcalina, beta-galactosidase, ou acetilcolinesterase; grupos prostéticos adequados incluem estreptavidina, avidina e biotina; materiais fluorescentes adequados incluem umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloreto de dansil e ficoeritrina; materiais luminescentes adequados incluem luminol; materiais bioluminescentes adequados incluem luciferase, luciferina, e aequorina; e nuclídeos radioativos adequados incluem ^{125}I, ^{131}I, ^{111}In e ^{99}Tc.

[0085] Em outro exemplo a(s) molécula(s) efetora(s) pode(m) aumentar a meia-vida do anticorpo in vivo, e/ou reduzir imunogenicidade do anticorpo e/ou estimular a liberação de um anticorpo através de uma barreira epitelial para o sistema imune. Exemplos de moléculas efetoras adequadas deste tipo incluem polímeros, albumina, proteínas de ligação de albumina ou compostos de ligação de albumina tal como aqueles descritos em W005/117984 (publicado em 15.12.05).

[0086] Onde a molécula efetora é um polímero ele, em geral, pode ser um polímero sintético ou um naturalmente ocorrente, por exemplo um polialquileno de cadeia linear ou ramificada opcionalmente substituído, polímero de polialcenileno ou polioxialquileno ou um polissacarídeo ramificado ou não ramificado, e.g. um homo ou hetero- polissacarídeo.

[0087] Substituintes opcionais particulares que podem estar presentes nos polímeros sintéticos mencionados acima incluem um ou mais grupos hidróxi, metil ou metóxi.

[0088] Exemplos particulares de polímeros sintéticos incluem poli(etilenoglicol) de cadeia linear ou ramificada opcionalmente substituído, poli(propilenoglicol) poli(álcool vinílico) ou derivados destes, especialmente poli(etilenoglicol) opcionalmente substituído tal como metoxipoli(etilenoglicol) ou derivados destes.

[0089] Polímeros naturalmente ocorrentes particulares incluem lactose, amilose, dextrana, glicogênio ou derivados destes.

[0090] "Derivados" como usado neste lugar é pretendido para incluir derivados reativos, por exemplo grupos reativos tiol-seletivos tal como maleimidas e os semelhantes. O grupo reativo pode ser ligado diretamente ou através de um segmento ligante ao polímero. Será percebido que o resíduo de um tal grupo irá em algumas instâncias formar parte do produto como o grupo de ligação entre o fragmento de anticorpo e o polímero.

[0091] O tamanho do polímero pode ser variado como desejado, mas geralmente estará em um intervalo de peso molecular médio de 500Da a 50000Da, preferivelmente de 5000 a 40000Da e mais preferivelmente de 20000 a 40000Da. O tamanho de polímero pode em particular ser selecionado com base no uso pretendido do produto por exemplo capacidade de localizar para certos tecidos tal como tumores ou pro10ngar meia-vida circulante (para revisão veja Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 531-545). Assim, por exemplo, onde o produto é pretendido para deixar a circulação e penetrar no tecido, por exemplo para uso no tratamento de um tumor, pode ser vantajoso usar um polímero de baixo peso molecular, por exemplo com um peso molecular de por volta de 5000Da. Para aplicações onde o produto permanece na circulação, pode ser vantajoso usar um polímero de alto peso molecular, por exemplo tendo um peso molecular no intervalo de 20000Da a 40000Da.

[0092] Polímeros particularmente preferidos incluem um polímero de polialquileno, tal como um poli(etilenoglicol) ou, especialmente, um

metoxipoli(etilenoglicol) ou um derivado destes, e especialmente com um peso molecular no intervalo de cerca de 15000Da a cerca de 40000Da.

[0093] Em um exemplo anticorpos para uso na presente invenção são acoplados a unidades de poli(etilenoglicol) (PEG). Em um exemplo particular o anticorpo é um fragmento de anticorpo e as moléculas de PEG podem ser acopladas através de qualquer cadeia lateral de aminoácido disponível ou grupo funcional de aminoácido terminal localizado no fragmento de anticorpo, por exemplo qualquer grupo livre de amino, imino, tiol, hidroxil ou carboxil. Tais aminoácidos podem ocorrer naturalmente no fragmento de anticorpo ou podem ser manipulados no fragmento usando métodos de DNA recombinante (veja por exemplo Patente Norte-Americana 5.219.996; Patente Norte-Americana 5.667.425; W098/25971). Em um exemplo a molécula de anticorpo da presente invenção é um fragmento Fab modificado caracterizado pelo fato de que a modificação é a adição à extremidade C-terminal de sua cadeia pesada de um ou mais aminoácidos para permitir o acoplamento de uma molécula efetora. Preferivelmente, os aminoácidos adicionais formam uma região de dobradiça modificada contendo um ou mais resíduos de cisteína à qual a molécula efetora pode ser acoplada. Múltiplos sítios podem ser usados para acoplar duas ou mais moléculas de PEG.

[0094] Preferivelmente moléculas de PEG são covalentemente ligadas através de um grupo tiol de pelo menos um resíduo de cisteína localizado no fragmento de anticorpo. Cada molécula de polímero acoplada ao fragmento de anticorpo modificado pode ser covalentemente ligada ao átomo de enxofre de um resíduo de cisteína localizado no fragmento. A ligação covalente geralmente será uma ponte dissulfeto ou, em particular, uma ponte de enxofre-carbono. Onde um grupo tiol é usado como o ponto de acoplamento moléculas efetoras ativadas apropriadamente, por exemplo derivados tiol seletivos tal como maleimidas e derivados de cisteína podem ser usados. Um polímero ativado pode ser usado como a matéria-prima na preparação de fragmentos de anticorpo modificados por polímero como descrito acima. O polímero ativado pode ser qualquer polímero contendo um grupo tiol reativo tal como um ácido ou éster a-halocarboxílico, e.g. iodoacetamida, uma imida,

e.g. maleimida, uma vinil sulfona ou um dissulfeto. Tais matérias-primas podem ser obtidas comercialmente (por exemplo a partir de Nektar, anteriormente Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA) ou podem ser preparadas a partir de matérias-primas comercialmente disponíveis usando procedimentos químicos convencionais. Moléculas particulares de PEG incluem 20K metoxi-PEG-amina (obtenível a partir de Nektar, anteriormente Shearwater; Rapp Polymere; e SunBio) e M-PEG-SPA (obtenível a partir de Nektar, anteriormente Shearwater).

[0095] Em uma forma de realização, o anticorpo é um fragmento Fab ou diFab modificado que é PEGuilado, i.e. tem PEG (poli(etilenoglicol)) covalentemente acoplado a este, e.g. de acordo com os métodos descritos em Patente Européia 0948544 ou EP1090037 [veja também "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, New York, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris and S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC e "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam and A. Dent, Grove Publishers, New York; Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54:531-545]. Em um exemplo PEG é acoplado a uma cisteína na região de dobradiça. Em um exemplo, um fragmento Fab modificado por PEG tem um grupo maleimida covalentemente ligado a um único grupo tiol em uma região de dobradiça modificada. Um resíduo de lisina pode ser covalentemente ligado ao grupo maleimida e a cada um dos grupos amina no resíduo de lisina pode ser acoplado um polímero de metoxipoli(etilenoglicol) tendo um peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. O peso molecular total do PEG acoplado ao fragmento Fab portanto pode ser aproximadamente 40.000 Da.

[0096] Em uma forma de realização, a presente invenção fornece uma molécula de anticorpo neutralizante tendo especificidade para IL-6 humana, que é um fragmento Fab modificado tendo uma cadeia pesada compreendendo a sequência dada em SEQ ID NO:11 e uma cadeia leve compreendendo a sequência dada em SEQ ID NO:13 e tendo na extremidade C-terminal de sua cadeia pesada uma região de dobradiça modificada contendo pelo menos um resíduo de cisteína ao qual uma

molécula efetora é acoplada. Preferivelmente a molécula efetora é PEG e é acoplada usando os métodos descritos em (W098/25971 e W02004072116) através dos quais um grupo lisil-maleimida é acoplado ao resíduo de cisteína na extremidade C-terminal da cadeia pesada, e cada grupo amino do resíduo de lisil tem covalentemente ligado a ele um resíduo de metoxipoli(etilenoglicol) tendo um peso molecular de cerca de 20.000 Da. O peso molecular total do PEG acoplado ao anticorpo é portanto aproximadamente 40.000Da.

[0097] Em outro exemplo moléculas efetoras podem ser acopladas a fragmentos de anticorpo usando os métodos descritos em pedidos de patente Internacional W02005/003169, W02005/003170 e W02005/003171.

[0098] A presente invenção também fornece uma sequência de DNA isolada codificando a(s) cadeia(s) pesada(s) e/ou leve(s) de uma molécula de anticorpo da presente invenção. Preferivelmente, a sequência de DNA codifica a cadeia pesada ou a cadeia leve de uma molécula de anticorpo da presente invenção. A sequência de DNA da presente invenção pode compreender DNA sintético, por exemplo produzido por processamento químico, cDNA, DNA genômico ou qualquer combinação destes.

[0099] Sequências de DNA que codificam uma molécula de anticorpo da presente invenção podem ser obtidas por métodos bem conhecidos por aqueles versados na técnica. Por exemplo, sequências de DNA codificando para parte ou todas as cadeias pesadas e leves de podem ser sintetizadas como desejado a partir das sequências determinadas de DNA ou com base nas sequências de aminoácidos correspondentes.

[00100] DNA codificando para sequências de arcabouço aceptor é amplamente disponível para aqueles versados na técnica e pode ser prontamente sintetizado com base em suas sequências de aminoácidos conhecidas.

[00101] Técnicas padrão de biologia molecular podem ser usadas para preparar sequências de DNA codificando para a molécula de anticorpo da presente invenção. Sequências desejadas de DNA podem ser sintetizadas completamente ou em parte usando técnicas de síntese de oligonucleotídeo. Técnicas de mutagênese sítio

dirigida e reação em cadeia da polimerase (PCR) podem ser usadas conforme apropriado.

[00102] Exemplos de sequências adequadas de DNA são fornecidos em SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:12; SEQ ID NO:14; SEQ ID NO:15 e SEQ ID NO:17. Nucleotídeos 1-57 em SEQ ID NO 15 e 1-60 em SEQ ID NO 17 codificam a sequência de peptídeo sinal de anticorpo de camundongo B72.3 (Whittle et al., 1987, Protein Eng. 1(6) 499-505) que é clivada para gerar uma molécula de anticorpo neutralizante da presente invenção. Por conseguinte, a presente invenção também fornece uma sequência de DNA isolada codificando a cadeia pesada de um anticorpo da presente invenção que compreende nucleotídeos 58-2008 de SEQ ID NO:15. A presente invenção também fornece uma sequência de DNA isolada codificando a cadeia leve de um anticorpo da presente invenção que compreende nucleotídeos 61-705 de SEQ ID NO:17.

[00103] A presente invenção também se refere a um vetor de clonagem ou expressão compreendendo uma ou mais sequências de DNA da presente invenção. Por conseguinte, é fornecido um vetor de clonagem ou expressão compreendendo uma ou mais sequências de DNA codificando um anticorpo da presente invenção. Preferivelmente, o vetor de clonagem ou expressão compreende duas sequências de DNA, codificando a cadeia leve e a cadeia pesada da molécula de anticorpo da presente invenção, respectivamente. Preferivelmente, um vetor de acordo com a presente invenção compreende as sequências dadas em SEQ ID NOS:15 e 17. Nucleotídeos 1-57 em SEQ ID NO 15 e 1-60 em SEQ ID NO 17 codificam a sequência de peptídeo sinal de anticorpo de camundongo B72.3 que é mais preferivelmente clivada para gerar uma molécula de anticorpo neutralizante da presente invenção.

[00104] Métodos gerais pelos quais os vetores podem ser construídos, métodos de transfecção e métodos de cultura são bem conhecidos por aqueles versados na técnica. Neste respeito, referência é feita a "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, New York e ao Maniatis Manual produzido por Cold Spring Harbor Publishing.

[00105] Também é fornecida uma célula hospedeira compreendendo um ou mais vetores de clonagem ou expressão compreendendo uma ou mais sequências de DNA codificando um anticorpo da presente invenção. Qualquer sistema de célula hospedeira/vetor adequado pode ser usado para expressão das sequências de DNA codificando a molécula de anticorpo da presente invenção. Sistemas bacterianos, por exemplo E. colt, e outros microbianos podem ser usados ou sistemas de expressão em célula hospedeira eucariótica, por exemplo de mamífero, também podem ser usados, veja Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181. Células hospedeiras de mamíferos adequadas incluem células CHO, NSO, mieloma ou hibridoma. Exemplos de sistemas de expressão adequados incluem o sistema de expressão de glutamina sintetase descrito em W087/04462.

[00106] A presente invenção também fornece um processo para a produção de uma molécula de anticorpo de acordo com a presente invenção compreendendo cultivar uma célula hospedeira contendo um vetor da presente invenção em condições adequadas para levar a expressão de proteína a partir de DNA codificando a molécula de anticorpo da presente invenção, e isolar a molécula de anticorpo.

[00107] A molécula de anticorpo pode compreender apenas um polipeptídeo de cadeia pesada ou leve, em cujo caso apenas uma sequência de codificação de polipeptídeo de cadeia pesada ou cadeia leve precisa ser usada para transfectar as células hospedeiras. Para produção de produtos compreendendo tanto cadeias pesadas como leves, a linhagem celular pode ser transfectada com dois vetores, um primeiro vetor codificando um polipeptídeo de cadeia leve e um segundo vetor codificando um polipeptídeo de cadeia pesada. Alternativamente, um único vetor pode ser usado, o vetor incluindo sequências codificando polipeptídeos de cadeia leve e cadeia pesada.

[00108] Como os anticorpos da presente invenção são úteis no tratamento e/ou profilaxia de uma condição patológica, a presente invenção também fornece uma composição farmacêutica ou diagnóstica compreendendo uma molécula de anticorpo da presente invenção em combinação com um ou mais de um excipiente,

diluente ou carreador farmaceuticamente aceitável. Por conseguinte, é fornecido o uso de um anticorpo da invenção para a fabricação de um medicamento. A composição normalmente será fornecida como parte de uma composição farmacêutica estéril que normalmente irá incluir um carreador farmaceuticamente aceitável. Uma composição farmacêutica da presente invenção pode compreender adicionalmente um adjuvante farmaceuticamente aceitável.

[00109] A presente invenção também fornece um processo para preparação de uma composição farmacêutica ou diagnóstica compreendendo adicionar e misturar a molécula de anticorpo da presente invenção junto com um ou mais de um excipiente, diluente ou carreador farmaceuticamente aceitável.

[00110] A molécula de anticorpo pode ser o único ingrediente ativo na composição farmacêutica ou diagnóstica ou pode ser acompanhada por outros ingredientes ativos incluindo outros ingredientes de anticorpo, por exemplo anticorpos anti-TNF, anti- IL-113, anti-célula T, anti-IFNy ou anti-LPS, ou ingredientes não de anticorpo tal como xantinas.

[00111] As composições farmacêuticas compreendem preferivelmente uma quantidade terapeuticamente efetiva do anticorpo da invenção. O termo "quantidade terapeuticamente efetiva" como usado neste lugar se refere a uma quantidade de um agente terapêutico necessária para tratar, melhorar ou prevenir uma doença ou condição visada, ou para exibir um efeito terapêutico ou preventivo detectável. Para qualquer anticorpo, a quantidade terapeuticamente efetiva pode ser estimada inicialmente ou em ensaios de cultura celular ou em modelos animais, normalmente em roedores, coelhos, cachorros, porcos ou primatas. O modelo animal também pode ser usado para determinar o intervalo de concentração e via de administração apropriada. Tal informação pode então ser usada para determinar doses úteis e vias para administração em humanos.

[00112] A quantidade terapeuticamente efetiva precisa para um sujeito humano irá depender da severidade do estado de doença, da saúde geral do sujeito, da idade, peso e gênero do sujeito, dieta, tempo e freqüência de administração, combinação(ões) de drogas, sensibilidades de reação e tolerância/resposta a

terapia. Esta quantidade pode ser determinada por experimentação de rotina e está dentro do julgamento do médico. Geralmente, uma quantidade terapeuticamente efetiva será de 0,01 mg/kg a 50 mg/kg, preferivelmente 0,1 mg/kg a 20 mg/kg. Composições farmacêuticas podem ser convenientemente apresentadas em formas de dose unitária contendo uma quantidade pré-determinada de um agente ativo da invenção por dose.

[00113] Composições podem ser administradas individualmente a um paciente ou podem ser administradas em combinação (e.g. simultaneamente, seqüencialmente ou separadamente) com outros agentes, drogas ou hormônios.

[00114] A dose na qual a molécula de anticorpo da presente invenção é administrada depende da natureza da condição a ser tratada, do grau da inflamação presente e de se a molécula de anticorpo está sendo usada profilaticamente ou para tratar uma condição existente.

[00115] A freqüência de dose irá depender da meia-vida da molécula de anticorpo e da duração de seu efeito. Se a molécula de anticorpo tem uma meia-vida curta (e.g. 2 a 10 horas) pode ser necessário dar uma ou mais doses por dia. Alternativamente, se a molécula de anticorpo tem uma meia-vida 10nga (e.g. 2 a 15 dias ou 2 a 30 dias) pode ser necessário dar apenas uma dosagem uma vez por dia, uma vez per semana ou mesmo uma vez a cada 1 ou 2 meses.

[00116] O carreador farmaceuticamente aceitável não deve por si só induzir a produção de anticorpos prejudiciais ao indivíduo recebendo a composição e não deve ser tóxico. Carreadores adequados podem ser grande macromoléculas lentamente metabolizadas tal como proteínas, polipeptídeos, lipossomos, polissacarídeos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos e partículas virais inativas.

[00117] Sais farmaceuticamente aceitáveis podem ser usados, por exemplo sais minerais de ácido, tal como cloridratos, bromidratos, fosfatos e sulfatos, ou sais de ácidos orgânicos, tal como acetatos, propionatos, malonatos e benzoatos.

[00118] Carreadores farmaceuticamente aceitáveis em composições terapêuticas podem conter adicionalmente líquidos tal como água, salina, glicerol e etanol.

Adicionalmente, substâncias auxiliares, tal como agentes umectantes ou emulsificantes ou substâncias tamponantes de pH, podem estar presentes em tais composições. Tais carreadoras possibilitam que as composições farmacêuticas sejam formuladas como comprimidos, pílulas, drágeas, cápsulas, líquidos, géis, xaropes, pastas e suspensões, para ingestão pelo paciente.

[00119] Formas preferidas para administração incluem formas adequadas para administração parenteral, e.g. por injeção ou infusão, por exemplo por injeção única ou infusão contínua. Onde o produto é para injeção ou infusão, ele pode adotar a forma de uma suspensão, solução ou emulsão em um veículo oleoso ou aquoso e ele pode conter agentes formuladores, tal como agentes de suspensão, conservantes, estabilizantes e/ou dispersantes. Alternativamente, a molécula de anticorpo pode estar em forma seca, para reconstituição antes de uso com um líquido estéril apropriado.

[00120] Uma vez formuladas, as composições da invenção podem ser administradas diretamente ao sujeito. Os sujeitos a serem tratados podem ser animais. Entretanto, é preferido que as composições sejam adaptadas para administração a sujeitos humanos.

[00121] As composições farmacêuticas desta invenção podem ser administradas por qualquer número de vias incluindo, mas não limitado a, via oral, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutânea (por exemplo, veja WO 98/20734), subcutânea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual, intravaginal ou retal. Hyposprays também podem ser usados para administrar as composições farmacêuticas da invenção. Tipicamente, as composições terapêuticas podem ser preparadas como injetáveis, ou como soluções líquidas ou suspensões. Formas sólidas adequadas para solução em, ou suspensão em, veículos líquidos antes de injeção também podem ser preparadas.

[00122] Liberação direta das composições geralmente será realizada por injeção, subcutaneamente, intraperitonealmente, intravenosamente ou intramuscularmente, ou liberadas para o espaço intersticial de um tecido. As composições também

podem ser administradas em uma lesão. Tratamento de dosagem pode ser um programa de dose única ou um programa de múltiplas doses.

[00123] Será percebido que o ingrediente ativo na composição será uma molécula de anticorpo. Como tal, ele será susceptível a degradação no trato gastrointestinal. Assim, se a composição é para ser administrada por uma via usando o trato gastrointestinal, a composição precisará conter agentes que protegem o anticorpo de degradação mas que liberam o anticorpo uma vez ele tenha sido absorvido do trato gastrointestinal.

[00124] Uma discussão criteriosa de carreadores farmaceuticamente aceitáveis está disponível em Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

[00125] Também é contemplado que o anticorpo da presente invenção pode ser administrado por uso de terapia gênica. A fim de atingir isto, sequências de DNA codificando as cadeias pesadas e leves da molécula de anticorpo sob o controle de componentes apropriados de DNA são introduzidas em um paciente de forma que as cadeias de anticorpo são expressas a partir das sequências de DNA e montadas in situ.

[00126] A presente invenção também fornece uma molécula de anticorpo para uso no controle de doenças inflamatórias. Preferivelmente, a molécula de anticorpo pode ser usada para reduzir o processo inflamatório ou para prevenir o processo inflamatório.

[00127] Também é fornecida uma molécula de anticorpo de acordo com a presente invenção para uso no tratamento e/ou profilaxia de um distúrbio patológico que é mediado por IL-6 ou associado com um nível aumentado de IL-6. A presente invenção fornece adicionalmente o uso de uma molécula de anticorpo de acordo com a presente invenção na fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou profilaxia de um distúrbio patológico que é mediado por IL-6 ou associado com um nível aumentado de IL-6. Preferivelmente, a condição patológica é selecionada a partir do grupo consistindo de infecções (virais, bacterianas, fúngicas e parasíticas), choque endotóxico associado com infecção, artrite, artrite reumatóide, artrite

psoriática, artrite idiopática sistêmica de início juvenil (JIA), lúpus eritematoso sistêmico (SLE), asma, doença inflamatória pélvica, mal de Alzheimer, doença de Crohn, colite ulcerativa, síndrome de intestino irritável, doença de Castleman, espondilite anquilosante, dermatomiosite, uveíte, doença de Peyronie, doença celíaca, doença de vesícula biliar, doença pilonidal, peritonite, psoríase, vasculite, adesões cirúrgicas, derrame, Diabete Tipo I, artrite de Lyme, meningoencefalite, distúrbios inflamatórios imune mediados do sistema nervoso e periférico tal como esclerose múltipla e síndrome de Guillain-Barr, outros distúrbios autoimunes, pancreatite, trauma (cirurgia), doença enxerto-versus-hospedeiro, rejeição de transplante, câncer (tanto tumores sólidos tal como melanomas, hepatoblastomas, sarcomas, carcinomas de célula esquamosa, cânceres de célula transicional, cânceres ovarianos como malignidades hematológicas e em particular leucemia mielogenosa aguda, leucemia mielogenosa crônica, câncer gástrico e câncer de colo), doença cardíaca incluindo doenças isquêmicas tal como infarto do miocárdio assim como arteriosclerose, coagulação intravascular, reabsorção óssea, pacientes queimados, osteoporose, periodontite e hipocloridia.

[00128] Preferivelmente o distúrbio patológico é artrite reumatóide ou lúpus eritematoso sistêmico (SLE).

[00129] A presente invenção também fornece uma molécula de anticorpo de acordo com a presente invenção para uso no tratamento ou profilaxia de dor.

[00130] A presente invenção fornece adicionalmente o uso de uma molécula de anticorpo de acordo com a presente invenção na fabricação de um medicamento para o tratamento ou profilaxia de dor.

[00131] Uma molécula de anticorpo da presente invenção pode ser utilizada em qualquer terapia onde é desejado reduzir os efeitos de IL-6 no corpo humano ou animal. IL-6 pode estar circulante no corpo ou pode estar presente em um nível indesejavelmente alto localizado em um sítio particular no corpo, por exemplo um sítio de inflamação.

[00132] Uma molécula de anticorpo da presente invenção preferivelmente é usada para o controle de doença inflamatória.

[00133] A presente invenção também fornece um método de tratar sujeitos humanos ou animais sofrendo de ou em risco de uma desordem mediada por IL-6, o método compreendendo administrar ao sujeito uma quantidade efetiva da molécula de anticorpo da presente invenção.

[00134] A molécula de anticorpo da presente invenção também pode ser usada em diagnose, por exemplo na diagnose in vivo e formação de imagem (representação gráfica de órgãos do corpo através de determinadas técnicas e aparelhos) de estados de doença envolvendo IL-6.

[00135] A presente invenção é descrita adicionalmente apenas como forma de ilustração nos exemplos seguintes, que se referem às Figuras acompanhantes, nas quais:

[00136] Figura 1 mostra o modelo de enxerto para as sequências de cadeia pesada (Figura 2a; SEQ ID NO:11) e leve (Figura 2b; SEQ ID NO:13) de 240.g1. O símbolo (I) destaca diferenças entre sequências de arcabouço doador:aceptor:enxertado. CDR's são sublinhados uma vez. Estes são como definido por Kabat, exceto para CDR-H1 que abrande tanto definições de Kabat como Chothia. Sequências sublinhadas duas vezes são resíduos de arcabouço doador retidos nos enxertos.

[00137] Figura 2a mostra a sequência traduzida de cadeia pesada de IgG4 240.g1, mostrando limites íntron/éxon.

[00138] Figura 2b mostra a sequência traduzida de cadeia leve 240.g1, mostrando limites íntron/éxon.

[00139] Figura 3a mostra que a inibição de IL-6 humana recombinante, derivada de mamífero humano, macaco-rhesus, macaco-caranguejeiro e de camundongo induziu proliferação de células T1165 por anticorpo 240.gl.

[00140] Figura 3b mostra que a inibição de IL-6 humana recombinante e sIL-6R induziu produção de MCP-1 em HUVECs por anticorpo 240.gl.

[00141] Figura 3c mostra que a inibição de IL-17 induziu IL-6 endógena e sIL-6R induziu produção de MCP-1 em HUVECs por anticorpo 240.gl.

[00142] Figura 4. Neutralização in vivo de hIL-6 induziu SAA em camundongos por

administração de CA030 240.g1 (anticorpo de sítio 3) n=7-8/grupo, exceto PBS n=6. Análise estatística por ANOVA com teste posterior de Bonferroni, ** P<0,01 comparado com IL-6 apenas.

[00143] Manipulações de DNA e métodos gerais

[00144] E. coli linhagem INVaF' (Invitrogen) foi usada para transformação e crescimento de cultura de rotina. Enzimas de restrição e modificação de DNA foram obtidas a partir de Roche Diagnostics Ltd. e New England Biolabs. Preparações de plasmídeo foram realizadas usando kits de purificação Maxi Plasmid (QIAGEN, No. de catálogo 12165). Reações de seqüenciamento de DNA foram realizadas usando o kit de seqüenciamento ABI Prism Big Dye terminator (No. de catálogo 4304149) e correm em um seqüenciador automatizado ABI 3100 (Applied Biosystems). Dados foram analisados usando o programa AutoAssembler (Applied Biosystems). Oligonucleotídeos foram obtidos a partir de INVITROGEN. Genes sintéticos foram construídos em Entelechon. A concentração de Fab e IgG foi determinada usando ELISA de montagem.

Exemplo 1: Isolamento de 132E09

[00145] Ratos foram imunizados por injeção subcutânea de IL-6 humana recombinante (Peprotech) em três intervalos semanais, inicialmente com Adjuvante Completo de Freund e subseqüentemente com Adjuvante Incompleto de Freund. Baços foram coletados uma-duas semanas depois da última imunização, e suspensões celulares únicas preparadas. Linfócitos de rato imune foram cultivados na presença de células EL4 de tioma de camundongo irradiado e meios condicionados de célula T de coelho por uma semana em placas de microtítulo de 96 poços. Sobrenadantes foram triados para a presença de anticorpos específicos para IL-6 humana em ELISAs. Positivos foram adicionalmente triados para a capacidade de neutralizar os efeitos biológicos de IL-6 humana em um ensaio de linhagem celular DS1 (Bock et al., 1993, Cytokine, 5, 480-489).

[00146] Células B individuais secretando anticorpo com características de ligação apropriadas foram isoladas a partir de poços positivos de microtítulo de acordo com o Método de Anticorpo de Linfócito Selecionado (Babcook et al., 1996, Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 93, 7843-7848; W092/02551), e genes de região variável de cadeia pesada e leve foram clonados através de PCR de transcrição reversa a partir de células B únicas de rato. Regiões variáveis foram expressas em formato de IgG recombinante para confirmar ligação, e anticorpo 132E09 foi selecionado para humanização e estudo posterior. A sequência de região variável de rato foi registrada como CA030_00240.

[00147] As sequências de região V são mostradas em SEQ ID NOS:1 a 4.

Exemplo 2: Enxerto por CDR de 132E09

[00148] Uma série de regiões VL e VH humanizadas foram concebidas nas quais as regiões hipervariáveis de CDR mais um número variado de resíduos de arcabouço de 132E09 foram enxertados em arcabouços aceptores de região V humana.

[00149] Dez regiões VL enxertadas (gL1-10) foram concebidas e genes foram construídos por montagem de oligonucleotídeos e mutagênese por PCR. Um total de 13 regiões VII enxertadas também foram construídas (gHl-13) usando duas diferentes regiões de arcabouço, VH3 1-4 3-72 e VH3 1-3 321. As sequências enxertadas de cadeia leve foram subclonadas no vetor de expressão de cadeia leve humana pKH10,1 que contém o DNA codificando a região constante C-Kappa humana (alótipo Km3). As sequências enxertadas de cadeia pesada foram subclonadas no vetor de expressão gama-4 humano pVhg4P FL, que contém o DNA codificando a região constante gama-4 humana contendo a mutação que estabiliza dobradiça 5241P (Angal et al., supra). Plasmídeos foram co-transfectados em células CHO e os anticorpos produzidos triados para atividade em ensaios de ligação de IL-6 e in vivo. Transfecções de células CHO foram realizadas usando o procedimento de Lipofectamine™ 2000 de acordo com instruções do fabricante (InVitrogen, No. de catálogo 11668).

[00150] Dos 13 enxertos de cadeia pesada produzidos, dois continham apenas um único resíduo doador de arcabouço (Ala) em posição 49 e estes foram produzidos usando ambos os dois diferentes arcabouços de cadeia pesada. O enxerto VH3 1-3 3-21 expressou fracamente em células CHO e mostrou uma

afinidade reduzida para IL-6. Em contraste, o enxerto usando o arcabouço VH3 1-4 3-72 expressou bem e manteve a afinidade do anticorpo doador. Este enxerto de cadeia pesada, compreendendo apenas um único resíduo de arcabouço doador, foi selecionado em combinação com o enxerto de cadeia leve gL10 no qual apenas os CDRs foram transferidos.

[00151] Figura 1 mostra um alinhamento entre a sequência doadora de rato 132E09 e os arcabouços aceptores humanos. O arcabouço aceptor de cadeia pesada é a sequência de linhagem germinativa humana VH3 1-3 3-72, com arcabouço 4 vindo desta porção da linhagem germinativa de região JH humana JH4. O arcabouço aceptor de cadeia leve é a sequência de linhagem germinativa humana VK1 2-1-(1) 012, com arcabouço 4 vindo desta porção da linhagem germinativa de região JK humana JK2. As sequências de enxerto para gH13 e gL10 são mostradas em Figura 1 (SEQ ID NOS:11, 12, 13 e 14).

[00152] Este anticorpo enxertado foi denominado CA030_00240.gl. Este foi produzido como uma IgG4 completa compreendendo a substituição de serina para prolina em posição 241 como descrito acima. As sequências completas traduzidas de cadeia pesada e leve são mostradas em Figuras 2a e 2b respectivamente. A sequência de aminoácidos completa da cadeia pesada é fornecida em SEQ ID NO 16 e a cadeia leve em SEQ ID NO 18. A sequência de DNA codificando a cadeia pesada e a leve são fornecidas em SEQ ID Nos 15 e 17 respectivamente. Nucleotídeos 1-57 em SEQ ID NO 15 e em Figura 2a codificam as sequências de peptídeo sinal de anticorpo de camundongo B72.3 VII e nucleotídeos 1-60 em SEQ ID NO 17 e em Figura 2b codificam as sequências de peptídeo sinal de anticorpo de camundongo B72.3 VL.

[00153] Anticorpo de camundongo B72.3 é descrito em Whittle et al., 1987, Protein Eng. 1(6) 499-505.

Exemplo 3: Afinidade de ligação

[00154] CA030 00240.g1 medidas de afinidade de ligação

[00155] A tecnologia BIAcore monitora a ligação entre biomoléculas em tempo real e sem o requerimento para marcação. Um dos interactantes, denominado o

ligante, é ou imobilizado diretamente ou capturado na superfície imobilizada enquanto que o outro, denominado o analito, corre em solução pela superfície capturada. O sensor detecta a mudança em massa na superfície de sensor na medida em que o analito se liga ao ligante para formar um complexo na superfície. Isto corresponde ao processo de associação. O processo de dissociação é monitorado quando o analito é substituído por tampão. No ensaio de afinidade BIAcore, o ligante é IgG4 completa CA030_00240.g1 e o analito é IL-6 humana.

[00156] Instrumento

[00157] Biacore ® 3000, Biacore AB, Uppsala, Sweden

[00158] Circuito integrado sensor

[00159] CM5 (categoria de pesquisa) Número de Catálogo: BR-1001-14, Biacore AB, Uppsala, Sweden. Circuitos integrados foram armazenados a 4 °C.

[00160] Solução normalizadora BIA

[00161] 70% (w/w) de Glicerol. Parte de Kit BIAmaintenance Número de Catálogo: BR-1002-51, Biacore AB, Uppsala, Sweden. O kit BIAmaintenance foi armazenado a 4 °C.

[00162] Kit de Acoplamento de Amina

[00163] Número de Catálogo: BR-1000-50, Biacore AB, Uppsala, Sweden.

[00164] Etil-3-(3-dimetilaminopropil) cloridrato de carbodiimida (EDC). Ajustado para 75 mg/mL em água destilada e armazenado em alíquotas de 200 uL a –70 °C.

[00165] N-Hidroxisuccinimida (NHS). Constituído para 11,5 mg/mL em água destilada e armazenado em alíquotas de 200 uL a –70 °C.

[00166] 1 M de cloridrato de etanolamina -NaOH pH 8,5. Armazenado em alíquotas de 200 µL a –70 °C.

[00167] Tampões

[00168] Tampão de corrida: HBS-EP (sendo 0,01 M de HEPES pH 7,4, 0,15 M de NaC1, 3 mM de EDTA, 0,005 % de Surfactante P20). Número de Catálogo: BR-1001-88, Biacore AB, Uppsala, Sweden. Tampão armazenado a 4 °C.

[00169] Tampão de imobilização: Acetato 5,0 (sendo 10 mM de acetato de sódio pH 5,0). Número de Catálogo: BR-1003-51, Biacore AB, Uppsala, Sweden. Tampão

armazenado a 4 °C.

[00170] Captura de ligante

[00171] IgG anti-humana de cabra de fragmento $F(ab')_2$ Affinipure, fragmento Fc específico. Jackson ImmunoResearch Inc (Pennsylvania, USA) Número de Catálogo: 109-006-098. Reagente armazenado a 4 °C.

[00172] Analito

[00173] IL-6 humana recombinante (R&D Systems Europe Ltd, Abingdon, Oxon. Número de Catálogo

[00174] 206-IL-050, Número de Lote A131402A) armazenada a –70 °C e descongelada uma vez para cada ensaio.

[00175] IL-6 de macaco cynomologous recombinante e IL-6 de macaco Macaco-rhesus recombinante foram produzidas por transfecção transitória de células CHO. O material foi usado como sobrenadante de cultura celular não purificado e não quantificado.

[00176] Solução de Regeneração

[00177] 40 mM de HC1 preparado por diluição com água destilada a partir de uma solução estoque 11,6 M (BDH, Poole, England. Número de Catálogo: 101254H).

[00178] 5 mM de NaOH preparado por diluição com água destilada a partir de uma solução estoque 50 mM. Número de Catálogo: BR-1003-58, Biacore AB, Uppsala, Sweden.

[00179] Método de Ensaio

[00180] BIA (Análise de Interação Biomolecular) foi realizado usando um BlAcore 3000 (BlAcore AB). IgG anti-humana de cabra de fragmento F(ab')2 Affinipure, fragmento Fc específico (Jackson ImmunoResearch) foi imobilizado em um Circuito Integrado Sensor CM5 através de química de acoplamento de amina para um nível de captura de r-:.:5000 unidades de resposta (RUs). Tampão HBS-EP (10mM de HEPES pH 7,4, 0,15 M de NaC1, 3 mM de EDTA, 0,005 % de Surfactante P20, BlAcore AB) foi usado como o tampão de corrida com uma vazão de 10 µl/min. Uma injeção de 10 µl de CA030_240.g1 em 4 pg/mL foi usada para captura pela IgG-Fc anti-humana imobilizada. IL-6 humana foi titulada sobre o CA030 240.g1 capturado

em várias concentrações em uma vazão de 30 pL/min. A superfície foi regenerada por uma injeção de 10 µL de 40 mM de HC1, seguido por uma injeção de 5 µL de 5 mM em NaOH em uma vazão de 10µL/min.

[00181] Curvas de ligação de subtração de fundo foram analisadas usando o aplicativo computacional BlAevaluation (versão 3.2) seguindo procedimentos padrão. Parâmetros cinéticos foram determinados a partir do algoritmo de adaptação.

[00182] Um grupo de CA030 240.g1 foi usado neste estudo. A afinidade foi medida em concentrações de IL-6 humana em ou abaixo de 20 nM. O valor de afinidade determinado para CA030_240.g1 foi no intervalo 9,02-10,50 pM com uma média ± s.e.m. de 9,76 ± 0,74 pM (Tabela 1.1). Não foi possível medir a afinidade com a IL-6 humana imobilizada no circuito integrado BlAcore pois imobilizar a IL-6 resultou em uma perda de conformação nativa.

[00183] Pelo fato de não ter sido possível quantificar a IL-6 de macaco Cynomologous ou macaco Macaco-rhesus também não foi possível determinar verdadeiros parâmetros cinéticos para sua interação com CA030 00240.gl. Entretanto, inspeção visual dos sensogramas de ligação indica que CA030 00240.g1 se liga a estas IL-6's de primata não humano com uma afinidade similar àquela para IL-6 humana.

[00184] TABELA 1.1: Afinidade de CA030_240.g1 para IL-6 humana.

Referência	ka ($M^{-1}s^{-1}$)	kd (s^4)	Kd (^{M})	Kd pM
10017474/39-51	7,31E+05	7,68E-06	1,05E-11	10,5
10017474/39-51	8,52E+05	7,68E-06	9,02E-12	9,02

[00185] Exemplo 5: Ensaios de neutralização in vitro

[00186] A potência de anticorpo CA030 00240.gl, de agora em diante abreviado para 240.gl, foi determinada usando dois ensaios diferentes. O primeiro ensaio empregou uma linhagem celular dependente de IL-6 de camundongo, chamada T1165, que prolifera em resposta a IL-6 de camundongo, macaco-rhesus, macaco-caranguejeiro e humana. Esta sinalização direta de IL-6 para receptor de IL-6 de

superfície celular, em conjunção com uma subunidade de receptor de sinalização chamada gp130, é denominada cis-sinalização. O segundo ensaio usou células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) estimuladas com IL-6 mais receptor de IL-6 solúvel (IL-6R) com a saída sendo produção de proteína quimioatratora de monócito-1 (MCP-1). Neste ensaio IL-6 foi ou adicionada exogenamente ou pode ser produzida estimulando HUVECs com a citocina interleucina-17 (IL-17). Estas duas variantes de ensaio foram denominadas trans-sinalização pois HUVECs não expressam IL-6R e podem apenas responder i.e. produzir MCP-1 quando IL-6 e IL-6R solúvel são ambos adicionados exogenamente.

[00187] Usando estes vários ensaios foi possível gerar valores de ND50 (50% de dose de neutralização) para 240.g1 contra IL-6 humana (recombinante e natural), de macaco-rhesus, de macaco-caranguejeiro e de camundongo.

[00188] Materiais

[00189] Meio de cultura

[00190] Meio de cultura T1165– RPMI1640, suplementado com 10% de soro bovino fetal, penicilina (100 unidades/ml), estreptomicina (50µg/ml), glutamina (2mM) e 10ng/ml de IL-6 humana recombinante, R&D systems, UK.

[00191] Meio de cultura HUVEC– Meio basal de célula de endotélio de vaso sanguíneo grande (LVECBM) TCS Cellworks, UK, suplemento de crescimento de célula de endotélio de vaso sanguíneo grande TCS Cellworks, UK e suplemento de antibiótico TCS Cellworks, UK.

[00192] CA 030 00240.g1 produzido em casa em uma concentração de 6,83mg/m1 em PBS.

[00193] IL-6 humana R&D systems, UK, IL-6 derivada de mamífero humano (derivado doméstico a partir de transfecção de CHO com IL-6 humana 10017108/67), IL-6 de macaco-rhesus (derivado doméstico a partir de transfecção de CHO com IL-6 de macaco-rhesus 10017108/67), IL-6 de macaco-caranguejeiro (derivado doméstico a partir de transfecção de CHO com IL-6 de macaco-caranguejeiro 10017108/67), IL-6 de camundongo R&D systems, UK. Anticorpo de captura de MCP-1 anti-humano (555055) e anticorpo de detecção de MCP-1 anti-

humano (554664) e MCP-1 humano recombinante (890225), BD Biosciences, CA. Estreptavidina-HRP (AMDEX) Amersham bioscience, UK. Thrombin Merck Biosciences, Darmstadt, Germany . sIL-6R R&D systems, UK. IL-17 humana R&D systems, UK.

Ensaio T1165 - CellTiter 96® AQueous Promega, CA.

[00194] TM Blue (Serologicals, GA).

[00195] Medida de atividade de 240.g1 usando a proliferação dependente de IL-6 de células T1165.

[00196] Células T1165 foram descongeladas 4 dias antes de uso e cultivadas em RPMI1640 suplementado com 10% de FCS, antibióticos, glutamina e 10ng/m1 de IL-6 humana. Viabilidade celular foi monitorada usando exclusão por azul de tripano, apenas células consideradas sendo pelo menos 90% viáveis foram usadas. Antes de uso células foram lavadas, duas vezes, em RPMI1640 na ausência de IL-6 humana. Células foram então contadas e dispensadas em placas de fundo plano de 96 poços em uma densidade de $5x10^4$/célula por poço. Em placas separadas uma diluição serial de 240.g1 foi incubada na presença de ou IL-6 humana recombinante, derivada de mamífero humano (também referida como IL-6 de CHO humana), de macaco-rhesus, de macaco-caranguejeiro ou de camundongo em uma concentração fixa de 1ng/ml (0,038nM). O complexo pré-misturado de 240.g1 e IL-6 foi então transferido para poços contendo células T1165 que foram incubados por 48 horas a 37°C em uma atmosfera umidificada de 5% de CO_2. Durante as últimas seis horas de incubação 20m1 de CellTiter 96® AQueous foi adicionado para determinar o número de células proliferantes. A inibição de proliferação dependente de IL-6 de células T1165 por 240.g1 foi expressa como uma inibição percentual de poços tratados com IL-6 apenas menos poços de controle que continham células mas nenhuma IL-6.

[00197] A atividade de 240.g1 contra IL-6 humana recombinante, derivada de mamífero humano, de macaco-rhesus, de macaco-caranguejeiro e de camundongo induziu proliferação da linhagem celular T1165 pode ser vista em figura 3a. 240.g1 potencialmente inibiu atividade de IL-6 humana recombinante, derivada de mamífero

humano, de macaco-rhesus, de macaco-caranguejeiro mas não de camundongo.

[00198] O ND50 para IL-6 humana recombinante foi 1,1 d 0,5 ng/ml (7,26 ± 3,3 pM). O ND50 para IL-6 derivada de mamífero humano foi 3,6 ± 2,4 ng/ml (23,76 ± 15,84 pM). O ND50 para IL-6 de macaco-rhesus foi 2,2 ± 1,1 ng/ml (14,52 ± 7,26 pM). O ND50 para IL-6 de macaco-caranguejeiro foi 5,4 ± 1,1 ng/ml (35,64 ± 7,26 pM).

[00199] Medida de atividade de 2401.g1 usando produção de MCP-1 induzida por IL-6 e receptor de IL-6 solúvel em HUVECs.

[00200] HUVECs (TCS Cellworks, UK) foram crescidas em meio de basal de célula de endotélio de vaso sanguíneo grande (LVECBM) e ficaram em cultura não mais do que cinco vezes. Células foram crescidas até 75% de confluência antes de uso. Células foram separadas usando tripsina/EDTA, ressuspensas e lavadas uma vez em LVECBM fresco. Células foram então contadas e dispensadas em placas de fundo plano de 96 poços em uma densidade de $2x10^4$/células por poço. Células foram então cultivadas durante a noite a 37°C em uma atmosfera umidificada de 5% de CO_2. No dia seguinte células foram lavadas em meio fresco suplementado com trombina biotinilada (3U/ml), e postas de lado. Em placas separadas uma diluição serial de 240.g1 foi incubada na presença de IL-6 humana recombinante (50ng/m1; 3,84nM) e sIL-6R em uma concentração fixa de 50Ong/m1 (10,15nM). Em adição 240.g1 também foi incubado com IL-17 humana recombinante (25ng/m1;1,18nM), o que estimula HUVECs a produzir IL-6, e sIL-6R em uma concentração fixa de 50Ong/m1(10,15nM). O complexo pré-misturado de 240.g1 e IL-6/sIL-6R ou IL-17/sIL-6R foi então transferido para poços contendo HUVECs que foram incubados por 24 horas a 37°C em uma atmosfera umidificada de 5% de CO_2. Depois do período de incubação sobrenadante livre de células foi coletado e níveis de MCP-1 humano determinados por ELISA sanduíche (protocolo dado abaixo). A inibição de produção de MCP-1 induzida por IL-6/sIL-6R ou IL17/sIL-6R por 240.g1 foi expressa como uma inibição percentual de poços tratados com IL-6/sIL-6R ou IL-17/sIL-6R menos poços de controle que continham células mas nenhum estímulo. Em adição controles foram adicionados para indicar a resposta de células à adição de IL-6

humana na ausência de sIL-6R.

ELISA de MCP-1

[00201] Placas Nunc Maxisorp foram revestidas com anticorpo de captura de anti-MCP-1 em uma concentração de 2µg/ml. Placas foram incubadas a +4°C durante a noite então lavadas duas vezes em PBS mais 0,1% de tween20 (tampão de lavagem). Placas foram bloqueadas por 1 hora em PBS mais 5% de albumina de soro bovino. Placas foram então lavadas quatro vezes com tampão de lavagem e padrões e amostras adicionados. Placas foram incubadas por duas horas em temperatura ambiente. Placas foram então lavadas e anticorpo anti-MCP-1 biotinilado adicionado em uma concentração de lmg/ml. Placas foram incubadas por 2 horas adicionais então lavadas quatro vezes. Uma diluição de 1:5000 de estreptavidina-HRP foi então adicionada e placas incubadas por 30 minutos. Placas foram lavadas quatro vezes finais e substrato TMB foi adicionado. Leituras colorimétricas foram tomadas em 630nm e leituras de fundo em 492nm. Concentrações de MCP-1 foram derivadas, de uma curva padrão usando um ajuste de curva logística de quatro parâmetros, em aplicativo computacional Genesis II.

[00202] A atividade de 240.g1 contra trans-sinalização induzida por IL-6 humana recombinante e sIL-6R em HUVECs pode ser vista em Figura 3b. 240.g1 inibiu potencialmente produção de MCP-1 induzida por IL-6 humana recombinante e sIL-6R por HUVECs. O ND50 foi 64 ± 62 ng/ml (422 ± 409 pM).

[00203] A atividade de 240.g1 contra IL-17 induziu trans-sinalização induzida por IL-6 endógena e sIL-6R em HUVECs pode ser vista em Figura 3c. 240.g1 inibiu potencialmente produção de MCP-1 induzida por IL-6 endógena induzida por IL-17 e sIL-6R por HUVECs. O ND50 foi 93 ± 70 ng/ml (614 ± 462 pM).

Conclusão

[00204] 240.g1 é capaz de neutralizar a bioatividade de IL-6 humana recombinante, derivada de mamífero humano, de macaco-rhesus e de macaco-caranguejeiro mas não de camundongo em um ensaio de cis-sinalização de IL-6 . Em adição 240.g1 pode neutralizar trans-sinalização de IL-6 induzida ou por IL-6 recombinante ou endógena.

Exemplo 6: Atividade in vivo

[00205] IL-6 é conhecida por induzir proteínas de fase aguda. Em camundongos a mais proeminente proteína de fase aguda é amilóide A de soro (SAA). IL-6 humana é capaz de atuar no receptor de camundongo de forma que é possível injetar IL-6 humana em camundongos e medir produção de SAA no soro.

[00206] Camundongos balb/c foram injetados s.c. com o anticorpo anti-hIL-6 específico de sítio 3, IgG4 completa CA030_240.g1. 24 horas depois, camundongos foram injetados i.p. com hIL-6 a 30[1,g/kg (Peprotech Número de Catálogo 200-06, Número de Lote 0203B16). Depois de 20 horas o sangue foi tirado por punção cardíaca e soro coletado para verificação de amilóide A de soro (SAA) por ELISA (Tridelta Número de Lote 22KT022). Como observado em Figura 4, indução de SAA por hIL-6 foi inibida por CA030_240.g1 com redução estatisticamente significante em SAA sendo observada em doses de 0,3, 0,1 e 0,03mg/kg.

[00207] n=7-8/grupo, exceto PBS n=6. Análise estatística por ANOVA com teste posterior de Bonferroni, ** P<0,01 comparado com IL-6 apenas .

[00208] 2 experimentos adicionais confirmaram inibição significante de SAA induzida por IL-6 (3Oug/kg) por CA030 240.g1 em doses de 0,3 e 0,1 mg/kg.

[00209] Exemplo 7: Mapeamento de Epítopo CA030 00240,21

[00210] O epítopo em IL-6 humana que CA030_00240.g1 reconhece foi mapeado usando tecnologia RMN usando 240.g1 como um fragmento Fab'. Isto requereu que IL-6 humana fosse expressa em E. coli e uniformemente marcada com isótopos estáveis $^{15}N/^{13}C/^{2}H$. Transferências de ressonância de esqueleto específico de sequência completa foram obtidas para IL-6 livre e mudanças na posição destes sinais induzidas pela ligação do fragmento Fab' de CA030_00240.g1 foram detectadas usando um espectro 3D TROSY HNCO.

Expressão e purificação de IL-6 humana recombinante:

[00211] IL-6 humana foi preparada a partir de um vetor de expressão de E. coli (pET3d) contendo a sequência de codificação da forma madura da proteína. A proteína foi expressa em células Tuner (DE3) pLysS, resultando em altos rendimentos de um produto insolúvel. Amostras marcadas 15N, $_{15N/13C}$ e 15N/13c/2H

de IL-6 foram preparadas a partir de células crescidas em meios ricos apropriadamente marcados (Celtone).

[00212] A IL-6 foi purificada a partir de células transformadas de E. coli usando procedimentos bem estabelecidos. Inicialmente, células coletadas de 1 l de meio de cultura foram ressuspensas em 40 mL de tampão A [100 mM de KC1, 2 mM de DTT, 10mM de Tris-HC1 pH 8,5, 25 % (w/v) de sucrose, comprimido dissolvido de inibidor de protease (Boehringer)]. 10 mL de tampão B [300 mM de Tris-HC1 pH 8,5, 100 mM de EDTA, 4 mg/ml de lisozima] foi adicionado e a suspensão incubada em gelo por 10-30 minutos com rotação ocasional. 50 ml de tampão C [1 M de LiC1, 20 mM de EDTA, 0,5 % (v/v) de NP-40] foi então adicionado e a suspensão posta através da Prensa Francesa duas vezes em 20.000 psi (138 MPa). O hogeneizado foi então centrifugado a 16.000g rpm por 15 minutos a 4 °C e o grânulo retido. O grânulo foi ressuspenso em 40 ml de tampão D [10 mM de Tris-HC1 pH 8,5, 0,1 mM de EDTA, 0,5 M de LiC1, 0,5 % (v/v) de NP-40, 1 mM de DTT, comprimido dissolvido de protease] e posto através da Prensa Francesa e centrifugado como antes. Este estágio é repetido. O grânulo é então ressuspenso em 40 ml de tampão E [10 mM de Tris-HC1 pH 8,5, 0,1 mM de EDTA, 0,5 % (v/v) de NP-40, 1 mM de DTT, comprimido dissolvido de protease] e posto através da Prensa Francesa e centrifugado como antes. Repetir este estágio. O grânulo final é dissolvido em 6 mL de 6 M GuHC1, 50 mM de Tris-HC1 pH 8,0 e clarificado por centrifugação a 48.000 g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante é retido e a IL-6 solubilizada quantificada espectrofotometricamente.

[00213] A IL-6 solubilizada diluída para 2,5 mg/mL em 5 M de GuHC1, 50 mM de NaC1, 50 mM de Tris-HC1, 2 mM de GSH, 0,2 mM de GSSG, 1 mM de EDTA, pH 8,0 e incubada a 25 °C por 1 hora. As amostras foram então adicionalmente diluídas, de uma maneira em gotas para 250 µg/mL em 50 mM de NaC1, 50 mM de Tris-HC1, 2 mM de GSH, 0,2 mM de GSSG, 1 mM de EDTA, pH 8,0 e incubada 25 °C por 3 horas. Qualquer precipitado formado neste estágio é removido por centrifugação a 30.000 g por 30 minutos a 4 °C. O material clarificado é dialisado contra 50 mM de Tris-HC1, 10 % (v/v) de glicerol, pH 9,0 por um mínimo de 16 horas a 4 °C com duas

mudanças de tampão. Depois de diálise a solução é clarificada por centrifugação a 30.000 g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante é retido e carregado em uma coluna de troca iônica de 8 mL monoQ (Amersham Biosciences) e eluído com um gradiente linear de cloreto de sódio (0-1,0 M). Frações contendo a IL-6 re-enovelada foram identificadas por SDS-PAGE e então combinadas e difiltradas em 25 mM de fosfato de sódio, 100 mM de NaC1, 0,01 % (w/v) de NaN_3, pH 6,5.

[00214] O fragmento Fab' de CA030_00240.g1 foi gerado, purificado e formulado em 25 mM de fosfato de sódio, 100 mM de NaC1, 0,01 % (w/v) de NaN_3, pH 6,5. Os complexos 1:1 entre IL-6 e o fragmento Fab' de CA030_00240.g1 foram preparados para análise RMN misturando quantidades equimolares das proteínas em uma concentração de cerca de 0,2 – 0,6 mM.

Espectroscopia RMN:

[00215] Os experimentos de RMN foram realizados em amostras de 0,35 ml das proteínas e complexos em um tampão de 25 mM de fosfato de sódio, 100 mM de cloreto de sódio e 0,01% de (w/v) azida de sódio em pH 6,5 (95% de H_20 e 5% de D_20). O complexo 1:1 entre IL-6 marcada com $^{15}N/^{13}C/^{2}H$ e o fragmento Fab' não marcado de CA030_00240.g1 foi preparado para análise RMN misturando quantidades equimolares das proteínas para atingir uma concentração final de 0,1 mM. Os dados de RMN foram adquiridos a 25°C para IL-6 livre e para o complexo IL-6:fragmento Fab' de CA030_00240.g1 em um espectrômetro de 800 MHz Bruker Avance equipado com uma criosonda de tripla ressonância (15Ni13c ,i--, t ti). Espectros padrão HNCACB, CBCA(CO)NH e HNCO (Wittekind, M., and Mueller, L. (1993) J Magn Reson, Series B 101(2), 201; Grzesiek, S., and Bax, A. (1993) JBiomol RMN 3(2), 185-204; Muhandiram, D. R., and Kay, L. E. (1994) J Magn Reson, Series B 103(3), 203; Grzesiek, S., and Bax, A. (1992) J Magn Reson 96(2), 432) foram usados para fazer transferências de ressonância de esqueleto específico de sequência completa (ix 13_c e 1H) para IL-6 livre usando uma amostra de 0,9 mM uniformemente marcada com $^{15}N/^{13}C$.

[00216] Mudanças nas posições de sinais de esqueleto de IL-6 induzidas por ligação de fragmento Fab' de CA030 00240.g1 foram detectadas usando um

espectro 3D TROSYTEINCO (Salzmann, M. et al., (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(23), 13585-13590). Parâmetros de aquisição típicos para todos os experimentos de 3D RMN são fornecidos em tabela 1.

[00217] Todos os espectros foram processados usando RMNPipe (Delaglio, F. et al., (1995) JBiomol RMN 6(3), 277-293), com predição linear usada para pro10ngar o tempo de aquisição efetiva na dimensão ^{15}N de dados 3D para cerca de 30 ms. Estimulação branda de resolução foi aplicada em todas as dimensões usando uma função seno-quadrado alterada. Análise dos espectros foi realizada usando Sparky (Goddard, T. D., and Kneller, D. G. SPARKY 3. In., University of California, San Francisco).

Análise de dados de ligação de Fab:

[00218] A abordagem de mudança mínima (Farmer, B. T. et al., (1996) Nat Struct Mol Biol 3(12), 995; Muskett, F. W. et al., (1998) J Biol Chem 273(34), 21736-21743) foi usada para determinar as mudanças nas posições de sinais RMN de IL-6 resultando de ligação de fragmento Fab' de CA030 00240.g1. Inicialmente, todos os picos no espectro 3D HNCO de IL-6 livre e espectro 3D TROSY1INCO de IL-6 ligada a g132E09 Fab foram selecionados em seus centros. Os valores de mudança química de 15N e ^{1}H de ressonâncias de esqueleto foram corrigidos para a diferença em temperatura entre espectros do complexo e proteína livre (-0,8 ppm para ^{15}N e -0,05 ppm para ^{1}H) (Baxter, N. J., and Williamson, M. P. (1997) JBiomol RMN 9(4), 359-369). A mudança mínima em posição para picos entre IL-6 livre e ligada a Fab foi obtida usando Microsoft Excel para calcular a diferença de mudança química combinada em ^{15}N, ^{13}C e 1H para cada pico assinalado no espectro HNCO da proteína livre comparado com todos os picos observados em espectro TROSY-HNCO de complexo de Fab. As diferenças combinadas de próton de amida, mudança química de nitrogênio e carbono (M) foram definidas de acordo com a seguinte equação (Equação 1), onde $A8_{HN}$, M_N e A5c correspondem às diferenças em mudanças de ^{1}H, ^{15}N e ^{13}C entre pares de picos HNCO comparados e a_N e ac são fatores de escala de 0,2 e 0,33 requeridos para levar em conta diferenças na variação de mudanças químicas de próton de amida, nitrogênio de amida e carbono.

Para cada pico HNCO individual, a mudança mínima induzida por ligação de Fab foi adotada como o valor de mudança combinada mais baixo possível (A5).

$$\Delta\delta = \sqrt{(\Delta\delta_{HN})^2 + (\Delta\delta_N.\alpha_N)^2 + (\Delta\delta_c.\alpha_c)^2} \quad \text{(Equação 1)}$$

[00219] Para identificar os sítios de ligação (epítopos) de Fab em IL-6, um histograma de mudança mínima combinada versus sequência protéica foi usado para revelar regiões de IL-6 contendo sinais significantemente perturbados. Se o tamanho da mudança química combinada para aminoácidos individuais excedeu um valor de limiar da média da mudança química combinada para todos os aminoácidos mais um desvio padrão daquela média, estes resíduos foram selecionados para avaliação adicional como possíveis resíduos de contato no sítio de ligação de Fab. As localizações de resíduos candidatos a sítio de ligação foram finalmente examinadas na estrutura de alta resolução de IL-6 (Xu, G. Y .et al., (1997) J Mol Biol 268(2), 468-481) e apenas resíduos posicionados na superfície de proteína foram considerados estarem disponíveis para ligação de Fab.

[00220] Dois limiares diferentes foram aplicados para identificar resíduos ligados pelo Fab, a mudança mínima média + 1SD (0,143) e a mudança mínima média +2SD (0,213). O sítio de ligação do anticorpo foi encontrado abrangendo o resíduo de assinatura de sítio 3 crítico de Trp157 (Boulanger et al., 2003, Science, 300, 2101-2104). Usando a numeração de aminoácidos usada em Boulanger et al., supra o anticorpo 240g.1 foi encontrado se ligando a pelo menos os seguintes resíduos (média +2SD (0,213)) S47, C50, E93, R104, F105, E106, T149, K150, A153, Q156, Q159 e S169. O anticorpo pode se ligar a todos os seguintes resíduos (média +1SD (0,143)) C44, S47, C50, S53, A58, E93, V96, R104, F105, E106, T149, K150, Q152, A153, Q154, N155, Q156, W157, Q159, T163, L165, S169 e E172.

[00221] Será percebido que os mesmos resíduos também podem ser numerados baseados na numeração de aminoácidos do precursor não processado de IL-6 (Swiss Prot número de Acesso P05231). Usando esta numeração o anticorpo 240g.1 se liga a pelo menos os seguintes resíduos S75, C78, E121, R132, F133, E134, T177, K178, A181, Q182, Q187 e S197. O anticorpo pode se ligar a todos os seguintes resíduos C72, S75, C78, S81, A86, E121, V124, R132, F133, E134, T177,

K178, Q180, A181, Q182, N183, Q184, W185, Q187, T191, L193, 5197 e E200.

[00222] Tabela 1: Parâmetros básicos de experimentos RMN

Experimento	Dimensão indireta	Largura de varredura [ppm]	Compensação de carreador [ppm]	Tempo de aquisição [ms]
HNCACB e CBCA(CO)NH	15N (F2)	35	117,5	23,4
	13C (Fl)	70	44,7	9,6 (6,6)
HNCO	15N (F2)	35	117,5	23
	^{13}C (Fl)	12	177,5	17,7
TROsy-HNCO	15N (F2)	35	117,5	17,6
	^{13}C (Fl)	14	177,5	17,6

[00223] A dimensão direta de ^{1}H (F3 ou F2) foi adquirida com uma largura de varredura de 14 ppm e tempo de aquisição de 85 ms.

[00224] Certamente será entendido que a presente invenção foi descrita como forma de exemplo apenas, e não é de maneira alguma pretendida para ser limitante, e que modificações de detalhe podem ser feitas dentro do escopo das reivindicações a seguir. Características preferidas de cada forma de realização da invenção são como para cada das outras formas de realização mutatis mutandis. Todas as publicações, incluindo mas não limitado a patentes e pedidos de patente, citadas neste relatório são neste lugar incorporadas por referência como se cada publicação individual fosse especificamente e individualmente indicada para ser incorporada por referência neste lugar embora completamente descrita.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo neutralizante, caracterizado pelo fato de que tem especificidade para IL-6 humana, tendo uma cadeia pesada compreendendo a sequência gH13 dada na SEQ ID NO:11 e uma cadeia leve compreendendo a sequência gL10 dada na SEQ ID NO:13.

2. Anticorpo neutralizante tendo especificidade para IL-6 humana de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que tem uma cadeia pesada compreendendo a sequência dada em SEQ ID NO:16 e uma cadeia leve compreendendo a sequência dada em SEQ ID NO:18.

3. Sequência de DNA isolada, caracterizada pelo fato de codificar a cadeia pesada de um anticorpo como definido na reivindicação 1 ou na reivindicação 2, em que a sequência de DNA codificando a cadeia pesada compreende a sequência dada em SEQ ID NO:12 ou SEQ ID NO:15 ou nucleotídeos 58-2008 de SEQ ID NO:15.

4. Sequência de DNA isolada, caracterizada pelo fato de codificar a cadeia leve de um anticorpo como definido na reivindicação 1 ou na reivindicação 2, em que a sequência de DNA codificando a cadeia leve compreende a sequência dada em SEQ ID NO:14 ou SEQ ID NO:17 ou nucleotídeos 61-705 de SEQ ID NO:17.

5. Vetor de clonagem ou expressão, caracterizado pelo fato de compreender uma ou mais sequências de DNA como definidas em qualquer uma das reivindicações 3-4.

6. Vetor de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o vetor compreende a sequência dada em SEQ ID NO:15 e a sequência dada em SEQ ID NO:17.

7. Processo para a produção de um anticorpo tendo especificidade de ligação para IL-6 humana, caracterizado pelo fato de compreender cultivar a célula hospedeira para expressão de um anticorpo como definido na reivindicação 1 ou na reivindicação 2, a célula hospedeira compreendendo: a) uma sequência de DNA codificando a cadeia pesada do dito anticorpo como definida na reivindicação 3; e b)

uma sequência de DNA codificando a cadeia leve do dito anticorpo, em que as sequências de DNA são fornecidas em um ou mais vetores de clonagem ou expressão como definida na reivindicação 4; e isolar o anticorpo.

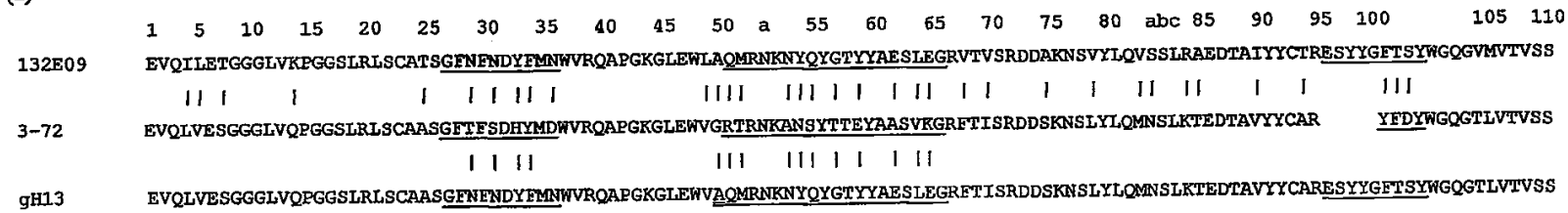
8. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de compreender um anticorpo como definido na reivindicação 1 ou na reivindicação 2, em combinação com um ou mais de um excipiente, diluente ou carreador farmaceuticamente aceitável.

9. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de compreender adicionalmente outros ingredientes ativos.

10. Uso de um anticorpo como definido na reivindicação 1 ou na reivindicação 2, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para o tratamento ou profilaxia de artrite reumatoide.

FIGURA 1

(a)


1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 a 55 60 65 70 75 80 abc 85 90 95 100 105 110
132E09 EVQILETGGGLVKPGGSLRLSCATSGFNFNDYFMNWVRQAPGKGLEWLAQMRNKNYQYGTYYAESLEGRVTVSRDDAKNSVYLQVSSLRAEDTAIYYCTRESYYGFTSYWGQGVMVTVSS
3-72 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMDWVRQAPGKGLEWVGRTRNKANSYTTEYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCAR YFDYWGQGTLVTVSS
gH13 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFNDYFMNWVRQAPGKGLEWVAQMRNKNYQYGTYYAESLEGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARESYYGFTSYWGQGTLVTVSS

(b)

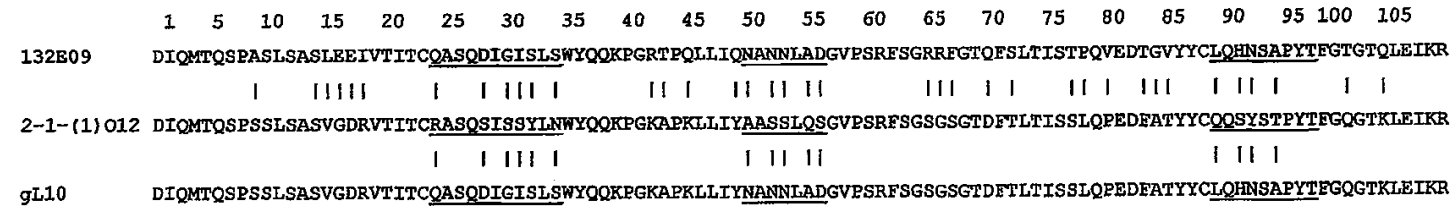

1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105
132E09 DIQMTQSPASLSASLEEIVTITCQASQDIGISLSWYQQKPGRTPQLLIQNANNLADGVPSRFSGRRFGTQFSLTISTPQVEDTGVYYCLQHNSAPYTFGTGTQLEIKR
2-1-(1)012 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKLEIKR
gL10 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDIGISLSWYQQKPGKAPKLLIYNANNLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSAPYTFGQGTKLEIKR

FIGURA 2

(a) Seqüência traduzida de cadeia pesada de 240.gl, mostrando limites de íntron/éxon

```
          10          20          30          40          50
ATG GAG TGG AGC TGG GTG TTT TTG TTC TTC CTG TCC GTG ACC ACA GGC GTG CAC TCT
TAC CTC ACC TCG ACC CAC AAA AAC AAG AAG GAC AGG CAC TGG TGT CCG CAC GTG AGA
 M   E   W   S   W   V   F   L   F   F   L   S   V   T   T   G   V   H   S>

 60          70          80          90          100         110
GAA GTC CAG CTC GTT GAG AGT GGC GGT GGC CTG GTC CAG CCC GGT GGA TCA CTC CGA
CTT CAG GTC GAG CAA CTC TCA CCG CCA CCG GAC CAG GTC GGG CCA CCT AGT GAG GCT
 E   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   L   V   Q   P   G   G   S   L   R>

    120         130         140         150         160         170
CTG TCC TGC GCT GCA AGC GGG TTT AAT TTT AAT GAT TAC TTC ATG AAC TGG GTT CGG
GAC AGG ACG CGA CGT TCG CCC AAA TTA AAA TTA CTA ATG AAG TAC TTG ACC CAA GCC
 L   S   C   A   A   S   G   F   N   F   N   D   Y   F   M   N   W   V   R>

        180         190         200         210         220
CAG GCA CCT GGC AAA GGC CTG GAA TGG GTG GCT CAG ATG AGG AAC AAG AAT TAT CAG
GTC CGT GGA CCG TTT CCG GAC CTT ACC CAC CGA GTC TAC TCC TTG TTC TTA ATA GTC
 Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   A   Q   M   R   N   K   N   Y   Q>

230         240         250         260         270         280
TAC GGG ACA TAC TAT GCC GAG AGT CTG GAG GGA AGG TTC ACC ATC TCC AGG GAC GAT
ATG CCC TGT ATG ATA CGG CTC TCA GAC CTC CCT TCC AAG TGG TAG AGG TCC CTG CTA
 Y   G   T   Y   Y   A   E   S   L   E   G   R   F   T   I   S   R   D   D>

   290         300         310         320         330         340
TCT AAG AAC AGC CTC TAC CTT CAG ATG AAC TCT TTG AAA ACC GAG GAC ACA GCC GTG
AGA TTC TTG TCG GAG ATG GAA GTC TAC TTG AGA AAC TTT TGG CTC CTG TGT CGG CAC
 S   K   N   S   L   Y   L   Q   M   N   S   L   K   T   E   D   T   A   V>

        350         360         370         380         390
TAC TAT TGT GCT AGA GAA AGT TAT TAC GGG TTC ACA TCT TAT TGG GGA CAG GGA ACC
ATG ATA ACA CGA TCT CTT TCA ATA ATG CCC AAG TGT AGA ATA ACC CCT GTC CCT TGG
 Y   Y   C   A   R   E   S   Y   Y   G   F   T   S   Y   W   G   Q   G   T>

400         410         420         430         440         450
CTG GTG ACT GTC TCG AGC GCT TCT ACA AAG GGC CCA TCC GTC TTC CCC CTG GCG CCC
GAC CAC TGA CAG AGC TCG CGA AGA TGT TTC CCG GGT AGG CAG AAG GGG GAC CGC GGG
 L   V   T   V   S   S   A   S   T   K   G   P   S   V   F   P   L   A   P>

   460         470         480         490         500         510
TGC TCC AGG AGC ACC TCC GAG AGC ACA GCC GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC
ACG AGG TCC TCG TGG AGG CTC TCG TGT CGG CGG GAC CCG ACG GAC CAG TTC CTG ATG
 C   S   R   S   T   S   E   S   T   A   A   L   G   C   L   V   K   D   Y>

        520         530         540         550         560         570
```

88

```
TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC
AAG GGG CTT GGC CAC TGC CAC AGC ACC TTG AGT CCG CGG GAC TGG TCG CCG CAC GTG
 F   P   E   P   V   T   V   S   W   N   S   G   A   L   T   S   G   V   H>

          580         590         600         610         620
ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC
TGG AAG GGC CGA CAG GAT GTC AGG AGT CCT GAG ATG AGG GAG TCG TCG CAC CAC TGG
 T   F   P   A   V   L   Q   S   S   G   L   Y   S   L   S   S   V   V   T>

630         640         650         660         670         680
GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACG AAG ACC TAC ACC TGC AAC GTA GAT CAC AAG CCC
CAC GGG AGG TCG TCG AAC CCG TGC TTC TGG ATG TGG ACG TTG CAT CTA GTG TTC GGG
 V   P   S   S   S   L   G   T   K   T   Y   T   C   N   V   D   H   K   P>

    690         700         710         720         730         740         750
AGC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AGA GTT G GTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGCTGGA
TCG TTG TGG TTC CAC CTG TTC TCT CAA C CACTCTCCGGTCGTGTCCCTCCCTCCCACAGACGACCT
 S   N   T   K   V   D   K   R   V>

       760         770         780         790         800         810         820
AGCCAGGCTCAGCCCTCCTGCCTGGACGCACCCCGGCTGTGCAGCCCCAGCCCAGGGCAGCAAGGCATGCCCCAT
TCGGTCCGAGTCGGGAGGACGGACCTGCGTGGGGCCGACACGTCGGGGTCGGGTCCCGTCGTTCCGTACGGGGTA

  830         840         850         860         870         880         890         900
CTGTCTCCTCACCCGGAGGCCTCTGACCACCCCACTCATGCCCAGGGAGAGGGTCTTCTGGATTTTTCCACCAGG
GACAGAGGAGTGGGCCTCCGGAGACTGGTGGGGTGAGTACGGGTCCCTCTCCCAGAAGACCTAAAAAGGTGGTCC

       910         920         930         940         950         960         970
CTCCGGGCAGCCACAGGCTGGATGCCCCTACCCCAGGCCCTGCGCATACAGGGGCAGGTGCTGCGCTCAGACCTG
GAGGCCCGTCGGTGTCCGACCTACGGGGATGGGGTCCGGGACGCGTATGTCCCCGTCCACGACGCGAGTCTGGAC

  980         990        1000        1010        1020        1030        1040        1050
CCAAGAGCCATATCCGGGAGGACCCTGCCCCTGACCTAAGCCCACCCCAAAGGCCAAACTCTCCACTCCCTCAGC
GGTTCTCGGTATAGGCCCTCCTGGGACGGGGACTGGATTCGGGTGGGGTTTCCGGTTTGAGAGGTGAGGGAGTCG

      1060        1070        1080        1090        1100        1110
TCAGACACCTTCTCTCCTCCCAGATCTGAGTAACTCCCAATCTTCTCTCTGCAG AG TCC AAA TAT GGT
AGTCTGTGGAAGAGAGGAGGGTCTAGACTCATTGAGGGTTAGAAGAGAGACGTC TC AGG TTT ATA CCA
                                                        E   S   K   Y   G>

1120        1130        1140
  CCC CCA TGC CCA CCA TGC CCA G
  GGG GGT ACG GGT GGT ACG GGT C
   P   P   C   P   P   C   P>

      1150        1160        1170        1180        1190        1200
  GTAAGCCAACCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCT
  CATTCGGTTGGGTCCGGAGCGGGAGGTCGAGTTCCGCCCTGTCCACGGGATCTCATCGGA

      1210        1220        1230        1240        1250
  GCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACGCATCCACCTCCATCTCTTCCTCAG CA CCT GAG TTC
```

89

```
CGTAGGTCCCTGTCCGGGGTCGGCCCACGACTGCGTAGGTGGAGGTAGAGAAGGAGTC GT GGA CTC AAG
                                                          A   P   E   F>

1270          1280          1290          1300          1310          1320
CTG GGG GGA CCA TCA GTC TTC CTG TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACT CTC ATG ATC
GAC CCC CCT GGT AGT CAG AAG GAC AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGA GAG TAC TAG
 L   G   G   P   S   V   F   L   F   P   P   K   P   K   D   T   L   M   I>

 1330          1340          1350          1360          1370          1380
TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACG TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAG GAA GAC CCC GAG
AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGC ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTC CTT CTG GGG CTC
 S   R   T   P   E   V   T   C   V   V   V   D   V   S   Q   E   D   P   E>

      1390          1400          1410          1420          1430          1440
GTC CAG TTC AAC TGG TAC GTG GAT GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG
CAG GTC AAG TTG ACC ATG CAC CTA CCG CAC CTC CAC GTA TTA CGG TTC TGT TTC GGC
 V   Q   F   N   W   Y   V   D   G   V   E   V   H   N   A   K   T   K   P>

           1450          1460          1470          1480          1490
CGG GAG GAG CAG TTC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC
GCC CTC CTC GTC AAG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG
 R   E   E   Q   F   N   S   T   Y   R   V   V   S   V   L   T   V   L   H>

1500          1510          1520          1530          1540          1550
CAG GAC TGG CTG AAC GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GGC CTC CCG
GTC CTG ACC GAC TTG CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG TTT CCG GAG GGC
 Q   D   W   L   N   G   K   E   Y   K   C   K   V   S   N   K   G   L   P>

    1560          1570          1580                    ↓
TCC TCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA G
AGG AGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CGG TTT C
 S   S   I   E   K   T   I   S   K   A   K>

1590      1600      1610      1620      1630      1640      1650
GTGGGACCCACGGGGTGCGAGGGCCACATGGACAGAGGTCAGCTCGGCCCACCCTCTGCCCT
CACCCTGGGTGCCCCACGCTCCCGGTGTACCTGTCTCCAGTCGAGCCGGGTGGGAGACGGGA

          1660      1670      1680      ↓ 1690          1700          1710
GGGAGTGACCGCTGTGCCAACCTCTGTCCCTACAG GG CAG CCC CGA GAG CCA CAG GTG TAC ACC
CCCTCACTGGCGACACGGTTGGAGACAGGGATGTC CC GTC GGG GCT CTC GGT GTC CAC ATG TGG
                                      G   Q   P   R   E   P   Q   V   Y   T>

    1720          1730          1740          1750          1760          1770
CTG CCC CCA TCC CAG GAG GAG ATG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC
GAC GGG GGT AGG GTC CTC CTC TAC TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC CAG
 L   P   P   S   Q   E   E   M   T   K   N   Q   V   S   L   T   C   L   V>

          1780          1790          1800          1810          1820
AAA GGC TTC TAC CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG
TTT CCG AAG ATG GGG TCG CTG TAG CGG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC
 K   G   F   Y   P   S   D   I   A   V   E   W   E   S   N   G   Q   P   E>
```

90

```
1830          1840          1850          1860          1870          1880
  AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC
  TTG TTG ATG TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATG
   N   N   Y   K   T   T   P   P   V   L   D   S   D   G   S   F   F   L   Y>

    1890          1900          1910          1920          1930          1940
  AGC AGG CTA ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG GAG GGG AAT GTC TTC TCA TGC TCC
  TCG TCC GAT TGG CAC CTG TTC TCG TCC ACC GTC CTC CCC TTA CAG AAG AGT ACG AGG
   S   R   L   T   V   D   K   S   R   W   Q   E   G   N   V   F   S   C   S>

        1950          1960          1970          1980          1990
  GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACA CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CTG
  CAC TAC GTA CTC CGA GAC GTG TTG GTG ATG TGT GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GAC
   V   M   H   E   A   L   H   N   H   Y   T   Q   K   S   L   S   L   S   L>

2000
  GGT AAA TGA
  CCA TTT ACT
   G   K   *>
```

(b) Cadeia leve

```
             10            20            30            40            50            60
  ATG AGC GTG CCT ACC CAG GTC CTC GGC CTG TTG CTG CTC TGG CTG ACC GAT GCC CGC TGC GAT
  TAC TCG CAC GGA TGG GTC CAG GAG CCG GAC AAC GAC GAG ACC GAC TGG CTA CGG GCG ACG CTA
   M   S   V   P   T   Q   V   L   G   L   L   L   L   W   L   T   D   A   R   C   D>

         70            80            90           100           110           120
  ATC CAG ATG ACT CAA TCA CCC AGT TCC CTG AGC GCC TCT GTC GGC GAC AGG GTG ACC ATC ACA
  TAG GTC TAC TGA GTT AGT GGG TCA AGG GAC TCG CGG AGA CAG CCG CTG TCC CAC TGG TAG TGT
   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D   R   V   T   I   T>

    130           140           150           160           170           180
  TGC CAG GCC TCT CAA GAC ATT GGC ATC AGC CTG TCC TGG TAC CAG CAA AAA CCC GGC AAG GCC
  ACG GTC CGG AGA GTT CTG TAA CCG TAG TCG GAC AGG ACC ATG GTC GTT TTT GGG CCG TTC CGG
   C   Q   A   S   Q   D   I   G   I   S   L   S   W   Y   Q   Q   K   P   G   K   A>

190           200           210           220           230           240           250
  CCT AAG CTC CTG ATC TAC AAT GCT AAC AAC CTG GCC GAT GGC GTG CCT AGT AGG TTT AGC GGG
  GGA TTC GAG GAC TAG ATG TTA CGA TTG TTG GAC CGG CTA CCG CAC GGA TCA TCC AAA TCG CCC
   P   K   L   L   I   Y   N   A   N   N   L   A   D   G   V   P   S   R   F   S   G>

         260           270           280           290           300           310
  TCT GGT TCC GGA ACA GAT TTC ACA CTC ACC ATC AGC TCA CTG CAG CCC GAG GAC TTC GCC ACT
  AGA CCA AGG CCT TGT CTA AAG TGT GAG TGG TAG TCG AGT GAC GTC GGG CTC CTG AAG CGG TGA
   S   G   S   G   T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T>

    320           330           340           350           360           370
  TAC TAT TGC CTG CAG CAC AAC AGC GCC CCC TAC ACC TTC GGA CAA GGC ACT AAA CTG GAG ATC
  ATG ATA ACG GAC GTC GTG TTG TCG CGG GGG ATG TGG AAG CCT GTT CCG TGA TTT GAC CTC TAG
```

91

```
  Y   Y   C   L   Q   H   N   S   A   P   Y   T   F   G   Q   G   T   K   L   E   I>

380           390           400           410           420           430           440
 AAG CGT ACG GTA GCG GCC CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT
 TTC GCA TGC CAT CGC CGG GGT AGA CAG AAG TAG AAG GGC GGT AGA CTA CTC GTC AAC TTT AGA
  K   R   T   V   A   A   P   S   V   F   I   F   P   P   S   D   E   Q   L   K   S>

        450           460           470           480           490           500
 GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG
 CCT TGA CGG AGA CAA CAC ACG GAC GAC TTA TTG AAG ATA GGG TCT CTC CGG TTT CAT GTC ACC
  G   T   A   S   V   V   C   L   L   N   N   F   Y   P   R   E   A   K   V   Q   W>

    510           520           530           540           550           560
 AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG
 TTC CAC CTA TTG CGG GAG GTT AGC CCA TTG AGG GTC CTC TCA CAG TGT CTC GTC CTG TCG TTC
  K   V   D   N   A   L   Q   S   G   N   S   Q   E   S   V   T   E   Q   D   S   K>

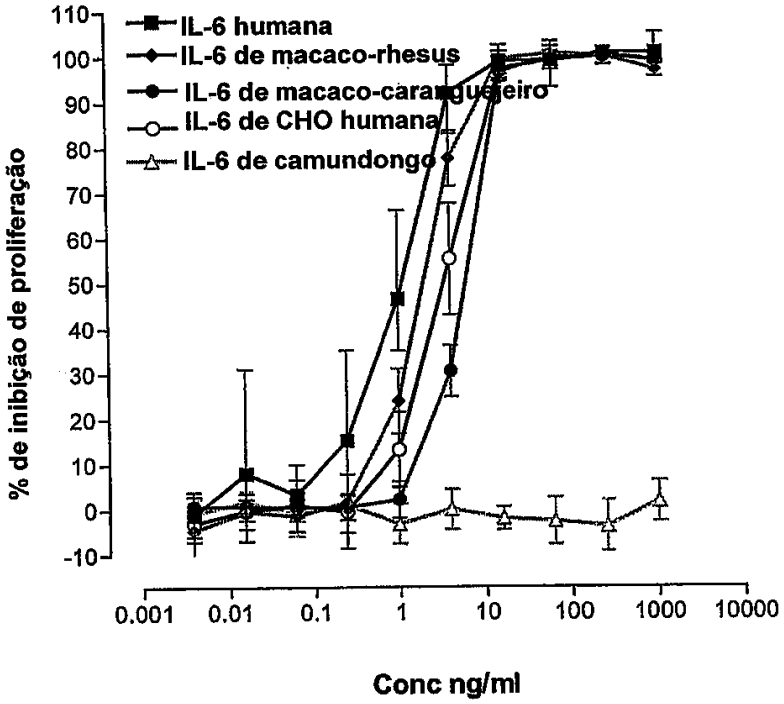
570           580           590           600           610           620           630
 GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA
 CTG TCG TGG ATG TCG GAG TCG TCG TGG GAC TGC GAC TCG TTT CGT CTG ATG CTC TTT GTG TTT
  D   S   T   Y   S   L   S   S   T   L   T   L   S   K   A   D   Y   E   K   H   K>

          640           650           660           670           680           690
 GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG
 CAG ATG CGG ACG CTT CAG TGG GTA GTC CCG GAC TCG AGC GGG CAG TGT TTC TCG AAG TTG TCC
  V   Y   A   C   E   V   T   H   Q   G   L   S   S   P   V   T   K   S   F   N   R>

      700
 GGA GAG TGT TAG
 CCT CTC ACA ATC
  G   E   C   *>
```

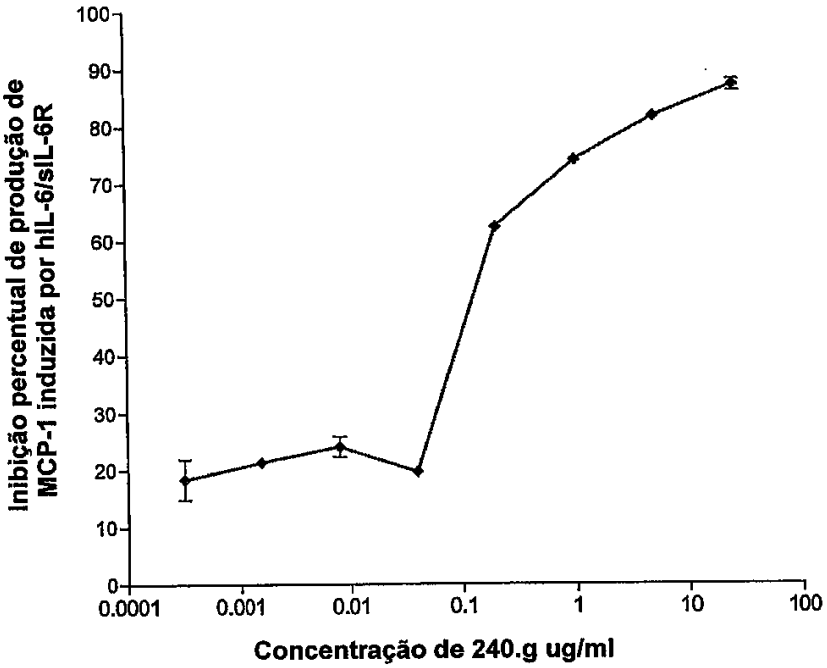
92

FIGURA 3a


IL-6 humana
IL-6 de macaco-rhesus
IL-6 de macaco-caranguejeiro
IL-6 de CHO humana
IL-6 de camundongo
% de inibição de proliferação
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
Conc ng/ml

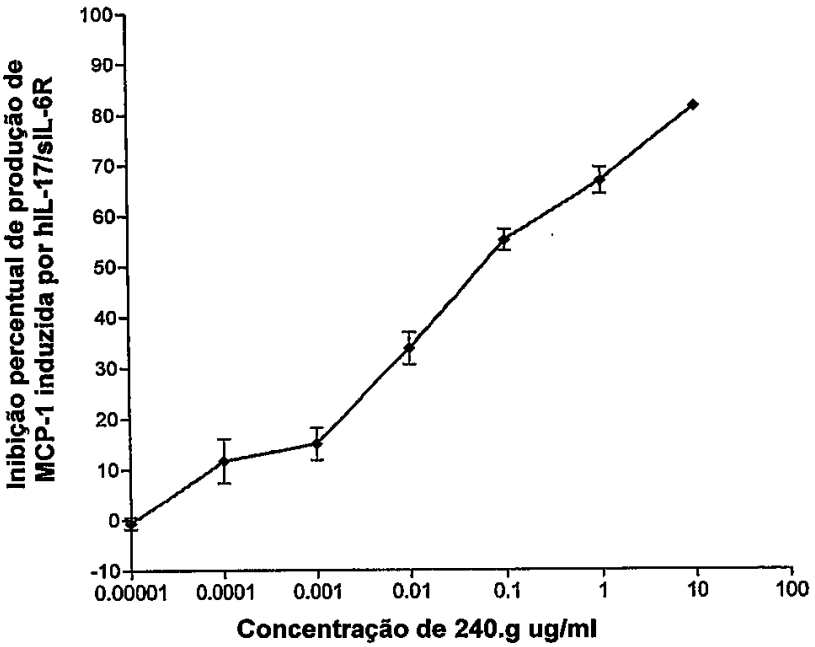
93

FIGURA 3B


Inibição percentual de produção de MCP-1 induzida por hIL-6/sIL-6R
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Concentração de 240.g ug/ml

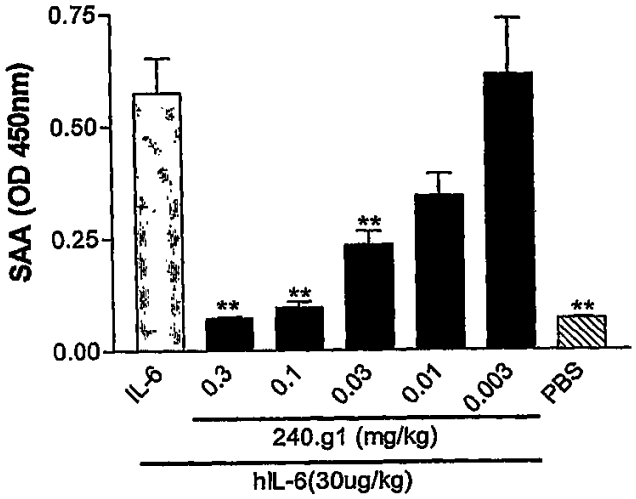
94

FIGURA 3C


Inibição percentual de produção de MCP-1 induzida por hIL-17/sIL-6R
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Concentração de 240.g ug/ml

95

FIGURA 4


0.75
0.50
0.25
0.00
SAA (OD 450nm)
**
**
**
**
IL-6
0.3
0.1
0.03
0.01
0.003
PBS
240.g1 (mg/kg)
hIL-6(30ug/kg)