



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

**(21) PI 0719430-7 A2**



(22) Data de Depósito: 28/11/2007

(43) Data da Publicação: 01/04/2014

(RPI 2256)

(51) *Int.Cl.:*

C07K 16/24

A61K 39/395

C12N 15/13

A61P 37/02

A61P 35/00

**(54) Título:** MEMBRO DE LIGAÇÃO ISOLADO PARA IL-6 HUMANA, MOLÉCULA DE ANTICORPO ISOLADA, DOMÍNIOS VH E VL ISOLADOS, COMPOSIÇÃO, USO DE UM MEMBRO DE LIGAÇÃO ISOLADO, OU UMA MOLÉCULA DE ANTICORPO, MÉTODO PARA TRATAR UM DISTÚRBIO, ASSOCIADO COM IL-6 EM UM INDIVÍDUO, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, CÉLULA HOSPEDEIRA, E, MÉTODOS PARA PRODUZIR UM MEMBRO DE LIGAÇÃO, UMA MOLÉCULA DE ANTICORPO OU UM DOMÍNIO VH OU VL DE ANTICORPO, PARA PRODUZIR UM DOMÍNIO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DE ANTICORPO PARA IL-6 E PARA PRODUZIR UMA COMPOSIÇÃO DE MOLÉCULA DE ANTICORPO

**(57) Resumo:**

**(30) Prioridade Unionista:** 30/11/2006 US 60/861704

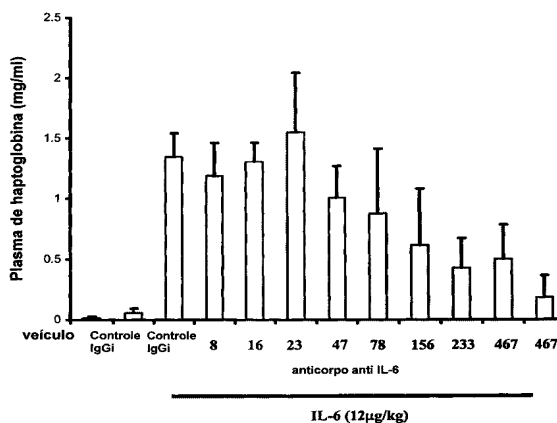
**(73) Titular(es):** Astrazeneca Ab, Medimmune Limited

**(72) Inventor(es):** Philip Mallinder, Simon Charles Cruwys, Steven Godfrey Lane

**(74) Procurador(es):** Momsen, Leonardos & CIA.

**(86) Pedido Internacional:** PCT GB2007004527 de 28/11/2007

**(87) Publicação Internacional:** WO 2008/065378de 05/06/2008



“MEMBRO DE LIGAÇÃO ISOLADO PARA IL-6 HUMANA, MOLÉCULA DE ANTICORPO ISOLADA, DOMÍNIOS VH E VL ISOLADOS, COMPOSIÇÃO, USO DE UM MEMBRO DE LIGAÇÃO ISOLADO, OU UMA MOLÉCULA DE ANTICORPO, MÉTODO PARA  
5 TRATAR UM DISTÚRPIO ASSOCIADO COM IL-6 EM UM INDIVÍDUO, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, CÉLULA HOSPEDEIRA, E, MÉTODOS PARA PRODUZIR UM MEMBRO DE LIGAÇÃO, UMA MOLÉCULA DE ANTICORPO OU UM DOMÍNIO VH OU VL DE ANTICORPO, PARA PRODUZIR UM DOMÍNIO DE  
10 LIGAÇÃO A ANTÍGENO DE ANTICORPO PARA IL-6 E PARA PRODUZIR UMA COMPOSIÇÃO DE MOLÉCULA DE ANTICORPO”

Esta invenção se relaciona a membros de ligação, especialmente moléculas de anticorpo, que inibem efeitos biológicos de IL-6. Os membros de ligação são úteis para tratamento de distúrbios associados  
15 com IL-6, incluindo doenças inflamatórias e tumores.

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina pró-inflamatória pleiotrópica produzida por uma variedade de tipos celulares, incluindo fibroblastos estimulados, monócitos e células endoteliais, que formam a fonte principal de IL-6 *in vivo*. Células tal como células T, células B, macrófagos,  
20 queratinócitos, osteoblastos e vários outros podem produzir IL-6 sob estímulo. IL-6 também é expressa a partir de linhagens celulares tumorais e células tumorais, p. ex., células de carcinoma de pulmão, câncer de próstata, mieloma, hipernefoma e mixoma cardíaco [1,2]. Sob condições não-inflamatórias, IL-6 é secretada a partir de tecido adiposo [3].

25 A regulação da expressão de IL-6 depende do tipo celular que a está produzindo. Em células de mieloma múltiplo, IL-6 parece agir em uma alça de retroalimentação positiva – estimulando as células a crescerem assim como a produzir mais IL-6 [4,5]. Em outros tipos celulares, IL-6 parece inibir o crescimento e ativação de células e pode agir como um regulador negativo

para algumas citocinas pró-inflamatórias.

Para iniciar a sinalização celular, IL-6 se liga com baixa afinidade a um receptor transmembrana, receptor alfa de IL-6 (também referido como IL-R6 , IL-6Ra, IL-6R, gp80 ou CD126) para formar um complexo “IL-6:IL-6Ra”. Este complexo se liga ao receptor de sinal gp130; IL-6Ra e gp130 juntos formam um sítio de ligação para IL-6 de alta afinidade e induzem a formação de um hexâmero composto de duas cópias de cada um de IL-6, IL-6Ra e gp130 [6]. Os domínios transmembranares e citoplasmáticos do IL-6Ra não são necessários par transdução de sinal, visto que IL-6Ra também existe como uma forma secretada solúvel (sIL-6R ou sIL-6Ra). O receptor solúvel é produzido por *splicing* diferencial do mensageiro de IL-6Ra ou por *shedding* proteolítico. sIL-6R é capaz de formar um complexo ligante-receptor com Il-6, “IL-6:sIL-6Ra”. Esse complexo pode se ligar a gp130 em células e iniciar desse modo sinalização celular em células positivas para gp130, mesmo quando essas células não expressam IL-6Ra. Assim, sIL-6R tem o potencial de ampliar o repertório de células que respondem a IL-6 e pensa-se que tenha uma função importante na inflamação mediada por IL-6 [7].

Uma estrutura cristalina de ligante de IL-6 humana foi elucidada [6]. A estrutura cristalina do domínio extracelular de IL-6Ra humano [8] e a estrutura hexamérica do complexo IL-6/IL-6R/gp130 [9] também foram obtidas. Essas estruturas combinadas com estudos de mutagênese identificaram três sítios na superfície de IL-6 que estão envolvidos na atividade funcional da Il-6 no complexo com os vários componentes do receptor. Resíduos do sítio 1 estão envolvidos na interação entre IL-6 e IL-6Ra. Resíduos do sítio 2 estão envolvidos na interação entre IL-6 e o domínio de ligação a citocina gp130. Os resíduos no sítio 4 de IL-6 estão envolvidos na interação com o domínio semelhante à Ig da segunda gp130 no complexo hexamérico. Um quarto sítio na IL-6 também foi

identificado onde a IL-6 interage com a segunda molécula de IL-6 no complexo IL-6/IL-6R/gp130 [1-].

Vários anticorpos monoclonais antiligante de IL-6 foram isolados. Foram realizados estudos de mapeamento que mostram que eles se  
5 ligam a sítios de ligação diferentes, como descrito acima, na superfície de IL-6 humana [11, 12, 13, 14, 15].

Vários anticorpos monoclonais anti-IL-6Ra também foram gerados e seus sítios de ligação em IL-6Ra mapeados [16, 14, 15, 17].

IL-6 pertence a uma família de citocinas, que inclui  
10 interleucina-11 (IL-11), fator neurotrófico ciliar (CNTF), oncostatina M (OsM), fator inibitório de leucemia (LIF), citocina semelhante à cardiotropina (CLC) e cardiotropina 1 (CT-1). Cada um dos membros dessa família tem sua própria subunidade de receptor alfa e forma complexos com a subunidade de receptor comum gp130. A interrupção direcionada do gene gp130 é  
15 embrionicamente letal [18, 19]. Todos os membros da família IL-6 podem induzir a expressão de proteínas de fase aguda de hepatócitos.

A sinalização de IL-6 envolve a fosforilação de tirosina por quinases da família JAK e subsequente ativação de duas cascatas de sinalização intracelular, as vias SHP2/ERK MAPK e STAT1/3, levando à  
20 expressão gênica através de NF-IL-6 e AP-1 [18,20].

IL-6 mostra um amplo espectro de funções biológicas incluindo: hematopoese, indução de respostas de fase aguda, ativação de células T, estímulo de secreção de anticorpo, defesa do hospedeiro contra infecção, ativação de osteoclasto e células de mieloma [21, 22]. Para uma  
25 revisão dos efeitos de IL-6 veja ref. [23]. IL-6 foi originalmente identificada como um fator de diferenciação de células B gerado por células T [24], mas foi identificado subsequentemente como um potente ativador e fator promotor de crescimento de muitos tipos celulares. Ela induz a maturação final de células B em células produtoras de anticorpo e é um fator acessório essencial

para ativação e proliferação de célula T. Estudos mostraram que IL-6 está envolvida na ativação de linfócitos T auto-reativos e na proliferação e diferenciação de células T citotóxicas. IL-6 foi implicada em hematopoese como um cofator que causa a ativação e diferenciação de células-tronco hematopoiéticas. O efeito de IL-6 na resposta de fase aguda também está bem documentado [25]. IL-6 induz uma variedade de proteínas de fase aguda incluindo fibrinogênio, alfa-anti-quimiotripsina, soro amilóide A e proteínas C-reativa de hepatócitos humanos. Proteínas de fase aguda controlam respostas imunes e inflamação e têm efeitos no remodelamento de tecidos. O nível sérico de IL-6 se correlaciona bem com aquele da proteína C-reativa em variedade de patologias, sugerindo uma função causal de IL-6 na resposta de fase aguda. Também foi demonstrado que IL-6 é produzida por osteoblastos e parece estar envolvida na ativação de osteoclasto e reabsorção óssea [26, 27, 28]. Paradoxicalmente foi sugerido que IL-6 não apenas tem funções como uma citocina pró-inflamatória, mas também pode, em certas circunstâncias e tipos celulares, arrefecer o entusiasmo dos efeitos de outras citocinas pró-inflamatórias levando a uma redução da inflamação.

Devido a IL-6 tem uma variedade de feitos biológicos, a elevação de IL-6 foi implicada como uma citocina chave em uma variedade de indicações de doença. Foi demonstrado que os níveis de IL-6 circulante estão elevados em doenças tal como artrite reumatóide, doença de Castleman, artrite idiopática juvenil e doenças de Crohn [29]. Devida a isso, IL-6 foi implicada em dirigir a patologia nessas indicações inflamatórias. Além disso, demonstrou-se que uma variedade de tipos tumorais é estimulada por IL-6, incluindo melanoma, carcinoma de células renal, sarcoma de Kaposi, carcinoma de ovário, linfoma, leucemia, mieloma múltiplo e carcinoma de próstata [30]. Além disso, níveis circulantes aumentados de IL-6 foram relatados em vários cânceres. Em algumas indicações de câncer níveis de IL-6 elevados foram usados como indicadores prognósticos da doença.

Devido à função de IL-6 em doenças, uma variedade de anticorpos monoclonais anti-IL-6 humana quiméricos e murinos foram desenvolvidos como potenciais terapias.

5 US5856135 descreve um anticorpo humano remodelado para IL-6, derivado de um anticorpo monoclonal de camundongo “SK2”.

JP-10-66582 relata um anticorpo quimérico para IL-6, que é indicado como capaz de reconhecer a região de hélice D de IL-6 (sítio 1).

10 WO2004/020633 (EP1536012) descreve uma molécula de anticorpo scFv humano para IL-6 isolada usando tecnologia de visualização de fago. O scFv é relatado como tendo uma afinidade de 13 nM.

15 Um anticorpo anti-IL-6 murina, elsilimomab (também conhecido como B-E8) foi usado para tratar pacientes com mieloma múltiplo [31, 32], carcinoma de células renal [33] e artrite reumatóide [34] e melhoras em certos marcadores diagnósticos foram vistas em pacientes tratados com todas as três doenças. BE-8 também foi usado para tratar pacientes positivos para HIV com linfoma de célula grande polimórfica ou imunoblástico [35] com alívio de sintomas sistêmicos (isto é, febre, suores, caquexia) e supressão de crescimento espontâneo do linfoma em aproximadamente 50% dos pacientes.

20 Entretanto, a rápida depuração desse anticorpo e possíveis reações anafiláticas devido à produção de anticorpos humanos anti-camundongo (HAMA) contra elsilimomab limitaram seu uso na clínica [36].

25 Em geral, o uso clínico de anticorpo monoclonais humanos é limitado, conforme tais anticorpo frequentemente induzem HAMA. HAMA direcionados contra a parte Fc da imunoglobulina de camundongo são frequentemente produzidos, resultando em rápida depuração de mAb anti-IL-6 e possível reação anafilática [36]. Também se sabe que a farmacocinética de anticorpos de camundongo em humanos é diferente de anticorpos humanos tendo meias-vidas mais curtas e taxas de depuração aumentadas.

Para reduzir a imunogenicidade de anticorpos murinos em humanos, anticorpos quiméricos com regiões variáveis de camundongo e regiões constantes humanas foram construídos. Um anticorpo anti-IL-6 de camundongo e humano quimérico cCLB8 (conhecido como CNTO 328) foi  
 5 usado para tratar pacientes com mieloma múltiplo [5, 37], com estabilização de doença vista na maioria dos pacientes.

Entretanto, embora anticorpo quiméricos sejam menos imunogênicos que mAbs murinos, respostas de anticorpo humano anti-quimérico foram relatadas [38].

10 Foram efetuados estudos de mapeamento em cCLB8 que mostram que ele é um inibidor de sítio I de atividade de IL-6. Brakenhoff *et al.*, [39] demonstraram que cCLB8 se liga aos mutantes de deleção amino-terminal de IL-6 Pro46, Ser49, Glu51, Ile53, Asp54 e também se liga aos mutantes de deleção Asp62 e Met77 (embora em afinidade reduzida). Os  
 15 mesmos autores mostram que cCLB8 inibe IL-6 selvagem, mas não deleção C-terminal 5 em um ensaio de proliferação de célula B9 e que cCLB8 não se ligará a IL-6 del C-4 que tem os últimos 4 resíduos de aminoácidos C-terminais deletados. Esses dados sugerem que cCLB8 se ligue a um epítopo que envolve os resíduos C-terminais de IL-6.

20 Kalai *et al.*, [17] demonstraram que cCLB8 falhou em reconhecer os mutantes de IL-6 F106E, F102E/F106E ou R207E/R210E. Entretanto, o anticorpo reconhece os mutantes de IL-6 R207E e R207W. A ligação de cCLB8 aos mutantes R207W & R207E é aproximadamente 50% daquela relativa à selvagem, o que sugere que os resíduos F106 e R210  
 25 estejam envolvidos no epítopo de ligação a cCLB8 e o resíduo R207 esteja envolvido na ligação, mas tenha menos efeito que os resíduos F106 e R210. O cCLB8 se liga aos mutantes de sítio I de IL-6 R196M, K199N/Q203L e Q203L com 100% de atividade comparada à selvagem. Brakenhoff *et al.*, [13] demonstraram que cCLB8 se liga às seguintes variantes de IL-6: Q182H,

N183K, W185Q, W185G, W185R, T190P, Q182H/Q184P, W185R/S197N, Q187E/T190P, I164L/L186R/M189I, o que não é surpreendente visto que a maioria destas este separada distalmente dos resíduos do sítio I de IL-6.

O efeito positivo de se inibir a sinalização de IL-6 em câncer e doenças inflamatórias foi destacada adicionalmente pelo uso de um anticorpo anti-IL-6Ra humanizado Tocilizumab (também conhecido como hPM-1, MRA e Actemra). Esta é uma versão humanizada do anticorpo anti-IL6Ra murino PM-1. O tratamento de pacientes com este anticorpo provou-se eficaz em várias doenças incluindo artrite reumatóide, artrite idiopática juvenil, doença de Crohn, distúrbio mieloproliferativo, doença de Castleman e lúpus eritematoso sistêmico [40].

Nós tivemos êxito em isolar membros de ligação altamente potentes, de alta afinidade para IL-6. Devido à alta afinidade e potência deles, e ao desempenho deles em estudos funcionais como descrito aqui, membros de ligação da invenção são particularmente adequados para uso em tratamento terapêutico e/ou diagnóstico do corpo humano ou animal.

Os membros de ligação são úteis para tratar distúrbios associados com IL-6, conforme descrito em detalhes em outro lugar aqui.

Um anticorpo anti-IL-6 humana para o tratamento de doenças inflamatórias e câncer provê vantagens significativas sobre abordagens existentes. Por exemplo, anticorpos humanos não induzem respostas HAMA ou HACA e têm uma meia-vida *in vivo* mais longa comparada com anticorpos não humanos ou quiméricos.

Nós também reconhecemos que membros de ligação para IL-6 oferecem vantagens significativas quando comparados com membros de ligação para IL-6Ra, especialmente em termos de tratamento e administração *in vivo*, como descrito em outro lugar aqui.

Como descrito em maiores detalhes nos Exemplos, nós isolamos uma moléculas de anticorpo parental, designada CAN022D10, com

um grupo de sequências de CDR como mostrado na Tabela 7. Através de um processo de otimização nós geramos um painel de clones de anticorpo: Anticorpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 e 23, com sequências de CDR derivadas das sequências de CDR parentais e tendo substituições nas posições indicadas na Tabela 7.

Assim, por exemplo, pode ser visto na Tabela 7 que o Anticorpo 2 tem uma sequência de HCDR1 parental em que o resíduo 35 de Kabat é substituído por Thr (SEQ ID NO: 13). Os Anticorpos 14 e 22 contêm um resíduo adicional, isto é, uma inserção de aminoácido, em HCDR3: Ile no resíduo 100D de Kabat, que não está presente na sequência de HCDR3 parental SEQ ID NO: 5. Os Anticorpos 7, 8, 10, 16-19, 21 e 23 não contêm o resíduo 95 de Kabat em LCDR3, enquanto a LCDR3 parental (SEQ ID NO: 10) compreende Pro no resíduo 95 de Kabat. As sequências de HCDR3 e HCDR3 parental de todos os anticorpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 e 23 têm Trp no resíduo 95 de Kabat e Asp no resíduo 101 de Kabat, indicando que Trp H95 e Asp H101 podem contribuir com a ligação e/ou potência para IL-6 na ligação de membros da invenção.

Domínio VH, domínio VL e sequências CDR do anticorpo parental CAN022D10 e dos anticorpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 e 23, como descrito aqui, são mostrados na listagem de sequências anexada.

Conforme descrito em maiores detalhes abaixo, membros de ligação de acordo com a invenção demonstraram neutralizar IL-6 com alta potência. A neutralização significa inibição de uma atividade biológica de IL-6. Membros de ligação da invenção podem neutralizar um ou mais atividades de IL-6. A atividade biológica inibida é tipicamente ligação de IL-6 a um ou mais de seus pares de ligação. Por exemplo, a atividade biológica inibida pode ser ligação de IL-6 a IL-6R $\alpha$  transmembranar e/ou solúvel. Isto é demonstrado nos seguintes ensaios, que são descritos resumidamente aqui e

em maiores detalhes abaixo: o ensaio TF-1 mostra que membros de ligação de acordo com a invenção inibem a ligação de IL-6 a IL-6Ra de membrana visto que as células TF-1 não parecem produzir IL-6Ra solúvel. Como tal, os membros de ligação da invenção, portanto, inibem a ligação de IL-6 ao receptor de membrana. No ensaio de fibroblasto sinovial, membros de ligação de acordo com a invenção inibem a ligação de IL-6 a IL-6Ra solúvel visto que sIL-6Ra precisa ser adicionado a este ensaio para que ele funcione. A IL-1beta adicionada induz produção de IL-6 endógena que quando inibida por um membro de ligação desta invenção previne a produção de VEGF.

De acordo com a invenção, a ligação de IL-6 de primata humano ou não humano, p. ex., cinomolgo, a IL-6R $\alpha$  pode ser inibida, p. ex., um membro de ligação pode inibir a ligação de IL-6 humana madura a IL-6R $\alpha$ .

A inibição na atividade biológica pode ser parcial ou total. Membros de ligação podem inibir a atividade biológica de IL-6 em 100%, ou em pelo menos 95%, pelo menos 90%, pelo menos 85%, pelo menos 80%, pelo menos 75%, pelo menos 70%, pelo menos 60%, ou pelo menos 50% da atividade na ausência do membro de ligação.

A potência neutralizante de um membro de ligação pode ser determinada. A potência é normalmente expressa como um valor de IC<sub>50</sub>, em nM a menos que definido de outro modo. Em ensaios funcionais, o IC<sub>50</sub> é a concentração de um membro de ligação que reduz uma resposta biológica em 50% do seu máximo. Em estudos de ligação a ligante, o IC<sub>50</sub> é a concentração que reduz a formação do complexo ligante-receptor em 50% do nível de ligação específico máximo. O IC<sub>50</sub> pode ser calculado pela plotagem da % de resposta biológica máxima como uma função do log da concentração de membro de ligação e, usando um programa de computação, tal como Prism (GraphPad) ou Origin (Origin Labs) para por uma função de sigmóide para os dados para gerar valores de IC<sub>50</sub>. A potência pode ser determinada ou medida

usando um ou mais ensaios conhecidos de pessoas versadas e/ou conforme descritos ou referidos aqui.

A neutralização da atividade de IL-6 por um membro de ligação em um ensaio descrito aqui, p. ex., o ensaio de proliferação ou outros ensaios baseados em células descritos abaixo, indica que o membro de ligação se liga a e neutraliza IL-6. Outros métodos que podem ser usados para determinar ligação de um membro de ligação a IL-6 incluem ELISA, transferência de Western, imunoprecipitação, cromatografia de afinidade e ensaios bioquímicos.

Foi demonstrado que membros de ligação descritos aqui se ligam e neutralizam efeitos biológicos de IL-6 humana endógena, conforme mostrado em um ensaio de inibição de liberação de VEGF a partir de fibroblastos sinoviais humanos em resposta a IL-6 humana endógena, relatado nos Exemplos 1.7 e 2.7 aqui. Neste ensaio, fibroblastos sinoviais de pacientes com artrite reumatóide produzem IL-6 em resposta a estímulo com IL-1 $\beta$  e IL-6R $\alpha$  solúvel, levando à secreção induzida por IL-6 de VEGF. A IL-6 produzida pelos fibroblastos sinoviais humanos representa assim IL-6 humana endógena. IL-6 endógena é o alvo molecular para tratamento médico em humanos, portanto, a neutralização de IL-6 endógena é um indicador importante do potencial terapêutico dos membros de ligação. Visto que os ensaios foram conduzidos com fibroblastos sinoviais obtidos de pacientes com artrite reumatóide, os resultados são particularmente relevantes para uso dos membros de ligação para tratar artrite reumatóide. A potência de neutralização de moléculas de anticorpo otimizadas testadas no ensaio de liberação de VEGF superou aquela do anticorpo anti-IL-6 CNTO-328.

Um membro de ligação de acordo com a invenção pode ter um IC<sub>50</sub> de menos de 50 nM, p. ex., menos de 5 nM, p. ex., menos de 1 nM em um ensaio de inibição de liberação de VEGF a partir de fibroblastos sinoviais humanos estimulados com 0,6 pM de IL-1 $\beta$  humana e 2,4 nM de IL-6R $\alpha$

humana solúvel.

A IL-6 endógena é conhecida como sendo uma mistura de formas glicosiladas e não glicosiladas. A ligação de um membro de ligação da invenção a IL-6 endógena foi demonstrada no ensaio de fibroblasto sinovial visto que este ensaio utiliza IL-6 de fibroblastos sinoviais humanos, isto é, IL-6 endógena.

Um membro de ligação da invenção pode inibir proliferação de células TF-1 induzida por IL-6. TF-1 é uma linhagem celular pré-mielóide humana estabelecida a partir de um paciente com eritroleucemia (Kitamura *et al.*, 1989). A linhagem celular TF-1 requer a presença de um fator de crescimento para sobrevivência e proliferação. Os fatores de crescimento de células TF-1 individuais podem responder a, incluindo IL-6, GM-CSF e Oncostatina M. Um membro de ligação da invenção pode ter um IC<sub>50</sub> de menos de 100 nM, p. ex., menos de 20 nM, 10 nM, ou 1 nM, p. ex., menos de 100 pM, 70 pM, 50 pM, 40 pM, 30 pM, 20 pM ou 10 pM, em um ensaio para inibição de proliferação de células TF-1 em resposta a 20 pM de IL-6 humana. Conforme aqui descrito (veja o Exemplo 1.5), demonstrou-se que uma IgG “CAN022D10” parental tem um IC<sub>50</sub> no ensaio de proliferação de TF-1 de cerca de 93 nM e nós subsequentemente geramos variantes otimizadas de CAN022D10 que têm potência consideravelmente aumentada (IC<sub>50</sub> geralmente de menos de 100 pM), conforme mostrado nos Exemplos 2.2, 2.5 e 2.6 (Tabelas 3, 4 e 5, respectivamente). Notadamente, valores de IC<sub>50</sub> para alguns dos clones otimizados foram medidos como estando baixos como 5 pM ou menos, por exemplo o anticorpo 7, anticorpo 17 e anticorpo 18 de IgG de linhagem germinativa, representando potência de neutralização extremamente alta desses anticorpos.

Um membro de ligação da invenção pode inibir proliferação de células B9 induzida por IL-6. Células B9 são um subclone da linhagem celular de hibridoma de células B murina, B13.29, selecionado com base em

5 suas respostas específicas para IL-6. Células B9 requerem IL-6 para sobrevivência e proliferação e respondem a concentrações muito baixas de IL-6. Como tal, a proliferação dessas células na presença de um anticorpo de IL-6 pode ser avaliada e a afinidade do anticorpo determinada. O Exemplo 2.10 aqui mostra que o Anticorpo 18 inibiu a proliferação de células B9 em resposta a IL-6 e mostrou alta afinidade neste ensaio.

A produção de auto-anticorpo em artrite reumatóide é em geral da classe IgM. SKW6.4 é uma linhagem de células B linfoblastóide humana secretora de IgM clonal. Sob estímulo com IL-6 essas células secretam IgM, assim este ensaio foi percebido como sendo relevante para artrite reumatóide. Células SKW6.4 podem ser usadas em um ensaio para determinar a potência de membros de ligação na neutralização de IL-6, pela determinação da inibição de secreção de IgM em resposta a IL-6. Um membro de ligação da invenção pode ter um  $IC_{50}$  de menos de 10 pM, p. ex., menos de 5 pM, em um ensaio de células SKW6.4 de inibição de secreção de IgM em resposta a 100 pM de IL-6 humana. Mostrou-se que o anticorpo 18 neutraliza efeitos de IL-6 neste ensaio – veja o Exemplo 2.11 (Tabela 9).

A invenção provê membros de ligação de alta afinidade para IL-6 humana. Alta afinidade para IL-6 de macaco cinomolgo também foi demonstrada. Um membro de ligação da invenção pode se ligar a IL-6 humana e/ou IL-6 de cinomolgo com uma  $K_D$  de não mais que 1 nM, p. ex., não mais que 100 pM, 50 pM, 30 pM ou 10 pM. A  $K_D$  pode ser determinada por ressonância de plasma de superfície, p. ex., BIAcore®. Medições de BIAcore® da afinidade são descritas aqui no Exemplo 2.9. Extraordinariamente, descobriu-se que a afinidade dos Anticorpos 7 e 18 estava além dos limites de medição usando o instrumento de BIAcore®, indicando um valor de  $K_D$  abaixo de 10 pM.

Conforme descrito em outros lugares aqui, ressonância de plasma de superfície envolve passar um analito em fase fluida por um ligante

aderido a um suporte e determinar a ligação entre analito e ligante. Ressonância de plasma de superfície pode, por exemplo, ser realizada pelo qual IL-6 é passada na fase fluida por um membro de ligação aderido a um suporte. Dados de ressonância de plasma de superfície podem ser encaixados em um modelo de dados de analito monovalente. Uma constante de afinidade  $K_d$  pode ser calculada a partir da razão de constantes de taxas  $k_d/k_a$  como determinado por ressonância de plasma de superfície usando um modelo de dados de analito monovalente.

Senão, a afinidade de um membro de ligação para IL-16 pode ser calculada por análise de Schild, p. ex., com base em um ensaio de inibição de proliferação de células TF-1 em resposta a concentrações variadas de IL-6 humana. Um membro de ligação da invenção pode ter uma afinidade de menos de 10 pM, p. ex., menos de 1 pM, como calculado por análise de Schild. Como relatado no Exemplo 2.10 aqui, a afinidade do anticorpo 18 por IL-6 humana foi calculada como 0,4 pM usando análise de Schild.

Um membro de ligação da invenção pode opcionalmente não reagir cruzadamente com um ou mais, ou todos, dentre os seguintes: fator inibitório de leucemia (LIF), fator neurotrófico ciliar (CNTF), IL-11 ou oncostatina M.

Um membro de ligação da invenção pode opcionalmente não reagir cruzadamente com IL-6 de rato, IL-6 de camundongo e/ou IL-6 de cachorro.

A reatividade cruzada de membros de ligação pela ligação a outras proteínas ou IL-6 não humana pode ser testado, por exemplo, em um ensaio de fluorescência resolvido por tempo para inibição de ligação de IL-6 humana ao membro de ligação imobilizado em um suporte, tal como o ensaio de competição de epítipo DELFIA® como descrito no Exemplo 1.6. Por exemplo, qualquer um ou todos dentre LIF, CNTF, IL-11, oncostatina M, IL-6 de rato e IL-6 de camundongo podem mostrar nenhuma inibição, menos de

50% de inibição, ou podem ter um  $IC_{50}$  maior que 0,5 mM ou maior que 1 mM no ensaio de um ensaio de fluorescência resolvido por tempo para inibição de ligação de IL-6 humana marcada ao membro de ligação imobilizado em um suporte. Por exemplo, qualquer um ou todos dentre LIF, CNTF, IL-11, oncostatina M, IL-6 de rato e IL-6 de camundongo podem mostrar nenhuma inibição ou podem ter um  $IC_{50}$  de pelo menos 10 ou 100 vezes maior que aquele de IL-6 humana não marcada no ensaio de fluorescência resolvido por tempo para testar reatividade cruzada. Neste ensaio, IL-6 humana madura selvagem marcada é usada em uma concentração final da  $K_d$  de sua interação com o membro de ligação.

Um membro de ligação desta invenção pode reagir cruzadamente com IL-6 de cinomolgo. A reatividade cruzada pode ser determinada como inibição de ligação de IL-6 humana marcada ao membro de ligação imobilizado em um suporte, no ensaio de fluorescência resolvido por tempo descrito acima. Por exemplo, IL-6 de cinomolgo pode ter um  $IC_{50}$  de menos de 5 nM, p. ex., menos de 2,5 mM, p. ex., cerca de 1 nM, neste ensaio de fluorescência resolvido por tempo. A IL-6 de cinomolgo pode ter um  $IC_{50}$  de menos de 10 vezes de diferença, p. ex., menos de 5 vezes de diferença, de  $IC_{50}$  de IL-6 humana não marcada neste ensaio.

Um protocolo detalhado para o ensaio de fluorescência resolvido por tempo para determinar reatividade cruzada é provido na seção de Materiais e Métodos. Exemplos de dados de reatividade cruzada obtidos neste ensaio são mostrados na Tabela 2 no Exemplo 1.6.

Como relatado no Exemplo 2.8, membros de ligação descritos aqui mostraram alta reatividade cruzada com IL-6 de cinomolgo e mostraram nenhuma reatividade cruzada ou limitada com IL-6 de rato, camundongo ou cachorro.

Os dados de reatividade cruzada indicam que os membros de ligação descritos aqui se ligam a um epítipo em IL-6 que é conservado entre

as sequências de IL-6 humana e de cinomolgo e é diferente na sequência de IL-6 de camundongo, rato e cachorro comparadas com a sequência humana.

Acredita-se que os membros de ligação descritos aqui se liguem à região de “sítio 1” de IL-6, que é a região que interage com IL-6R $\alpha$ .

- 5    Membros de ligação da invenção podem assim inibir competitivamente a ligação de IL-6 a IL-6R $\alpha$ , neutralizando desse modo efeitos biológicos de IL-6 que são medidos através de IL-6R $\alpha$ .

Investigou-se a habilidade de um dos anticorpos descritos aqui, anticorpo 18, em se ligar a IL-6 humana mutante, em que mutações foram  
10    engenheiradas em resíduos do sítio 1. Como, descrito no Exemplo 3, nós identificamos mutações na IL-6 humana que resultaram em ligação reduzida com anticorpo 18, indicando que os resíduos mutados estavam envolvidos no reconhecimento pelo anticorpo 18 e podem formar parte do epítopo em IL-6 ligado por este anticorpo.

15    Por exemplo, em um ensaio de fluorescência resolvido por tempo para inibição de ligação de IL-6 humana selvagem marcada ao anticorpo 18 imobilizado em um suporte, nenhuma inibição foi observada para IL-6 humana mutante Arg207Glu (SEQ ID NO: 177), indicando que o anticorpo 18 se liga a IL-6 humana no resíduo Arg207.

20    Visto que o anticorpo 18 e os anticorpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 19, 21, 22 e 23 foram todos derivados de um anticorpo parental CAN22C10 e todos têm CDRs estruturalmente relacionadas, espera-se que todas essas moléculas de anticorpo se liguem ao mesmo epítopo ou sobreposto muito similar. Consequentemente, também se espera que os  
25    resultados de mapeamento de epítopo obtidos com o anticorpo 18 sejam representativos para CAN22D10 os outros anticorpos otimizados descritos aqui.

Um membro de ligação da invenção pode se ligar a IL-6 humana em Phe102 e/ou Ser204. Um membro de ligação da invenção também

pode se ligar a IL-6 humana em Arg207. Opcionalmente, um membro de ligação pode ser ligar a resíduos flanqueadores ou resíduos estruturalmente vizinhos na molécula de IL-6, além da ligação em Phe102 e/ou Ser204. Por convenção, a numeração de resíduos corresponde a IL-6 humana completa (SEQ ID NO: 161). Entretanto, a ligação pode ser determinada usando IL-6 humana madura. A ligação a resíduos de IL-6 é como determinado por mutagênese sítio-dirigida, como explicado abaixo.

A mutagênese de aminoácidos únicos e regiões de proteínas a fim de correlacionar estrutura com atividade é bem conhecida por alguém versado na técnica e tem sido usada para definir regiões de proteínas que se ligam a anticorpos [41]. A ligação a e/ou neutralização de IL-6 humana mutantes pode ser usada para avaliar se um membro de ligação se liga a Phe102, Ser204 e/ou Arg207. A ausência de ligação ou neutralização, ou ligação ou neutralização significativamente reduzida, com IL-6 mutante comparada com a selvagem indica que um membro de ligação se liga ao resíduo mutado.

A ligação a um resíduo em IL-6 pode ser determinada usando IL-6 mutada no resíduo selecionado em um ensaio de fluorescência resolvido por tempo de inibição de ligação de IL-6 humana selvagem marcada ao membro de ligação imobilizado em um suporte, em que a IL-6 humana madura selvagem marcada está em uma concentração final igual à  $K_d$  de sua interação com o membro de ligação. Um exemplo destes dados de competição e ensaio obtidos são mostrados no Exemplo 3, com resultados apresentados na Tabela 10. Quando a IL-6 mutante não inibe a ligação de IL-6 selvagem marcada ao membro de ligação, ou quando a IL-6 mutante tem um  $IC_{50}$  maior que aquele da IL-6 selvagem não marcada (p. ex., mais de 10 vezes ou 100 vezes maior), isto indica que o resíduo mutado está ligado ao membro de ligação.

IL-6 humana mutante Phe102Glu (SEQ ID NO: 175), IL-6

humana mutante Ser204Glu (SEQ ID NO: 176) e/ou IL-6 humana mutante Arg207Glu (SEQ ID NO: 177) pode mostrar nenhuma inibição, ou pode ter um  $IC_{50}$  mais de 100 vezes maior que o  $IC_{50}$  de IL-6 humana selvagem (SEQ ID NO: 165), em um ensaio de fluorescência resolvido por tempo para inibição de ligação de IL-6 humana selvagem marcada a um membro de ligação da invenção imobilizado em um suporte, em que a IL-6 humana selvagem marcada está em uma concentração final igual à  $K_d$  de sua interação com o membro de ligação.

Um membro de ligação da invenção pode opcionalmente não se ligar a e/ou neutralizar IL-6 humana mutante que tem uma mutação no resíduo Phe102, Ser204 e/ou Arg207, p. ex., mutação Phe102Glu, Ser204Glu, Ser204Tyr e/ou Arg207Glu. Exemplos de sequências de IL-6 humana mutante são SEQ ID NOS: 175-177. Assim, um membro de ligação da invenção pode não inibir a ligação de uma ou mais dessas moléculas de IL-6 mutante a IL-6R $\alpha$ .

Um membro de ligação da invenção pode compreender uma molécula de anticorpo, p. ex., uma molécula de anticorpo humano. O membro de ligação normalmente compreende um domínio VH e/ou VL de anticorpo. Domínios VH e VL de membros de ligação também são providos como parte da invenção. Dentro de cada domínio VH e VL estão regiões determinantes de complementaridade (“CDRs”) e regiões estruturais (“FRs”). Um domínio VH compreende um grupo de HCDRs e um domínio VL compreende um grupo de LCDRs. Uma molécula de anticorpo pode compreender um domínio VH de anticorpo compreendendo uma CDR1, CDR2 e CDR3 de VH e uma estrutura. Senão ou também, ela pode compreender um domínio VL de anticorpo compreendendo uma CDR1, CDR2 e CDR3 de VL e uma estrutura. Uma estrutura de domínio VH ou VL compreende quatro regiões estruturais, FR1, FR2, FR3 e FR4, intercaladas com CDRs na seguinte estrutura:

FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

Exemplos de domínios VH e VL e CDRs de anticorpo de acordo com a presente invenção são listados na listagem de sequências anexada que forma parte da presente divulgação. CDRs adicionais são divulgadas abaixo e na Tabela 7. Todas as sequências de VH e VL, 5 sequências de CDR, grupos de CDRs e grupos de HCDRs e grupos de LCDRs aqui divulgados representam aspectos e modalidades da invenção. Conforme aqui descrito, um “grupo de CDRs” compreende CDR1, CDR2 e CDR3. Assim, um grupo de HCDRs se refere a HCDR1, HCDR2 e HCDR3 e um grupo de LCDRs se refere a LCDR1, LCDR2 e LCDR3. A menos que 10 indicado de outro modo, um “grupo de CDRs” inclui HCDRs e LCDRs.

Tipicamente, membros de ligação da invenção são anticorpos monoclonais.

Um membro de ligação da invenção pode compreender um sítio de ligação a antígeno dentro de uma molécula não anticorpo, 15 normalmente provida por uma ou mais CDRs, p. ex., um grupo de CDRs em uma armação proteica não anticorpo, como discutido adicionalmente abaixo.

Aqui é descrito um membro de ligação compreendendo o grupo parental de CDRs como mostrado na Tabela 7 para CAN022D10 parental, em que HCDR1 é SEQ ID NO: 3 (resíduos de Kabat 31-35), 20 HCDR2 é SEQ ID NO: 4 (resíduos de Kabat 50-65), HCDR3 é SEQ ID NO: 5 (resíduos de Kabat 95-102), LCDR1 é SEQ ID NO: 8 (resíduos de Kabat 24-34), LCDR2 é SEQ ID NO: 9 (resíduos de Kabat 50-56) e LCDR3 é SEQ ID NO: 10 (resíduos de Kabat 89-97).

Um membro de ligação da invenção pode compreender uma 25 ou mais CDRs como aqui descrito, p. ex., uma CDR3 e opcionalmente também uma CDR1 e CDR2 para formar um grupo de CDRs. A CDR ou grupo de CDRs pode ser uma CDR parental ou grupo parental de CDRs, ou pode ser uma CDR ou grupo de CDRs de quaisquer dos anticorpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 ou 23, ou pode ser uma variante dessas

como descrito aqui.

Por exemplos, um membro de ligação ou um domínio VL de acordo com a invenção pode compreender uma LCDR3 que tem uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 120.

5 Um membro de ligação pode compreender um grupo de CDRs H e/ou L do anticorpo parental ou qualquer dos anticorpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 ou 23 com uma ou mais mutações de aminoácidos dentro do grupo divulgado de CDRs H e/ou L. Mutações de aminoácidos são substituições, deleções ou inserções de um aminoácido. Por exemplo, pode  
10 haver até 20, p. e., até 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 ou 2 mutações, p. ex., substituições, dentro do grupo de CDRs H e/ou L. Por exemplo, pode haver até 6, 5, 4, 3 ou 2 mutações, p. ex., substituições, em HCDR3 e/ou pode haver até 6, 5, 4, 3 ou 2 mutações, p. ex., substituições, em LCDR3. HCDR3 e/ou LCDR3 podem opcionalmente conter uma inserção ou deleção de um  
15 aminoácido quando comparadas com o grupo divulgado de H e/ou LCDRs. As substituições podem, por exemplo, ser nas posições substituídas em qualquer dos anticorpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 ou 23, como mostrado na Tabela 7. Assim, substituições podem opcionalmente ser em números de Kabat selecionados a partir dos seguintes:

20 Resíduo de Kabat 35 em HCDR1;  
Resíduo de Kabat 64 em HCDR2;  
Resíduo de Kabat 96, 97, 98, 99, 100, 100A, 100B, 100C e/ou  
102 em HCDR3;

Resíduo de Kabat 34 em LCDR1;  
25 Resíduo de Kabat 89, 90, 91, 92, 93, 94, 96 ou 97 em LCDR3.  
As mutações de aminoácidos podem compreender mutações como mostrado na Tabela 7, p. ex., substituições de aminoácidos como indicado.

Por exemplo, um membro de ligação ou domínio VH de

acordo com a invenção pode compreender a HCDR1 parental com o resíduo de Kabat Ile 35 trocado por Thr ou Val.

Um membro de ligação ou um domínio VH de acordo com a invenção pode compreender a HCDR2 parental com o resíduo de Kabat Lys  
5 64 trocado por Arg.

Um membro de ligação ou um domínio VH pode compreender a HCDR3 parental com uma ou mais das seguintes mutações:

Resíduo de Kabat Ala 96 trocado por Glu;  
Resíduo de Kabat Asp 97 trocado por Glu ou Asn;  
10 Resíduo de Kabat Asp 98 trocado por Gly, Glu ou His;  
Resíduo de Kabat His 99 trocado por Gly ou Thr;  
Resíduo de Kabat Tyr 100 trocado por Pro, Asn, Arg, Trp ou Ala;

Resíduo de Kabat Tyr 100A trocado por Ala, Arg, Thr, Gly,  
15 Asn, Pro ou Ser;

Resíduo de Kabat 100B trocado por His, Trp, Gln, Pro ou Thr;  
Resíduo de Kabat Ile 100C trocado por Ala, Val, His, Tyr ou Leu;

Ile inserido no resíduo de Kabat 100D;  
20 Resíduo de Kabat Val 102 é trocado por Leu, His, Met ou Ile.

Assim, um membro de ligação ou um domínio VH da invenção pode compreender uma HCDR3 em que o resíduo de Kabat 100D é Ile ou em que o resíduo de Kabat 100D está ausente.

Um membro de ligação ou um domínio VL da invenção pode  
25 compreender a LCDR1 parental em que o resíduo de Kabat Ala 34 é trocado por Thr.

Um membro de ligação de um domínio VL da invenção pode compreender LCDR3 parental com uma ou mais das seguintes mutações:

Resíduo de Kabat Gln 89 trocado por Met ou Ala;

Resíduo de Kabat Gln 90 trocado por Asn, Ser ou Ala;  
 Resíduo de Kabat Ser 91 trocado por Asn, Gly, Ala ou His;  
 Resíduo de Kabat Tyr 92 trocado por Trp, Ser, Lys ou Phe;  
 Resíduo de Kabat Ser 93 trocado por Leu, Lys, Arg ou Ala;  
 5 Resíduo de Kabat Thr 94 trocado por Ala, Gly ou Pro;  
 Resíduo de Kabat Pro 95 deletado;  
 Resíduo de Kabat Trp 96 trocado por Gly;  
 Resíduo de Kabat Thr 97 trocado por Ser.

Assim, um membro de ligação ou um domínio VL da invenção  
 10 pode compreender uma LCDR3 em que o resíduo Kabat 95 é Pro ou em que o  
 resíduo de Kabat 95 está ausente.

A invenção provê um membro de ligação isolado para IL-6  
 humana compreendendo um grupo de CDRs: HCDR1, HCDR2, HCDR3,  
 LCDR1, LCDR2 e LCDR3, em que o grupo de CDRs tem 22 ou menos  
 15 alterações de aminoácidos, p. ex., até 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11,  
 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 alteração ou nenhuma alteração, a partir de um  
 grupo de CDRs em que:

HCDR1 tem sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;  
 HCDR2 tem sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4;  
 20 HCDR3 tem sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 115;  
 LCDR1 tem sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;  
 LCDR2 tem sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 e  
 LCDR3 tem sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 120.

Uma alteração de aminoácido pode ser uma substituição,  
 25 inserção ou deleção. Exemplos de posições de Kabat que podem ser  
 substituídas e exemplos de substituições de resíduos são discutidos abaixo e a  
 Tabela 7 ilustra algumas das substituições.

Como mostrado na Tabela 7, o comprimento de HCDR3 e  
 LCDR3 variou entre diferentes anticorpos otimizados descritos aqui. Em

relação às CDRs parentais de CAN022D10, uma inserção entre os resíduos de Kabat 100 e 102 (mostrada na Tabela 7 no resíduo de Kabat 100D) foi observada em alguns anticorpo e uma deleção entre os resíduos de Kabat 92 e 97 foi observada em outros anticorpos. A deleção no resíduo de Kabat 95 não foi observada em combinação com a inserção. Assim, pode ser vantajoso para as mais compridas, sequências de HCDR3 de 12 resíduos serem combinadas com a as mais compridas, sequências de LCDR3 de 9 resíduos e pode ser vantajoso para as mais curtas, sequências de HCDR3 de 11 resíduos serem combinadas com as mais curtas, sequências de LCDR3 de 8 resíduos.

De acordo com o sistema de numeração de Kabat, resíduos de LCDR3 são numerados de 89 até 97. Sequências de LCDR3 mais curtas que 9 resíduos não são previstas pelo sistema de numeração de Kabat. Na presente invenção, membros de ligação podem ter uma LCDR3 mais curta que 9 resíduos, p. ex., LCDR3 pode ser de 8 resíduos de comprimento, como mostrado na Tabela 7. Nós numeramos os 8 resíduos de LCDR3 89, 90, 91, 92, 93, 94, 96 e 97, respectivamente. Na Tabela 7, deleção é mostrada assim, no resíduo de Kabat 95. Entretanto, será apreciado que o efeito da deleção é reduzir o comprimento da sequência de LCDR3 e que em princípio a deleção poderia ser considerada para ser feita em qualquer um dos resíduos de 89 até 97, p. ex., qualquer um dos resíduos de 92 até 97.

Em HCDR3, o sistema de numeração de Kabat acomoda variabilidade no comprimento de CDR pela extensão do sistema de numeração entre os resíduos de Kabat 100 e 101, p. ex., incluindo o resíduo 100A para uma HCDR3 de 9 resíduos, mais 100B para uma HCDR3 de 10 resíduos, mais 100C para uma HCDR3 de 11 resíduos, mais 100D para uma HCDR3 de 12 resíduos, como apropriado. Na Tabela 7, a inserção de um aminoácido adicional na HCDR3 de alguns dos clones otimizados em relação à HCDR3 parental é mostrada no resíduo de Kabat 100D. Entretanto, será apreciado que em princípio esta inserção pode ser considerada para ser feita

em qualquer um dos resíduos de Kabat 100 até 102.

Como demonstrado aqui, uma ou mais inserções ou deleções podem estar presentes em uma ou mais CDRs de um membro de ligação, p. ex., uma HCDR3 e/ou LCDR3. Por exemplo, um membro de ligação da invenção pode compreender um grupo de CDRs de qualquer um dos anticorpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 e 23, ou uma variante destes como descrito aqui, em que cada CDR opcionalmente tem uma inserção para aumentar o comprimento da CDR em um resíduo ou tem uma deleção de um resíduo para diminuir o comprimento da CDR em um resíduo.

10 Inserções e/ou deleções podem ser feitas em HCDRs e/ou em LCDRs, p. ex., em uma HCDR3 e/ou em uma LCDR3.

Por exemplo, um membro de ligação pode, por exemplo, compreender um grupo de CDRs que tem 20 ou menos substituições de aminoácidos em um grupo de CDRs em que:

- 15 HCDR1 tem sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;
  - HCDR2 tem sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4;
  - HCDR3 tem sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 115;
  - LCDR1 tem sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;
  - LCDR2 tem sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 e
  - 20 LCDR3 tem sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 120;
- em que o membro de ligação opcionalmente tem uma inserção de um resíduo para aumentar o comprimento da HCDR3 ou uma deleção de um resíduo para diminuir o comprimento da HCDR3 e/ou
- tem uma inserção de um resíduo para aumentar o comprimento da LCDR3 ou uma deleção de um resíduo para diminuir o comprimento da LCDR3.
- 25

Um membro de ligação da invenção pode ter uma inserção de um resíduo em HCDR3 SEQ ID NO: 115 e/ou uma inserção de um resíduo em LCDR3 SEQ ID NO: 120.

Inserções ou deleções podem ser feitas em qualquer ponto nas CDRs. Por exemplo, inserções ou deleções em HCDR3 podem ser de qualquer um dos resíduos de Kabat de 95-102, p. ex., qualquer um dos resíduos de Kabat de 100-102. Por exemplo, inserções ou deleções em  
 5 LCDR3 podem ser de qualquer um dos resíduos de Kabat de 89 até 97, p. ex., qualquer um dos resíduos de Kabat de 92 até 97.

Um membro de ligação ou domínio VH da invenção pode compreender uma HCDR1 em que o resíduo de Kabat 35 é Ile, Thr ou Val.

Um membro de ligação ou domínio VH da invenção pode  
 10 compreender uma HCDR2 em que o resíduo de Kabat 64 é Lys ou Arg.

Um membro de ligação ou domínio VH da invenção pode compreender uma HCDR3 em que o resíduo de Kabat 95 é Trp e/ou o resíduo de Kabat 101 é Asp.

Um membro de ligação ou domínio VH da invenção pode  
 15 compreender uma HCDR3 em que:

Resíduo de Kabat 96 é Ala ou Glu;

Resíduo de Kabat 97 é Asp, Glu ou Asn;

Resíduo de Kabat 98 é Asp Gly, Glu ou His;

Resíduo de Kabat 99 é His, Gly ou Thr;

20 Resíduo de Kabat 100 é Pro, Tyr, Asn, Arg, Trp ou Ala;

Resíduo de Kabat 100A é Pro, Tyr Ala, Arg, Thr, Gly, Asn ou Ser;

Resíduo de Kabat 100B é Trp, Tyr, His, Gln, Pro ou Thr;

Resíduo de Kabat 100C é Ile, Ala, Val, His, Tyr ou Leu e

25 Resíduo de Kabat 102 é Leu, Val, His, Met ou Ile.

Um membro de ligação ou domínio ou domínio VL da invenção pode compreender uma LCDR1 em que o resíduo de Kabat 34 é Ala ou Thr.

Um membro de ligação ou domínio VL da invenção pode

compreender uma LCDR3 em que:

Resíduo de Kabat 89 é Gln, Met ou Ala;

Resíduo de Kabat 90 é Gln, Asn, Ser ou Ala;

Resíduo de Kabat 91 é Ser, Asn, Gly, Ala ou His;

5 Resíduo de Kabat 92 é Trp, Tyr, Ser, Lys ou Phe;

Resíduo de Kabat 93 é Leu, Ser, Lys, Arg ou Ala;

Resíduo de Kabat 94 é Gly, Thr, Ala ou Pro;

Resíduo de Kabat 96 é Gly ou Trp e

Resíduo de Kabat 97 é Ser ou Thr.

10 A invenção provê membros de ligação compreendendo uma HCDR1, HCDR2 e/ou HCDR3 do anticorpo parental ou qualquer um dentre 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 e 23 e/ou uma LCDR1, LCDR2 e/ou LCDR3 do anticorpo parental ou qualquer um dentre 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 e 23, p. ex., um grupo de CDRs do anticorpo  
15 parental ou qualquer um dentre 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 e 23 mostrados na Tabela 7.

Por exemplo, um membro de ligação da invenção pode compreender um grupo de CDRs: HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 e LCDR3, em que: HCDR1 é SEQ ID NO: 113; HCDR2 é SEQ ID  
20 NO: 114; HCDR3 é SEQ ID NO: 115; LCDR1 é SEQ ID NO: 118; LCDR2 é SEQ ID NO: 119 e LCDR3 é SEQ ID NO: 120, representando as CDRs do anticorpo 18.

O membro de ligação pode compreender um grupo de CDRs VH de um desses anticorpos. Opcionalmente, ele também pode compreender  
25 um grupo de CDRs VL de um desses anticorpos e as CDRs VL podem ser do mesmo anticorpo ou de um diferente das CDRs VH.

Um domínio VH compreendendo um grupo de HCDRs do anticorpo parental ou qualquer um dentre 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 e 23 e/ou um domínio VL compreendendo um grupo de LCDRs do

anticorpo parental ou qualquer um dentre 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 e 23 também são providos pela invenção.

Tipicamente, um domínio VH está pareado com um domínio VL para prover um sítio de ligação a antígeno de anticorpo, embora, como  
5 discutido adicionalmente abaixo, um domínio VH ou VL sozinho possa ser usado para ligar-se a antígeno. O domínio VH de anticorpo 2 pode ser pareado com o domínio VL de anticorpo 2, para que um sítio de ligação a antígeno de anticorpo seja formado compreendendo tanto o domínio VH como o VL de anticorpo 2. Modalidades análogas são providas para os outros  
10 domínios VH e VL divulgados aqui. Em outras modalidades, o VH de anticorpo 2 é pareado com um domínio VL fora o VL do anticorpo. A promiscuidade da cadeia leve é bem estabelecida na técnica. Novamente, modalidades análogas são providas pela invenção para os outros domínios VH e VL divulgados aqui.

15 Assim, o VH do anticorpo parental ou qualquer um dentre 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 e 23 pode estar pareado com o VL do anticorpo parental ou qualquer um dentre 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 e 23.

Um membro de ligação pode compreender uma molécula de  
20 anticorpo que tem uma ou mais CDRs, p. ex., um grupo de CDRs, dentro de uma estrutura de anticorpo. Por exemplo, uma ou mais CDRs ou um grupo de CDRs de um anticorpo pode ser enxertado em uma estrutura (p. ex., estrutura humana) para prover uma molécula de anticorpo. As regiões estruturais podem ser de sequências de segmento gênico de linhagem germinativa  
25 humana. Assim, a estrutura pode ser tornada de linhagem germinativa, pela qual um ou mais resíduos dentro da estrutura são alterados para estarem de acordo com os resíduos na posição equivalente na estrutura de linhagem germinativa humana mais similar. A pessoa versada pode selecionar um segmento de linhagem germinativa que é mais próximo em sequência à

sequência estrutural do anticorpo antes de ser tornado de linhagem germinativa e testar a afinidade ou atividade dos anticorpo para confirmar que o processo de se alterar para linhagem germinativa não reduz significativamente a ligação a antígeno ou potência em ensaios descritos aqui.

- 5 Sequências de segmento gênico de linhagem germinativa humana são conhecidas por aqueles versados na técnica e podem ser acessadas, por exemplo, a partir da compilação de VBase.

Um membro de ligação da invenção pode ser uma molécula de anticorpo humano isolado que tem um domínio VH compreendendo um grupo de HCDRs em uma estrutura de linhagem germinativa humana, p. ex., Vh3\_DP-86\_(3-66). Assim, as regiões estruturais de domínio VH FR1, FR2 e/ou FR3 podem compreender regiões estruturais de segmento gênico de linhagem germinativa humana Vh3\_DP-86\_(3-66) e/ou podem ser tornados de linhagem germinativa pela mutação de resíduos estruturais para ficarem de acordo com os resíduos estruturais deste segmento gênico de linhagem germinativa humana. FR4 pode compreender uma região estrutural de segmento JH2 de linhagem germinativa j humana. A sequência de aminoácidos FR1 de VH pode ser SEQ ID NO: 167. A sequência de aminoácidos FR2 de VH pode ser SEQ ID NO: 168. A sequência de aminoácidos FR3 de VH pode ser SEQ ID NO: 169. A sequência de aminoácidos FR4 de VH pode ser SEQ ID NO: 170.

Normalmente, o membro de ligação também tem um domínio VL compreendendo um grupo de LCDRs, p. ex., em uma estrutura de linhagem germinativa humana, p. ex., Vk1\_L12. Assim, as regiões estruturas de domínio VL podem compreender regiões estruturais FR1, FR2 e/ou FR3 de segmento gênico de linhagem germinativa humana Vk1\_L12 e/ou podem ser tornadas de linhagem germinativa pela mutação de resíduos estruturais para ficarem de acordo com os resíduos estruturais deste segmento gênico de linhagem germinativa humana. FR4 pode compreender uma região estrutural

de segmento JK2 de linhagem germinativa j humana. A sequência de aminoácidos FR1 de VL pode ser SEQ ID NO: 171. A sequência de aminoácidos FR2 de VL pode ser SEQ ID NO: 172. A sequência de aminoácidos FR3 de VL pode ser SEQ ID NO: 173. A sequência de aminoácidos FR4 de VL pode ser SEQ ID NO: 174.

Um domínio VL tornado de linhagem germinativa pode ou não ser tornado de linhagem germinativa no resíduo ou resíduos de Vernier, mas normalmente não é.

Uma molécula de anticorpo ou um domínio VH da invenção podem compreender o seguinte grupo de regiões estruturais de cadeia pesada:

FR1 de SEQ ID NO: 167;

FR2 de SEQ ID NO: 168;

FR3 de SEQ ID NO: 169;

FR4 de SEQ ID NO: 170;

ou pode compreender o citado grupo de regiões estruturais de cadeia pesada com uma, duas, três, quatro ou cinco alterações de aminoácidos, p. ex., substituições.

Uma molécula de anticorpo ou um domínio VL da invenção podem compreender o seguinte grupo de regiões estruturais de cadeia leve:

FR1 de SEQ ID NO: 171;

FR2 de SEQ ID NO: 172;

FR3 de SEQ ID NO: 173;

FR4 de SEQ ID NO: 174;

ou pode compreender o citado grupo de regiões estruturais de cadeia leve com uma, duas, três, quatro ou cinco alterações de aminoácidos, p. ex., substituições.

Uma alteração de aminoácido pode ser uma substituição, uma inserção ou uma deleção.

Por exemplo, uma molécula de anticorpo da invenção pode

compreender um grupo de regiões estruturais de cadeia pesada e leve, em que

FR1 de cadeia pesada é de SEQ ID NO: 167;

FR2 de cadeia pesada é de SEQ ID NO: 168;

FR3 de cadeia pesada é de SEQ ID NO: 169;

5 FR4 de cadeia pesada é de SEQ ID NO: 170;

FR1 de cadeia leve é de SEQ ID NO: 171;

FR2 de cadeia leve é de SEQ ID NO: 172;

FR3 de cadeia leve é de SEQ ID NO: 173;

FR4 de cadeia leve é de SEQ ID NO: 174;

10 ou pode compreender o citado grupo de regiões estruturais de cadeia pesada e leve com 10 ou menos, p. ex., cinco ou menos, alterações de aminoácidos, p. ex., substituições. Por exemplo, pode haver uma ou duas substituições de aminoácidos no citado grupo de regiões estruturais de cadeia pesada e leve.

15 Uma molécula de anticorpo não tornada de linhagem germinativa tem as mesmas CDRs, mas estruturas diferentes, comparada com uma molécula de anticorpo tornada de linhagem germinativa. Das sequências de anticorpo mostradas aqui na listagem de sequências anexada, sequências de anticorpo Nos. 7, 10, 17 e 18 foram tornadas de linhagem germinativa. Os  
20 anticorpos tornados de linhagem germinativa 2 até 5, 8, 14, 16, 19 e 21 até 23 podem ser produzidos tornando de linhagem germinativa as regiões estruturais das sequências de domínio VH e VL mostradas aqui para esses anticorpos.

O códon 3' cgt e resíduo de arginina correspondente mostrados  
25 nas sequências nucleotídicas e de aminoácidos para os domínios VL capa dos anticorpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 e 23, respectivamente foram incluídos nas sequências expressadas scFv e IgG desses anticorpos. O resíduo de arginina C-terminal das sequências corresponde ao resíduo de Kabat 108. A origem deste resíduo e seu tripleto CGT codificante é explicada

abaixo.

Para expressar a cadeia leve da IgG, foi provida uma sequência nucleotídica codificando a cadeia leve de anticorpo, compreendendo um primeiro éxon codificando o domínio VL, um segundo éxon codificando o domínio CL e um íntron separando o primeiro éxon do segundo éxon. Sob circunstâncias normais, o íntron é excisado (*spliced*) pela maquinaria de processamento de mRNA celular, unindo a extremidade 3' do primeiro éxon à extremidade 5' do segundo éxon. Assim, quando o DNA tendo a citada primeira sequência nucleotídica foi expresso como RNA, o primeiro e segundo éxons foram unidos (*spliced together*). A tradução do RNA que sofreu *splicing* produz um polipeptídeo compreendendo o domínio VL e o domínio CL. A escolha de domínio constante é insignificante nisso: para cadeias leves o aminoácido de conexão é arginina, formado pelo códon cga, onde a primeira citosina é codificada no éxon 1 e a guanina e a adenina são codificadas no éxon 2.

Após o *splicing*, para os anticorpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 e 23, a Arg no resíduo de Kabat 108 é codificada pela última base (c) da sequência de estrutura 4 de domínio VL e pelas primeiras duas bases (gt) do domínio CL.

O resíduo de arginina no resíduo de Kabat 108 pode ser considerado como sendo o resíduo C-terminal do domínio VL da molécula de anticorpo.

Um membro de ligação da invenção pode ser um que compete pela ligação a IL-6 com qualquer membro de ligação que (i) se ligue a IL-6 e (ii) compreenda um membro de ligação, domínio VH e/ou VL, CDR, p. ex., HCDR3 e/ou grupo de CDRs aqui divulgado.

A competição entre membros de ligação pode ser dosada facilmente *in vitro*, por exemplo, usando ELISA e/ou pela etiquetagem com uma molécula repórter específica de um membro de ligação que pode ser

detectado na presença de um ou mais outros membros de ligação não etiquetados, para permitir a identificação de membros de ligação que se ligam ao mesmo epítopo ou a um epítopo sobreposto. Tais métodos são prontamente conhecidos por alguém de conhecimento ordinário da técnica e estão descritos em maiores detalhes aqui (veja a Descrição Detalhada e os ensaios de competição de epítopo na seção de Materiais e Métodos dos Exemplos). Assim, um aspecto adicional da presente invenção provê um membro de ligação compreendendo um sítio de ligação a antígeno de anticorpo humano que compete com uma molécula de anticorpo, por exemplo, uma molécula de anticorpo compreendendo um domínio VH e/ou VL, CDR, p. ex., HCDR3 ou grupo de CDRs do anticorpo parental ou qualquer dos anticorpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 ou 23, pela ligação a IL-6.

Em aspectos adicionais, a invenção provê um ácido nucleico isolado que compreende uma sequência codificando um membro de ligação, domínio VH e/ou domínio VL de acordo com a presente invenção e métodos para preparar um membro de ligação, um domínio VH e/ou um domínio VL da invenção, que compreendem expressar o citado ácido nucleico sob condições para produzir o citado membro de ligação, domínio VH e/ou domínio VL e recuperá-lo.

Outro aspecto da presente invenção provê ácido nucleico, geralmente isolado, codificando uma sequência de CDR de VH ou CDR de VL aqui divulgada.

Um aspecto adicional provê uma célula hospedeira contendo ou transformada com ácido nucleico da invenção.

Aspectos adicionais da presente invenção provêm composições contendo membros de ligação da invenção e o uso deles em métodos de ligação, inibição e/ou neutralização de IL-6, incluindo métodos de tratamento do corpo humano ou animal por terapia.

Membros de ligação de acordo com a invenção podem ser

usados em um método de tratamento ou diagnóstico, tal como um método de tratamento (que pode incluir tratamento profilático) de uma doença ou distúrbio no corpo humano ou animal (p. ex., em um paciente humano), que compreende administrar ao citado paciente uma quantidade eficaz de um membro de ligação da invenção. Doenças tratáveis de acordo com a presente invenção incluem quaisquer em que IL-6 tenha uma função, como discutido em detalhe em outro lugar aqui.

Esses e outros aspectos da invenção são descritos em maiores detalhes abaixo.

#### Terminologia

É conveniente chamar a atenção aqui de que “e/ou” onde usados aqui é para ser tomado como divulgação específica de cada uma das duas características ou componentes especificados com ou sem o(a) outro(a). Por exemplo, “A e/ou B” é para ser tomado como divulgação específica de cada um de (i) A, (ii) B e (iii) A e B, exato como se cada um fosse exposto individualmente aqui.

#### *IL-6 e receptor de IL-6*

IL-6 é interleucina 6. IL-6 também pode ser referida aqui como “o antígeno”.

A sequência de aminoácidos completa da IL-6 humana é SEQ ID NO: 161. Esta sequência é clivada *in vivo* para remover um peptídeo líder N-terminal, para produzir IL-6 madura. IL-6 humana madura tem sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 165. A sequência madura representa a IL-6 circulante *in vivo*, que é o antígeno alvo para aplicações terapêuticas e diagnósticas *in vivo* como aqui descrito. Consequentemente, IL-6 referida aqui é normalmente IL-6 humana madura, a menos que indicado de outro modo pelo contexto.

IL-6 pode ser conjugada a um marcador detectável, tal como HIS FLAG, p. ex., para uso em ensaios como aqui descrito. Por exemplo, uma

proteína de fusão compreendendo IL-6 conjugada a uma sequência HIS FLAG pode ser usada. Uma sequência de IL-6 humana etiquetada com HIS FLAG é a de SEQ ID NO: 162.

O receptor a de IL-6, IL-6Ra, é o receptor para interleucina 6. IL-6Ra também é conhecido como IL-6R $\alpha$ , IL-6R e CD126. IL-6Ra existe *in vivo* em uma forma transmembranar e em uma forma solúvel. Referências a IL-6Ra podem ser a IL-6Ra transmembranar e/ou IL-6Ra solúvel a menos que indicado de outro modo pelo contexto.

O receptor de IL-6 referido aqui é normalmente receptor de IL-6 humana, a menos que indicado de outro modo. Um sequência de aminoácidos de IL-6Ra solúvel humana (sIL-6Ra, sIL-6R) é SEQ ID NO: 163. Um sequência de aminoácidos de IL-6Ra transmembranar humana é SEQ ID NO: 164.

IL-6 se liga a IL-6Ra para formar um complexo, IL-6:IL-6Ra. O complexo pode ser ou solúvel (com sIL-6Ra) ou ligado a membrana (com IL-6Ra transmembranar). Quando a IL-6Ra está na forma solúvel, o complexo é designado IL-6:sIL-6Ra. Referências a IL-6:IL-6Ra podem incluir IL-6 complexada com IL-6Ra transmembranar ou com IL-6Ra solúvel, a menos que indicado de outro modo pelo contexto.

*gp130*

Gp130 é um receptor do complexo IL-6:IL-6Ra. Clonagem e caracterização de gp130 são relatadas em Hibi *et al.*, Cell 63: 1149-1157 (1990). Uma sequência de gp130 humana é exposta em SEQ ID NO: 166.

#### *Membro de ligação*

Este descreve um membro de um par de moléculas que se liga a outra. Os membros de um par de ligação podem ser derivados naturalmente ou produzidos sinteticamente completamente ou parcialmente. Um membro do par de moléculas tem uma área em sua superfície, ou uma cavidade, que se liga a e é, portanto, complementar a uma organização espacial particular e

polar do outro membro do par de moléculas. Exemplos de tipos de pares de ligação são antígeno-anticorpo, biotina-avidina, hormônio-receptor de hormônio, receptor-ligante, enzima-substrato. A presente invenção diz respeito a reações do tipo antígeno-anticorpo.

5 Um membro de ligação normalmente compreende uma molécula que tem um sítio de ligação a antígeno. Por exemplo, um membro de ligação pode ser uma molécula de anticorpo ou uma proteína não anticorpo que compreende um sítio de ligação a antígeno.

Um sítio de ligação a antígeno pode ser provido por meio de  
10 arranjo de CDRs em armações de proteína não anticorpo, tal como fibronectina ou citocromo B, etc. [42, 43, 44], ou tornando aleatórios ou mutando resíduos de aminoácidos de uma alça dentro de uma armação proteica para conferir especificidade de ligação por um alvo desejado. Armações para engenheirar novos sítios de ligação em proteínas foram  
15 revisados em detalhe por Nygren *et al.*, [44]. Armações proteicas para miméticos de anticorpo são divulgadas em WO/0034784, que é incorporada aqui como referência em sua totalidade, no qual os inventores descrevem proteínas (miméticos de anticorpo) que incluem um domínio de fibronectina tipo III que tem pelo menos uma alça tornada aleatória. Uma armação  
20 adequada na qual para enxertar uma ou mais CDRs, p. ex., um grupo de HCDRs, pode ser provida por qualquer membro de domínio da superfamília de genes de imunoglobulina. A armação pode ser uma proteína humana ou não humana. Uma vantagem de uma armação de proteína não anticorpo é que ela pode prover um sítio de ligação a antígeno em uma molécula de armação  
25 que é menor e/ou mais fácil de produzir que pelo menos algumas moléculas de anticorpo. Tamanho pequeno de um membro de ligação pode conferir propriedades fisiológicas úteis, tal como uma habilidade para entrar em células, penetrar profundamente em tecidos ou alcançar alvos dentro de outras estruturas, ou se ligar nas cavidades proteicas do antígeno alvo. O uso de

sítios de ligação a antígeno em armações de proteína não anticorpo é revisado em Wess, 2004 [45]. Proteínas típicas são as que têm um cerne estável e uma ou mais alças variáveis, em que a sequência de aminoácidos da alça ou alças é especificamente ou aleatoriamente mutada para criar um sítio de ligação a antígeno que se liga ao antígeno alvo. Tais proteínas incluem os domínios de ligação de IgG de proteína A de *S. aureus*, transferrina, tetranectina, fibronectina (p. ex., 10º domínio de fibronectina tipo III), lipocalinas assim como armações de gama-cristalina e outras de Affilin™ (Scil Proteins). Exemplos de outras abordagens incluem “microcorpos” sintéticos baseados em ciclotídios – pequenas proteínas que têm ligações de dissulfeto intramoleculares, microproteínas (Versabodies™, Amunix) e proteínas de repetição de anquirina (DARPin, Molecular Partners).

Além das sequências de anticorpo e/ou sítio de ligação a antígeno, um membro de ligação de acordo com a presente invenção pode compreender outros aminoácidos, p. ex., formar um peptídeo ou polipeptídeo, tal como um domínio enovelado, ou para conferir à molécula outra característica funcional além da habilidade de se ligar a antígeno. Membros de ligação da invenção podem portar um marcador detectável, ou podem ser conjugadas a uma toxina ou a uma unidade direcionamento ou enzima (p. ex., através de uma ligação de peptidil ou ligante). Por exemplo, um membro de ligação pode compreender um sítio catalítico (p. ex., em um domínio enzimático) assim como um sítio de ligação a antígeno, em que o sítio de ligação a antígeno se liga ao antígeno e assim direciona o sítio catalítico para o antígeno. O sítio catalítico pode inibir função biológica do antígeno, p. ex., por clivagem.

Se bem que, como mencionado, CDRs podem ser portadas por armações não anticorpo, a estrutura para portar uma CDR ou um grupo de CDRs da invenção será geralmente a de uma sequência de cadeia pesada ou leve de anticorpo ou porção considerável deste em que a CDR ou grupo de

CDRs esteja localizado em uma localização correspondente à CDR ou grupo de CDRs de domínios variáveis de anticorpo VH e VL de ocorrência natural codificados por genes de imunoglobulina rearranjados. As estruturas e localizações de domínios variáveis de imunoglobulina podem ser determinadas por referência a Kabat *et al.*, 1987 [46] e atualizações desta. Vários recursos on-line acadêmicos e comerciais estão disponíveis para questionar esse banco de dados. Por exemplo, veja a ref. [47] e o recurso on-line associado, atualmente no endereço da rede <http://www.bioinf.org.uk/abs/simkab.html>.

Região CDR ou CDR, destina-se a indicar as regiões hipervariáveis das cadeias pesada e leve da imunoglobulina como definido por Kabat *et al.*, 1991 [48] e edições posteriores. Um anticorpo tipicamente contém 3 CDRs de cadeia pesada e 3 CDRs de cadeia leve. O termo CDR ou CDRs é usado aqui a fim de indicar, de acordo com o caso, uma dessas regiões ou várias, ou mesmo o total, dessas regiões que contêm a maioria dos resíduos de aminoácidos responsáveis pela ligação por afinidade do anticorpo ao antígeno ou ao epítipo que ele reconhece.

Entre as seis sequências de CDR curtas, a terceira CDR da cadeia pesada (HCDR3) tem uma maior variabilidade de tamanho (maior diversidade essencialmente devido aos mecanismos de arranjo dos genes que dão origem a ela). Ela pode ser tão curta quanto com 2 aminoácidos embora o tamanho mais longo conhecido seja de 26. O comprimento de CDR também pode variar de acordo com o comprimento que pode ser acomodado pela estrutura latente particular. Funcionalmente, HCDR3 tem um papel em parte na determinação da especificidade do anticorpo [refs. 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56].

HCDR1 pode ter 5 aminoácidos de comprimento, consistindo nos resíduos de Kabat 31-35.

HCDR2 pode ter 17 aminoácidos de comprimento, consistindo

nos resíduos de Kabat 50-65.

HCDR3 pode ter 11 ou 12 aminoácidos de comprimento, consistindo nos resíduos de Kabat 95-102, opcionalmente incluindo o resíduo de Kabat 100D.

5 LCDR1 pode ter 11 aminoácidos de comprimento, consistindo nos resíduos de Kabat 24-34.

LCDR2 pode ter 7 aminoácidos de comprimento, consistindo nos resíduos de Kabat 50-56.

10 LCDR3 pode ter 8 ou 9 aminoácidos de comprimento, consistindo nos resíduos de Kabat 89-97, incluindo opcionalmente o resíduo de Kabat 95.

#### *Molécula de anticorpo*

Este descreve uma imunoglobulina natural ou produzida sinteticamente parcialmente ou inteiramente. O termo também cobre qualquer

15 polipeptídeo ou proteínas compreendendo um sítio de ligação a antígeno. Deve-se entender aqui que a invenção não está relacionada aos anticorpos na forma natural, isto é, dizer que eles não estão em seu ambiente natural, mas que eles foram capazes de serem isolados ou obtidos por purificação de fontes naturais, senão obtidos por recombinação genética, ou por síntese química e

20 que eles podem então conter aminoácidos artificiais como será descrito posteriormente. Fragmentos de anticorpo que compreendem um sítio de ligação a antígeno incluem, mas não estão limitados a, moléculas tais como Fab, Fab', Fab'-SH, scFv, Fv, dAb e Fd. Várias outras moléculas de anticorpo incluindo um ou mais sítios de ligação a antígeno de anticorpo foram

25 engenheiradas, incluindo, por exemplo, Fab2, Fab3, diacorpos, triacorpos, tetracorpos e minicorpos. Moléculas de anticorpo e métodos para a construção e uso delas são descritos em [57].

É possível tomar anticorpos monoclonais e outros e usar técnicas de tecnologia de DNA recombinante para produzir outros anticorpos

ou moléculas quiméricas que se ligam ao antígeno alvo. Tais técnicas podem envolver introduzir DNA codificando a região variável de imunoglobulina, ou as CDRs, de um anticorpo para as regiões constantes, ou regiões constantes mais regiões estruturais, de uma imunoglobulina diferente. Veja, por exemplo, EP-A-184187, GB 2188638A ou EP-A-239400 e um grande corpo de literatura subsequente. Um hibridoma ou outra células que produz um anticorpo pode estar sujeita a mutação genérica ou outras alterações, que podem ou não alteram a especificidade de ligação de anticorpo produzidos.

Visto que anticorpos podem ser modificados de várias maneiras, o termo “moléculas de anticorpo” deve ser interpretado como cobrindo qualquer membro de ligação ou substância que tenha um sítio de ligação a antígeno de anticorpo com a ligação a antígeno e/ou especificidade requerida. Assim, este termo cobre fragmentos de anticorpo e derivados, incluindo qualquer polipeptídeo compreendendo um sítio de ligação a antígeno de anticorpo, natural ou sintético inteiramente ou parcialmente. Moléculas quiméricas compreendendo um sítio de ligação a antígeno de anticorpo, ou equivalente, fusionadas a outro polipeptídeo (p. ex., derivado de outra espécie ou pertencendo a outra classe ou subclasse de anticorpo) são, portanto, incluídas. Clonagem e expressão de anticorpo quiméricos são descritas em EP-A-0120694 e EP-A-0125023 e um grande corpo de literatura subsequente.

Técnicas adicionais disponíveis na técnica de engenharia de anticorpo tornaram possível isolar anticorpos humanos e humanizados. Por exemplo, hibridomas humanos podem ser feitos como descrito por Kontermann & Dubel [58]. Visualização de fagos, outra técnica estabelecida para gerar membros de ligação foi descrita em detalhe em muitas publicações, tal como Kontermann & Dubel [58] e WO92/01047 (divulgada adicionalmente abaixo) e patentes US US5969108, US5565332, US5733743, US5858657, US5871907, US5872215, US5885793, US5962255, US6140471, US6172197,

US6225447, US6291650, US6492160, US6521404.

Camundongos transgênicos em que os genes de anticorpo de camundongo estão inativados e funcionalmente substituídos por genes de anticorpo humano enquanto deixam intactos outros componentes do sistema imune de camundongo, podem ser usados para isolar anticorpo humanos [59]. Anticorpos humanizados podem ser produzidos usando técnicas conhecidas na técnica tal como aquelas divulgadas em, por exemplo, WO91/09967, US 5.585.089, EP592106, US 565.332 e WO93/17105. Adicionalmente, WO2004/006955 descreve métodos para humanizar anticorpos com base na seleção de sequências estruturais de região variável de genes de anticorpo humano pela comparação de tipos estruturais de CDR canônica para sequências de CDR da região variável de um anticorpo não humano com tipos estruturais de CDR canônicas para CDRs correspondentes de uma biblioteca de sequências de anticorpo humano, p. ex., segmentos gênicos de anticorpo de linhagem germinativa. Regiões variáveis de anticorpo humano que têm tipos estruturais de CDR canônica similar às CDRs não humanas formam um subgrupo de sequências de anticorpo humano membro a partir das quais se seleciona sequências estruturais humanas. Os membros de subgrupo podem ser adicionalmente classificados por similaridade de aminoácidos entre as sequências de CDR humana e não humana. No método de WO2004/006955, sequências humanas do topo da classificação são selecionadas para prover as sequências estruturais para construir um anticorpo quimérico que substitui funcionalmente sequências de CDR humana pelas equivalentes CDRs não humanas usando as estruturas humanas de membro de subgrupo selecionadas, provendo desse modo um anticorpo humanizado de alta afinidade e baixa imunogenicidade sem necessidade de comparar sequências estruturais entre anticorpos não humanos e humanos. Anticorpos quiméricos feitos de acordo com o método também são divulgados.

Moléculas de anticorpo sintético podem ser criadas pela

expressão a partir de genes gerados por meio de oligonucleotídios sintetizados e montados dentro de vetores de expressão adequados, por exemplo, como descrito por Knappik *et al.*, [60] ou Krebs *et al.*, [61].

Demonstrou-se que fragmentos de um anticorpo inteiro podem desempenhar a função de antígenos de ligação. Exemplos de fragmentos de ligação são (i) o fragmento Fab que consiste nos domínios VL, VH, CL e CH1; (ii) o fragmento Fd que consiste dos domínios VH e CH1; (iii) o fragmento Fv que consiste nos domínios VL e VH de um único anticorpo; (iv) o fragmento dAb [62, 63, 64], que consiste em um domínio VH ou um VL; (v) regiões CDR isoladas; (vi) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados; (vii) moléculas Fv de cadeia única (scFv), em que um domínio VH e um domínio VL estão ligados por um ligante peptídico que permite que os dois domínios se associem para formar um sítio de ligação a antígeno [65, 66]; (viii) dímeros de Fv de cadeia única biespecíficos (PCT/US92/09965) e (ix) “diacorpos”, fragmentos multivalentes ou multiespecíficos construídos por fusão gênica (WO94/13804; [67]). Moléculas de Fv, scFV ou diacorpo podem ser estabilizadas pela incorporação de pontes dissulfeto ligando os domínios VH e VL [68]. Minicorpos compreendendo um scFV unido a um domínio CH3 também podem ser feitos [69]. Outros exemplos de fragmentos de ligação são Fab', que diferem de fragmentos Fab pela adição de poucos resíduos na extremidade carbóxi-terminal do domínio CH1 de cadeia pesada, incluindo uma ou mais cisteínas da região de dobra do anticorpo e Fab'-SH, que é um fragmento Fab' em que o(s) resíduo(s) de cisteína dos domínios constantes abrigam um grupo tiol livre.

Qui *et al.*, [70] descreveram moléculas de anticorpo contendo duas CDRs ligadas por uma região estrutural. CDR3 do domínio VH ou VL foi ligada à alça de CDR1 ou CDR2 do outro domínio. A ligação foi feita através da extremidade C-terminal da CDR1 ou CDR2 selecionada com a

extremidade N-terminal da CDR3, através de uma região FR. Qui *et al.*, selecionaram a região FR que tem poucos trechos hidrofóbicos. A melhor combinação para o anticorpo testado foi encontrada como sendo CDR1 de VL ligada por FR2 de VH a CDR3 de VH (VHCDR1-VHFR2-VLCDR3). Em um  
5 peso molecular de cerca de 3 kDa, essas moléculas de anticorpo oferecem vantagens em termos de penetração em tecido melhorada quando comparadas com imunoglobulinas completas (aprox. 150 kDa) ou scFv (aprox. 28 kDa).

Fragmentos de anticorpo da invenção podem ser obtidos partindo de uma moléculas de anticorpo parental ou quaisquer das moléculas  
10 de anticorpo 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 e 23, por métodos tal como digestão por enzimas, p. ex., pepsina ou papaína e/ou por clivagem das pontes dissulfeto por redução química. De outra maneira, os fragmentos de anticorpo compreendidos na presente invenção podem ser obtidos por técnicas de recombinação genética igualmente bem conhecidas pela pessoa  
15 versada na técnica senão, por síntese peptídica por meio de, por exemplo, sintetizadores peptídicos automáticos, tal como aqueles fornecidos pela companhia Applied Biosystems, etc., ou por síntese e expressão de ácido nucleico.

Fragmentos de anticorpo funcional de acordo com a presente  
20 invenção incluem qualquer fragmento funcional cuja meia-vida seja aumentada por uma modificação química, especialmente por PEGuilação ou por incorporação em um lipossomo.

Um dAb (anticorpo de domínio) é um pequeno fragmento de ligação a antígeno monomérico de um anticorpo, nominalmente a região  
25 variável de uma cadeia pesada ou leve de anticorpo [64]. DABs de VH ocorrem naturalmente em camelídeos (p. ex., camelo, lhama) e podem ser produzidos pela imunização de um camelídeo com um antígeno alvo, isolando células B antígeno-específicas e clonando diretamente genes dAb de células B individuais. DABs também são capazes de serem produzidas em cultura de

células. O tamanho pequeno deles, boa solubilidade e estabilidade de temperatura os torna particularmente úteis fisiologicamente e adequados para seleção e maturação de afinidade. DABs de VH de camelídeos estão sendo desenvolvidos para uso terapêutico sob o nome de “nanocorpos™”. Um membro de ligação da presente invenção pode ser um DAB compreendendo um domínio VH ou VL consideravelmente como exposto aqui, ou um domínio VH ou VL compreendendo um grupo de CDRs consideravelmente como exposto aqui.

Anticorpos biespecíficos ou bifuncionais formam uma segunda geração de anticorpo monoclonais em que duas regiões diferentes são combinadas na mesma molécula [71]. O uso deles foi demonstrado tanto no campo diagnóstico como no campo terapêutico a partir da capacidade deles de recrutar novas funções efetoras ou para se direcionar a várias moléculas na superfície de células tumorais. Quando são para serem usados anticorpos biespecíficos, esses podem ser anticorpos biespecíficos convencionais, que podem ser fabricados em uma variedade de meios [72], p. ex., preparados quimicamente ou a partir de hibridomas híbridos, ou podem ser quaisquer dos fragmentos de anticorpo biespecífico mencionados acima. Esses anticorpos podem ser obtidos por métodos químicos [73, 74] ou métodos somáticos [75, 76], mas também e preferencialmente por técnicas de engenharia genética que permitem que a heterodimerização seja forçada e assim, facilite o processo de purificação do procurado anticorpo [77]. Exemplos de anticorpos biespecíficos incluem aqueles da tecnologia BiTE™ em que os domínios de ligação de dois anticorpos com especificidade diferente podem ser usados e diretamente ligados através de peptídeos flexíveis curtos. Isto combina dois anticorpos em uma cadeia polipeptídica única curta. Diacorpos e scFv podem ser construídos sem uma região Fc, usando apenas domínios variáveis, potencialmente reduzindo os efeitos de reação anti-idiotípica.

Anticorpos biespecíficos podem ser construídos como IgG

inteira, como Fab'2 biespecífico, como Fab'PEG, como diacorpos senão como scFv biespecífico. Adicionalmente, dois anticorpos biespecíficos podem ser ligados usando métodos de rotina conhecidos na técnica para formar anticorpos tetravalentes. Diacorpos biespecíficos, como em oposição a  
5 anticorpos inteiros biespecíficos, também podem ser particularmente úteis porque eles podem ser prontamente construídos e expressados em *E. coli*. Diacorpos (e muitos outros polipeptídeos, tal como fragmentos de anticorpo) de especificidades de ligação apropriadas podem ser prontamente selecionados usando visualização de fagos (WO94/13804) a partir de  
10 bibliotecas. Se um braço do diacorpo for para ser mantido constante, por exemplo, com uma especificidade direcionada contra IL-6, então pode ser feita uma biblioteca onde o outro braço seja variado e um anticorpo de especificidade apropriada selecionada. Anticorpos inteiros biespecíficos podem ser feitos por métodos de engenharia alternativa como descrito em  
15 Ridgeway *et al.*, 1996 [78].

Vários métodos estão disponíveis na técnica para obter anticorpos contra IL-6. Os anticorpos podem ser anticorpos monoclonais, especialmente de origem humana, murina, quimérica ou humanizada, que podem ser obtidos de acordo com os métodos padrões bem conhecidos pela  
20 pessoa versada na técnica.

Em geral, para a preparação de anticorpos monoclonais ou seus fragmentos funcionais, especialmente de origem murina, é possível referir-se às técnicas que são descritas em particular no manual "Antibodies" [79] ou à técnica de preparação de hibridomas descrita por Köhler e  
25 Milstein [80].

Anticorpos monoclonais podem ser obtidos, por exemplo, a partir de células B de um animal imunizado contra IL-6, ou um de seus fragmentos contendo o epítopo reconhecido pelos citados anticorpos monoclonais. Fragmentos adequados e peptídeos ou polipeptídeos e que os

compreendam são descritos aqui e podem ser usados para imunizar animais para gerar anticorpos contra IL-6. A citada IL-6, ou um de seus fragmentos, pode ser produzida especialmente de acordo com os métodos de trabalho usuais, por recombinação genética partindo de uma sequência de ácido nucleico contida na sequência de cDNA que codifica IL-6 ou fragmento desta, por síntese peptídica partindo de uma sequência de aminoácidos compreendida na sequência peptídica da IL-6 e/ou fragmento desta.

Os anticorpos monoclonais podem, por exemplo, ser purificados em uma coluna de afinidade em que IL-6 ou um de seus fragmentos contendo o epítipo reconhecido pelos citados anticorpos monoclonais, tenha sido previamente imobilizada. Mais particularmente, os anticorpos monoclonais podem ser purificados por cromatografia em proteína A e/ou G, seguida ou não por cromatografia de troca iônica que pretende eliminar os contaminantes de proteína residual assim como o DNA e o LPS, em si próprios, seguida ou não por cromatografia de exclusão em gel de sepharose a fim de eliminar os potenciais agregados devidos à presença de dímeros ou de outros multímeros. Em uma modalidade, o todo dessas técnicas pode ser usado simultaneamente ou sucessivamente.

#### *Sítio de ligação de antígeno*

Este descreve a parte da molécula que se liga ou é complementar ao todo ou parte do antígeno alvo. Em uma molécula de anticorpo ele é referido como o sítio de ligação a antígeno de anticorpo e compreende a parte do anticorpo que se liga e é complementar ao todo ou parte do antígeno alvo. Quando um antígeno é grande, um anticorpo pode apenas se ligar a uma parte particular do antígeno, tal parte é denominada um epítipo. Um sítio de ligação a antígeno de anticorpo pode ser provido por um ou mais domínios variáveis de anticorpo. Um sítio de ligação a antígeno de anticorpo compreende uma região variável de cadeia leve (VL) e uma região variável de cadeia pesada (VH) de anticorpo.

WO2006/072620 descreve o engenheiramento de sítios de ligação de antígeno em alças estruturais (não CDR) que se prolongam entre filamentos beta de domínios de imunoglobulina. Um sítio de ligação de antígeno pode ser engenheirado em uma região de uma molécula de anticorpo separada da localização natural das CDRs, p. ex., em uma região estrutural de um domínio VH ou VL, ou em um domínio constante de anticorpo, p. ex., CH1 e/ou CH3. Um sítio de ligação a antígeno engenheirado em uma região estrutural pode ser adicional a, ou em vez disso, um sítio de ligação a antígeno formado por grupos de CDRs de um domínio VH e VL. Quando múltiplos sítios de ligação de antígeno estão presentes em uma molécula de anticorpo, eles podem se ligar ao mesmo antígeno (IL-6), aumentando desse modo a valência do membro de ligação. Senão, múltiplos sítios de ligação a antígeno podem se ligar a antígenos diferentes (IL-6 e um ou mais outros antígenos) e isso pode ser usado para adicionar funções efetoras, prolongar meia-vida ou melhorar distribuição *in vivo* da molécula de anticorpo.

#### *Isolado*

Isto se refere ao estado em que membros de ligação da invenção, ou ácido nucleico codificando tais membros de ligação, geralmente estarão de acordo com a presente invenção. Assim, membros de ligação, domínios VH e/ou VL e moléculas de ácido nucleico codificante e vetores de acordo com a presente invenção podem ser providos isolados e/ou purificados, p. ex., a partir do ambiente natural deles, na forma consideravelmente pura ou homogênea, ou, no caso de ácido nucleico, livre ou consideravelmente livre de ácido nucleico ou genes de origem fora a da sequência que codifica um polipeptídeo com a função requerida. Membros isolados e ácido nucleico isolado estarão livres ou consideravelmente livres de material com o qual eles estão naturalmente associados, tal como outros polipeptídeos ou ácidos nucléicos com os quais eles são encontrados no ambiente natural deles, ou do ambiente em que eles são preparados (p. ex.,

cultura de células) quando tal preparação é por tecnologia do DNA recombinante praticada *in vitro* ou *in vivo*. Membros e ácido nucleico podem ser formulados com diluentes ou adjuvantes e ainda por fins práticos ser isolado – por exemplo, os membros serão normalmente misturados com  
 5 gelatina ou outros veículos se usados para revestir placas de microtitulação para uso em imunoenaios, ou serão misturados com veículos ou diluentes farmacologicamente aceitáveis quando usados em diagnóstico ou terapia. Membros de ligação podem ser glicosilados, naturalmente ou por sistemas de células eucarióticas heterólogas (p. ex., células CHO ou NOS (ECACC  
 10 85110503)), ou eles podem ser (por exemplo, se produzidos por expressão em uma célula procariótica) não glicosilados.

Preparações heterogêneas compreendendo moléculas de anticorpo anti-IL-6 também formam parte da invenção. Por exemplo, tais preparações podem ser misturas de anticorpo com cadeias pesadas completas  
 15 e cadeias pesadas que não possuam a lisina C-terminal, com vários graus de glicosilação e/ou com aminoácidos derivados, tal como ciclização de um ácido glutâmico N-terminal para formar um resíduo de ácido piroglutâmico.

Conforme aqui utilizada, a frase “consideravelmente como exposto” se refere à(s) característica(s) das CDRs relevantes do domínio VH  
 20 ou VL de membros de ligação descritos aqui que serão idênticas ou altamente similares às regiões especificadas das quais a sequência é exposta aqui. Conforme aqui utilizada, a frase “altamente similar” com respeito à(s) região(ões) especificadas de um ou mais domínios variáveis, contempla que de 1 até cerca de 5, p. ex., de 1 até 4, incluindo de 1 até 3, ou 1 ou 2, ou 3 ou  
 25 4, substituições de aminoácidos podem ser feitas na CDR e/ou no domínio VH ou VL.

#### Breve descrição da figura

Figura 1. Esta figura mostra o efeito da administração de um anticorpo anti-IL-6 (anticorpo 18) no aumento de haptoglobina induzido por

IL-6 recombinante humana no camundongo *in vivo*.

Descrição detalhada da invenção

Como mencionado acima, um membro de ligação de acordo com a presente invenção modula e pode neutralizar uma atividade biológica de IL-6. Como aqui descrito, membros de ligação a IL-6 da presente invenção podem ser otimizados para potência de neutralização. Geralmente, a otimização de potência envolve mutar a sequência de um membro de ligação selecionado (normalmente a sequência de domínio variável de um anticorpo) para gerar uma biblioteca de membros de ligação, que são então dosados para potência e os membros de ligação mais potentes são selecionados. Membros de ligação “otimizados por potência” assim selecionados tendem a ter uma potência mais alta que o membro de ligação a partir do qual a biblioteca foi gerada. Contudo, membros de ligação de alta potência também podem ser obtidos sem otimização, por exemplo, um membro de ligação de alta potência pode ser obtido diretamente a partir de uma triagem inicial, p. ex., um ensaio de neutralização bioquímica. Um membro de ligação “otimizado por potência” se refere a um membro de ligação com uma potência otimizada de neutralização de uma atividade particular ou função a jusante de IL-6. Ensaio e potências são descritos em maiores detalhes em outro lugar aqui. A presente invenção provê tanto membros de ligação otimizados por potência como não otimizados, assim como métodos para otimização de potência a partir de um membro de ligação selecionado. A presente invenção permite assim que a pessoa versada gere membros de ligação que tenham alta potência.

Em um aspecto adicional, a presente invenção provê um método para obter um ou mais membros de ligação capazes de se ligarem ao antígeno, o método incluindo por em contato uma biblioteca de membros de ligação de acordo com a invenção com o citado antígeno e selecionar um ou mais membros de ligação da biblioteca capazes de se ligarem ao citado antígeno.

A biblioteca pode ser visualizada em partículas ou complexos moleculares, p. ex., pacotes genéticos replicáveis, tal como partículas de levedura, bacterianas ou de bacteriófago (p. ex., T7), vírus, células ou covalentes, sistemas ribossomais ou outros de visualização *in vitro*, cada

5 partícula ou complexo molecular contendo ácido nucleico codificando o domínio variável VH de anticorpo visualizado nele e também opcionalmente um domínio VL visualizado se estiver presente. A visualização de fagos é descrita em WO92/01047 e p. ex., patentes US US5969108, US5565332, US5733743, US5858657, US5871907, US5872215, US5885793,

10 US5962255, US6140471, US6172197, US6225447, US6291650, US6492160 e US6521404, cada uma das quais é aqui incorporada como referência em sua totalidade.

Após seleção de membros de ligação capazes de se ligarem ao antígeno e de serem visualizados em bacteriófago ou outras partículas de

15 biblioteca ou complexos moleculares, o ácido nucleico pode ser tomado de um bacteriófago ou outra partícula ou complexo molecular exibindo o citado membro de ligação selecionado. Tal ácido nucleico pode ser usado em produção subsequente de um membro de ligação ou um domínio variável VH ou VL de anticorpo por expressão a partir de ácido nucleico com a sequência

20 de ácido nucleico tomada de um bacteriófago ou outra partícula ou complexo molecular exibindo o citado membro de ligação.

Um domínio variável VH de anticorpo com a sequência de aminoácidos de um domínio variável VH de anticorpo de um citado membro de ligação selecionado pode ser provido na forma isolada, como pode um

25 membro de ligação compreendendo tal domínio VH.

A habilidade de se ligar a IL-6 pode ser testada adicionalmente, também a habilidade para competir com, p. ex., uma molécula de anticorpo parental ou uma molécula de anticorpo 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 ou 23 (p. ex., no formato scFv e/ou formato de

IgG, p. ex., IgG1) por ligação a IL-6. A habilidade de neutralizar IL-6 pode ser testada, como discutido adicionalmente em outro lugar aqui.

Um membro de ligação de acordo com a presente invenção pode ser ligar a IL-6 com a afinidade de uma molécula de anticorpo parental ou outra, p. ex., scFv, ou um dos anticorpos, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 ou 23, p. ex., IgG1, ou com uma afinidade que é melhor.

Um membro de ligação de acordo com a presente invenção pode neutralizar uma atividade biológica de IL-6 com a potência de uma molécula de anticorpo parental ou outra, uma dos anticorpos, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 ou 23, p. ex., scFv, ou IgG1, ou com uma potência que é melhor.

A afinidade de ligação e potência de neutralização de membros de ligação diferentes podem ser comparadas sob condições apropriadas.

Variantes dos domínios VH e VL e CDRs da presente invenção, incluindo aquelas para as quais sequências de aminoácidos são expostos aqui e que podem ser empregadas em membros de ligação da invenção podem ser obtidas por meio de métodos de alteração ou mutação de sequência e triagem de membros de ligação a antígeno com características desejadas. Exemplos de características desejadas incluem, mas não estão limitadas a:

- Afinidade de ligação pelo antígeno aumentada em relação a anticorpos conhecidos que são específicos para o antígeno.

- Neutralização aumentada de uma atividade de antígeno em relação aos anticorpos conhecidos que são específicos para o antígeno se a atividade for conhecida.

- Habilidade competitiva especificada com um conhecido anticorpo ou ligante para o antígeno em uma razão molar específica.

- Habilidade para imunoprecipitar complexo.

- Habilidade para se ligar a um epítipo especificado.

- Epítopo linear, p. ex., sequência peptídica identificada usando varredura de ligação a peptídeo como aqui descrito, p. ex., usando peptídeos triados em conformação linear e/ou constringida.

- Epítopo conformacional, formado por resíduos não contíguos.

- Habilidade para modular uma nova atividade biológica de IL-6, ou molécula a jusante.

Tais métodos também são providos aqui.

Variantes de moléculas de anticorpo divulgadas aqui podem ser produzidas e usadas na presente invenção. Seguindo a dianteira da química computacional em aplicar técnicas de análise de dados multivariados às relações de estrutura/propriedade-atividade [81] podem ser derivados relacionamentos de atividade quantitativas de anticorpos usando técnicas matemáticas bem conhecidas, tal como regressão estatística, reconhecimento de padrão e classificação [82, 83, 84, 85, 86, 87]. As propriedades de anticorpo podem ser derivadas de modelos empíricos e teóricos (por exemplo, análise de prováveis resíduos de contato ou propriedade físico-química calculada) de sequência de anticorpo, estruturas funcional e tridimensional e essas propriedades podem ser consideradas singularmente e em combinação.

Um sítio de ligação a antígeno de anticorpo composto de um domínio VH e um domínio VL é tipicamente formado por seis alças de polipeptídeo: três de domínio variável de cadeia leve (VL) e três do domínio variável de cadeia pesada (VH). A análise de anticorpo de estrutura atômica conhecida elucidou relacionamentos entre a estrutura de sequência e a tridimensional de sítios de combinação do anticorpo [88, 89]. Esses relacionamentos implicam em, exceto para a terceira região (alça) nos domínios VH, alças de sítio de ligação têm uma de um pequeno número de conformações de cadeia principal: estruturas canônicas. A estrutura canônica formada em uma alça particular foi mostrada como sendo determinada por

seu tamanho e pela presença de certos resíduos em sítios chave tanto nas regiões de alça como estruturais [88, 89].

Este estudo de relacionamento de sequência-estrutura pode ser usada para predição daqueles resíduos em um anticorpo de sequência conhecida, mas de uma estrutura tridimensional desconhecida, que são importantes em manter a estrutura tridimensional de suas alças de CDR e daí manter a especificidade de ligação. Essas predições podem ser endossadas por comparação das predições para a produção de experimentos de otimização líderes. Em uma abordagem estrutural, pode ser criado um modelo da molécula de anticorpo [90] usando qualquer pacote livremente disponível ou comercial, tal como WAM [91]. Um pacote de softwares de visualização e análise de proteína, tal como Insight II (Accelrys, Inc.) ou Deep View [92] pode então ser usado para avaliar possíveis substituições em cada posição na CDR. Esta informação pode então ser usada para fazer substituições prováveis de ter efeito mínimo ou benéfico na atividade.

As técnicas requeridas para fazer substituições dentro de sequências de aminoácidos de CDRs, domínios VH e VL de anticorpos e membros de ligação geralmente estão disponíveis na técnica. Sequências variantes podem ser feitas, com substituições que podem ou não ser preditas para ter efeito mínimo ou benéfico na atividade e testadas pela habilidade de se ligarem e/ou neutralizarem IL-6 e/ou por qualquer outra propriedade desejada.

Variantes de sequência de aminoácidos de domínio variável de quaisquer dos domínios VH e VL cujas sequências são especificamente divulgadas aqui podem ser empregadas de acordo com a presente invenção, conforme discutido.

Variantes de domínios VL da invenção e membros de ligação ou moléculas de anticorpo que os compreendem, incluem domínios VL em que a arginina não está presente no resíduo de Kabat 108, p. ex., onde o

resíduo de Kabat 108 é um resíduo diferente ou está deletado. Por exemplo, uma molécula de anticorpo, tal como uma molécula de anticorpo que não possui um domínio constante, p. ex., um scFv, pode compreender um domínio VL que tem uma sequência de domínio VL ou variante desta conforme aqui descrito, em que a arginina no resíduo de Kabat 108 é um resíduo de aminoácido fora arginina ou está deletado.

Um aspecto adicional da invenção é uma molécula de anticorpo compreendendo um domínio VH que tem pelo menos 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 ou 99% de identidade de sequência de aminoácidos com um domínio VH de qualquer um dos anticorpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 e 23 mostrados na listagem de sequências anexada e/ou compreendendo um domínio VL que tem pelo menos 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 ou 99% de identidade de sequência de aminoácidos com um domínio VL de qualquer um dos anticorpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 e 23 mostrados na listagem de sequências anexada. Algoritmos que podem ser usados para calcular a % de identidade de duas sequências de aminoácidos incluem, p. ex., BLAST [93], FASTA [94], ou o algoritmo de Smith-Waterman [95], p. ex., empregando parâmetros padrões.

Variantes particulares podem incluir uma ou mais alterações de sequências de aminoácidos (adição, deleção, substituição e/ou inserção de um resíduo de aminoácido).

Alterações podem ser feitas em uma ou mais regiões estruturais e/ou uma ou mais CDRs. As alterações normalmente não resultam em perda de função, portanto, um membro de ligação compreendendo uma sequência de aminoácidos assim alterada pode reter uma habilidade de se ligar a e/ou neutralizar IL-6. Ela pode reter a mesma ligação quantitativa e/ou habilidade de neutralização como um membro de ligação em que a alteração não seja feita, p. ex., como medido em um ensaio descrito aqui. O membro de ligação compreendendo uma sequência de aminoácidos assim alterada pode

ter uma habilidade melhorada de se ligar a e/ou neutralizar IL-6. A alteração pode compreender substituir um ou mais resíduos de aminoácidos por um aminoácido que não ocorra naturalmente ou não padrão, modificando um ou mais resíduos de aminoácidos para uma forma que não ocorra naturalmente ou não padrão na sequência. Exemplos de números e localizações de alterações em sequências da invenção são descritos em outro lugar aqui. Aminoácidos que ocorrem naturalmente incluem 20 L-aminoácidos “padrões” identificados como G, A, V, L, I, M, P, F, W, S, T, N, Q, Y, C, K, R, H, D, E por seus códigos de uma letra padrões. Aminoácidos não padrões incluem qualquer outro resíduo que possa ser incorporado em um cerne polipeptídico ou resultar de modificação de um resíduo de aminoácido existente. Aminoácidos não padrões podem ser de ocorrência natural ou de ocorrência não natural. Vários aminoácidos não padrões que ocorrem naturalmente são conhecidos na técnica, tal como 4-hidroxiprolina, 5-hidroxilisina, 3-metil-histidina, N-acetilserina, etc. [96]. Aqueles resíduos de aminoácidos que são derivados em suas posições N-alfa estarão localizados apenas na extremidade N-terminal de uma sequência de aminoácidos. Normalmente na presente invenção, um aminoácido é um L-aminoácido, mas ele pode ser m D-aminoácido. A alteração pode, portanto, compreender modificar um L-aminoácido em, ou substituí-lo por, um D-aminoácido. Formas metiladas, acetiladas e/ou fosforiladas de aminoácidos também são conhecidas e aminoácidos na presente invenção podem ser submetidos a tal modificação.

Sequências de aminoácidos em domínios de anticorpo e membros de ligação da invenção podem compreender aminoácidos não naturais ou não padrões descritos acima. Aminoácidos não padrões (p. e.x., D-aminoácidos) podem ser incorporados em uma sequência de aminoácidos durante a síntese, ou por modificação ou substituição dos aminoácidos padrões “originais” após a síntese da sequência de aminoácidos.

O uso de aminoácidos que ocorrem não naturalmente e/ou não

padrões aumenta a diversidade estrutural e funcional e pode assim, aumentar o potencial para alcançar propriedades de neutralização e ligação a IL-6 desejadas em um membro de ligação da invenção. Adicionalmente, D-aminoácidos e análogos demonstraram ter diferentes perfis farmacocinéticos comparados com L-aminoácidos padrões, devido a degradação *in vivo* de polipeptídeos que têm L-aminoácidos após administração a um animal, p. ex., um humano, significando que D-aminoácidos são vantajosos para algumas aplicações *in vivo*.

Novas regiões VH ou VL portanto sequências derivadas de CDR da invenção podem ser geradas usando mutagênese aleatória de um ou mais genes de VH e VL selecionados para gerar mutações no domínio variável inteiro. Tal técnica é descrita por Gram *et al.*, [97], que usaram PCR propenso a erro. Em algumas modalidades uma ou duas substituições de aminoácidos são feitas no domínio variável inteiro ou grupo de CDRs.

Outro método que pode ser usado é direcionar mutagênese para regiões CDR de genes VH e VL. Tais técnicas são divulgadas por Barbas *et al.*, [98] e Schier *et al.*, [99].

Todas as técnicas acima descritas são conhecidas como tais na técnica e a pessoa versada será capaz de usar tais técnicas para prover membros de ligação da invenção usando metodologia de rotina na técnica.

Um aspecto adicional da invenção provê um método para obter um sítio de ligação a antígeno de anticorpo para IL-6, o método compreendendo prover por meio de adição, deleção, substituição ou inserção de um ou mais aminoácidos na sequência de aminoácidos de um domínio VH exposto aqui um domínio VH que é uma sequência de aminoácidos variante do domínio VH, opcionalmente combinando o domínio VH assim provido com um ou mais domínios VL e testando o domínio VH ou combinação VH/VL ou combinações para identificar um membro de ligação ou um sítio de ligação a antígeno de anticorpo para IL-6 e opcionalmente com uma ou

mais propriedades desejadas, p. ex., habilidade para neutralizar atividade de IL-6. O citado domínio VL pode ter uma sequência de aminoácidos que é consideravelmente conforme exposto aqui. Um método análogo pode ser empregado em que uma ou mais variantes de sequência de um domínio VL  
5 divulgado aqui são combinadas com um ou mais domínio VH. Conforme mencionado acima, uma sequência de aminoácidos de CDR consideravelmente como exposto aqui pode ser portada como uma CDR em um domínio variável de anticorpo humano ou porção considerável deste. As sequências de HCDR3 consideravelmente como exposto aqui representam  
10 modalidades da presente invenção e cada uma dessas pode ser portada como uma HCDR3 em um domínio variável de cadeia pesada humana ou uma porção considerável deste.

Domínios variáveis empregados na invenção podem ser obtidos ou derivados de qualquer domínio variável de linhagem germinativa  
15 ou rearranjado, ou podem ser um domínio variável sintético com base em consenso ou sequências reais de domínios variáveis humanos conhecidos. Um domínio variável pode ser derivado de um anticorpo não humano. Uma sequência de CDR da invenção (p. ex., CDR3) pode ser introduzida em um repertório de domínios variáveis que não possuem uma CDR (p. e.x., CDR3),  
20 usando tecnologia de DNA recombinante. Por exemplo, Marks *et al.*, [100] descrevem métodos para produzir repertórios de domínios variáveis de anticorpo em que iniciadores consenso direcionado para ou adjacentes à extremidade 5' da área de domínio variável são usados em conjunto com iniciadores consenso para a terceira região estrutural de genes de VH humana  
25 para prover um repertório de domínios variáveis de VH que não possuem uma CDR3. Marks *et al.*, descrevem adicionalmente como esse repertório pode ser combinado com uma CDR3 de um anticorpo particular. Usando técnicas análogas, as sequências derivadas de CDR3 da presente invenção podem ser embaralhadas com repertórios de domínios VH ou VL que não possuem uma

CDR3 e os domínios VH ou VL completamente embaralhados combinados com um domínio VL ou VH cognato para prover membros de ligação da invenção. O repertório pode então ser visualizado em um sistema hospedeiro adequado, tal como o sistema de visualização de fagos de WO92/01047, que é aqui incorporado como referência em sua totalidade, ou qualquer de um subsequente grande corpo de literatura, incluindo Kay, Winter & MacCafferty [101], para que membros de ligação adequados possam ser selecionados. Um repertório pode consistir em de qualquer coisa de  $10^4$  membros individuais para cima, por exemplo, pelo menos  $10^5$ , pelo menos  $10^6$ , pelo menos  $10^7$ , pelo menos  $10^8$ , pelo menos  $10^9$  ou pelo menos  $10^{10}$  membros ou mais. Outros sistemas de hospedeiros adequados incluem, mas não estão limitados a visualização de levedura, visualização bacteriana, visualização de T7, visualização viral, visualização celular, visualização de ribossomo e visualização covalente.

Um método para prepara um membro de ligação para antígeno IL-6 é provido, tal método compreende:

(a) Prover um repertório de partida de ácidos nucléicos codificando um domínio VH que inclui uma CDR3 a ser substituída ou não possui uma região codificadora de CDR3;

(b) Combinar o citado repertório com um ácido nucleico doador codificando uma sequência de aminoácidos consideravelmente exposto aqui para uma CDR3 de VH tal que o citado ácido nucleico doador seja inserido na região CDR3 no repertório, para prover um repertório produto de ácidos nucleicos codificando um domínio VH;

(c) Expressar os ácidos nucleicos do citado repertório produto;

(d) Selecionar um membro de ligação para IL-6 e

(e) Recuperar o citado membro de ligação ou ácido nucleico codificando ele.

Novamente, um método análogo pode ser empregado em que uma CDR3 de VL da invenção seja combinada com um repertório de ácidos nucleicos codificando um domínio VL que inclui uma CDR3 a ser substituída ou que não possui uma região codificadora de CDR3.

5 De maneira similar, uma ou mais, ou todas as três CDRs podem ser enxertadas em um repertório de domínios VH ou VL que são então triados por um membro de ligação ou membros de ligação para IL-6.

Por exemplo, um ou mais dos anticorpos parentais ou 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 ou 23 HCDR1, HCDR2 e HCDR3 ou o  
10 anticorpo parental ou 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 ou 23 grupo de HCDRs podem ser empregados e/ou um ou mais dos anticorpos parentais ou 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 ou 23 LCDR1, LCDR2 e LCDR3 ou o anticorpo parental ou 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 ou 23 grupo de LCDRs podem ser empregados.

15 De maneira similar, outros domínios VH e VL, grupo de CDRs e grupos de HCDRs e/ou grupos de LCDRs aqui divulgados podem ser empregados.

Uma porção considerável de um domínio variável de imunoglobulina pode compreender pelo menos as três regiões de CDR, junto  
20 com as regiões estruturais intervenientes delas. A porção também pode incluir pelo menos cerca de 50% de cada uma ou tanto da primeira como da quarta região estrutural, o 50% sendo os 50% C-terminais da primeira região estrutural e os 50% N-terminais da quarta região estrutural. Resíduos adicionais na extremidade N-terminal ou C-terminal da parte considerável do  
25 domínio variável podem ser aqueles não normalmente associados com regiões de domínio variável de ocorrência natural. Por exemplo, a construção de membros de ligação da presente invenção feita por técnicas de DNA recombinante pode resultar na introdução de resíduos N- ou C-terminais codificados por ligantes introduzidos para facilitar a clonagem ou outras

etapas de manipulação. Outras etapas de manipulação incluem a introdução de ligantes para unir domínios variáveis da invenção para sequências protéicas adicionais incluindo regiões constantes de anticorpo, outros domínios variáveis (por exemplo, na produção de diacoros) ou marcadores detectáveis/funcionais como discutido em maiores detalhes em outro lugar aqui.

Embora em alguns aspectos da invenção, membros de ligação compreendam um par de domínios VH e VL, domínios de ligação singulares baseados ou em sequências de domínio VH ou VL formam aspectos adicionais da invenção. Sabe-se que domínios de imunoglobulina únicos, especialmente domínios VH, são capazes de se ligarem a antígenos alvo de uma maneira específica. Por exemplo, veja a discussão de dAbs acima. No caso de cada um dos domínios de ligação únicos, esses domínios podem ser usados para triar domínios complementares capazes de formar um membro de ligação de dois domínios capaz de se ligar a IL-6. Isto pode ser alcançado por métodos de triagem por visualização de fagos usando a suposta abordagem combinatória dual hierárquica como divulgado em WO92/01047, incorporada aqui como referência em sua totalidade, em que uma colônia individual contendo ou um clone de cadeia H ou L é usada para infectar uma biblioteca completa de clones codificando a outra cadeia (L ou H) e o membro de ligação de duas cadeias resultante é selecionado de acordo com técnicas de visualização de fagos, tal como aquelas descritas naquela referência. Esta técnica também é divulgada em Marks *et al.*, IBID [100].

Membros de ligação da presente invenção podem compreender adicionalmente regiões constantes de anticorpo ou partes destas, p. ex., regiões constantes de anticorpo humano ou partes destas. Por exemplo, um domínio VL pode ser aderido na sua extremidade C-terminal a domínios constantes de cadeia leve de anticorpo incluindo cadeias C $\kappa$  ou C $\lambda$ . De maneira similar, um membro de ligação baseado em um domínio VH pode ser

aderido na sua extremidade C-terminal ao todo ou parte (p. ex., um domínio CH1) de uma cadeia pesada de imunoglobulina derivada de qualquer isotipo de anticorpo, p. ex., IgG, IgA, IgE e IgM e qualquer das subclasses de isotipo, particularmente IgG1 e IgG4. IgG1 é vantajosa, devido à sua função efetora e facilidade de fabricação. Qualquer variante de região constante sintética ou outra que tenha essas propriedades e estabilize regiões variáveis também pode ser útil na presente invenção.

Membros de ligação da invenção podem ser marcados com um marcador detectável ou funcional. Assim, um membro de ligação ou moléculas de anticorpo pode estar presente no forma de um imunoconjugado para obter um sinal detectável e/ou quantificável. Imunoconjugados podem compreender uma molécula de anticorpo da invenção conjugada com marcador detectável ou funcional. Um marcador pode ser qualquer molécula que produz ou pode ser induzida a produzir um sinal, incluindo, mas não limitando a fluorescedores, radiomarcadores, enzimas, quimioluminescedores ou fotossensibilizadores. Assim, a ligação pode ser detectada e/ou medida pela detecção de fluorescência ou luminescência, radioatividade, atividade enzimática ou absorbância luminosa.

Marcadores adequados incluem, por meio de ilustração e não de limitação,

- enzimas, tal como fosfatase alcalina, glicose-6-fosfato desidrogenase (“G6PDH”), alfa-D-galactosidase, glicose oxidase, glicose amilase, anidrase carbônica, acetilcolinesterase, lisozima, malato desidrogenase e peroxidase, p. ex., peroxidase de rábano-picante;

- corantes;

- marcadores fluorescentes ou fluorescedores, tal como fluoresceína e seus derivados, fluorocromo, compostos e derivados de rodamina, GFP (GFP para “Proteína Fluorescente Verde” – “*Green Fluorescent Protein*”), dansila, umbeliferona, ficoeritrina, ficocianina,

aloficocianina, o-ftaldeído e fluorescamina; fluoróforos tal como criptatos e quelatos de lantanídeos, p. ex., de európio, etc. (Perkin Elmer e Cis Biointernational);

- marcadores quimioluminescentes ou quimioluminescedores, tal como isoluminol, luminol e os dioxetanos;

- marcadores bioluminescentes, tal como luciferase e luciferina;

- sensibilizadores;

- coenzimas;

- substratos de enzima;

- radiomarcadores incluindo, mas não limitando a bromo 77, carbono 14, cobalto 57, flúor 8, gálio 67, gálio 68, hidrogênio 3 (trítio), índio 111, índio 113m, iodo 123m, iodo 125, iodo 126, iodo 131, iodo 133, mercúrio 107, mercúrio 203, fósforo 32, rênio 99m, rênio 101, rênio 105, rutênio 95, rutênio 97, rutênio 103, rutênio 105, escândio 47, selênio 75, enxofre 35, tecnécio 99, tecnécio 99m, telúrio 121m, telúrio 122m, telúrio 125m, túlio 165, túlio 167, túlio 168, ítrio 199 e outros radiomarcadores mencionados aqui;

- partículas, tal como partículas de látex ou carbono; sol metálico; cristalito; lipossomos; células, etc., que podem ser marcados adicionalmente com um corante, catalisador ou outro grupo detectável;

- moléculas tal como biotina, digoxigenina ou 5-bromodesoxiuridina;

- unidades de toxina, tal como, por exemplo, uma unidade de toxina selecionada de um grupo de exotoxina de *Pseudomonas* (PE ou um fragmento citotóxico ou mutante desta), toxina diftérica ou um fragmento citotóxico ou mutante desta, uma toxina botulínica A, B, C, D, E ou F, ricina ou um fragmento citotóxico desta, saporina ou um fragmento citotóxico desta, toxina antiviral de caruru-de-cacho ou um fragmento citotóxico desta e

briodina 1 ou um fragmento citotóxico desta.

Enzimas e coenzimas adequadas são divulgadas em Litman, *et al.*, US4275149 e Bogulaski *et al.*, US4318980, cada um dos quais são aqui incorporados como referência em suas totalidades. Fluorescedores e quimioluminescedores adequados são divulgadas em Litman, *et al.*, US4275149, que é aqui incorporado como referência em sua totalidade. Marcadores incluem adicionalmente unidades químicas, tal como biotina que podem ser detectadas através de ligação a uma unidade detectável cognata específica, p. ex., avidina marcada ou estreptavidina. Marcadores detectáveis podem ser aderidos a anticorpos da invenção usando química convencional conhecida na técnica.

Imunoconjugados ou seus fragmentos funcionais podem ser preparados por métodos conhecidos pela pessoa versada na técnica. Eles podem ser acoplados a enzimas ou a marcadores fluorescentes diretamente ou pelo intermédio de um grupo espaçador ou de um grupo de ligação, tal como um polialdeído, como glutaraldeído, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido dietileno-triaminopentacético (DPTA) ou na presença de agentes acopladores, tal como aqueles mencionados acima para os conjugados terapêuticos. Conjugados contendo marcadores do tipo fluoresceína podem ser preparados por reação com um isotiocianato.

Os métodos conhecidos pela pessoa versada na técnica existentes para acoplar os radioisótopos terapêuticos aos anticorpos ou diretamente ou através de um agente quelante, tal como EDTA, DPTA mencionados acima podem ser usados para radioelementos que podem ser usados no diagnóstico. Também é possível realizar a marcação com sódio <sup>125</sup> pelo método de T cloramina [102] senão, com tecnécio <sup>99m</sup> pela técnica de Crockford *et al.*, (US4424200, incorporada aqui como referência em sua totalidade) ou aderido através de DPTA como descrito por Hnatowich (US4479930, incorporado aqui como referência em sua totalidade).

Existem numerosos métodos pelos quais o marcador pode produzir um sinal detectável por meio externo, por exemplo, por exame visual, radiação eletromagnética, calor e reagentes químicos. O marcador também pode ser ligado a outro membro de ligação que se liga ao anticorpo da invenção, ou a um suporte.

O marcador pode produzir diretamente um sinal, e, portanto, componentes adicionais não são necessários para produzir um sinal. Numerosas moléculas orgânicas, por exemplo, fluorescedores, são capazes de absorver luz ultravioleta e visível, onde a absorção de luz transfere energia para essas moléculas e as eleva a um estado de energia excitado. Essa energia absorvida é então dissipada pela emissão de luz em um segundo comprimento de onda. Esta segunda emissão de comprimento de onda também pode transferir energia para uma molécula aceptora marcada e a energia resultante dissipada a partir da molécula aceptora pela emissão de luz, por exemplo, transferência de energia ressonante fluorescente (FRET). Outros marcadores que diretamente produzem um sinal incluem isótopos radioativos e corantes.

Senão, o marcador pode precisar de outros componentes para produzir um sinal e o sistema produtor de sinal incluiria então todos os componentes necessários para produzir um sinal mensurável, o que pode incluir substratos, coenzimas, acentuadores, enzimas adicionais, substâncias que reagem com produtos enzimáticos, catalisadores, ativadores, cofatores, inibidores, removedores, íons metálicos e uma substância de ligação específica requerida para ligação de substâncias que geram sinal. Uma discussão detalhada de sistemas produtores de sinal pode ser encontrada em Ullman *et al.*, US5185243, que é aqui incorporada como referência em sua totalidade. A presente invenção provê um método compreendendo causar ou permitir ligação de um membro de ligação como provido aqui a IL-6. Como mencionado, tal ligação pode ocorrer *in vivo*, p. ex., após administração de um membro de ligação, ou de ácido nucleico codificando um membro de

ligação, ou ela pode ocorrer *in vitro*, por exemplo, em ELISA, transferência de Western, imunocitoquímica, imunoprecipitação, cromatografia de afinidade e ensaios bioquímicos ou baseados em célula, tal como um ensaio de proliferação de célula TF-1.

5                   A presente invenção também provê a medição de níveis de antígeno diretamente, pelo emprego de um membro de ligação de acordo com a invenção, por exemplo, em um sistema biossensor. Por exemplo, a presente invenção, compreende um método para detectar e/ou medir a ligação a IL-6, compreendendo (i) expor o citado membro de ligação a IL-6 e (ii) detectar a  
10                   ligação do citado membro de ligação a IL-6, em que a ligação é detectada usando qualquer métodos ou marcador detectável descrito aqui. Este e qualquer outro método de detecção de ligação descrito aqui, pode ser interpretado diretamente pela pessoa que executa o método, por exemplo, pela observação visual de um marcador detectável. Senão, este método, ou  
15                   qualquer outro método de detecção de ligação descrito aqui, pode produzir um relato na forma de uma auto-radiografia, uma fotografia, uma impressão de computador, um relato de citometria de fluxo, um gráfico, uma tabela, um tubo de teste ou recipiente ou poço contendo o resultado, ou qualquer outra representação visual ou física de um resultado do método.

20                   A quantidade de ligação de membro de ligação a IL-6 pode ser determinada. A quantificação pode estar relacionada à quantidade do antígeno em uma amostra teste, que pode ser de interesse diagnóstico. A triagem para ligação a IL-6 e/ou a quantificação desta pode ser útil, por exemplo, em pacientes de triagem para doenças ou distúrbios referidos aqui e/ou qualquer  
25                   outra doença ou distúrbio envolvendo expressão e/ou atividade aberrante de IL-6.

Um método diagnóstico da invenção pode compreender (i) obter uma amostra de tecido ou fluido de um indivíduo, (ii) expor a citada amostra de tecido ou fluido a um ou mais membros de ligação da presente

invenção e (iii) detectar IL-6 ligada quando comparada com uma amostra controle, em que um aumento na quantidade de ligação a IL-6 quando comparada com o controle pode indicar um nível aberrante de expressão ou atividade de IL-6. Amostras de tecido ou fluido a serem testadas incluem  
5 sangue, soro, urina, material de biópsia, tumores, ou qualquer tecido suspeito de conter níveis aberrantes de IL-6. Indivíduos de teste positivo para atividade ou níveis aberrantes de IL-6 também podem se beneficiar dos métodos de tratamento divulgados posteriormente aqui. Aqueles versados na técnica são capazes de escolher um modo adequado de determinar a ligação do membro  
10 de ligação a um antígeno de acordo com a preferência e conhecimento geral deles, à luz dos métodos aqui divulgados.

As reatividades de membros de ligação em uma amostra podem ser determinadas por quaisquer meios apropriados. Radioimunoensaio (RIA) é uma possibilidade. Antígeno marcado radioativamente é misturado  
15 com antígeno não marcado (a amostra teste) e permite-se que se ligue ao membro de ligação. O antígeno ligado é separado fisicamente do antígeno não ligado e a quantidade de antígeno radioativo ligada ao membro de ligação determinada. Quanto mais antígeno houver na amostra teste, menos antígeno radioativo se ligará ao membro de ligação. Um ensaio de ligação competitiva  
20 também pode ser usado com antígeno não radioativo, usando antígeno ou um análogo ligado a uma molécula repórter. A molécula repórter pode ser um corante laser, fósforo ou fluorocromo com absorção ou características de emissão isolada espectralmente. Fluorocromos adequados incluem fluoresceína, rodamina, ficoeritrina e vermelho Texas e quelatos ou criptatos  
25 de lantanídeos. Corantes cromagênicos adequados incluem diaminobenzidina.

Outros repórteres incluem partículas coloidais macromoleculares ou material particulado, tal como microesferas de látex que são coloridas, magnéticas ou paramagnéticas e agentes biologicamente ou quimicamente ativos que podem diretamente ou indiretamente causar sinais

detectáveis a serem observados visualmente, detectados eletronicamente ou registrados de outro modo. Essas moléculas podem ser enzimas, que catalisam reações que desenvolvem ou alteram cores ou causam alterações em propriedades elétricas, por exemplo. Elas podem ser molecularmente excitáveis, tal que transições eletrônicas entre estados de energia resultem em absorções ou emissões espectrais características. Elas podem incluir entidades químicas usadas em conjunto com biossensores. Sistemas de detecção de biotina/avidina ou biotina/estreptavidina e fosfatase alcalina podem ser empregados.

Os sinais gerados por conjugados repórter-membro de ligação individual podem ser usados para derivar dados relativos ou absolutos quantificáveis de ligação de membro de ligação relevante em amostras (normal e teste).

Um kit compreendendo um membro de ligação de acordo com qualquer aspecto ou modalidade da presente invenção também é provido como um aspecto da presente invenção. No kit, o membro de ligação pode estar marcado para permitir que sua reatividade em uma amostra seja determinada, p. ex., como descrito adicionalmente abaixo. Adicionalmente, o membro de ligação pode ou não estar aderido a um suporte sólido. Componentes de um kit estão geralmente estéreis e em frascos ou outros recipientes selados. Kits podem ser empregados em análise diagnóstica ou outros métodos para os quais membros de ligação sejam úteis. Um kit pode conter instruções para uso dos componentes em um método, p. ex., um método de acordo com a presente invenção. Materiais ancilares para auxiliar ou permitir a execução de tal método podem ser incluídos em um kit da invenção. Os materiais ancilares incluem um segundo membro de ligação diferente que se liga ao primeiro membro de ligação e está conjugado a um marcador detectável (p. ex., um marcador fluorescente, isótopo radioativo ou enzima). Kits baseados em anticorpo também podem compreender

microesferas para conduzir uma imunoprecipitação. Cada componente dos kits geralmente está em seu próprio recipiente adequado. Assim, esses kits geralmente compreendem recipientes distintos adequados para cada membro de ligação. Adicionalmente, os kits podem compreender instruções para  
5 executar o ensaio e métodos para interpretar e analisar os dados resultantes da execução do ensaio.

A presente invenção também provê o uso de um membro de ligação conforme acima para medir níveis de antígeno em um ensaio de competição, isto é, dizer que um método para medir o nível de antígeno em  
10 uma amostra pelo emprego de um membro de ligação como provido pela presente invenção em um ensaio de competição. Isto pode ser quando a separação física de antígeno ligado e do não ligado não é necessária. Ligar uma molécula repórter a um membro de ligação para que uma mudança física ou ótica ocorra na ligação é uma possibilidade. A molécula repórter pode  
15 diretamente ou indiretamente gerar sinais detectáveis, que podem ser quantificáveis. A ligação de moléculas repórter pode ser direta ou indireta, covalente, p. ex., através de uma ligação peptídica ou não covalente. A ligação através de uma ligação peptídica pode ser como resultado de expressão recombinante de uma fusão gênica codificando anticorpo e  
20 molécula repórter.

Em vários aspectos e modalidades, a presente invenção se prolonga para um membro de ligação que compete pela ligação a IL-6 com qualquer membro de ligação definido aqui, p. ex., o anticorpo parental ou qualquer dos anticorpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 e 23, p.  
25 ex., no formato de IgG1. A competição entre membros de ligação pode ser dosada facilmente *in vitro*, por exemplo pela etiquetagem com uma molécula repórter específica de um membro de ligação que pode ser detectado na presença de outro(s) membro(s) de ligação não etiquetados, para permitir a identificação de membros de ligação que se ligam ao mesmo epítipo ou

epítopo sobreposto. A competição pode ser determinada, por exemplo, usando ELISA em que IL-6 é imobilizada em uma placa e um primeiro membro de ligação etiquetado ou marcado junto com um ou mais outros membros de ligação etiquetados ou marcados é adicionado à placa. A presença de um

5 membro de ligação não etiquetado que compete com o membro de ligação etiquetado é observada por uma diminuição no sinal emitido pelo membro de ligação etiquetado.

Por exemplo, a presente invenção inclui um método para identificar um composto de ligação a IL-6, compreendendo (i) imobilizar IL-6

10 em um suporte, (ii) por em contato a citada IL-6 imobilizada simultaneamente ou de uma maneira passo a passo com pelo menos um membro de ligação etiquetado ou marcado de acordo com a invenção e um ou mais compostos de ligação teste não etiquetados ou não marcados e (iii) identificar um novo composto de ligação a IL-6 pela observação de uma diminuição na quantidade

15 de etiqueta ligada a partir do membro de ligação etiquetado. Tais métodos podem ser realizados de uma maneira de alta produtividade usando um formato de multipoços ou de arranjos. Tais ensaios também podem ser realizados em solução. Veja, por exemplo, US 5.814.468, que aqui é incorporada como referência em sua totalidade. Como descrito acima, a

20 detecção de ligação pode ser interpretada diretamente pela pessoa que realiza o método, por exemplo, pela observação visual de um marcador detectável, ou pela diminuição na presença deste. Senão, os métodos de ligação da invenção podem produzir um relato na forma de uma auto-radiografia, uma fotografia, uma impressão de computador, um relato de citometria de fluxo, um gráfico,

25 uma tabela, um tubo de teste ou recipiente ou poço contendo o resultado, ou qualquer outra representação visual ou física de um resultado do método.

Ensaio de competição também podem ser usados em mapeamento de epítopo. Em um caso, o mapeamento de epítopo pode ser usado para identificar o epítopo ligado por um membro de ligação a IL-6 que

opcionalmente pode ter características de neutralização e/ou modulação otimizadas. Tal epítopo pode ser linear ou conformacional. Um epítopo conformacional pode compreender pelo menos dois fragmentos diferentes de IL-6, em que os citados fragmentos estão posicionados em proximidade um do outro quando a IL-6 está enovelada em sua estrutura terciária ou quaternária para formar um epítopo conformacional que é reconhecido por um inibidor de IL-6, tal como um membro de ligação de IL-6. No teste de competição, um fragmento peptídico do antígeno pode ser empregado, especialmente um peptídeo que inclui ou consiste essencialmente em um epítopo de interesse. Um peptídeo que tem a sequência do epítopo mais um ou mais aminoácidos em cada extremidade pode ser usado. Membros de ligação de acordo com a presente invenção podem ser tais que a ligação deles ao antígeno é inibida por um peptídeo com ou incluindo a sequência dada.

A presente invenção provê adicionalmente um ácido nucleico isolado codificando um membro de ligação da presente invenção. Ácido nucleico pode incluir DNA e/ou RNA. Em um, a presente invenção provê um ácido nucleico que codifica uma CDR ou grupo de CDRs ou domínio VH ou domínio VL ou sítio de ligação a antígeno de anticorpo ou molécula de anticorpo, p. ex., scFv ou IgG1, da invenção como definido acima.

A presente invenção também provê construções na forma de plasmídeos, vetores, cassetes de transcrição ou expressão que compreendem pelo menos um polinucleotídeo conforme acima.

A presente invenção também provê uma célula hospedeira recombinante que compreende uma ou mais construções como acima. Um ácido nucleico codificando qualquer CDR ou grupo de CDRs ou domínio VH ou domínio VL ou sítio de ligação a antígeno de anticorpo ou molécula de anticorpo, p. ex., scFv ou IgG1 como provido, forma por si só um aspecto da presente invenção, como o faz um método de produção do produto codificado, método o qual compreende expressão a partir do ácido nucleico

codificante. A expressão pode convenientemente ser alcançada por cultivo sob condições apropriadas de células hospedeiras recombinantes contendo o ácido nucleico. Após a produção pela expressão de um domínio VH ou VL, ou membro de ligação, pode ser isolado e/ou purificado usando qualquer  
5 técnica adequada, então usada como apropriado.

Ácido nucleico de acordo com a presente invenção pode compreender DNA ou RNA e pode ser completamente ou parcialmente sintético. Referência a uma sequência nucleotídica como set ou aqui abrange uma molécula de DNA com a sequência especificada e abrange uma molécula  
10 de RNA com a sequência especificada em que U substitui T, a menos que o contexto requeira de outro modo.

Um aspecto ainda adicional provê um método de produção de um domínio variável VH de anticorpo, o método incluindo causar expressão de ácido nucleico codificante. Tal método compreende cultivar células  
15 hospedeiras sob condições de produção do citado domínio variável VH de anticorpo.

Métodos análogos de produção de domínios variáveis e membros de ligação compreendendo um domínio VH e/ou VL são providos como aspectos adicionais da presente invenção.

20 Um método de produção pode compreender uma etapa de isolamento e/ou purificação do produto. Um método de produção pode compreender formular o produto em uma composição incluindo pelo menos um componente adicional, tal como um excipiente farmacologicamente aceitável.

25 Sistemas para clonagem e expressão de um polipeptídeo em uma variedade de células hospedeiras diferentes são bem conhecidos. Células hospedeiras adequadas incluem bactérias, células mamíferas, células vegetais, fungos filamentosos, levedura e sistemas de baculovírus e plantas transgênicas e animais. A expressão de anticorpos e fragmentos de

anticorpos em células procarióticas é bem estabelecida na técnica. Para uma revisão, veja, por exemplo, Plückthun [103]. Um hospedeiro bacteriano comum é *E. coli*.

5 A expressão em células eucarióticas em cultura também está disponível para aqueles versados na técnica como uma opção para produção de um membro de ligação [104, 105, 106]. Linhagens celulares mamíferas disponíveis na técnica para expressão de um polipeptídeo heterólogo incluem células de ovário de hamster chinês (CHO), células HeLa, células de rim de hamster bebê, células de melanoma de camundongo NS0, células de mieloma  
10 de rato YB2/0, células de rim embrionário humano, célula de retina embrionária humana e muitas outras.

Vetores adequados podem ser escolhidos ou construídos, contendo sequências regulatórias apropriadas, incluindo sequências promotoras, sequências terminadoras, sequências de poliadenilação,  
15 sequências acentuadoras, genes marcadores e outras sequências conforme apropriado. Vetores podem ser plasmídeos, p. ex., fagomídeo, ou vírus, p. ex., ‘fago, conforme apropriado [107]. Muitas técnicas e protocolos conhecidos para manipulação de ácido nucleico, por exemplo, na preparação de construções de ácido nucleico, mutagênese, seqüenciamento, introdução de  
20 DNA em células e expressão gênica e análise de proteínas, são descritas em detalhe em Ausubel *et al.*, [108].

Um aspecto adicional da presente invenção provê uma célula hospedeira contendo ácido nucleico conforme aqui divulgado. Tal célula hospedeira pode estar *in vitro* e pode estar em cultura. Tal célula hospedeira  
25 pode estar *in vivo*. A presença *in vivo* da célula hospedeira pode permitir expressão intracelular dos membros de ligação da presente invenção como “intracorpos” ou anticorpos intracelulares. Intracorpos podem ser usados para terapia gênica.

Um aspecto ainda adicional provê um método compreendendo

introduzir ácido nucleico da invenção em uma célula hospedeira. A introdução pode empregar qualquer técnica disponível. Para células eucarióticas, técnicas adequadas podem incluir transfecção com fosfato de cálcio, DEAE-dextran, eletroporação, transfecção mediada por lipossomo e transdução usando retrovírus ou outros vírus, p. ex., da vacínia ou, para células de inseto, baculovírus. A introdução de ácido nucleico na célula hospedeira, em particular uma célula eucariótica pode usar um sistema viral ou baseado em plasmídeo. O sistema de plasmídeo pode ser mantido epissomalmente ou pode ser incorporado na célula hospedeira ou em um cromossomo artificial. A incorporação pode ser ou aleatória ou de integração direcionada de uma ou mais cópias em loci únicos ou múltiplos. Para células bacterianas, técnicas adequadas podem incluir transformação por cloreto de cálcio, eletroporação e transfecção usando bacteriófago.

A introdução pode ser seguida pela causa ou permissão de expressão do ácido nucleico, p. ex., pelo cultivo de células hospedeiras sob condições para expressão do gene. A purificação do produto expressado pode ser alcançada por métodos conhecidos por alguém versado na técnica.

Ácido nucleico da invenção pode ser integrado no genoma (p. ex., cromossomo) da célula hospedeira. A integração pode ser promovida pela inclusão de sequências que promovem a recombinação com o genoma, de acordo com técnicas padrões.

A presente invenção também provê um método que compreende usar uma construção como estipulado acima em um sistema de expressão a fim de expressar um membro de ligação ou polipeptídeo conforme acima.

Há evidência para envolvimento de IL-6 em uma variedade de distúrbios, como discutido em outro lugar aqui. Os membros de ligação da presente invenção podem, portanto, ser usados em um método de diagnóstico ou tratamento de um distúrbio associado com IL-6. Tal distúrbio pode, por

exemplo, ser um distúrbio inflamatório e/ou auto-imune tal como, por exemplo, artrite reumatóide, osteoartrite, caquexia, doença pulmonar obstrutiva crônica, artrite idiopática juvenil, asma, lúpus eritematoso sistêmico, doença inflamatória do intestino, doença de Crohn ou  
 5 aterosclerose. Um membro de ligação da presente invenção também pode ser usado para tratar um distúrbio tal como um tumor e/ou câncer.

Membros de ligação da presente invenção também podem ser usados em método de diagnóstico ou tratamento de pelo menos uma doença relacionada a IL-6, em um paciente, animal, órgão, tecido ou célula,  
 10 incluindo, mas não limitando a:

(o trato respiratório) doenças obstrutivas das vias respiratórias incluindo doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD); asma, tal como brônquica, alérgica, intrínseca, extrínseca e asma por poeira, particularmente asma crônica ou inveterada (p. ex., asma tardia e hiper-responsividade das  
 15 vias respiratórias); bronquite; rinite aguda, alérgica, atrófica e rinite crônica incluindo rinite caseosa, rinite hipertrófica, rinite purulenta, rinite seca e rinite medicamentosa; rinite membranosa incluindo rinite croupus, fibrinosa e pseudomembranosa e rinite escrofulosa; rinite sazonal incluindo rinite nervosa (febre do feno) e rinite vasomotora, sinusite, fibrose pulmonar  
 20 idiopática (IPF); sarcoidose, doença de pulmão de fazendeiro e relacionadas, síndrome de angústia respiratória do adulto, pneumonite por hipersensibilidade, pneumonia de pulmão fibróide e intersticial idiopática;

(osso e articulações) artrite reumatóide, artrite crônica juvenil, artrite juvenil de início sistêmico, espondiloartropatias soronegativas  
 25 (incluindo espondilite anquilosante, artrite psoriática e doença e Reiter), doença de Behcet, síndrome de Sjogren e esclerose sistêmica, gota, osteoporose e osteoartrite.

(pele) psoríase, dermatite atópica, dermatite de contato e outras dermatoses eczmatosas, dermatite de contato alérgico, dermatite

seborreica, líquen plano, escleroderma, pênfigo, pênfigo bolhoso, epidermólise bolhosa, urticária, angiodermas, vasculites, eritemas, eosinofilia cutânea, uveíte, alopecia circunscrita, conjutivite alérgica e conjutivite vernal.

- 5                                   (trato gastrointestinal) úlcera gástrica, doença celíaca, proctite, gastroenterite eosinofílica, mastocitose, doença inflamatória do intestino, doença de Crohn, colite ulcerativa, síndrome antifosfolipídica, alergias relacionadas a comida que têm efeitos remotos no intestino, p. ex., enxaqueca, rinite e eczema;
- 10                               (doença sistêmica e de outros tecidos) caquexia, esclerose múltipla, aterosclerose, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), glomerulonefrite proliferativa mesangial, síndrome nefrótica, nefrite glomerular, insuficiência renal aguda, hemodiálise, uremia, lúpus eritematoso discoide ou localizado, lúpus eritematoso sistêmico, doença de Castleman,
- 15                               tireoidite de Hashimoto, miastenia grave, diabetes tipo I, diabetes resistente a insulina tipo B, anemia falciforme, iridociclite/uveíte/neurite ótica, síndrome nefrítica, fascite de eosinofilia, síndrome de hiper-IgE, vasculite sistêmica/granulomatose de Wegener, orquite/procedimentos de reversão de vasectomia, hanseníase lepromatosa, hepatite induzida por álcool, síndrome
- 20                               de Sézary e púrpura trombocitopênica idiopática; adesões pós-operatórias, nefrose, síndrome de resposta inflamatória sistêmica, síndrome de sepse, sepse Gram positiva, sepse Gram negativa, sepse de cultura negativa, sepse fúngica, febre neutropênica, pancreatite aguda, urosepse, doença de Graves, doença de Raynaud, citotoxicidade mediada por anticorpo, reações de
- 25                               hipersensibilidade tipo III, síndrome POEMS (polineuropatia, organomegalia, endocrinopatia, gamopatia monoclonal e síndrome de alterações da pele), doença de tecido conjuntivo misto, doença de Addison idiopática, diabetes melito, hepatite ativa crônica, cirrose biliar primária, vitiligo, síndrome pós-MI (cardiotomia), hipersensibilidade tipo IV, granulomas devido a

organismos intracelulares, doença de Wilson, hemacromatose, deficiência de alfa-I-antitripsina, retinopatia diabética, tireoidite de Hashimoto, avaliação do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal, tireoidite, encefalomielite, doença pulmonar crônica neonatal, linfoistiocitose hematofagocítica familiar, alopecia, terapia por radiação (p. ex., incluindo, mas não limitando a astenia, anemia, caquexia e semelhantes), intoxicação por salicilato crônica, apneia de sono, obesidade, insuficiência cardíaca e meningococcemia;

(rejeição de aloenxerto) aguda e crônica após, por exemplo, transplante de rim, coração, fígado, pulmão, pâncreas, medula óssea, osso, intestino delgado, pele, cartilagem e córnea; doença hospedeiro contra enxerto crônica;

(doença maligna) leucemia, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia aguda, célula T, célula B, ou FAB ALL, leucemia mielocítica crônica (CML), leucemia mieloide (AML), leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia de células pilosas, síndrome mielodiplásica (MDS), qualquer linfoma, doença de Hodgkin, linfoma não Hodgkin, qualquer linfoma maligno, linfoma de Burkitt, mieloma múltiplo, sarcoma de Kaposi, carcinoma de célula renal, carcinoma colorretal, carcinoma da próstata, carcinoma pancreático, carcinoma nasofaríngeo, histiocitose maligna, síndrome paraneoplásica/hipercalcemia da malignidade, tumores sólidos, adenocarcinomas, sarcomas, melanoma maligno, hemangioma, doença metastática, reabsorção óssea relacionada a câncer, dor óssea relacionada a câncer; a supressão de metástase cancerígena; a melhora de caquexia de câncer;

Fibrose cística, acidente vascular cerebral, lesão por reperfusão no coração, cérebro, membros periféricos e outros órgãos;

Ferimentos de queimadura, trauma/hemorragia, exposição a radiação ionizante, úlceras cutâneas crônicas;

Doenças reprodutoras (p. ex., distúrbios de ovulação,

menstruação e implantação, trabalho *pre-term*, pré-eclampsia, endometriose);

(infecções) infecção bacteriana aguda ou crônica, processos infecciosos ou parasíticos crônicos e agudos, incluindo infecções bacterianas, virais e fúngicas, infecção por HIV/neuropatia por HIV, meningite, hepatite  
 5 (A, B ou C ou outra hepatite viral e semelhantes), artrite séptica, peritonite, pneumonia, epiglote, *E. coli* O157:H7, síndrome hemolítico-urêmica/púrpura trombocitopênica trombótica, malária, febre da dengue hemorrágica, leishmaniose, hanseníase, síndrome do choque tóxico, miosite estreptocócica, gangrena gasosa, tuberculose de micobactéria,  
 10 *Mycobacterium avium-intracellulare*, pneumonia por *Pneumocystis carinii*, doença inflamatória pélvica, orquite/epididimite, *Legionella*, doença de Lyme, *influenza* A, vírus Epstein-Barr, síndrome hemaflagocítica vital-associada, encefalite viral/meningite asséptica e semelhantes.

Consequentemente, a invenção provê um método para tratar  
 15 um distúrbio relacionado a IL-6, compreendendo administrar a um paciente em necessidade desta uma quantidade eficaz de um ou mais membros da presente invenção sozinhos ou em um regime terapêutico combinado com outro medicamento apropriado conhecido na técnica ou aqui descrito.

Evidência de envolvimento de IL-6 em certos distúrbios é  
 20 resumida em outro lugar aqui. Além disso, os dados apresentados aqui indicam adicionalmente que membros de ligação da invenção podem ser usados para tratar tais distúrbios, incluindo tratamento preventivo e redução de gravidade dos distúrbios. Consequentemente, a invenção provê um método para tratar ou reduzir a gravidade de pelo menos um sintoma de qualquer dos  
 25 distúrbios mencionados aqui, compreendendo administrar a um paciente em necessidade deste uma quantidade eficaz de um ou mais membros de ligação da presente invenção sozinhos ou em um regime terapêutico combinado com outro medicamento apropriado conhecido na técnica ou descrito aqui tal que a gravidade de pelo menos um sintoma de qualquer dos distúrbios seja

reduzida.

Assim, os membros de ligação da presente invenção são úteis como agentes terapêuticos no tratamento de doenças ou distúrbios envolvendo expressão e/ou atividade de IL-6 e/ou IL-6Ra, especialmente expressão/atividade aberrante. Um método de tratamento pode compreender administrar uma quantidade eficaz de um membro de ligação da invenção a um paciente em necessidade deste, em que expressão e/ou atividade aberrante de IL-6 e/ou IL-6Ra é diminuída. Um método de tratamento pode compreender (i) identificar um paciente que demonstra atividade ou níveis aberrantes de IL-6:IL-6Ra, por exemplo, usando os métodos diagnósticos descritos acima e (ii) administrar uma quantidade eficaz de um membro de ligação da invenção ao paciente, em que atividade e/ou expressão aberrante de IL-6Ra e/ou IL-6 é diminuída. Uma quantidade eficaz de acordo com a invenção é uma quantidade que diminui a atividade e/ou expressão aberrante de IL-6Ra e/ou IL-6 para diminuir ou reduzir a gravidade de pelo menos um sintoma da doença ou distúrbio particular a ser tratado, mas não necessariamente cura a doença ou distúrbio.

A invenção também provê um método para antagonizar pelo menos um efeito de IL-6, compreendendo por em contato com ou administrar uma quantidade eficaz de um ou mais membros de ligação da presente invenção tal que o citado um efeito de IL-6 é antagonizado. Efeitos de IL-6 que podem ser antagonizados pelos métodos da invenção incluem ligação de IL-6 a gp130 e efeitos a jusante que surgem como consequência desta ligação. Consequentemente, aspectos adicionais da invenção provêm métodos de tratamento compreendendo a administração de um membro de ligação como provido, composições farmacêuticas compreendendo tal membro de ligação e uso de tal membro de ligação na fabricação de um medicamento para administração, por exemplo, de um método para fazer um medicamento ou composição farmacêutica compreendendo formular o membro de ligação com

um excipiente farmacêuticamente aceitável. Um excipiente farmacêuticamente aceitável pode ser um composto ou uma combinação de compostos que entram em uma composição farmacêutica não provocando reações secundárias e que permite, por exemplo, facilitação da administração do(s) composto(s) ativo(s), um aumento em sua tempo de vida e/ou em sua eficácia no corpo, um aumento em sua solubilidade em solução senão, uma melhora em sua conservação. Esses veículos farmacêuticamente aceitáveis são bem conhecidos e serão adaptados pela pessoa versada na técnica como uma função da natureza e do modo de administração do(s) composto(s) ativo(s) escolhido(s).

Membros de ligação da presente invenção geralmente serão administrados na forma de uma composição farmacêutica, que pode compreender pelo menos um componente além do membro de ligação. Assim, composições farmacêuticas de acordo com a presente invenção e para uso de acordo com a presente invenção, podem compreender, além do ingrediente ativo, um excipiente farmacêuticamente aceitável, veículo, tampão, estabilizador ou outros materiais bem conhecidos por aqueles versados na técnica. Tais materiais devem ser não tóxicos e não devem interferir com a eficácia do ingrediente ativo. A natureza precisa do veículo ou outro material dependerá da via de administração, que pode ser oral, inalada, intratraqueal, tópica, intravesicular ou por injeção, como discutido abaixo.

Composições farmacêuticas para administração oral, tal como, por exemplo, moléculas de anticorpo de domínio único (p. ex., “nanobodies™”) etc. também são previstos na presente invenção. Tais formulações orais podem estar na forma de comprimido, cápsula, pó, líquida ou semi-sólida. Um comprimido pode compreender um veículo sólido, tal como gelatina ou um adjuvante. Composições farmacêuticas líquidas geralmente compreendem um veículo líquido, tal como água, petróleo, óleos animais ou vegetais, óleo mineral ou óleo sintético. Solução de salina

fisiológica, dextrose ou outra solução sacarídica ou glicóis, tal como etileno glicol, propileno glicol ou polietileno glicol podem ser incluídos.

Para injeção intravenosa, ou injeção no sítio da doença, o ingrediente ativo estará na forma de uma solução aquosa parenteralmente aceitável que é livre de pirógeno e tem pH, isotonicidade e estabilidade adequados. Aqueles com conhecimento relevante da técnica são bem capazes de preparar soluções adequadas usando, por exemplo, veículos isotônicos, tais como injeção de cloreto de sódio, injeção de Ringer, injeção de Ringer lactada. Conservantes, estabilizadores, tampões, antioxidantes e/ou outros aditivos podem ser empregados como requerido incluindo tampões tais como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes, tais como ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de octadecildimetilbezil e amônio; cloreto de hexametônio; cloreto de benzalcônio; cloreto de benzetônio; álcool fenólico, butílico ou benzílico; alquil parabenos, tais como metil ou propil parabeno; catecol; resorcinol; cicloexanol; 3'-pentanol e m-cresol); polipeptídeos de baixo peso molecular; proteínas, tais como albumina sérica, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tais como glicina, glutamina, asparaginas, histidina, arginina, ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos incluindo glicose, manose ou dextrinas; agentes quelantes, tais como EDTA; açúcares, tais como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; contra-íons formadores de sal, tais como sódio; complexos metálicos (p. ex., complexos Zn-proteína); e/ou tensoativos não iônicos, tais como TWEEN™, PLURONICS™ ou polietileno glicol (PEG).

Membros de ligação da presente invenção podem ser formulados em formas líquidas, semi-sólidas ou sólidas dependendo das propriedades físico-químicas das moléculas e da via de distribuição. Formulações podem incluir excipientes, ou combinações de excipientes, por exemplo: açúcares, aminoácidos e tensoativos. Formulações líquidas podem

incluir uma ampla faixa de concentrações de anticorpo e pH. Formulações sólidas podem ser produzidas por liofilização, secagem por borriço, ou secagem por tecnologia de fluido supercrítico, por exemplo. Formulações de membros de ligação dependerão da via destinada a distribuição: por exemplo, 5 formulações para distribuição pulmonar podem consistir em partículas com propriedades físicas que garantem penetração no pulmão profundo na inalação; formulações tópicas (p. ex., para tratamento de cicatrização, p. ex., cicatrização dérmica) podem incluir agentes modificadores de viscosidade, que prolongam o tempo que o fármaco fica residente no sítio de ação. Um 10 membro de ligação pode ser preparado com um veículo que protegerá o membro de ligação contra liberação rápida, tal como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes, emplastos transdérmicos e sistemas de distribuição microencapsulada. Polímeros biodegradáveis, biocompatíveis podem ser usados, tal como acetato de etileno vinila, 15 polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido polilático. Muitos métodos para a preparação de tais formulações são conhecidos por aqueles versados na técnica [109].

O tratamento pode ser dado oralmente (tal como, por exemplo, moléculas de anticorpo de domínio único (p. ex., “nanobodies™)), por 20 injeção (por exemplo, subcutaneamente, intra-articular, intravenosa, intraperitoneal, intra-arterial ou intramuscular), por inalação, intratraqueal, pela via intravesicular (instilação na bexiga urinária), ou topicamente (por exemplo, intra-ocular, intranasal, retal, em ferimentos, na pele). O tratamento pode ser administrado por infusão em pulso, particularmente com doses 25 declinantes do membro de ligação. A via de administração pode ser determinada pelas características físico-químicas do tratamento, por considerações especiais da doença ou pelo requerimento de se otimizar a eficácia ou minimizar efeitos colaterais. Uma via particular de administração é intravenosa. Outra via para administrar composições farmacêuticas da

presente invenção é subcutaneamente. É previsto que o tratamento não se restringirá ao uso na clínica. Portanto, injeção subcutânea usando um dispositivo livre de agulha também é vantajoso.

5 Uma composição pode ser administrada sozinha ou em combinação com outros tratamentos, simultaneamente ou sequencialmente dependendo da doença a ser tratada.

Um membro de ligação da invenção pode ser usado como parte de uma terapia de combinação em conjunto com um componente medicinal adicional. Tratamentos de combinação podem ser usados para  
10 prover efeitos sinérgicos significativos, particularmente a combinação de um membro de ligação da invenção com um ou mais outros fármacos. Um membro de ligação da invenção pode ser administrado simultaneamente ou sequencialmente ou como uma preparação combinada com outro agente ou agentes terapêuticos, para o tratamento de uma ou mais doenças listadas aqui.

15 Um membro de ligação da invenção pode ser usado como um quimiossensibilizador pelo qual ele pode aumentar a eficácia terapêutica de agentes citotóxicos e pode assim, ser provido para administração em combinação com um ou mais agentes citotóxicos, simultaneamente ou sequencialmente. O membro de ligação também pode ser usado como um  
20 radio sensibilizador pelo qual ele pode melhorar a eficácia de radiação e pode assim, ser provido para administração em combinação com radiação, simultaneamente ou sequencialmente.

Um membro de ligação de acordo com a presente invenção pode ser provido em combinação ou adição com um ou mais dos seguintes  
25 agentes:

- uma citocina ou agonista ou antagonista de função de citocina (p. ex., um agente que age nas vias de sinalização de citocinas, tal como um modulador do sistema SOCS), tal como um interferon alfa, beta e/ou gama; fator de crescimento semelhante a insulina tipo I (IGF-I), seus

receptores e proteínas de ligação associadas; interleucinas (IL), p. ex., uma ou mais de IL-1 até -33 e/ou um antagonista ou inibidor de interleucina, tal como anakinra; inibidores de receptores de membros da família interleucina ou inibidores de subunidades específicas de tais receptores, um inibidor de fator

5 de necrose de tumor alfa (TNF- $\alpha$ ), tal como anticorpos monoclonais anti-TNF (por exemplo, infliximab, adalimumab e/ou CDP-870) e/ou antagonista de receptor de TNF, p. ex., uma molécula de imunoglobulina (tal como etanercept) e/ou um agente de baixo peso molecular, tal como pentoxifilina;

- um modulador de células B, p. ex., um anticorpo monoclonal

10 se direcionando a linfócitos B (tal como CD20 (rituximab) ou MRA-aIL16R) ou linfócitos T (p. ex., CTLA4-Ig, HuMax IL-15 ou Abatacept);

- um modulador que inibe atividade de osteoclasto, por exemplo, um anticorpo para RANKL;

- um modulador de função de quimiocina ou receptor de

15 quimiocina, tal como um antagonista de CCR1, CCR2, CCR2A, CCR2B, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10 e CCR11 (para a família C-C); CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5 e CXCR6 (para a família C-X-C) e CX<sub>3</sub>CR1 para a família C-X<sub>3</sub>-C;

- um inibidor de metaloproteases de matriz (MMPs), isto é, um

20 ou mais de estromelisinases, as collagenases e gelatinases assim como agrecanase, especialmente coelagenase-1 (MMP-1), collagenase-2 (MMP-8), collagenase-3 (MMP-13), estromelisinase-1 (MMP-3), estromelisinase-2 (MMP-10) e/ou estromelisinase-3 (MMP-11) e/ou MMP-9 e/ou MMP-12, p. ex., um agente tal como doxiciclina;

25 - um inibidor de biossíntese de leucotrieno, inibidor de 5-lipoxigenase (5-LO) ou antagonista de proteína ativadora de 5-lipoxigenase (FLAP), tal como zileuton; ABT-761; fenileuton; tepoxalina; Abbott-79175; Abbott-85761; N-(5-substituído)-tiofeno-2-alquilsulfonimidaz; 2,6-di-terc-butilfenolidrazonas; metroxitetraidropiranos tais como Zeneca ZD-2138; o

composto SB-210661; um composto de piridinil-substituído 2-cianonaftaleno, tal como L-739.010; um composto de 2-cianoquinolina, tal como L-746.530; indol e/ou um composto de quinolina, tal como MK-591, MK-886 e/ou BAY x 1005;

5                   - um receptor antagonista para leucotrienos (LT) B $\delta$ , LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub>, selecionado do grupo que consiste em fenotiazin-3-óis, tais como L-651.392; compostos de amidino, tais como CGS-25019c; benzoxalaminas, tais como ontazolast; benzenocarboximidamidas, tais como BIIL 284/260; e composto, tais como zafirlukast, ablukast, montelukast, 10 pranlukast, verlukast (MK-679), Ro-245913, iralukast (CGP 45715A) e BAY x 7195;

                  - um inibidor de fosfodiesterase (PDE), tal como uma metilxantina, p. ex., teofilina e/ou aminofilina; e/ou um inibidor de isoenzima de PDE seletivo, p. ex., um inibidor de PDE4 e/ou inibidor da isoforma 15 PDE4D e/ou um inibidor de PDE5;

                  - um antagonista de receptor de histamina do tipo 1, tal como cetirizina, loratadina, desloratidina, fexofenadina, acrivastina, terfenadina, astemizol, azelastina, levocabastina, clorfeniramina, prometazina, ciclizina e/ou mizolastina (geralmente aplicada oralmente, topicamente ou 20 parenteralmente);

                  - um inibidor de bomba de prótons (tal como omeprazol) ou antagonista de receptor tipo 2 de histamina gastroprotetora;

                  - um antagonista do receptor tipo 4 de histamina;

                  - um agente simpatomimético vasoconstritor agonista de 25 adrenoreceptor alfa-1/alfa-2, tal como propilexedrina, fenilefrina, fenilpropanolamina, efedrina, pseudoefedrina, cloreto de nafazolina, cloreto de oximetazolina, cloreto de tetraidrozolina, cloreto de xilometazolina, cloreto de tramazolina e cloreto de etilnorepinefrina;

                  - um agente anticolinérgico, p. ex., um antagonista de receptor

muscarínico (M1, M2 e M3), tal como atropina, hioscina, glicopirrolato, brometo de ipratrópio, brometo de tiotrópio, brometo de oxitrópio, pirenzepina e telenzepina;

5                   - um agonista de beta-adrenoreceptor (incluindo subtipos 1-4 de receptor beta), tal como isoprenalina, salbutamol, formoterol, salmeterol, terbutalina, orciprenalina, mesilato de bitolterol e/ou pirbuterol, p. ex., um enantiômero quiral deste;

                  - um cromônio, p. ex., cromoglicato de sódio e/ou nedocromil sódio;

10                  - um glicocorticóide, tal como flunisolide, triancinolona, acetonide, dipropionato de beclometasona, budenosídeo, propionato de fluticasona, ciclesonídeo e/ou furoato de mometasona;

                  - um agente que modula receptores de hormônio nuclear, tal como um PPAR;

15                  - uma imunoglobulina (Ig) ou preparação de Ig ou um antagonista ou anticorpo que modula função de Ig, tal como anti-IgE (p. ex., omalizumab);

                  - outro agente anti-inflamatório aplicado topicamente ou sistêmico, p. ex., talidomida ou um seu derivado, um retinoide, ditanol e/ou  
20       calcipotriol;

                  - combinações de aminossalicilatos e sulfapiridina, tal como sulfassalazina, mesalazina, balsalazida e olsalazina; agentes imunomodulatórios, tais como as tiopurinas; corticosteroides, tal como budesonídeo;

25                  - um agente antibacteriano, p. ex., um derivado de penicilina, uma tetraciclina, um macrolídeo, um beta-lactâmico, uma fluorquinolona, metronidazol e/ou um aminoglicosídeo inalado; e/ou um agente antiviral, p. ex., aciclovir, famciclovir, valaciclovir, ganciclovir, cidofovir; amantadina, rimantadina; ribavirina; zanamavir e/ou oseltamavir; um inibidor de protease,

tal como indinavir, nelfinavir, ritonavir e/ou saquinavir; um inibidor de transcriptase reversa nucleosídica, tal como didanosina, lamivudina, estavudina, zalcitabina, zidovudina; um inibidor de transcriptase reversa não nucleosídica, tal como nevirapina, efavirenz;

5                               - um agente cardiovascular, tal como um bloqueador de canal de cálcio, bloqueador de beta-adrenoreceptor, inibidor de enzima conversora de angiotensina (ACE), antagonista de receptor de angiotensina-2; agente que baixa lipídeo, tal como estatina e/ou fibrato; um modulador de morfologia de células sanguínea, tal como pentoxifilina; um trombolítico e/ou um  
10                              anticoagulante, p. ex., um inibidor de agregação de plaquetas;

                                  - um agente CNS, tal como um antidepressivo (tal como sertralina), fármaco anti-Parkinsoniano (tal como deprenil, L-dopa, ropinirol, pramipexol; inibidor de MAOB, tal como selegina e rasagilina; inibidor de comP, tal como tasmar; inibidor A-2, inibidor de recaptção de dopamina,  
15                              antagonista de NMDA, agonista de nicotina, agonista de dopamina e/ou inibidor de óxido nítrico sintase neuronal) e um fármaco de anti-Alzheimer, tal como donepezil, rivastigmine, tacrina, inibidor de COX-2, propentofilina ou metrifonato;

                                  - um agente para o tratamento de dor aguda e crônica, p. ex.,  
20                              um analgésico de ação central ou periférica, tal como um análogo ou derivado de opioide, carbamazepina, fenitoína, valproato de sódio, amitriptilina ou outro agente antidepressivo, paracetamol, ou agente anti-inflamatório não esteroideal;

                                  - um agente anestésico local aplicado topicamente (incluindo  
25                              inalado) ou parenteralmente, tal como lignocaína ou um análogo desta;

                                  - um agente antiosteoporose, p. ex., um agente hormonal, tal como raloxifeno, ou um bifosfonado, tal como alendronato;

                                  - (i) um inibidor de triptase; (ii) um antagonista de fator ativador de plaquetas (PAF); (iii) um inibidor de enzima conversora de

interleucina (ICE); (iv) um inibidor de IMPDH; (v) inibidores de moléculas de adesão incluindo antagonista de VLA-4; (v) inibidores de moléculas de adesão incluindo antagonista de VLA-4; (vi) uma catepsina; (vii) um inibidor de quinase, p. ex., um inibidor de tirosina quinases (tal como, Btk, Itk, Jak3

5 MAP exemplos de inibidores devem incluir Gefitinib, mesilato de Imatinib), uma serina/treonina quinase (p. ex., um inibidor de MAP quinase, tal como p38, JNK, proteína quinases A, B e C e IKK), ou uma quinase envolvida na regulação do ciclo celular (p. ex., uma quinase dependente de ciclina); (viii) um inibidor de glicose-6 fosfato desidrogenase; (ix) um antagonista de

10 receptor de kinin-B.sub1. e/ou B.sub2.; (x) um agente antigota, p. ex., colchicina; (xi) um inibidor de xantina oxidase, p. ex., alopurinol; (xii) um agente uricosúrico, p. ex., probenecid, sulfinpirazona e/ou benzbromarona; (xiii) um secretagogue de hormônio de crescimento; (xiv) fator de crescimento transformante (TGF $\beta$ ); (xv) fator de crescimento derivado de

15 palquetas (PDGF); (xvi) fator de crescimento de fibroblasto, p. ex., fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF); (xvii) fator estimulador de colônia de macrófago (GM-CSF); (xviii) creme capsaicina; (xix) um antagonista de receptor de NK.sub3. e/ou NK.sub1. taquiquinina, tal como NKP-608C, SB-233412 (talnetant) e/ou D-4418; (xx) um inibidor de elastase, p. ex., UT-77

20 e/ou ZD-0892; (xxi) um inibidor de enzima conversora de TNF-alfa (TACE); (xxiii) uma molécula homóloga a receptor quimioatrativo expressada em células TH2 (tal como um antagonista de CRTH2); (xxiv) um inibidor de um P38; (xxv) agente modulando a função de receptores semelhantes a Toll (TKR) e (xxvi) um agente que modula a atividade de receptores purinérgicos,

25 tal como P2X7; (xxvii) um inibidor de ativação de fator de transcrição, tal como NF $\kappa$ B, API e/ou STATS.

Um inibidor pode ser específico ou pode ser um inibidor misto, p. ex., um inibidor se direcionando a mais de uma das moléculas (p. ex., receptores) ou classes moleculares mencionadas acima.

O membro de ligação também poderia ser usado em associação com um agente quimioterapêutico ou outro inibidor de tirosina quinase em co-administração ou na forma de um imunoc conjugado. Fragmentos do citado anticorpo poderiam também ser usados em anticorpos

5    biespecíficos obtidos por mecanismos recombinantes ou acoplamento bioquímico e então associando a especificidade do anticorpo descrito acima com a especificidade de outros anticorpos capazes de reconhecer outras moléculas envolvidas na atividade para a qual IL-6 está associada.

Para tratamento de uma doença inflamatória, um membro de

10    ligação da invenção pode ser combinado com um ou mais agentes, tal como agentes anti-inflamatórios não esteroidais (daqui por diante NSAIDs) incluindo inibidores de ciclo-oxigenase (COX)-1/COX-2 não seletivos aplicados topicamente ou sistemicamente, tal como piroxicam, diclofenac, ácidos propiônicos, tal como naproxeno, flurbiprofeno, fenoprofeno,

15    cetoprofeno e ibuprofeno, fenamatos, tal como ácido mefenâmico, indometacina, sulindac, azapropazona, pirazolonas, tal como fenilbutazona, salicilatos, tal como aspirina); inibidores de COX-2 seletivos (tal como meloxicam, celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, lumarocoxib, parecoxib e etoricoxib); ciclo-oxigenase inibindo doadores de óxido nítrico (CINODs);

20    glicocorticosteroides (administrados por vias tópica, oral, intramuscular, intravenosa ou intra-articulares); metotrexato, leflunomide; hidroxiclороquina, d-penicilamina, auranofina ou outras preparações de ouro oral ou parenteral; analgésicos; diacereína; terapias intra-articulares, tal como derivados de ácido hialurônico; e suplementos nutricionais, tal como glicosamina.

25    Um membro de ligação da invenção também pode ser usado em combinação com um agente terapêutico existente para o tratamento de câncer. Agentes adequados para serem usados em combinação incluem:

(i) fármacos antiproliferativos/antineoplásicos e combinações destes, como usado em oncologia médica, tal como Gleevec (mesilato de

imatinib), agentes alquilantes (por exemplo, cis-platina, carboplatina, ciclofosfamida, mostarda de nitrogênio, melfalan, clorambucil, busulfan e nitrosoureas); antimetabólitos (por exemplo, antifolatos, tal como fluorpirimidinas semelhantes a 5-fluoracil e tegafur, raltitrexed, metotrexato, 5 citosina arabinosídeo, hidroxiureia, gemcitabina e paclitaxel); antibióticos antitumorais (por exemplo, antraciclinas semelhantes a adriamicina, bleomicina, doxorubicina, daunomicina, epirubicina, idarubicina, mitomicina-C, dactinomicina e mitramicina); agentes antimetabólicos (por exemplo, vinca alcaloides semelhantes a vincristina, vinblastina, vindesina e vinorelbina e 10 taxoides semelhantes a taxol e taxotere); e inibidores de topoisomerase (por exemplo, epidofilotoxinas semelhantes a etoposídeo e teniposídeo, ansacrina, topotecano e camptotecinas);

(ii) agentes citostáticos, tal como antiestrogênicos (por exemplo, tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno e idoxifeno), 15 hiporreguladores de receptor de estrogênio (por exemplo, fulvestrant), antiandrógenos (por exemplo, bicalutamida, flutamida, nilutamida e acetato ciproterona), antagonistas de LHRH ou agonistas de LHRH (por exemplo, goserelina, leuprolina e buserelina), progestógenos (por exemplo, acetato de megestrol), inibidores de aromatase (por exemplo, como anastrozol, letrozol, 20 vorazol e exemestano) e inibidores de 5 $\alpha$ -redutase, tal como finasteride;

(iii) Agentes que inibem invasão de células cancerosas (por exemplo, inibidores de metaloproteinase semelhantes a marimastat e inibidores de função de receptor de ativador de plasminogênio uroquinase);

(iv) inibidores de função de fator de crescimento, por exemplo, 25 tais inibidores incluem anticorpos de fator de crescimento, anticorpos de receptor fator de crescimento (por exemplo, o anticorpo antierbb2 trastuzumab e o anticorpo antierbb1 cetuximab [C225]), inibidores de farnesil transferase, inibidores de tirosina quinase e inibidores de serina/treonina quinase, por exemplo, inibidores da família de fator de crescimento

epidérmico (por exemplo, inibidores de família EGFR de tirosina quinase, tal como N-(3-cloro-4-fluorfenil)-7-metóxi-6-(3-morfolinopropóxi)quinazolin-4-amina (gefitinib, AZD1839), N-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietóxi)quinazolin-4-amina (erlotinib, OSI-774) e 6-acrilamido-N-(3-cloro-4-fluorfenil)-7-(3-morfolinopropóxi)quinazolin-4-amina (CI 1033)), por exemplo, inibidores da família de fator de crescimento derivado de plaquetas e por exemplo, inibidores da família de fator de crescimento de hepatócito;

(v) agentes antiangiogênicos, tal como aqueles que inibem os efeitos de fator de crescimento endotelial vascular (por exemplo, o anticorpo antifator de crescimento de célula endotelial vascular bevacizumab, compostos, tal como aqueles divulgados em Pedidos de Patente Internacional WO 97/22596, WO 97/30035, WO 97/32856 e WO 98/13354, cada um dos quais é incorporado aqui em sua totalidade) e compostos que trabalham por outros mecanismos (por exemplo, linomida, inibidores de função de integrina  $\alpha v \beta 3$  e angiostatina);

(vi) agentes de lesão vascular, tal como combretastina A4 e compostos divulgados em Pedidos de Patente Internacional WO 99/02166, WO 00/40529, WO 00/41669, WO 01/92224, WO 02/04434 e WO 02/08213 (cada um dos quais é incorporado aqui em sua totalidade);

(vii) terapias anti-sentido, por exemplo, aquelas que são direcionadas a alvos listados acima, tal como ISIS 2503, um anti-sentido anti-ras.

(viii) abordagens de terapia gênica, incluindo, por exemplo, abordagens para substituir genes aberrantes, tal como p53 aberrante ou BRCA1 ou BRCA2 aberrante, abordagens GDEPT (terapia pró-fármaco de enzima direcionada por gene), tal como aquelas usando citosina desaminase, timidina quinase ou uma enzima nitrorredutase bacteriana e abordagens para aumentar tolerância do paciente a quimioterapia ou radioterapia, tal como terapia gênica de resistência a multifármacos; e

(ix) abordagens imunoterapêuticas, incluindo, por exemplo, abordagens *ex vivo* e *in vivo* para aumentar a imunogenicidade de células tumorais de paciente, tal como transfecção com citocinas, tal como interleucina 2, interleucina 4 ou fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos, abordagens para diminuir anergia de célula T, abordagens usando células imunes transfectadas, tal como células dendríticas transfectadas com citocina, abordagens usando linhagens de célula tumoral transfectadas com citocina e abordagens usando anticorpos anti-idiotípicos.

Um membro de ligação da invenção e um ou mais dos componentes medicinais adicionais acima podem ser usados na fabricação de um medicamento. O medicamento pode ser para administração separada ou combinada a um indivíduo e conseqüentemente, pode compreender o membro de ligação e o componente adicional como uma preparação combinada ou como preparações separadas. Preparações separadas podem ser usadas para facilitar administração separada e sequencial ou simultânea e permitir administração dos componentes por diferentes vias, p. ex., administração oral e parenteral.

De acordo com a presente invenção, composições providas podem ser administradas a mamíferos. A administração é normalmente em uma “quantidade terapeuticamente eficaz”, esta sendo suficiente para mostrar benefício a um paciente. Tal benefício pode ser pelo menos melhora de pelo menos um sintoma. A quantidade real administrada e taxa e curso de tempo de administração dependerão da natureza e gravidade do que está sendo tratado, do mamífero particular sendo tratado, da condição clínica do paciente individual, da causa do distúrbio, do sítio de distribuição da composição, do tipo de membro de ligação, do método de administração, da programação de administração e de outros fatores conhecidos por praticantes de medicina. A prescrição de tratamento, p. ex., decisões de dosagem etc., está dentro da responsabilidade de praticantes gerais e outros doutores médicos e pode

depende da gravidade dos sintomas e/ou progressão de uma doença sendo tratada. Doses apropriadas de anticorpo são bem conhecidas na técnica [110, 111]. Dosagens específicas indicadas aqui ou na Physician's Desk Reference (2003) como apropriado para o tipo de medicamento a ser administrado

5 podem ser usadas. Uma quantidade terapeuticamente eficaz ou dose adequada de um membro de ligação da invenção pode ser determinada pela comparação de sua atividade *in vitro* e atividade *in vivo* em um modelo animal. Métodos para a extrapolação de dosagens eficazes em camundongos e outros animais de teste para humanos são conhecidos. A dose precisa dependerá de vários

10 fatores, incluindo se o anticorpo é para diagnóstico, prevenção ou para tratamento, do tamanho e localização da área a ser tratada, da natureza precisa do anticorpo (p. ex., anticorpo inteiro, fragmento ou diacorpo) e da natureza de qualquer marcador detectável ou outra molécula aderida ao anticorpo. Uma dose de anticorpo típica estará na faixa de 100 µg até 1 g para aplicações

15 sistêmicas e 1 µg até 1 mg para aplicações tópicas. Uma dose de carregamento mais alto inicial, seguida por uma ou mais doses mais baixas, pode ser administrada. Tipicamente, o anticorpo será um anticorpo inteiro, p. ex., o isotipo IgG1. Esta é uma dose para um único tratamento de um paciente adulto, que pode ser proporcionalmente ajustada para crianças e bebês e

20 também ajustada para outros formatos de anticorpo em proporção a peso molecular. Tratamentos podem ser repetidos em intervalos diários, de duas vezes por semana, semanais ou mensais, ao critério do médico. Tratamentos podem ser a cada duas até quatro semanas para administração subcutânea e a cada quatro até oito semanas para administração intravenosa. O tratamento

25 pode ser periódico e o período entre administrações é de cerca de duas semanas ou mais, p. ex., cerca de três semanas ou mais, cerca de quatro semanas ou mais, ou cerca de uma vez por mês. O tratamento pode ser dado antes e/ou após cirurgia e/ou pode ser administrado ou aplicado diretamente no sítio anatômico de tratamento cirúrgico.

Membros de ligação a IL-6 da invenção podem oferecer vantagens em termos de requerimentos de dosagem e administração, comparados com anticorpos para sIL-6Ra. Como mencionado em outro lugar aqui, níveis circulantes de IL-6 são significativamente mais baixos que níveis  
5 circulantes de sIL-6Ra na doença. Consequentemente, o uso de um membro de ligação a IL-6, em oposição a um membro de ligação anti-IL-6R, tem vantagens significativas em que a quantidade de fármaco a ser fabricada para cada dose de pacientes pode ser mais baixa. Além disso, se a dose de um terapêutico de anti-IL6 é mais baixa, pode haver vantagens significativas em  
10 que a baixa dose facilita injeções subcutâneas assim como injeções intravenosas (i.v.). É bem conhecido por aqueles versados na técnica que dosagem subcutânea pode estar limitada pela quantidade de membro de ligação, p. ex., molécula de anticorpo, requerida por dose. Isto é devido às injeções subcutâneas a serem limitadas pelo volume que pode ser injetado em  
15 um sítio na pele. Volumes de injeção subcutânea de 1,2 mL ou menos são tipicamente utilizados. Como pode ser cada vez mais difícil formular um membro de ligação para injeção subcutânea em concentrações maiores que 50 mg/mL, doses acima de 100 mg através desta via geralmente requerem múltiplas injeções e mais desconforto para o paciente.

20 Ter um terapêutico anti-IL-6 de dose mais baixa também pode requerer uma dose de “carregamento” mais baixa de anticorpo para inibir todo o IL-6 sistêmico comparado com o sIL-6Ra sistêmico visto que este está em maiores concentrações.

Benefícios adicionais podem estar associados com  
25 direcionamento a IL-6 em vez do receptor de IL-6, representando vantagens adicionais de membros de ligação da invenção quando comparados com membros de ligação para IL-6Ra.

Por exemplo, há relatos na literatura que mostram que os níveis circulantes de IL-6 são significativamente mais baixos que níveis

circulantes de sIL-6Ra na doença [112, 113]. Como os níveis de sIL-6R são significativamente maiores que níveis de IL-6, mais membro de ligação anti-sIL-6R pode ser requerido para neutralizar o sIL-6Ra, comparada com a quantidade de membro de ligação anti-IL-6 requerido para neutralizar IL-6.

5 Daí, uma dose mais baixa de um membro ligante antiligante pode ser necessária, comparando com se um membro de ligação anti-receptor fosse usado.

Direcionamento a IL-6 ligante em vez de receptor de IL-6 pode reduzir níveis de IL-6 na doença, mas ainda permite que níveis de IL-6  
10 aumentem durante a infecção, quando IL-6 é hiperregulada como parte da resposta imune.

Kawano *et al.*, [4] mostraram que IL-6 era um fator de crescimento potente e mostraram que células de mieloma recentemente isoladas de pacientes produziram IL-6 e expressaram seus receptores. Além  
15 do mais, anticorpo anti-IL-6 inibe o crescimento *in vitro* de células de mieloma. Isto é evidência direta de que uma alça autócrina está operando na oncogênese de mielomas humanos. Subsequente a esse estudo, Van Zaanen *et al.*, [5] demonstraram que a produção de IL-6 em paciente de mieloma múltiplo diminui quando tratados com um anticorpo anti-IL-6 ligante.

20 Vários estudos adicionais mostram que IL-6 está envolvida em uma alça de retroalimentação autócrina em outros tipos celulares, p. ex., células musculares lisas (SMC) [114], células de astroglioma U373-MG [115], adipócitos 3T3 [116], neurônios [117], células endoteliais [118] e células de sarcoma de Kaposi [119]. A inibição de IL-6 usando um membro  
25 de ligação anti-IL-6 na doença pode, portanto, levar a uma diminuição na produção de doença basal de IL-6.

Adicionalmente, membros de ligação anti-IL-6 se ligam a IL-6 na circulação sistêmica, em contraste com membros de ligação pra receptor de IL-6 que precisam penetrar o tecido a fim de ocupar o receptor na superfície

de células envolvidas na patologia da doença a ser tratada.

Membros de ligação para IL-6 podem formar um equilíbrio com IL-6 na circulação sistêmica, tendo o efeito de causar gradientes por barreiras, p. ex., a membrana sinovial, que tem o efeito rede de remover IL-6  
 5 ativa da articulação e formar um complexo inativo com o membro de ligação. A consequência disto é que um membro de ligação para IL-6 pode ter início mais rápido e o regime de dosagem pode ser diferente e potencialmente mais fácil de otimizar, comparado com um membro de ligação a IL-6R.

A sinalização de IL-6 é mediada por ligação de IL-6 a IL-6R e  
 10 pela ligação desse complexo a gp130. Dado que a ligação de IL-6 e IL-6Ra é de afinidade nanomolar (cerca de 5 nM) e que o complexo IL6:IL6R e a ligação a gp130 é de afinidade picomolar, um membro de ligação que se direciona a IL-6 enfrenta uma quantidade mais baixa de competição para  
 15 ligação a IL-6 e portanto, pode suprimir uma proporção maior de sinalização de IL-6. Embora isto possa também ser aplicada a um membro de ligação se direcionando a IL-6Ra solúvel e prevenir a formação do complexo IL-6:IL-6R, se o IL-6Ra está ligado a membrana então devido a restrições estéricas pode ser mais difícil para um anti-IL-6Ra se ligar e inibir o IL-6Ra  
 20 apresentado na membrana.

## **Exemplos**

### **Exemplo 1. Isolamento líder**

#### ***1.1 Seleções***

Bibliotecas de visualização de fagos de Fv de cadeia única (scFv) humana naïve clonadas em um vetor fagomídeo baseado no fago  
 25 filamentoso M13 foram usadas para seleções [120, 121]. Anticorpos scFv anti-IL-6 específicos foram isolados das bibliotecas de visualização de fagos usando uma série de ciclos de seleção em IL-6 humana recombinante essencialmente como previamente descrito por Vaughan *et al.*, [120] e Hawkins *et al.*, [122]. Em resumo, para seleções biogarimpo, IL-6 humana em

PBS (PBS de Dulbecco, pH 7,4) foi adsorvida em poços de uma placa de microtitulação durante a noite a 4<sup>0</sup>C. Poços foram lavados com PBS então bloqueados por 1 h com PBS-Marvel (3% p/v). Fago purificado em PBS-Marvel (3% p/v) foi adicionado aos poços e deixado ligar-se a antígeno  
 5 revestido por 1 h. Fago não ligado foi removido por uma série de ciclos de lavagem usando PBS-Tween (0,1% v/v) e PBS. Partículas de fago ligado foram eluídas, infectadas em bactérias e recuperadas para a próxima rodada de seleção [120].

### *1.2 Inibição de ligação de IL-6 a receptor de IL-6 por scFv*

10 *bruto*

Um número representativo de clones individuais da segunda rodada de seleções foi cultivado em placas de 96 poços. ScFvs foram expressos no periplasma bacteriano e triados pela atividade inibitória deles em um ensaio de ligação receptor de IL-6 humana/IL-6 humana HTRF®  
 15 (Fluorescência Resolvida por Tempo Homogênea, CIS Bio International). Neste ensaio, amostras competiram pela ligação a IL-6 humana marcada com criptato (R&D Systems), com IL-6R biotinilado (Peprotech). Uma referência anti-IL-6 mAb (Biosource AHC0562) foi incluída em todos os ensaios de potência como um controle positivo. O método de ensaio detalhado é provido  
 20 na seção de Materiais e Métodos.

### *1.3 Reforma de scFv para IgG1*

Clones foram convertidos de scFv para formato de IgG por sub-clonagem dos domínios VH e VL em vetores expressando cadeias pesada e leve de anticorpo inteiro, respectivamente. O domínio VH foi clonado em  
 25 um vetor (pEU15.1) contendo os domínios constantes de cadeia pesada humana e elementos regulatórios para expressar cadeia pesada de IgG inteira em células mamíferas. De maneira similar, o domínio VL foi clonado ou em vetor pEU3.4 para a expressão da cadeia leve capa humana ou pEU4.4 para a expressão dos domínios constantes de cadeia leve lambda humana, com

elementos regulatórios para expressar cadeia leve de IgG inteira em células mamíferas. Vetores para a expressão de cadeias pesadas e cadeias leves foram originalmente descritas em ref. [123]. Vetores de Tecnologia de Anticorpo de Cambridge foram engenheirados simplesmente pela introdução de um elemento OriP. Para obter IgGs, os vetores expressando IgG de cadeia pesada e leve foram transfectados em células mamíferas EBNA-HEK293. IgGs foram expressas e secretadas no meio. Colheitas foram reservadas e filtradas antes da purificação. A IgG foi purificada usando cromatografia de Proteína A. Sobrenadantes de cultura são carregados em uma coluna de tamanho apropriado de Proteína A em cerâmica (BioSeptra) e lavados com 50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 250 mM de NaCl. IgG ligada foi eluída da coluna usando 0,1 M de citrato de sódio (pH 3,0) e neutralizada pela adição de Tris-HCl (pH 9,0). O material eluído teve o tampão trocado para PBS usando colunas Nap10 (Amersham, #17-0854-02) e a concentração de IgG foi determinada espectrofotometricamente usando um coeficiente de extinção baseado na sequência de aminoácidos da IgG [124]. A IgG purificada foi analisada para agregação ou degradação usando SEC-HPLC e por SDS-PAGE.

#### *1.4 Inibição de ligação de IL-6 a receptor de IL-6 por scFv e IgG purificados*

ScFV que mostrou um efeito inibitório significativo na interação IL-6:IL-6R como extratos periplásmicos brutos, foi submetida a seqüenciamento de DNA [120, 125]. ScFvs únicos foram expressos novamente em bactérias e purificados por cromatografia de afinidade (como descrito por Bannister *et al.*, [126]. Amostras de IgG purificadas desses clones também foram preparadas como descrito na seção 1.3. As potências dessas amostras foram determinadas pela competição de uma série de diluição da preparação purificada contra sIL-6R biotinilada para ligação a IL-6 humana etiquetada com HIS FLAG (derivada de *E. coli* caseira).

Os resultados para clonar CAN022D10, como um scFv e como

uma IgG que têm um domínio constante de cadeia leve kapa e cadeia pesada humana, são dados na Tabela 1. Protocolos detalhados são providos na seção de Materiais e Métodos.

*Tabela 1: Potência de scFv e IgG de CAN022D10 no ensaio bioquímico de HTRF de receptor-ligante*

| CLONE     | IC <sub>50</sub> de scFv (nM) | IC <sub>50</sub> de IgG (nM) |
|-----------|-------------------------------|------------------------------|
| CAN022D10 | 45                            | 0,31                         |

### *1.5 Inibição de proliferação induzida por IL-6 de células TF-1 por scFv e IgG purificadas*

A potência de neutralização de preparação de scFv purificadas contra bioatividade de IL-6 humana e de cinomolgo foi avaliada usando ensaio de proliferação de célula TF-1. TF-1 é uma linhagem celular pré-mielóide humana estabelecida a partir de um paciente com eritroleucemia [134]. A linhagem celular TF-1 é dependente de fator para sobrevivência e proliferação. Demonstrou-se que células TF-1 respondem tanto a IL-6 humana como de cinomolgo (derivada de *E. coli* caseira) e foram mantidas em meios contendo GM-CSF humano (4 ng/mL, R&D Systems). A inibição de proliferação dependente de IL-6 foi determinada pela medição da redução na incorporação de timidina tritiada no DNA recém-sintetizado de célula em divisão. Uma descrição detalhada do protocolo é provida na seção de Materiais e Métodos.

Preparações purificadas de CAN022D10 foram capazes de inibir a proliferação induzida por IL-6 das células TF-1 na concentração máxima testada, embora a inibição completa não tenha sido observada. Não foi possível, portanto, calcular dados de potência em IC<sub>50</sub> preciso a partir dos resultados obtidos. Quando testada como uma IgG purificada, o IC<sub>50</sub> para CAN022D10 foi calculado como sendo 93 nM.

### *1.6 Reatividade cruzada entre espécies e seletividade de anticorpos em ensaios de competição por epítipo DELFIA®*

A reatividade cruzada entre espécies e seletividade de

anticorpos a membros da família IL-6 foi estabelecida usando ensaios de competição por epítipo DELFIA®, pela medição de inibição de IL-6 HIS FLAG biotinilada (derivada de *E. coli* caseira), ligando cada anticorpo anti-IL-6 imobilizado.

5 Titulações de fator inibitório de leucemia (LIF), purificado (Chemicon), fator neurotrófico ciliar (CNTF), IL-11 e oncostatina M (todos R & D Systems) foram testados em cada ensaio para estabelecer a potência para cada proteína relacionada estruturalmente, conforme medido pelos valores de IC<sub>50</sub> no ensaio.

10 As titulações de espécies de IL-6 incluindo de cinomolgo (derivada de *E. coli* caseira), IL-6 HIS FLAG humana (derivada de HEK-EBNA caseira), IL-6 de rato e murina (ambas R & D Systems) foram testadas em cada ensaio para estabelecer a reatividade cruzada entre espécies dos anticorpos. Resultados exemplos deste experimento são providos na  
15 Tabela 2. Detalhes do protocolo são providos na seção de Materiais e Métodos.

*Tabela 2: Potências de proteínas relacionadas a IL-6 e IL-6 de diferentes espécies no ensaio de competição de CAN22D10*

| <b>Proteína</b>      | <b>IC<sub>50</sub> (nM)</b> |
|----------------------|-----------------------------|
| IL-6 humana          | 32*                         |
| IL-6 de cinomolgo    | 100*                        |
| IL-6 murina          | Nenhuma inibição            |
| IL-6 de rato         | Nenhuma inibição            |
| IL-11 humana         | Nenhuma inibição            |
| CNTF humano          | Nenhuma inibição            |
| LIF humano           | Nenhuma inibição            |
| Oncostatina M humana | Nenhuma inibição            |

\* Valores são aproximações visto que foram obtidas curvas incompletas para as amostras

20 1.7 Inibição de liberação de VEGF induzida por IL-6 endógena de fibroblasto sinovial humano por IgG purificada

Potências dos anticorpos foram avaliadas para inibição de liberação de VEGF induzida por IL-6 de fibroblastos sinoviais humanos explantados de doadores com artrite reumatóide. Um protocolo detalhado para

este procedimento é provido em Materiais e Métodos. Em resumo, titulações da IgG teste foram adicionadas a fibroblasto em cultura, que foram então estimulados pela adição de IL-1 $\beta$  e IL-6R $\alpha$  humano solúvel para induzir expressão de IL-6 e permitir sinalização das células para induzir expressão de VEGF. Após uma incubação de 48h, sobrenadantes foram removidos e testados por ELISA para a expressão de VEGF usando um kit disponível comercialmente (R & D Systems). Esses dados foram usados para determinar IC<sub>50</sub> para o CABN022D10, que foi calculado como sendo 45 nM.

### Exemplo 2. Otimização de anticorpo

#### 2.1 *Identificação de aminoácidos que podem melhorar a ligação do anticorpo líder a Il-6*

Uma estratégia para identificar resíduos chave na sequência de anticorpo parental que pode melhorar a ligação a IL-6 foi efetuada pela introdução de mutações aleatórias por toda a sequência de scFv de CAN022D10. Isto foi alcançado por duas rodadas de mutagênese usando um kit de mutagênese aleatória por PCR Diversify™ (BD Biosciences), seguindo as instruções dos fabricantes para incorporar em média, 8,1 mutações por quilobase na sequência de ácido nucleico por rodada de mutagênese. As seleções foram realizadas essencialmente como descrito previamente (Hanes *et al.*, 2000; Methods in Enzymology. 328 404-430). Em resumo, a biblioteca de mutagênese aleatória do clone parental foi transcrita em mRNA e usando um processo de tradução bloqueada, complexos mRNA-ribossomo-scFv foram formados. Esses complexos foram incubados com bio-huIL-6 e aqueles que se ligaram ao antígeno foram então capturados em microesferas paramagnéticas revestidas com estreptavidina. Complexos de ribossomo não específicos foram lavados embora e mRNA foi isolado dos complexos ribossomais ligados, transcrito reversamente para cDNA e então amplificado por PCR. Este DNA foi usado para a próxima rodada de seleção e/ou clonado para triagem. O processo de seleção foi repetido na presença de concentrações

decrecentes de bio-huIL-6 (100 nM até 0,1 nM por 4 rodados). ScFv isolado por visualização ribossomal foi clonado em vetor fagomídeo pCANTAB6 por digestão com endonucleases de restrição *Nco1/Not1* (New England Biolabs) da construção de visualização de ribossomo, seguida por ligação em pCANTAB6 digerido com *Nco1/Not1* usando DNA ligase de T4 (New England Biolabs) [127]. DNA ligado foi então transformado em células TG-1 quimicamente competentes e scFv bruto de clones individuais foi posto em competição contra IgG de CAN022D10 pela ligação a IL-6 HIS/FLAG testada em um ensaio bioquímico ligante-anticorpo.

## 2.2 Identificação de clones melhorados usando um ensaio bioquímico anticorpo-ligante (usando IgG de CAN022D10)

Preparações de scFv brutas de um número representativo de clones individuais para as produções de rodada 3 e rodada 4 foram triadas pela atividade inibitória delas em um ensaio de ligação de HTRF® de IgG -IL-6 de CAN022D10. Neste ensaio, a ligação de anticorpo biotinilado e IL-6 etiquetada com FLAG foi detectada usando anticorpo monoclonal anti-FLAG marcado com criptato e estreptavidina XL<sup>entl</sup> (TM). O método de ensaio detalhado é provido na seção de Materiais e Métodos.

O scFv que demonstrou um efeito inibitório significativo foi seqüenciado e produzido como preparações purificadas como descrito na seção 1.4. O valor de IC<sub>50</sub> para cada scFv foi então calculado a partir dos dados obtidos por um série de diluição teste da amostra purificada no ensaio bioquímico anticorpo-ligante de HTRF e ensaio de proliferação de TF-1. Os clones mais potentes no ensaio de proliferação de TF-1 foram convertidos para IgG com um domínio constante de cadeia pesada e domínio constante de cadeia leve kapa, como descrito previamente e foram retestados no ensaio de proliferação de TF-1. Dados de potência exemplo tanto para scFv como IgG para cada amostra são providos na

Tabela 3.

*Tabela 3: Exemplos clones com potências melhoradas nos ensaio bioquímicos de anticorpo-ligante e de proliferação de TF-1, isolados da biblioteca de mutagênese aleatória de CAN022D10 por visualização ribossomal*

| Clone       | IC <sub>50</sub> (pM) |      |                                |     |
|-------------|-----------------------|------|--------------------------------|-----|
|             | Ensaio bioquímico     |      | Ensaio de proliferação de TF-1 |     |
|             | scFv                  | IgG* | scFv                           | IgG |
| Anticorpo 2 | 35                    | 36   | 9600                           | 16  |
| Anticorpo 3 | 22                    | 43   | 7300                           | 50  |
| Anticorpo 4 | 24                    | 43   | 13400                          | 61  |
| Anticorpo 5 | 65                    | 26   | 12400                          | 42  |

\*O protocolo foi modificado para determinação de potência de IgG, portanto, potências de scFv e IgG para cada clone não devem ser comparadas diretamente. Para detalhes de modificações, veja Materiais e Métodos.

### 2.3 Otimização de clone parental por mutagênese dirigida

Anticorpos líderes foram otimizados usando uma abordagem de mutagênese dirigida usando seleções de visualização de fago baseada em afinidade. Para a abordagem de mutagênese dirigida, grandes bibliotecas de scFv-fago derivadas de clones líderes foram criadas por mutagênese oligonucleotídeo-dirigida das regiões determinantes de complementaridade 3 (CDR3) de cadeia pesada (VH) e leve (VL) variável usando técnicas de biologia molécula padrão [128]. As bibliotecas foram submetidas a seleções de visualização de fago baseadas em afinidade a fim de selecionar variantes com maior afinidade por IL-6. Em consequência, essas deveriam mostrar uma atividade inibitória melhorada da ligação de IL-6 a seu receptor. As seleções foram realizadas essencialmente como previamente descrito [129]. Em resumo, as partículas de fago de scFv foram incubadas com IL-6 humana biotinilada recombinante em solução (bio-huIL-6, derivada de *E. coli* caseira e modificada de forma caseira). ScFv-fago ligado a antígeno foi capturada em microesferas paramagnéticas revestidas com estreptavidina (Dynabeads® M 280) seguindo as recomendações do fabricante. As scFv-fagopartículas selecionadas foram então recuperadas

como previamente descrito [125] e o processo de seleção foi repetido na presença de concentrações decrescentes de bio-huIL-6 (50 nM até 0,1 nM por 3 rodadas).

Na completude das 3 rodadas de seleção, as bibliotecas aleatórias de VH e VL foram combinadas para formar uma única biblioteca em que clones continham sequências VH e VL aleatórias individualmente pareadas aleatoriamente. Seleções foram então continuadas como previamente descrito na presença de concentrações decrescentes de bio-huIL-6 (0,1 nM até 0,1 pM por 4 rodadas adicionais).

2.4 *Identificação de clones melhorados da mutagênese dirigida usando um ensaio bioquímico anticorpo-ligante (usando IgG de anticorpo 5)*

ScFv bruto de clones das produções de seleção de mutagênese dirigida foi testado em um ensaio bioquímico anticorpo-ligante, essencialmente como descrito na seção 2.2. Para essas produções, o ensaio bioquímico foi reconfigurado para usar IgG de anticorpo 5. Este anticorpo é uma variante melhorada de CAN022D10 com maior potência no ensaio de proliferação de TF-1. A incorporação desta IgG mais potente resultou no ensaio que foi capaz de distinguir entre clones de maior potência. O protocolo para este ensaio modificado foi conforme descrito para o ensaio bioquímico anticorpo-ligante original usando CAN022D10, com as seguintes alterações. Primeiramente, a concentração de IL-6 HIS FLAG usada foi reduzida de 1 nM para 0,5 nM. Em segundo, as concentrações do anticorpo anti-IL-6 e da estreptavidina XLent! (TM) foram aumentadas de 1 nM e 20 nM para 16 nM e 40 nM, respectivamente. ScFV que demonstrou um efeito inibitório significativo foi seqüenciado e produzido como scFv e IgG purificados, então testado no ensaio de proliferação de TF-1.

2.5 *Inibição de proliferação de células TF-1 induzida por IL-6 por scFv e IgG purificados de clones otimizados*

Potências dos clones otimizados foram determinadas usando o ensaio de proliferação de TF-1 induzida por IL-6 como previamente descrito. Clones foram testados tanto como preparações de scFv purificadas como IgG reformatada. Resultados de exemplo tanto para scFv como IgG são dados na

5 Tabela 4.

*Tabela 4: Potências de exemplo de clones identificados a partir das bibliotecas de mutagênese dirigida quando testados no ensaio de proliferação de célula TF-1*

| Clone (não tornado de linhagem germinativa) | IC <sub>50</sub> (pM) |      |
|---------------------------------------------|-----------------------|------|
|                                             | scFv                  | IgG  |
| Anticorpo 7                                 | 11                    | 3    |
| Anticorpo 8                                 | 419                   | 48   |
| Anticorpo 10                                | 549                   | 40   |
| Anticorpo 14                                | 448                   | 31   |
| Anticorpo 16                                | 154                   | 4.9  |
| Anticorpo 17                                | 38                    | 16   |
| Anticorpo 18                                | 51                    | 30   |
| Anticorpo 19                                | 508                   | 68   |
| Anticorpo 21                                | 42                    | N.D. |
| Anticorpo 22                                | 41                    | N.D. |
| Anticorpo 23                                | 161                   | 20   |
| CNTO-328                                    | N.D.                  | 74   |

N.D. Não determinado

Clones demonstraram efeito inibitório significativo, mas

10 valores de IC<sub>50</sub> precisos não puderam ser determinados a partir da série de diluição de scFv purificado.

### *2.6 Processo de fazer sequências de linhagem germinativa*

As sequências de aminoácido dos domínios VH e VL dos anticorpo anti-IL-6 otimizados foram alinhadas com as sequências de linhagem germinativa conhecida no banco de dados VBASE [130]

15 e a linhagem germinativa mais próxima foi identificada por similaridade de sequência. Para os domínios V<sub>H</sub> da linhagem de anticorpo CANDY022D10 o segmento v de linhagem germinativa mais próximo foi Vh3\_DP-86\_(3-66) e o segmento j de linhagem germinativa mais próximo foi JH2. Para

20 os domínios VL o segmento v de linhagem germinativa mais próximo

foi Vk1\_L12 e o segmento j de linhagem germinativa mais próximo foi JK2.

Sem considerar os resíduos de Vernier [131], que foram deixados inalterados, houveram 3 alterações nas estruturas dos domínios V<sub>H</sub> e 4 alterações nos domínios V<sub>L</sub>, todas as quais foram revertidas para a sequência de linhagem germinativa mais próxima para combinar identicamente anticorpos humanos usando técnicas de mutagênese sítio-dirigida padrão com os iniciadores mutagênicos apropriados.

Um total de 5 resíduos de Vernier foram identificados na sequência scFv de CAN022D10 que foi mutada a partir da linhagem germinativa. Esses foi na cadeia pesada nos resíduos de Kabat 29 (I presente em vez de V), 69 (M em vez de I), 73 (I em vez de N) e 78 (V em vez de L). Uma única mutação de Vernier também foi identificada na sequência de cadeia leve no resíduo de Kabat 46 (V em vez L).

IgG tornada de linhagem germinativa foi então reavaliada no ensaio de proliferação de TF-1 induzida por IL-6 para confirmar que não houve uma redução na potência. Potências de exemplo para anticorpo tornados de linhagem germinativa (GL) são providos na Tabela 5.

*Tabela 5: Dados de potência de exemplo para clones otimizados tornados de linhagem germinativa quando avaliados no ensaio de proliferação de células TF-1 induzida por IL-6*

| Clone             | IC <sub>50</sub> (pM) |
|-------------------|-----------------------|
| Anticorpo 7 (GL)  | 5                     |
| Anticorpo 10 (GL) | 71                    |
| Anticorpo 17 (GL) | 1                     |
| Anticorpo 18 (GL) | 3                     |
| CNTO-328          | 101                   |

*2.7 Inibição de liberação de VEGF induzida por IL-6 endógena de fibroblasto sinovial por IgG otimizado*

IgG otimizada foi testada no ensaio de liberação de VEGF de fibroblasto sinovial para avaliar a potência contra IL-6 endogenamente

expressa. Este procedimento é revisado na seção 1.7 e descrito em detalhe na seção de Materiais e Método. Potências de exemplo para a IgG testada são dadas na Tabela 6a. Dados de potência média para a IgG testada são dados na Tabela 6b.

- 5 *Tabela 6a: Dados de potência de exemplo para clones otimizados quando avaliados contra IL-6 endógena no ensaio de liberação de VEGF de fibroblasto sinovial induzida por IL-6*

| Clone (GL = clones tornados de linhagem germinativa) | IC <sub>50</sub> (nM) |
|------------------------------------------------------|-----------------------|
| Anticorpo 2                                          | 0,59                  |
| Anticorpo 3                                          | 0,38                  |
| Anticorpo 4                                          | 0,52                  |
| Anticorpo 5                                          | 0,70                  |
| Anticorpo 7 (GL)                                     | 0,75                  |
| Anticorpo 10 (GL)                                    | 0,55                  |
| Anticorpo 17 (GL)                                    | 0,57                  |
| Anticorpo 18 (GL)                                    | 0,93                  |
| CNTO-328                                             | 1,31                  |

- 10 *Tabela 6b: Dados de potência média para clones otimizados quando avaliados contra IL-6 endógena no ensaio de liberação de VEGF de fibroblasto sinovial induzida por IL-6*

| Clone (GL = clones tornados de linhagem germinativa) | IC <sub>50</sub> (nM) (95% de CI) | n |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------|---|
| Anticorpo 7 (GL)                                     | 0,78 (0,54-1,11)                  | 3 |
| Anticorpo 17 (GL)                                    | 0,57 (0,51-0,64)                  | 3 |
| Anticorpo 18 (GL)                                    | 0,67 (0,20-2,25)                  | 4 |
| CNTO-328                                             | 1,02 (0,39-2,63)                  | 4 |

### 2.8 Seletividade e reatividade cruzada entre espécies de anticorpos otimizados em ensaios de competição por epítopo DELFIA®

- 15 A seletividade e reatividade cruzada entre espécies foi reavaliada para um painel de clones usando o ensaio de competição por epítopo DELFIA® como previamente descrito (veja a seção 1.6 e Materiais e Métodos). IL-6 humana e de cinomolgo produziram curvas de inibição sobrepostas e portanto, valores de IC<sub>50</sub> equívocos para todas as IgGs testadas. Nenhuma inibição foi observada para IL-6 murina, de rato ou cachorro ou qualquer das proteínas humanas relacionadas testadas contra o painel de

anticorpo. Estes dados demonstram que o painel de clones testado reage cruzadamente com IL-6 de cinomolgo, mas não se liga a IL-6 murina, de rato ou cachorro, ou às proteínas humanas mais relacionadas a IL-6 humana.

### 2.9 Cálculo de dados de afinidade para clones otimizados

#### 5 usando BIAcore

A afinidade de ligação de amostras de IgG purificadas de anticorpos representativos 7 e 18 para IL-6 humana e de cinomolgo foi determinada por ressonância de plasma de superfície usando um biossensor BIAcore 2000 (BIAcore AB) essencialmente como descrito na ref. [132]. Em  
 10 resumo, anticorpos purificados foram acoplados à superfície de um chip sensor CM5 usando um kit de acoplamento de amina (BIAcore) para prover uma densidade de superfície entre 220-225 Ru. IL-6 humana e de cinomolgo em uma faixa de concentração entre 200 nM e 0,2 nM em tampão HBS-EP foi passada pela superfície do chip sensor. Os sensogramas resultantes foram  
 15 avaliados usando software BIA Evaluation 3.1 para prover dados de ligação relativa.

O limite inferior de faixa de medição de afinidade do biossensor BIAcore 2000™ é de aproximadamente 10 pM (manual do instrumento BIAcore 2000). A partir dos dados obtidos, a afinidade dos  
 20 anticorpos tanto para IL-6 humana como de cinomolgo estava abaixo desse limite de 10 pM, isto é, os anticorpos foram mais potentes do que poderia ser medido. Medições de afinidade precisas, portanto, não foram calculadas. As afinidades de ambos os anticorpos para ambas as espécies de IL-6 usando esta abordagem são consideradas como sendo menos que 10 pM.

#### 25 2.10 Cálculo de dados de afinidade para um clone otimizado usando o ensaio de proliferação de célula Tf-1 in vitro

O ensaio de TF-1 foi usado para calcular a afinidade de anticorpo 18 por uso de análise de Schild. Uma curva padrão de IL-6 ( $7,7 \times 10^{-15}$  até  $3 \times 10^{-9}$  M) foi misturada com uma faixa de concentrações de IgG

( $2,67 \times 10^{-13}$  M até  $8,3 \times 10^{-10}$  M) em duplicata. Pela plotagem da concentração de anticorpo em log10 contra a razão de dose em log10, a afinidade da IgG foi determinada. Usando esta abordagem a afinidade de anticorpo 18 (GL) por IL-6 humana foi calculada como sendo de 0,40 pM (95% de CI 0,12 pM – 0,69 pM, n=6).

### 2.11 Potência de antagonista em IL-6 recombinante humana usando proliferação de célula B9 mediada por IL-6 *in vitro*

Proliferação de célula B9 induzida por IL-6 foi avaliada na presença de anticorpo 18 e um anticorpo de controle de isotipo. Os efeitos de uma faixa de concentrações de cada anticorpo ( $1 \times 10^{-13}$  M até  $1 \times 10^{-9}$ ) foram avaliados em uma curva padrão de IL-6 (faixa de concentração  $1 \times 10^{-14}$  M até  $1 \times 10^{-9}$  M). Pontos de dados foram em duplicata. A proliferação de B9 foi determinada após 4 dias de incubação por redução de azul de alamar (método fluorescente).

Mostrou-se que o anticorpo 18 inibe proliferação de B9 induzida por IL-6. O controle de isotipo não tinha efeito inibitório. Dados médios são mostrados na Tabela 8.

*Tabela 8: Valores em  $K_b$  médios para inibição de IL-6 induz proliferação de B9*

|                   | <b><math>K_b</math> médio em pM (95% de CI)</b> | <b>n</b> |
|-------------------|-------------------------------------------------|----------|
| Anticorpo 18 (GL) | 0,3 (0,1 – 0,5)                                 | 6        |

### 2.12 Potência de antagonista em IL-6 recombinante humana usando liberação de IgM mediada por IL-6 de células SKW6.4 *in vitro*

IL-6 induz secreção de IgM de linhagem celular de linfoblasto B humano SKW 6.4. Células SKW6.4 incubadas com uma faixa de concentrações de IL-6 ( $1 \times 10^{-13}$  M até  $3 \times 10^{-8,5}$  M) deram uma média [A]50 de 77 pM (n=3) na secreção de IgM. O efeito dos anticorpos anti-IL-6 humana 7, 17 e 18 e de um anticorpo controle de isotipo em secreção de IgM induzida por IL-6 foi avaliado pela observação da inibição de várias concentrações de anticorpo ( $1 \times 10^{-12,5}$  M até  $3 \times 10^{-8}$  M) na presença de 100

pM de IL-6. A secreção de IgM foi determinada após 4 dias de ELISA para IgM anti-humano. Pontos de dados foram em duplicata.

Anticorpos 7, 17 e 18 inibiram secreção de IgM induzida por IL-6. O controle de isotipo não teve efeito inibitório nesses ensaios. Dados médios são mostrados na Tabela 9.

*Tabela 9: Inibição média de secreção de IgM para células SKW6.4*

|                   | <b>IC50 Médio em pM</b> | <b>n</b> |
|-------------------|-------------------------|----------|
| Anticorpo 7 (GL)  | 2,64                    | 3        |
| Anticorpo 17 (GL) | 3,21                    | 3        |
| Anticorpo 18 (GL) | 2,63                    | 3        |

### Exemplo 3. Mapeamento de epítopo

#### *3.1 Comparação de epítopo de anticorpo anti-IL-6 com anticorpos anti-IL-6 humana conhecidos*

O epítopo de anticorpo 18 (GL) foi comparado com os epítopos de dois anticorpos anti-IL-6 humana B-E8 e cCLB8. Ambos os anticorpos são conhecidos por inibir a ligação de IL-6 a IL-6Ra e foram investigados como agentes terapêuticos potenciais [5, 31, 34, 37, 133]. Para permitir comparações dos epítopos dos três anticorpos, foi construído um painel de mutantes de IL-6 em que cada um continha uma mutação de aminoácido único comparada com a sequência selvagem (wt). A ligação de desses mutantes aos diferentes anticorpos foi então avaliada em ensaios de competição bioquímica. Esses experimentos foram baseados no ensaio de competição bioquímica descrito no Exemplo 1.6, com alterações nas concentrações de anticorpos e variantes de IL-6 quando necessário. Resumidamente, anticorpos foram revestidos na superfície de uma placa de imunoensaio Nunc Maxisorp de 96 poços em uma concentração ou de 2 nM (anticorpo 18) ou de 4 nM (B-E8 e cCLB8) em PBS e incubados durante a noite a 4°C. Após, a superfície dos poços foi bloqueada usando 3% (p/v) de BSA em PBS, diluições dos inibidores em uma faixa de concentração de 200 nM até 10 pM misturada com IL-6 humana biotinilada em uma concentração final de 0,15 M foram adicionada aos poços revestidos com anticorpo e

deixadas se ligarem. A ligação da IL-6 biotinilada aos anticorpos foi medida usando estreptavidina marcada com európio.

Pela comparação dos valores de  $IC_{50}$  obtidos para os mutantes com IL-6 humana selvagem, uma razão de potência poderia ser estabelecida para cada mutante. Então, pela comparação dessas razões pelos diferentes anticorpos, os efeitos das mutações individuais na ligação do anticorpo à molécula de IL-6 poderiam ser avaliados. Resultados típicos desses experimentos são apresentados na Tabela 10 com os experimentos sendo repetidos em 2 ocasiões adicionais.

Tabela 10:  $IC_{50}$  e razões de potência de um painel de mutantes de IL-6 contra os anticorpo anti-IL-6 humana anticorpo 18, B-E8 e cCLB8

| Mutante     | IC <sub>50</sub> (M) |                  |                  | Razão de potência |          |         |
|-------------|----------------------|------------------|------------------|-------------------|----------|---------|
|             | Anticorpo 18         | CNTO-328         | B-E8             | Anticorpo 18      | CNTO-328 | B-E8    |
| F102E       | 8,41E-08             | 2,80E-09         | 1,58E-08         | 310,951           | 3,021    | 57,246  |
| F106E       | 1,43E-09             | Nenhuma inibição | 3,31E-09         | 5,283             | -        | 11,989  |
| Irrelevante | Nenhuma inibição     | Nenhuma inibição | Nenhuma inibição | -                 | -        | -       |
| IL-6 wt     | 2,70E-10             | 9,26E-10         | 2,76E-10         | 1,000             | 1,000    | 1,000   |
| R207E       | Nenhuma inibição     | 5,13E-09         | Nenhuma inibição | -                 | 7,401    | -       |
| Q211A       | 3,07E-10             | 1,10E-07         | 8,15E-10         | 1,498             | 158,221  | 3,208   |
| Irrelevante | Nenhuma inibição     | Nenhuma inibição | Nenhuma inibição | -                 | -        | -       |
| IL-6 wt     | 2,05E-10             | 6,93E-10         | 2,65E-10         | 1,000             | 1,000    | 1,000   |
| R58E        | 4,79E-10             | 1,73E-09         | 1,57E-08         | 2,009             | 1,682    | 79,083  |
| S204E       | 2,57E-08             | 1,90E-09         | 4,83E-10         | 107,754           | 1,848    | 2,434   |
| Irrelevante | Nenhuma inibição     | Nenhuma inibição | Nenhuma inibição | -                 | -        | -       |
| IL-6 wt     | 2,39E-10             | 1,03E-09         | 1,98E-10         | 1,000             | 1,000    | 1,000   |
| E200W       | 5,22E-10             | 2,68E-09         | 5,68E-10         | 2,130             | 3,817    | 2,287   |
| R207L       | 1,31E-07             | 1,51E-09         | 9,41E-08         | 534,666           | 2,148    | 378,865 |
| IL-6 wt     | 2,45E-10             | 7,02E-10         | 2,48E-10         | 1,000             | 1,000    | 1,000   |

A numeração de resíduo na tabela 10 é pra a sequência de aminoácidos de IL-6 humana completa (SEQ ID NO: 161).

Os resultados mostram que os três anticorpo têm perfis de ligação diferentes contra o painel de mutantes de IL-6 e, portanto, se ligam a diferentes epítomos na superfície da citocina. Kalai *et al.*, (1997) previamente

observaram que cCLB8 não reconhece o mutante de IL-6 F106E. Isto foi confirmado em nossos experimentos, visto que ele não inibe a ligação da IL-6 biotinilada ao anticorpo. Em contraste, o mutante de IL-6 F106E é apenas 5 vezes menos potente que IL-6 selvagem no ensaio de competição usando anticorpo 18, indicando que ele se liga fortemente a este anticorpo. Um resultado similar foi observado com o mutante Q211A, onde a razão de potência contra anticorpo 18 foi de 1,5, comparada a 158 para cCLB8. No sentido inverso, mutantes F102E, R207E, R207L e S204E foram potentes inibidores no ensaio de cCLB8, mas foram observados como sendo consideravelmente menos potentes que IL-6 wt no ensaio de anticorpo 18.

Diferenças na ligação de anticorpo 18 e B-E8 foram observados com mutantes R58E e S204E. A razão de potência para R58E foi 2,009 para anticorpo 18, comparada a 79,083 para B-E8, indicando que esta mutação reduz a ligação de B-E8 a IL-6. O efeito da mutação S204E parece ser específica ao anticorpo 18 fora dos três anticorpo testados. Como com cCLB8, esta mutação tem pouco impacto na potência de ligação de IL-6 a B-E8, entretanto o mutante é mais de 100 vezes menos potente que a IL-6 selvagem no ensaio bioquímico para anticorpo 18.

#### Exemplo 4. Administração de um anticorpo anti-IL-6 *in vivo*

##### *4.1 Efeito de administração de um anticorpo anti-IL-6 no aumento de haptoglobina e neutrófilos induzido por Il-6 recombinante humana em camundongos*

A administração sistêmica de IL-6 é conhecida por causar um aumento sistêmico em concentrações de neutrófilos e proteína de fase aguda. Um modelo *in vivo* foi gerado onde a IL-6 humana foi administrada por injeção intraperitoneal em camundongos C57/B/6/J machos e concentrações de neutrófilos e da proteína e fase aguda haptoglobina foram medidas. A habilidade do anticorpo 18 (GL) administrado por injeção subcutânea em inibir as respostas foi medida.

#### 4.2 Ensaio de haptoglobina

Injeção intraperitoneal de IL-6 humana (5,2 nmol/kg, equivalente a 12 mg/kg, b.i.d.) por 7 dias resultou em um aumento significativo nos níveis de haptoglobina plasmática de  $0,02 \pm 0,01$  mg/mL (controles de veículo) até  $1,19 \pm 0,27$  mg/mL no grupo tratado com IL-6 (teste T,  $P < 0,01$ ). Embora o controle de isotipo de IgG1 não tenha tido efeito, o anticorpo 18 inibiu dose-dependentemente a resposta com inibição significativa (ANOVA,  $P < 0,01$  X IL-6 sozinha) sendo notada em doses de 10,6 nmol/kg (156 mg/kg) e acima (Figura 1).

#### 4.3 Ensaio de neutrófilo

Injeção intraperitoneal de IL-6 humana (5,2 nmol/kg, equivalente a 12 mg/kg, b.i.d.) por 7 dias resultou em um aumento significativo na contagem de neutrófilos de  $1,1 \pm 0,44 \times 10^9$  células/L (controles de veículo) até  $2,47 \pm 0,12 \times 10^9$  células/L no grupo tratado com IL-6 (teste T,  $P < 0,01$ ). Embora o controle de isotipo de IgG1 não tenha tido efeito, o anticorpo 18 inibiu dose-dependentemente a resposta com inibição significativa (ANOVA,  $P < 0,01$  X IL-6 sozinha) sendo notada em doses de 1,5 nmol/kg (23 mg/kg) e acima.

Esses resultados confirmam a habilidade de um anticorpo anti-IL-6 para inibir os efeitos sistêmicos de IL-6 *in vivo*.

### **Materiais e Métodos**

#### Inibição de ligação de IL-6 a receptor de IL-6 por scFv bruto

Produções de seleção foram triadas em formato de ensaio HTRF® (Fluorescência Resolvida por Tempo Homogênea) de ligação receptor-ligante para inibição ou de IL-6 humana marcada com criptato (R & D Systems 206-IL), ou de IL-6 humana etiquetada com HIS FLAG (derivada de *E. coli* caseira) se ligando a IL-6R biotinilada (Peprotech 200-06 R).

Produções durante isolamento líder foram triadas como scFv bruto não diluído contendo extratos periplasmáticos preparados em: 200 mM

de tampão HEPES pH 7,4, 0,5 mM de EDTA e 0,5 M de sacarose. Oito nanomolar de IL-6R humana biotinilada foram pré-incubados por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro, com 8 nM de estreptavidina XL<sup>entl</sup> (TM) (CIS Bio International 611SAXLA). Todas as diluições foram feitas em salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 0,4 M de fluoreto de potássio e 0,1% de BSA (tampão de ensaio).

Após pré-incubação dos reagentes, 10 µL de amostra de scFv bruto foram adicionados a uma placa de ensaio de baixo volume de 384 poços (Costar 3676). Isto foi seguido pela adição de 5 µL de mistura de receptor biotinilado pré-incubado e estreptavidina XL<sup>entl</sup> (TM) e então 5 µL de 11,2 nM de IL-6 humana marcada com criptato.

Placas de ensaio foram então centrifugadas a 1000 rpm em temperatura ambiente por 1 min e incubadas por 2 h em temperatura ambiente, antes da leitura de fluorescência resolvido por tempo em comprimentos de onda de emissão de 620 nm e 665 nm usando um leitor de placas EnVision (Perkin Elmer).

#### Inibição de ligação de IL-6 a receptor de IL-6 por scFv e IgG purificados

ScFv e IgG purificados de clones positivos identificados a partir de triagem foram testados em um ensaio de HTRF® para inibição de ligação de IL-6 humana etiquetada com HIS FLAG a IL-6R biotinilado. Oito nanomolar de IL-6R humano biotinilado foram pré-incubados por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro, com 8 nM de estreptavidina XL<sup>entl</sup> (TM). Todas as diluições foram feitas em salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 0,4 M de fluoreto de potássio e 0,1% de BSA (tampão de ensaio).

Uma titulação da amostra purificada foi usada a fim de estabelecer a potência de clone como medida por valores de IC<sub>50</sub> no ensaio. Após pré-incubação dos reagentes, 10 µL de titulação de amostra de scFv purificada foram adicionados a uma placa de ensaio de baixo volume de 384

poços (Costar 3676). Isto foi seguido pela adição de 5 µL da mistura de receptor biotilado pré-incubado e estreptavidina XL<sup>entl</sup> (TM). Dois nanomolar de IL-6 humana etiquetada com HIS FLAG foram combinados com 1,732 nM de IgG anti-flag marcada com criptato (CIS Bio International 61FG2KLB) e imediatamente 5 µL da mistura foram adicionados a placa de ensaio.

Placas de ensaio foram então centrifugada a 1000 rpm em temperatura ambiente por 1 min e incubadas por 2 h em temperatura ambiente, antes da leitura de fluorescência resolvido por tempo em comprimentos de onda de emissão de 620 nm e 665 nm usando um leitor de placas EnVision (Perkin Elmer).

#### Análise de dados

Os seguintes método foram usados para analisar dados dos ensaio de HTRF® descritos acima.

Dados foram analisados pelo cálculo da % de valores de Delta F para cada amostra. Delta F foi determinado de acordo com a equação 1.

#### *Equação 1:*

$$\% \text{ de delta F} = \frac{(\text{valor da razão } 665\text{nm}/620\text{nm} \text{ da amostra}) - (\text{valor da razão } 665\text{nm}/620\text{nm} \text{ de controle não específico})}{(\text{valor de razão } 665\text{nm}/620\text{nm} \text{ de controle não específico})} \times 100$$

Valores de % de delta F foram subsequentemente usados para calcular % de ligação específica como descrito na equação 2.

#### *Equação 2:*

$$\% \text{ de ligação específica} = \frac{\% \text{Delta F de amostra}}{\% \text{ de delta F de controle de ligação total}} \times 100$$

Valores de IC<sub>50</sub> foram determinados usando software GraphPad Prism por preenchimento de curva usando uma equação logística de quatro parâmetros (Equação 3).

#### *Equação 3:*

$$Y = \text{Fundo} + (\text{Topo} - \text{Fundo}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50} - X) * \text{HillSlope}))}$$

X é o logaritmo de concentração. Y é ligação específica

Y começa no Fundo e vai para o Topo com uma forma sigmoide.

Um mAb anti-IL-6 de referência (Biosource AHC0562) foi incluído em todos os ensaios como um controle positivo.

5                    Inibição de proliferação de células TF-1 induzida por IL-6 por scFv e IgG

Células TF-1 foram um presente da R&D Systems e foram mantidas de acordo com os protocolos fornecidos. Meios de ensaio compreendiam RPMI-1640 com GLUTAMAX I (Invitrogen) contendo 5% de  
10 soro fetal bovino (JRH) e 1% de piruvato de sódio (Sigma). Antes de cada ensaio, células TF-1 foram sedimentadas por centrifugação a 300xg por 5 min, os meios removidos por aspiração e as células ressuspensas em meios de ensaio. Este processo foi repetido duas vezes com células ressuspensas em uma concentração final de  $5 \times 10^5$  células/mL em meios de ensaio. As  
15 células foram plaqueadas usando 100  $\mu$ L/poço em uma placa de ensaio de 96 poços. Placas foram incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> para depurar a célula de GM-CSF. Soluções teste de scFv ou IgG purificada (em duplicata) foram diluídas para a concentração desejada em meios de ensaio. Um anticorpo irrelevante não direcionado a IL-6 foi usado como controle  
20 negativo. IL-6 de cinomolgo (caseira) e humana (R&D) derivada bacterionalmente recombinante foi adicionada em uma concentração final ou de 20 pM (IL-6 humana) ou de 100 pM (cinomolgo) quando misturada com anticorpo teste apropriado em um volume total de 100  $\mu$ L/poço. A concentração de IL-6 usada no ensaio foi selecionada como a dose que na  
25 concentração de ensaio final deu aproximadamente 80% da resposta proliferativa máxima. Todas as amostras foram incubadas por 30 min em temperatura ambiente. Cem microlitros de IL-6 e mistura de anticorpo foram então adicionados a 100  $\mu$ L das células para dar um volume de ensaio total de 200  $\mu$ L/poço. Placas foram incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Vinte microlitros de timidina tritiada ( $5\mu\text{Ci/mL}$ ) foram então adicionados a cada ponto de ensaio e as placas foram retornadas ao incubador por 24 horas adicionais. Células foram coletadas em placas com filtro de fibra de vidro (Perkin Elmer) usando um coletor de células. A incorporação de timidina foi determinada usando contador de cintilação líquida de microplacas Packard TopCount. Dados foram então analisados usando software Graphpad Prism.

Método para ensaio de fluorescência resolvida por tempo de inibição de ligação de IL-6 humana biotinilada a anticorpos anti-IL-6 imobilizados

O método específico usado para este ensaio e os resultados do mesmo providos no Exemplo 2.6 empregaram reagentes de DELFIA® e é exposto acima. O método também é descrito mais geralmente abaixo e é adequado como um ensaio para determinar e/ou quantificar a ligação de outras formas de IL-6 e proteínas relacionadas a MAb anti-IL-6.

Neste ensaio, o anticorpo monoclonal anti-IL-6 está ligado a um suporte sólido, por exemplo, estando aderido ao suporte através de Fc. Placas de ligação proteínas altas de poliestireno, p. ex., placas Nunc Maxisorb, podem ser usadas como um suporte adequado.

- Revestir o MAb anti-IL-6 nas placas em  $50\mu\text{L}$  por poço em PBS, durante a noite a  $4^{\circ}\text{C}$ .

- Todas as etapas subsequentes são realizadas em temperatura ambiente.

- Lavar placas três vezes com PBS, contendo 0,05% de Tween 20 (PBST, atualmente disponível na Sigma P1379), então bloquear com  $300\mu\text{L}$ /poço de PBS contendo 3% (p/v) de BSA (atualmente disponível na Roche Diagnostics, 70129138) por 1 h.

- Lavar placas três vezes com PBST.

- Preparar titulações de inibidor em PBS contendo 3% (p/v) de BSA e adicionar a uma placa de 'diluição' ( $40\mu\text{L}$ /poço) seguido por 40

$\mu\text{L}$ /poço de IL-6 biotinilada para dar uma concentração final de IL-6 biotinilada equivalente ao KD para a proteína para o anticorpo. Transfira 50  $\mu\text{L}$  das amostras da placa de diluição para os poços correspondentes na placa de ensaio.

5 - Incubar as placas por 1h.

- Lavar as placas três vezes com PBST então adicionar em cada poço 50  $\mu\text{L}$ /poço de 0,1  $\mu\text{g/mL}$  de estreptavidina marcado com európio em 50 mM de Tris-HCl, pH 7,5, contendo 0,9% de NaCl, 0,5% de BSA purificado, 0,1% de Tween 20 e 20  $\mu\text{M}$  de EDTA e incubar por 1 h.

10 - Lavar placas sete vezes com um tampão de lavagem compreendendo 0,05 M de salina tamponada com Tris (0,138 M de NaCl, 0,0027 M de KCl), 0,05% (v/v) de Tween 20, pH 8,0 (a 25°C)

- Para cada poço, adicione 50  $\mu\text{L}$  de uma solução de acentuação, acidificada com ácido acético e contendo Triton X-100 junto com os quelantes  $\beta\text{NTA}$  e TOPO. A alteração de pH resultante de alcalino para ácido causa uma rápida dissociação dos íons de európio do conjugado com estreptavidina. Os íons de európio livre então formam quelatos fluorogênicos com os quelantes disponíveis. A água é removida pela presença de TOPO, permitindo que os quelatos formem micelas, prolongando a fluorogenicidade do quelato.

15

20

- Incubar por 5 min, então medir a fluorescência resolvida por tempo em um comprimento de onda de emissão de 620 nm. Dados de fluorescência são convertidos a % de ligação específica de acordo com a Equação 1. Determinar ligação total de poços de controle contendo huIL-6 biotinilada, mas nenhum competidor. Determinar ligação não específica de poços contendo huIL-6 biotinilada e um excesso de 100 vezes de huIL-6. Dados resultantes encaixam em uma curva sigmoide para cálculo de valores  $\text{IC}_{50}$  de acordo com a Equação 2.

25

Determinação de concentrações de huIL-6 biotinilada e

revestimento de anticorpo para o ensaio de competição por epítopo bioquímico

A concentração de anticorpo usada para revestimento e a concentração de huIL-6 biotinilada usada no ensaio de competição por epítopo dependerá da afinidade da interação dos dois reagentes e da eficiência de imobilização de anticorpo.

Uma concentração padrão para revestimento de anticorpo e a concentração de huIL-6 biotinilada requerida deve, portanto, ser determinada para cada anticorpo a ser testado.

Como uma regra geral, a huIL-6 biotinilada em concentração final usada em cada ensaio é equivalente à KD do ligante para o anticorpo correspondente como determinado por análise de saturação. A concentração de anticorpo usada para revestimento deve ser tal que quando huIL-6 biotinilada for adicionada em KD um sinal mínimo para razão de ruído de 10:1 seja obtida quando detectada sob as condições de ensaio de competição.

Seletividade e reatividade cruzada entre espécies de anticorpos em ensaio de competição por epítopo de DELFIA®

IgG purificada foi absorvida em placas de microtitulação MAxisorp de 96 poços (Nunc) em PBS em uma concentração que deu um sinal significativo quando IL-6 humana biotinilada foi adicionada em aproximadamente sua Kd estimada para aquela IgG particular. IgG em excesso foi lavada fora com PBS-Tween (0,1% v/v) e os poços foram bloqueados com PBS-Marvel (3% p/v) por 1 h. Uma série de diluição de cada um dos seguintes competidores foi preparada em PBS, partindo de uma concentração de aproximadamente 200 vezes o valor da Kd da interação entre IL-6 humana biotinilada e a respectiva IgG; IL-6 humana, IL-6 de cinomolgo, IL-6 de rato (R & D Systems 506-RL/CF), IL-6 murina (R & D Systems 406-ML/CF), CNTF humano (R & D Systems 257-NT/CF), LIF humano (Chemicon, LIF1010), IL-11 humana (R & D Systems 518-IL/CF),

oncostatina M humana (R & D Systems 295-OM/CF). IL-6 humana não biotinilada foi suado como um controle positivo. Para esta série um volume igual de IL-6 humana recombinante biotinilada em uma concentração de aproximadamente 2 vezes a K<sub>d</sub> foi adicionado (resultando em um série partindo de uma razão de antígeno competidor:IL-6 humana biotinilada de aproximadamente 100:1). Essas misturas foram então transferidas para sobre IgG bloqueada e deixadas se equilibrarem por 1,5 h. Antígeno não ligado foi removido por lavagem com PBS-Tween (0,1% v/v), enquanto a IL-6 humana biotinilada remanescente foi detectada por conjugado de estreptavidina-európio<sup>3+</sup> (detecção de DELFIA®, PerkinElmer). A fluorescência resolvida por tempo foi medida em 620 nm em um leitor de placas EnVision (PerkinElmer). Dados de fluorescência foram convertidos para % de ligação específica (100% foi determinado a partir de poços controle contendo IL-6 humana biotinilada, mas nenhum competidor, 0% foi a partir de poços contendo IL-6 humana biotinilada e um excesso de 100 vezes de IL-6 humana não biotinilada). Dados resultantes foram analisados usando software para encaixe em curva Prism (Graphpad) para determinar valores de IC<sub>50</sub> de acordo com a Equação 3.

#### Método para ensaio de fluorescência resolvida por tempo de inibição de ligação de IL-6 humana biotinilada a anticorpos anti-IL-6 imobilizados

O método específico usado para este ensaio e os resultados do mesmo providos no Exemplo 2.8 empregaram reagentes de DELFIA® e é exposto acima. O método também é descrito mais geralmente abaixo e é adequado como um ensaio para determinar e/ou quantificar a ligação de outras formas de IL-6 e proteínas relacionadas a MAbs anti-IL-6.

Neste ensaio, o anticorpo monoclonal anti-IL-6 está ligado a um suporte sólido, por exemplo, estando aderido ao suporte através de Fc. Placas de ligação proteínas altas de poliestireno, p. ex., placas Nunc

Maxisorb, podem ser usadas como um suporte adequado.

- Revestir o MAb anti-IL-6 nas placas em 50  $\mu$ L por poço em PBS, durante a noite a 4°C.

- Todas as etapas subsequentes são realizadas em temperatura ambiente.

- Lavar placas três vezes com PBS, contendo 0,05% de Tween 20 (PBST, atualmente disponível na Sigma P1379), então bloquear com 300  $\mu$ L/poço de PBS contendo 3% (p/v) de BSA (atualmente disponível na Roche Diagnostics, 70129138) por 1 h.

- Lavar placas três vezes com PBST.

- Preparar titulações de inibidor em PBS contendo 3% (p/v) de BSA e adicionar a uma placa de 'diluição' (40  $\mu$ L/poço) seguido por 40  $\mu$ L/poço de IL-6 biotinilada para dar uma concentração final de IL-6 biotinilada equivalente à KD para a proteína para o anticorpo.

Tranfira 50  $\mu$ L das amostras da placa de diluição para os poços correspondentes na placa de ensaio.

- Incubar as placas por 1h.

- Lavar as placas três vezes com PBST então adicionar em cada poço 50  $\mu$ L/poço de 0,1  $\mu$ g/mL de estreptavidina marcada com európio em 50 mM de Tris-HCl, pH 7,5, contendo 0,9% de NaCl, 0,5% de BSA purificado, 0,1% de Tween 20 e 20  $\mu$ M de EDTA e incubar por 1 h.

- Lavar placas sete vezes com um tampão de lavagem compreendendo 0,05 M de salina tamponada com Tris (0,138 M de NaCl, 0,0027 M de KCl), 0,05% (v/v) de Tween 20, pH 8,0 (a 25°C)

- Para cada poço, adicione 50  $\mu$ L de uma solução de acentuação, acidificada com ácido acético e contendo Triton X-100 junto com os quelantes  $\beta$ NNTA e TOPO. A alteração de pH resultante de alcalino para ácido causa uma rápida dissociação dos íons de európio do conjugado com estreptavidina. Os íons de európio livre então formam quelatos fluorogênicos

com os quelantes disponíveis. A água é removida pela presença de TOPO, permitindo que os quelatos formem micelas, prolongando a fluorogenicidade do quelato.

- Incubar por 5 min, então medir a fluorescência resolvida por tempo em um comprimento de onda de emissão de 620 nm. Dados de fluorescência são convertidos a % de ligação específica de acordo com a Equação 1. Determinar ligação total de poços de controle contendo huIL-6 biotinilada, mas nenhum competidor. Determinar ligação não específica de poços contendo huIL-6 biotinilada e um excesso de 100 vezes de huIL-6.
- Encaixar dados resultantes em uma curva sigmoide para cálculo de valores  $IC_{50}$  de acordo com a Equação 2.

#### Determinação de concentrações de revestimento de anticorpo e huIL-6 biotinilada para o ensaio de competição por epítopo bioquímico

- A concentração de anticorpo usada para revestimento e a concentração de huIL-6 biotinilada usada no ensaio de competição por epítopo dependerá da afinidade da interação dos dois reagentes e da eficiência de imobilização de anticorpo.

- Uma concentração padrão para revestimento de anticorpo e a concentração de huIL-6 biotinilada requerida deve, portanto, ser determinada para cada anticorpo a ser testado.

- Como uma regra geral, a huIL-6 biotinilada em concentração final usada em cada ensaio é equivalente à KD do ligante para o anticorpo correspondente como determinado por análise de saturação. A concentração de anticorpo usada para revestimento deve ser tal que quando huIL-6 biotinilada for adicionada em KD um sinal mínimo para razão de ruído de 10:1 seja obtida quando detectada sob as condições de ensaio de competição.

#### Identificação de clones melhorados usando um ensaio bioquímico de anticorpo-ligante

Produções de seleção de otimização líder foram triadas em

formato de ensaio HTRF® de competição por epítopo para inibição de IL-6 humana etiquetada com HIS FLAG (derivada de *E. coli* caseira) se ligando a anticorpo anti-IL-6 biotinilado (IgG caseira derivada de isolamento líder, CAN022D10).

5                   Produções durante isolamento líder foram triadas como não diluídas, scFv bruto contendo extratos periplasmáticos preparados em: 50 nM de tampão MOPS pH 7,4, 0,5 mM de EDTA e 0,5 M de sorbitol. Um nanomolar de IL-6 HIS FLAG humana foi pré-incubado por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro, com 1,732 nM de IgG anti-flag marcada com criptato (CIS Bio International 61FG2KLB). Todas as diluições foram  
10 feitas em tampão de ensaio. Em paralelo, 1 nM de IgG anti-IL-6 biotinilada (competição de um membro de ligação testes contra a qual era para ser testado) foi pré-incubado por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro com 20 nM de IgG estreptavidina XL<sup>entl</sup> (TM) (CIS Bio International  
15 611SAXLB).

Após pré-incubação dos reagentes, 10 µL de amostra de scFv bruto foram adicionados a uma placa ótica de 384 poços (Perkin Elmer Cat NO. 6007279). Isto foi seguido pela adição de 10 µL de tampão de ensaio à placa inteira. Então 10 µL da mistura de IgG anti-IL-6 biotinilada pré-  
20 incubada e estreptavidina XL<sup>entl</sup> (TM) e 10 µL de mistura de criptato com anti-flag IL-6 humana etiquetada com HIS FLAG pré-incubada foram adicionados.

Placas de ensaio foram então centrifugadas a 1000 rpm em temperatura ambiente por 1 min e incubadas por 2 h em temperatura ambiente, antes da leitura de fluorescência resolvido por tempo em  
25 comprimentos de onda de emissão de 620 nm e 665 nm usando um leitor de placas EnVision (Perkin Elmer). Dados foram analisados calculando-se a % de delta F e % de ligação específica como previamente descrito.

Após a identificação de líderes melhorados da biblioteca de

mutagênese aleatória, produções de scFv bruto não diluído de seleções de mutagênese dirigida de CDR3 foram triadas em uma versão modificada do ensaio de HTRF® de competição por epítipo que incluiu as seguintes alterações: 0,5 nM de IL-6 HIS FLAG humana foi pré-incubado por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro, com 1,732 nM de IgG anti-flag marcada com criptato (CIS Bio International 61FG2KLB). Em paralelo, 16 nM de IgG anti-IL-6 biotinilada (anticorpo 5, IgG caseira identificada a partir de seleções de mutagênese aleatória de CAN022D10) foi pré-incubado por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro com 40 nM de estreptavidina XL<sup>entl</sup> (TM) (CIS Bio International 611SAXLB). Todas as outras condições foram conforme descritas para ensaio de competição por epítipo de CAN022D10. Dados foram analisados por cálculo de % de delta F e % de ligação específica como previamente descrito.

Inibição de liberação de VEGF induzida por IL-6 endógena a partir de fibroblastos sinoviais humanos por IgG purificada

Amostras de joelhos com artrite reumatóide de cirurgia de substituição de articulação total foram obtidos em DMEM contendo antibióticos. Sinóvia banhada em meios foi dissecada da articulação & finamente cortada. O tecido sinovial foi lavado com meios suplementados com 10% de FCS. A suspensão celular foi incubada em uma solução de colagenase por 2 horas em um incubador de CO<sub>2</sub> a 37°C. A suspensão celular sinovial digerida foi rompida por aspiração repetidamente através de uma pipeta de 10 mL, células tencionada & centrifugada a 400 g em temperatura ambiente por 5 minutos. As células foram ressuspensas em DMEM contendo 10% de FCS, passadas através de um tensionador de células, ajustadas a  $1 \times 10^6$  células por mL & incubadas em um incubador de CO<sub>2</sub> a 37°C em frascos de cultura de células de 225 cm<sup>2</sup> (3001, Costar Corning Inc.). Após aderência, a maioria do meio foi descartada, substituída com fresco & retornado ao incubador para incubação de longa duração. As células foram

examinadas em uma base semanal & foram passadas em confluência por tripsnização em uma taxa de passagem de 1 em 3.

Fibroblastos (P3-5) em confluência foram removidos dos frascos por incubação com 10 mL de solução 0,1% de tripsina-EDTA (25300-054, Gibco Life Sciences) por frasco por 5 até 10 minutos a 37°C. Um volume igual de meio de cultura baseado em DMEM suplementados com 10% de FCS foi adicionado às células, que foram então sedimentadas por centrifugação a 330 g por 5 minutos a TA. Após uma etapa de lavagem com meio de cultura baseado em DMEM suplementado com 10% de FCS, a suspensão celular (células  $1 \times 10^5$  células por mL) foi adicionada (150 µL por poço) a poços de placas de poliestireno de fundo chato de agregado de cultura de células de 96 poços estéreis (3598, Corning Costar) em  $1,5 \times 10^4$  células por poço. Uma adição adicional de meios de cultura baseados em DMEM suplementados com 10% de FCS foi adicionada a cada poço (100 µL por poço) para dar um volume total de 250 µL por poço. As células foram incubadas a 37°C durante a noite para permitir aderência e quiescência.

As placas de 96 poços foram inspecionadas para garantir que as células estavam confluentes e em boas condições (p. ex., livres de contaminação). O meio foi então aspirado dos poços e 100 µL de meio de cultura baseado em DMEM suplementado com 10% de FCS foi imediatamente adicionado. A este, 50 µL de meio de cultura baseado em DMEM suplementado com 10% de FCS contendo ou IgG de amostra ou meio sozinho foram adicionados aos poços (diluído 1 em 5 no ensaio).

Isto foi seguido pela adição de 50 µL por poço de meio de cultura baseado em DMEM suplementado com 10% de FCS contendo IL-6Rα solúvel (rhs) humano recombinante (500 ng por mL; 12 nM) e rhIL-1β (50 pg por mL; 2,95 pM, diluído 1 em 5 no ensaio).

Em poços separados, 50 µL de meio de cultura baseado em DMEM suplementado com 10% de FCS contendo: Rh-IL-6 (0, 100 ng por

mL; 21,5 nM), sIL-6R $\alpha$  (500 ng por mL; 12 nM), rhIL-1 $\beta$  (50 pg por mL; 2,95 pM), ou meio sozinho foram adicionados (diluído 1 em 5 no ensaio). O volume final em cada poço foi de 250  $\mu$ L.

5 As placas foram incubada por 48 horas a 37°C. Incubações foram realizadas em poços em duplicata ou triplicada como descrito no formato de placa. As placas foram centrifugada a 330 g por 5 minutos em TA e os meios sobrenadantes foram removidos e estocados a -40°C em placas de fundo chato de microtitulação (611F96, Sterilin).

10 VEGF foi medido usando um ELISA (DY293B, R&D Systems) seguindo as instruções dos fabricantes. Resumidamente, placas de ELISA foram revestidas com um anticorpo anti-VEGF humana de camundongo durante a noite a 4°C e bloqueadas com 1% de BSA/PBS. Placas foram lavadas com 0,05% de Tween 20/PBS e incubadas com sobrenadantes de cultura de fibroblastos derivados de sinóvia humana e um anticorpo anti-VEGF humana de bode biotinilado durante a noite em temperatura ambiente. Após a lavagem, VEGF foi detectada por uso de peroxidase de rábano picante com estreptavidina. Placas foram desenvolvidas usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:tetrametilbenzidina 1:1. A reação foi interrompida com 2 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e densidades óticas foram determinadas a 450 nm com comprimento de onde de 15 correção ajustada a 540 nm.

#### Medições de BIAcore

Estudos de BIAcore foram feitos usando um BIAcore 2000™. Anticorpos foram acoplados à superfície de um chip sensor CM-5 usando um kit de acoplamento de amina para prover uma densidade de superfície de 220-225 Ru. IL-6 humana em uma faixa de concentrações entre 200 nM e 0,2 nM em tampão HBS-EP foi passada pela superfície do chip sensor. Os sensogramas resultantes foram avaliados usando software BIA Evaluation 3.1 para calcular os valores de  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  e  $K_D$  para os anticorpos testados.

#### Ensaio de proliferação de células B9 mediada por IL-6

Células B9 são um subclone da linhagem celular de hibridoma de células B murina, B13.29, selecionado com base em suas respostas específicas para IL-6. Células B9 requerem IL-6 para sobrevivência e proliferação e respondem a concentrações muito baixas de IL-6.

5 Proliferação de células B9 induzida por IL-6 foi avaliada na presença de anticorpo 18 e de um controle de isotipo (CAT-002). Os efeitos de uma faixa de concentrações de cada anticorpo ( $1 \times 10^{-13}$  M até  $1 \times 10^{-9}$  M) foram avaliados em uma curva padrão de IL-6 (faixa de concentração  $1 \times 10^{-14}$  M até  $1 \times 10^{-9}$  M). Pontos de dados foram em duplicata. A proliferação de B9  
10 foi determinada após 4 dias de incubação por redução de azul de alamar (método fluorescente).

Células B9 foram cultivadas em RPMI-1640 contendo 5% de FCS, 2 mM de L-glutamina e 50  $\mu$ M de 2-mercaptoetanol. Células foram divididas a cada 2 a 4 dias para uma densidade entre  $0,05 \times 10^6$  mL<sup>-1</sup> e  $0,1 \times$   
15  $10^6$  mL<sup>-1</sup> e suplementadas com  $5 \times 10^{-13}$  M de IL-6 humana. Células usadas para experimentos não foram suplementadas com IL-6 por pelo menos 48 horas antes do experimento, mas foram suplementadas em 96 horas de experimento. Células usadas no ensaio foram tomadas a partir de um frasco estoque com uma densidade não maior que  $0,8 \times 10^6$  mL<sup>-1</sup>.

20 Cada anticorpo foi diluído a partir de soluções estoque para 10x a concentração de ensaio requerida máxima por diluições apropriadas em meios de ensaio (RPMI +5% de FCS, 2 mM de L-glutamina, 50  $\mu$ M de 2-mercaptoetanol, 100 U mL<sup>-1</sup> de penicilina e estreptomicina a 100 mg mL<sup>-1</sup>). Diluições de 10 vezes adicionais em meios de cultura foram efetuadas para  
25 obter as concentrações requeridas de cada anticorpo.

IL-6 foi reconstituído a partir de um pó liofilizado para uma solução de  $1 \times 10^{-5}$  M por adição de um volume apropriado de PBS estéril+0,1% de BSA. Uma diluição adicional para  $1 \times 10^{-8}$  M foi efetuada em meios de cultura. Alíquotas de  $1 \times 10^{-8}$  M foram estocadas congeladas até

requerido. No dia do ensaio alíquotas de  $1 \times 10^{-8}$  M foram diluídas conforme necessário para alcançar a faixa de soluções em 10x de concentração de ensaio final requerido.

5 O volume requerido de células foi removido de frascos de cultura e centrifugado a 300 g por 8 minutos. Sobrenadantes foram removidos e as células ressuspensas em um volume apropriado de meios de cultura para alcançar uma densidade celular de  $0,5 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ .

10 Ensaios foram realizados em placas de fundo chato, tratadas com cultura de tecidos, de 96 poços de poliestireno. O volume de ensaio final foi de 200  $\mu\text{L}$ . Vinte microlitros de solução de anticorpo 10x (anticorpo 18 ou CAT-002) ou meios de cultura foram adicionados aos poços apropriados de cada placa seguidos por 140  $\mu\text{L}$  adicionais de meios de cultura e 20  $\mu\text{L}$  da concentração apropriada de IL-6 ou meios de cultura.

15 Placas foram colocadas em um incubador de  $\text{CO}_2$  a 5% umidificado, a  $37^\circ\text{C}$  por 2 horas. Vinte microlitros de células foram então adicionados para cada poço. Número final de células por poço foi de 10000. Placas foram então retornadas para o incubador por 4 dias. A proliferação celular foi avaliada por incorporação de azul de alamar. Dez por cento v/v de azul de alamar foram adicionados em cada poço e as placas retornadas para o incubador por 6 horas. Placas foram então lidas em um espectrofluorímetro medindo fluorescência a 590 nm em seguida dados brutos de excitação a 544 nm foram normalizados para a curva de IL-6 controle em cada placa tal que a fluorescência máxima fosse definida como 100% e a fluorescência basal 0%. Dados normalizados foram encaixados usando o programa de encaixe de regressão não linear, de dose-resposta sigmoidal (alça variável) em Graph Pad Prism 4.01. Valores de  $\text{pEC}_{50}$  controle e valores de  $\text{pEC}_{50}$  na presença de cada concentração de anticorpo foram usados para determinar razões de dose (DR), 20 Valores de  $K_b$  foram determinados para a concentração mais baixa de anticorpo que elicitou uma alteração de 3 vezes ou mais na curva de

25

concentração de IL-6-efeito usando a equação de antagonismo químico abaixo:

$$K_b = ([Ab]/DR-1))$$

(Kenakin TP. Em: Pharmacologic Analysis of Drug-Receptor Interactions. 1a ed. Nova Iorque: Raven Press; 1987. pp. 205-24)

## 5                    Ensaio de liberação de IgM em célula SKW6.4 mediada por IL-6

IL-6 está envolvido na maturação final de células B em células produtoras de anticorpo (diferenciação de linfócito B). Células SKW foram previamente usadas para o estudo de respostas de células B (Nawata *et al.*,  
10    Ann NY Acad Sci 557: 230-238, 1989). Produção de auto-anticorpo em artrite reumatóide é em geral da classe IgM. SKW6.4 é uma linhagem celular linfoblastoide B humana secretora de IgM clonal. Células foram obtidas de ATCC, referência #TIB 215. No estímulo com IL-6 essas células secretam IgM, assim este ensaio foi percebido como sendo relevante para artrite  
15    reumatoide.

Secreção de IgM por célula SKW6.4 induzida por IL-6 foi avaliada na presença de CAT6001 e CAt-002 (controle de isotipo). Os efeitos de uma faixa de concentrações de cada anticorpo ( $1 \times 10^{-12,5}$  M até  $1 \times 10^{-8}$  M) foram avaliados na presença de 100 pM de IL-6. Pontos de dados estavam em  
20    duplicata. A secreção de IgM nos sobrenadantes celulares foi determinada após 4 dias de incubação suando ensaio de ELISA de anti-IgM humana.

Células SKW6.4 foram cultivadas em RPMI1640 contendo 2 mM de L-glutamina e 10% (v/v) de soro de bezerro fetal a 37°C a 95/5 % (v/v) de ar/CO<sub>2</sub> em 95% de umidade relativa. As células foram mantidas entre  
25    0,4 e  $2 \times 10^6$  células/mL. Para passagem celular de rotina, células foram coletadas por centrifugação a 300xg por 5 minutos em temperatura ambiente, o meio gasto foi removido e as células ressuspendidas no volume de meio fresco necessário.

Cada anticorpo foi diluído a partir de soluções estoque para 50x a concentração de ensaio requerida máxima por diluições apropriadas em meios de ensaio (RPMI +10% de FCS, 2 mM de L-glutamina). Diluições de 10 vezes adicionais em meios de cultura foram efetuadas para obter as concentrações necessárias de cada anticorpo.

Ensaio foram realizados em placas de fundo chato, tratadas com cultura de tecidos, de 96 poços de poliestireno. Estoques de célula SKW6.4 foram diluídos em uma densidade celular de  $0,3 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  em meios frescos e plaqueados em 100  $\mu\text{L}$ /poço (30.000 células por poço). Dois microlitros de anticorpo, na concentração final indicada, seguidos por 2  $\mu\text{L}$  de IL-6 em uma concentração final de 100 pM foram então adicionados em cada poço.

Placas foram então retornadas ao incubador a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Sobrenadantes livres de células foram coletados após 4 dias de incubação por centrifugação e então avaliados por ELISA de IGM no dia da coleta ou congelados a -20°C antes de análise adicional.

Um ELISA foi gerado usando um par de anticorpos de Serotec. O anticorpo de revestimento foi anti-IgM humana de camundongo (MCA1662) e o anticorpo de detecção foi anti-IgM humana de bode:ligado a HRP (STAR98P). O ensaio foi otimizado por métodos padrões para dar uma boa razão sinal sobre ruído usando anticorpo de revestimento @ diluição 1:2000 (5 $\mu\text{g/mL}$ ) e anticorpo de detecção @ diluição 1:3500 (200 ng/mL).

Solução padrão de IgM (Cat.# PHP003 proteína purificada de kapa M humana) foi adquirida da Serotec para gerar uma curva padrão.

Dados foram analisados usando um encaixe polinomial para os dados de curva padrão de IgM usando um programa de encaixe padrão. A porcentagem de inibição de cada amostra de anticorpo contra a produção de IgM controle na ausência de anticorpo foi calculada e valores de IC<sub>50</sub> foram gerados.

## Geração de proteínas mutantes de IL-6 e IL-6 para mapeamento de epítopo

### *Clonagem de cDNA de IL-6 humana e de cino*

As sequências de IL-6 humana e de macaco foram obtidas de EMBL (No de acesso: BC015511 e AB000554 para humano e cino, respectivamente). Usando essas sequências iniciadores oligonucleotídicos foram desenhados para amplificar o cDNA codificando IL-6 humana & de macaco. Os iniciadores N-terminais foram hIL6\_5'NdeI e macIL6\_5'NdeI para humano e cino respectivamente e macIL6\_3'NheI foi usado como o iniciador C-terminal para ambos (Veja a Tabela 11 para sequências oligonucleotídicas).

*Tabela 11: Sequências de iniciadores*

| <b>Iniciador</b> | <b>Sequência</b>                                             |
|------------------|--------------------------------------------------------------|
| macIL6_5'NdeI    | 5' TTATCAT-ATGGTACTCCCAGGAGAAGATTCCAA 3'<br>(SEQ ID NO: 183) |
| macIL6_3'NheI    | 5' TTATGCTAGC-CTACATTTGCCGAAGAGCCC 3'<br>(SEQ ID NO: 184)    |
| hIL6_5'NdeI      | 5' TTATACATATG-GTACCCCCAGGAGAAGATTCC 3'<br>(SEQ ID NO: 185)  |

Reações de PCR para amplificar os dois cDNAs foram efetuadas. O molde para cada reação de PCR foi de 10 ng de cDNA obtido de fígado humano e fígado de cinomolgo, respectivamente. O cDNA amplificado de cada reação foi purificado e clonado em pCR4blunt topo (Invitrogen) usando a reação de ligação da toporisomerase de acordo com o fabricante.

Clones positivos foram identificados e sequenciados. Os cDNAs resultantes foram subclonados usando técnicas padrões em vários vetores de expressão em promotor T7 de *E. coli* de tal maneira que o cDNA codificando IL-6 de cinomolgo ou humana madura foi fusionado na extremidade N-terminal com uma etiqueta HIS6-FLAG N-terminal a montante da valina N-terminal de IL-6 madura.

### *Gerando mutantes*

Mutagênese sítio-dirigida foi realizada usando um kit

Quickchange XL da Stratagene de acordo com o protocolo do fabricante. O desenho de iniciador de mutagênese foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante. Reações de mutagênese foram efetuadas de acordo com o protocolo usando plasmídeo pT7flagHISIL-6 como molde. Isto foi seguido por subsequente digestão com *DpnI* e transformação em células Top10 quimicamente competentes com seleção em placas de Agar contendo antibióticos apropriados a 37°C durante a noite. Para cada reação de mutagênese individual vários clones foram seqüenciados e DNA plasmidial de um clone correto de cada reação foi retido para uso futuro.

#### 10 *Expressão de proteínas mutantes de IL-6 e IL-6*

Plasmídeos de expressão de IL-6 foram transformados em células star BL21 (DE3) quimicamente competentes (Invitrogen) usando o método do fabricante. Células transformadas foram usadas para inocular 1L de culturas de caldo Terrific e essas foram incubadas em um incubador orbital a 37°C, até a A600 atingir 0,5. IPTG foi então adicionado a 0,25 mM e a incubação foi continuada durante a noite a 22°C. As células foram coletadas por centrifugação e os sedimentos celulares foram estocados a -80°C.

#### *Purificação de proteínas mutantes de IL-6 e IL-6*

Os sedimentados celulares foram descongelados e ressuspensos em 50 mL por sedimento de fosfato de potássio a 50 mM, pH 7,4, 10 mM de imidazol, 0,3M de NaCl, 5 mM de beta-mercaptoetanol, 10% de glicol (tampão A) + inibidores de protease livres de EDTA completos (Roche). As células foram lisadas por sonicação por 3 x 30 segundos em gelo. O lisado foi centrifugado a 100.000g a 4°C por 30 minutos e o sobrenadante foi submetido a cromatografia de afinidade em Ni NTA. Uma coluna de 5 mL de Ni-NTA Superflow (Qiagen) foi equilibrada a 3 mL/min com (tampão A). A amostra de IL-6 foi carregada e a coluna foi lavada com 10 volumes de coluna de imidazol a 15 mM em tampão A. Isto foi seguido por uma lavagem de 10 volumes de coluna com imidazol a 30 mM em tampão A. IL-6 foi

eluída da coluna usando uma lavagem de 5 volumes de coluna na direção de fluxo ascendente com imidazol a 0,3 M em tampão A. Frações de 10mL foram coletadas durante as etapas de lavagem e frações de 5 mL foram coletadas durante a etapa de eluição. A coluna foi corrida a 4<sup>0</sup>C usando o  
 5 AKTA Explorer100 Air. Frações contendo a proteína IL-6 purificada foram reservadas e dializadas durante a noite a 4<sup>0</sup>C contra 5L de PBS.

As proteínas IL-6 dializadas foram adicionalmente purificadas usando cromatografia de gel filtração. Para cada purificação a proteína IL-6 dialisada foi centrifugada a 100.000g e 4<sup>0</sup>C por 20 minutos. Até 13mL foram  
 10 aplicados em uma coluna de 318mL Superdex 200 26/60 (GE Healthcare) que foi equilibrada em PBS a 2,5 mL/min. A coluna foi corrida a 4<sup>0</sup>C usando um purificador AKTA. Frações contendo o pico de proteína IL-6 monomérico foram reservadas para análise adicional.

Cada proteína foi chacada por pureza usando cromatografia  
 15 com SDS padrão, a concentração proteica foi medida e espectrometria de massas Q-ToF foi usada para medir a massa da proteína. IL-6 purificada foi congelada em nitrogênio líquido e estocada a -80<sup>0</sup>C.

#### Materiais e Métodos para estudos *in vivo*

Animais foram aleatoriamente designados para entrar em  
 20 grupos de teste. Os camundongos em cada grupo de teste foram então tratados diariamente com doses subcutâneas ajustadas (10mL/kg) de cada controle de veículo (0,05% de BSA em PBS) ou 467 µg/kg de controle de isotipo de IgG1 ou anticorpo 18 (faixa de 467 µg/kg até 8 µg/kg). Ao mesmo tempo aos camundongos foram dadas injeções intraperitoniais (10mL/kg) b.i.d. ou de  
 25 controle de veículo (0,05% de BSA em PBS) ou 12 µg/kg de IL-6 recombinante humana.

No dia 7, duas horas após a dose de IL-6 final às 09:00h, os camundongos foram sacrificados e amostras sanguíneas terminais foram tomadas. O sangue foi transferido para tubos de sangue com EDTA de 1mL

Lab Tek, que foram colocados em um rolator por 5 minutos. Amostras foram então mantidas em gelo até o uso. Contagens celulares diferenciais foram realizadas usando um contador celular Sysmex. O restante da amostra foi transferido para um tubo Eppendorf e centrifugado rapidamente (300g, 5 min) para obter plasma que foi sub-aliquotado e estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até serem analisados por níveis de haptoglobina.

O ensaio de haptoglobina foi efetuado pelas instruções providas no kit de formato PHASE™ RANGE TriDelta por Biognosis (Hailsham, UK; Cat. No. TP-801).

Todos os resultados foram expressados como média $\pm$ SEM. Análise de dados foi por teste T não pareado ou ANOVA de uma direção seguido por teste de Dunnett (GraphPad Instat).

### Sequências

Domínio VH, domínio VL e sequências de CDR de membros de ligação são mostradas na listagem de sequência anexada, em que SEQ ID NOS correspondem como se segue:

|    |                            |                               |
|----|----------------------------|-------------------------------|
| 1  | nucleotídeo de CAN022D1030 | CAN022D10                     |
| VH |                            | 8 aa de CDR 1 de VL de        |
| 2  | aminoácido de VH de        | CAN022D10                     |
| 20 | CAN022D10                  | 9 aa de CDR 2 de VL de        |
| 3  | aa de CDR 1 de VH de       | CAN022D10                     |
|    | CAN022D10                  | 35 10 aa de CDR 3 de VL de    |
| 4  | aa de CDR 2 de VH de       | CAN022D10                     |
|    | CAN022D10                  | 11 nucleotídeo de anticorpo 2 |
| 25 | 5 aa de CDR 3 de VH de     | VH                            |
|    | CAN022D10                  | 12 aminoácido de VH 2 de Ab   |
| 6  | nucleotídeo de CAN022D1040 | 13 aminoácido de CDR 1 de VH  |
| VL |                            | 2 de Ab                       |
| 7  | aminoácido de VL de        | 14 aminoácido de CDR 2 de VH  |

|    |                                |    |                              |  |
|----|--------------------------------|----|------------------------------|--|
|    | 2 de Ab                        | 30 | anticorpo                    |  |
|    | 15 aminoácido de CDR 3 de VH   |    | 32 aminoácido de VH de Ab 4  |  |
|    | 2 de Ab                        |    | 33 aminoácido de CDR 1 de VH |  |
|    | 16 nucleotídeo de VL 2 Ab      |    | de Ab 4                      |  |
| 5  | 17 aminoácido de VL de Ab 2    |    | 34 aminoácido de CDR 2 de VH |  |
|    | 18 aminoácido de CDR 1 de VL35 |    | de Ab 4                      |  |
|    | de Ab 2                        |    | 35 aminoácido de CDR 3 de VH |  |
|    | 19 aminoácido de CDR 2 de VL   |    | de Ab 4                      |  |
|    | de Ab 2                        |    | 36 nucleotídeo de VL 4 de Ab |  |
| 10 | 20 aminoácido de CDR 3 de VL   |    | 37 aminoácido de VL de Ab 4  |  |
|    | de Ab 2                        | 40 | 38 aminoácido de CDR 1 de VL |  |
|    | 21 nucleotídeo de VH 3 de      |    | de Ab 4                      |  |
|    | anticorpo 3                    |    | 39 aminoácido de CDR 2 de VL |  |
|    | 22 aminoácido de VH de Ab 3    |    | de Ab 4                      |  |
| 15 | 23 aminoácido de CDR 1 de VH   |    | 40 aminoácido de CDR 3 de VL |  |
|    | de Ab 3                        | 45 | de Ab 4                      |  |
|    | 24 aminoácido de CDR 2 de VH   |    | 41 nucleotídeo de VH 5 de    |  |
|    | de Ab 3                        |    | anticorpo                    |  |
|    | 25 aminoácido de CDR 3 de VH   |    | 42 aminoácido de VH de Ab 5  |  |
| 20 | de Ab 3                        |    | 43 aminoácido de CDR 1 de VH |  |
|    | 26 nucleotídeo de VL 3 Ab      | 50 | de Ab 5                      |  |
|    | 27 aminoácido de VL de Ab 3    |    | 44 aminoácido de CDR 2 de VH |  |
|    | 28 aminoácido de CDR 1 de VL   |    | de Ab 5                      |  |
|    | de Ab 3                        |    | 45 aminoácido de CDR 3 de VH |  |
| 25 | 29 aminoácido de CDR 2 de VL   |    | de Ab 5                      |  |
|    | de Ab 3                        | 55 | 46 nucleotídeo de VL 5 de Ab |  |
|    | 30 aminoácido de CDR 3 de VL   |    | 47 aminoácido de VL de Ab 5  |  |
|    | de Ab 3                        |    | 48 aminoácido de CDR 1 de VL |  |
|    | 31 nucleotídeo de VH 4 de      |    | de Ab 5                      |  |

|    |    |                                     |    |  |                                       |
|----|----|-------------------------------------|----|--|---------------------------------------|
|    | 49 | aminoácido de CDR 2 de VL30 de Ab 5 |    |  | de Ab 8                               |
|    | 50 | aminoácido de CDR 3 de VL de Ab 5   |    |  | 66 nucleotídeo de VL 8 de Ab          |
| 5  | 51 | nucleotídeo de VH 7 de anticorpo    | 35 |  | 67 aminoácido de VL de Ab 8           |
|    | 52 | aminoácido de VH de Ab 7            |    |  | 68 aminoácido de CDR 1 de VL de Ab 8  |
|    | 53 | aminoácido de CDR 1 de VH de Ab 7   |    |  | 69 aminoácido de CDR 2 de VL de Ab 8  |
| 10 | 54 | aminoácido de CDR 2 de VH de Ab 7   | 40 |  | 70 aminoácido de CDR 3 de VL de Ab 8  |
|    | 55 | aminoácido de CDR 3 de VH de Ab 7   |    |  | 71 nucleotídeo de VH 10 de anticorpo  |
|    | 56 | nucleotídeo de VL 7 de Ab           |    |  | 72 aminoácido de VH de Ab 10          |
| 15 | 57 | aminoácido de VL de Ab 7            |    |  | 73 aminoácido de CDR 1 de VH de Ab 10 |
|    | 58 | aminoácido de CDR 1 de VL45 de Ab 7 |    |  | 74 aminoácido de CDR 2 de VH de Ab 10 |
|    | 59 | aminoácido de CDR 2 de VL de Ab 7   |    |  | 75 aminoácido de CDR 3 de VH de Ab 10 |
| 20 | 60 | aminoácido de CDR 3 de VL de Ab 7   | 50 |  | 76 nucleotídeo de VL 10 de Ab         |
|    | 61 | nucleotídeo de VH 8 de anticorpo    |    |  | 77 aminoácido de VL de Ab 10          |
|    | 62 | aminoácido de VH de Ab 8            |    |  | 78 aminoácido de CDR 1 de VL de Ab 10 |
| 25 | 63 | aminoácido de CDR 1 de VH de Ab 8   | 55 |  | 79 aminoácido de CDR 2 de VL de Ab 10 |
|    | 64 | aminoácido de CDR 2 de VH de Ab 8   |    |  | 80 aminoácido de CDR 3 de VL de Ab 10 |
|    | 65 | aminoácido de CDR 3 de VH           |    |  | 81 nucleotídeo de VH 14 de anticorpo  |
|    |    |                                     |    |  | 82 aminoácido de VH de Ab 14          |

|    |    |                             |     |                               |
|----|----|-----------------------------|-----|-------------------------------|
|    | 83 | aminoácido de CDR 1 de VH30 | 100 | aminoácido de CDR 3 de VL     |
|    |    | de Ab 14                    |     | de Ab 16                      |
|    | 84 | aminoácido de CDR 2 de VH   | 101 | nucleotídeo de VH 17 de       |
|    |    | de Ab 14                    |     | anticorpo                     |
| 5  | 85 | aminoácido de CDR 3 de VH   | 102 | aminoácido de VH de Ab 17     |
|    |    | de Ab 14                    | 35  | 103 aminoácido de CDR 1 de VH |
|    | 86 | nucleotídeo de VL 14 de Ab  |     | de Ab 17                      |
|    | 87 | aminoácido de VL de Ab 14   | 104 | aminoácido de CDR 2 de VH     |
|    | 88 | aminoácido de CDR 1 de VL   |     | de Ab 17                      |
| 10 |    | de Ab 14                    | 105 | aminoácido de CDR 3 de VH     |
|    | 89 | aminoácido de CDR 2 de VL40 |     | de Ab 17                      |
|    |    | de Ab 14                    | 106 | nucleotídeo de VL 17 de Ab    |
|    | 90 | aminoácido de CDR 3 de VL   | 107 | aminoácido de VL de Ab 17     |
|    |    | de Ab 14                    | 108 | aminoácido de CDR 1 de VL     |
| 15 | 91 | nucleotídeo de VH 16 de     |     | de Ab 17                      |
|    |    | anticorpo                   | 45  | 109 aminoácido de CDR 2 de VL |
|    | 92 | aminoácido de VH de Ab 16   |     | de Ab 17                      |
|    | 93 | aminoácido de CDR 1 de VH   | 110 | aminoácido de CDR 3 de VL     |
|    |    | de Ab 16                    |     | de Ab 17                      |
| 20 | 94 | aminoácido de CDR 2 de VH   |     | 111 nucleotídeo de VH 18 de   |
|    |    | de Ab 16                    | 50  | anticorpo                     |
|    | 95 | aminoácido de CDR 3 de VH   | 112 | aminoácido de VH de Ab 18     |
|    |    | de Ab 16                    | 113 | aminoácido de CDR 1 de VH     |
|    | 96 | nucleotídeo de VL 16 de Ab  |     | de Ab 18                      |
| 25 | 97 | aminoácido de VL de Ab 16   | 114 | aminoácido de CDR 2 de VH     |
|    | 98 | aminoácido de CDR 1 de VL55 |     | de Ab 18                      |
|    |    | de Ab 16                    | 115 | aminoácido de CDR 3 de VH     |
|    | 99 | aminoácido de CDR 2 de VL   |     | de Ab 18                      |
|    |    | de Ab 16                    | 116 | nucleotídeo de VL 18 de Ab    |

|    |     |                            |    |     |                            |  |
|----|-----|----------------------------|----|-----|----------------------------|--|
|    | 117 | aminoácido de VL de Ab 18  | 30 | 134 | aminoácido de CDR 2 de VH  |  |
|    | 118 | aminoácido de CDR 1 de VL  |    |     | de Ab 21                   |  |
|    |     | de Ab 18                   |    | 135 | aminoácido de CDR 3 de VH  |  |
|    | 119 | aminoácido de CDR 2 de VL  |    |     | de Ab 21                   |  |
| 5  |     | de Ab 18                   |    | 136 | nucleotídeo de VL 21 de Ab |  |
|    | 120 | aminoácido de CDR 3 de VL  | 35 | 137 | aminoácido de VL de Ab 21  |  |
|    |     | de Ab 18                   |    | 138 | aminoácido de CDR 1 de VL  |  |
|    | 121 | nucleotídeo de VH 19 de    |    |     | de Ab 21                   |  |
|    |     | anticorpo                  |    | 139 | aminoácido de CDR 2 de VL  |  |
| 10 | 122 | aminoácido de VH de Ab 19  |    |     | de Ab 21                   |  |
|    | 123 | aminoácido de CDR 1 de VH  | 40 | 140 | aminoácido de CDR 3 de VL  |  |
|    |     | de Ab 19                   |    |     | de Ab 21                   |  |
|    | 124 | aminoácido de CDR 2 de VH  |    | 141 | nucleotídeo de VH 22 de    |  |
|    |     | de Ab 19                   |    |     | anticorpo                  |  |
| 15 | 125 | aminoácido de CDR 3 de VH  |    | 142 | aminoácido de VH de Ab 22  |  |
|    |     | de Ab 19                   | 45 | 143 | aminoácido de CDR 1 de VH  |  |
|    | 126 | nucleotídeo de VL 19 de Ab |    |     | de Ab 22                   |  |
|    | 127 | aminoácido de VL de Ab 19  |    | 144 | aminoácido de CDR 2 de VH  |  |
|    | 128 | aminoácido de CDR 1 de VL  |    |     | de Ab 22                   |  |
| 20 |     | de Ab 19                   |    | 145 | aminoácido de CDR 3 de VH  |  |
|    | 129 | aminoácido de CDR 2 de VL  | 50 |     | de Ab 22                   |  |
|    |     | de Ab 19                   |    | 146 | nucleotídeo de VL 22 de Ab |  |
|    | 130 | aminoácido de CDR 3 de VL  |    | 147 | aminoácido de VL de Ab 22  |  |
|    |     | de Ab 19                   |    | 148 | aminoácido de CDR 1 de VL  |  |
| 25 | 131 | nucleotídeo de VH 21 de    |    |     | de Ab 22                   |  |
|    |     | anticorpo                  | 55 | 149 | aminoácido de CDR 2 de VL  |  |
|    | 132 | aminoácido de VH de Ab 21  |    |     | de Ab 22                   |  |
|    | 133 | aminoácido de CDR 1 de VH  |    | 150 | aminoácido de CDR 3 de VL  |  |
|    |     | de Ab 21                   |    |     | de Ab 22                   |  |

|    |     |                                                                                 |    |     |                                           |
|----|-----|---------------------------------------------------------------------------------|----|-----|-------------------------------------------|
|    | 151 | nucleotídeo de VH 23 de anticorpo                                               |    | 167 | FR1 de VH tornada de linhagem germinativa |
|    | 152 | aminoácido de VH de Ab 23                                                       | 30 | 168 | FR2 de VH tornada de linhagem germinativa |
| 5  | 153 | aminoácido de CDR 1 de VH de Ab 23                                              |    | 169 | FR3 de VH tornada de linhagem germinativa |
|    | 154 | aminoácido de CDR 2 de VH de Ab 23                                              |    | 170 | FR4 de VH tornada de linhagem germinativa |
|    | 155 | aminoácido de CDR 3 de VH35 de Ab 23                                            |    | 171 | FR1 de VL tornada de linhagem germinativa |
| 10 | 156 | nucleotídeo de VL 23 de Ab                                                      |    | 172 | FR1 de VL tornada de linhagem germinativa |
|    | 157 | aminoácido de VL de Ab 23                                                       |    | 173 | FR1 de VL tornada de linhagem germinativa |
|    | 158 | aminoácido de CDR 1 de VL de Ab 23                                              | 40 | 174 | FR1 de VL tornada de linhagem germinativa |
|    | 159 | aminoácido de CDR 2 de VL de Ab 23                                              |    | 175 | IL-6 mutante F102E                        |
| 15 | 160 | aminoácido de CDR 3 de VL de Ab 23                                              |    | 176 | IL-6 mutante S204E                        |
|    | 161 | aminoácido de IL-6 humana completa                                              | 45 | 177 | IL-6 mutante R207E                        |
| 20 | 162 | IL-6 humana etiquetada com HIS FLAG                                             |    | 178 | IL-6 mutante F106E                        |
|    | 163 | IL-6Ra solúvel (humano)                                                         |    | 179 | IL-6 mutante Q211A                        |
|    | 164 | IL-6Ra Transmembrana50 (humano)                                                 |    | 180 | IL-6 mutante R58E                         |
| 25 | 165 | aminoácido de IL-6 humana madura                                                |    | 181 | IL-6 mutante E200W                        |
|    | 166 | gp130 humana                                                                    |    | 182 | IL-6 mutante R207L                        |
| 55 |     | Sequências de anticorpos 7, 10, 17 e 18 foram tornadas de linhagem germinativa. |    | 183 | iniciador macIL6_5'NdeI                   |
|    |     |                                                                                 |    | 184 | iniciador macIL6_3'NheI                   |
|    |     |                                                                                 |    | 185 | iniciador hIL6_5'NdeI                     |

### **Referências**

Todas as referências citadas em qualquer lugar nesta especificação, incluindo aquelas citadas em qualquer lugar acima, são incorporadas aqui como referência em sua totalidade e para todos os fins.

- 5                   1       Kishimoto, T., (1989) Blood 74:1-10
- 2       Smith P.C. et al. (2001) Cytokine and Growth factor  
Reviews 12:33-40
- 3       Wallenius et al., (2002) Nat. Med. 8:75
- 4       Kawano et al. (1988) Nature 332:83
- 10               5       Van Zaanen et al. (1996) J. Clin Invest. 98:1441-1448
- 6       Somers, W., et al (1997) 1.9 EMBO J. 16:989-997
- 7       Jones, S. A et al. (2001) FASEB J. 15:43-58
- 8       Varghese et al. (2002) PNAS USA 99:15959-15964
- 9       Boulanger et al (2003) Science 300:2101-2104
- 15               10      Menziani et al (1997) Proteins: Structure Function and  
Genetics 29, 528
- 11      Brakenhoff et al. (1990) J. Immunol. 145:561-568
- 12      Wijdenes et al. (1991) Mol Immunol. 28:1183-1191
- 13      Brakenhoff et al. (1994) JBC 269:86
- 20               14      Kalai et al. (1996) Eur J Biochem 238 714-723
- 15      Kalai et al. (1997) Blood 89:1319-1333
- 16      Hirata et al. (1989) J. Immunol 143:2900-2906
- 17      Kalai et al. (1997) Eur J. Biochem 249:690-700
- 18      Ernst, M. and B. J. Jenkins. (2004) Trends Genet.  
25    20:23-32
- 19      Yoshida, K. et al (1996) PNAS USA 93:407-411
- 20      Heinrich, P. C. et al. (2003) Biochem.J. 374:1-20
- 21      Choy, E. (2004) Rheum.Dis.Clin.North Am. 30:405-

- 22 Jones SA et al. (2001) *FASEB J* 15:43-58
- 23 Kishimoto (2006) *Arthritis Research & Therapy*  
8:Supp 2/S2
- 24 Hirano T et al. (1986) *Nature* 324:73-76
- 5 25 Moshage (1997) *J. Pathol.* 181:257-266
- 26 Guillen, C. et al. (2004) *Calcif.Tissue Int.* 75:153-159
- 27 Tamura, T., et al. (1993) *PNAS USA* 90:11924-11928
- 28 Udagawa, N et al. (1995) *J. Exp. Med.* 182:1461-1468
- 29 Nishimoto N, and Kishimoto T. (2004) *Curr Op in*  
10 *Pharmacology* 4:386-391
- 30 Keller E.T. et al. (1996) *Front Biosci.* 1:340-57
- 31 Bataille et al. (1995) *Blood* 86:685-691
- 32 Lu et al. (1995) *Blood* 68:3123-3131
- 33 Blay et al. (1997) *Int J. Cancer* 424-430
- 15 34 Wendling et al. (1993) *J. Rheumatol.* 20:259-262
- 35 Emilie et al. (1994) *Blood* 84:2472-2479
- 36 Brochier J et al. (1995) *Int. J. of Immunopharm.* 17:41-  
48
- 37 van Zaanen et al. (1998) *Brit. Journal. Haematology*  
20 102:783
- 38 Bell and Kamm, (2000) *Aliment. Phamacol. Ther.* 14,  
501-514
- 39 Brakenhoff et al (1990) *J. Immunol* 145:651
- 40 Mihara et al. (2005) *Expert Opinion on Biological*  
25 *Therapy.* 5:683-90
- 41 Lu et al., (2005) *Biochemistry* 44:11106-14
- 42 Haan & Maggos (2004) *BioCentury*, 12(5): A1-A6
- 43 Koide et al. (1998) *Journal of Molecular Biology*, 284:  
1141-1151.

- 44 Nygren et al. (1997) *Curr. Op. Structural Biology*, 7:  
463-469
- 45 Wess, L. (2004) In: *BioCentury, The Bernstein Report on BioBusiness*, 12(42), A1-A7,
- 5 46 Kabat, E.A. et al, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 4th Edition. US Department of Health and Human Services. (1987)
- 47 Martin, A.C.R. *Accessing the Kabat Antibody Sequence Database by Computer* *PROTEINS: Structure, Function and*  
10 *Genetics*, 25 (1996), 130-133
- 48 Kabat, E.A. et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Edition. US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington
- 49 Segal et al., (1974) *PNAS*, 71:4298-4302
- 15 50 Amit et al., (1986) *Science*, 233:747-753
- 51 Chothia et al., (1987) *J. Mol. Biol.*, 196:901-917
- 52 Chothia et al., (1989) *Nature*, 342:877- 883
- 53 Caton et al., (1990) *J. Immunol.*, 144:1965-1968
- 54 Sharon et al., (1990) *PNAS*, 87:4814-4817
- 20 55 Sharon et al., (1990) *J. Immunol.*, 144:4863-4869
- 56 Kabat et al., (1991) *J. Immunol.*, 147:1709-1719
- 57 Holliger & Hudson, *Nature Biotechnology* 23(9):1126-  
1136 2005
- 58 Kontermann, R & Dubel, S, *Antibody Engineering*,  
25 Springer-Verlag New York, LLC; 2001, ISBN: 3540413545
- 59 Mendez, M. et al. (1997) *Nature Genet*, 15(2): 146-  
156
- 60 Knappik et al. (2000) *J. Mol. Biol.* 296, 57-86
- 61 Krebs et al. (2001) *J. Immunological Methods* 254 67-

84

- 62 Ward, E.S. et al., (1989) *Nature* 341, 544-546
- 63 McCafferty et al (1990) *Nature*, 348, 552-554
- 64 Holt et al (2003) *Trends in Biotechnology* 21, 484-490
- 5 65 Bird et al, (1988) *Science*, 242, 423-426
- 66 Huston et al, (1988) *PNAS USA*, 85, 5879-5883
- 67 Holliger, P. et al, (1993) *PNAS USA* 90 6444-6448
- 68 Reiter, Y. et al, (1996) *Nature Biotech*, 14, 1239-1245
- 69 Hu, S. et al, (1996) *Cancer Res.*, 56, 3055-3061
- 10 70 Qui et al., (2007) *Nat. Biotechnol.* 25:921-929
- 71 Holliger and Bohlen (1999) *Cancer & Metastasis Rev.*  
18: 411-419
- 72 Holliger, P. and Winter G. (1993) *Curr. Op. Biotech.* 4,  
446-449
- 15 73 Glennie M J et al. (1987) *J. Immunol.* 139, 2367-2375
- 74 Repp R. et al. (1995) *J. Hematother.* 4: 415-21
- 75 Staerz U. D. and Bevan M. J. (1986) *PNAS USA* 83:  
1453-7
- 76 Suresh M. R. et al. (1986) *Method Enzymol.* 121: 210-  
20 228
- 77 Merchand et al. (1998) *Nature Biotech.* 16:677-681
- 78 Ridgeway, J. B. B. et al (1996) *Protein Eng.*, 9, 616-  
621
- 79 Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*,  
25 Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y., pp. 726, 1988
- 80 Köhler and Milstein (1975) *Nature*, 256:495-497
- 81 Wold, et al. *Multivariate data analysis in chemistry.*  
*Chemometrics –Mathematics and Statistics in Chemistry* (Ed.: B. Kowalski),  
D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland, 1984 (ISBN 90-277-

1846-6)

82 Norman et al. Applied Regression Analysis. Wiley-Interscience; 3rd edition (April 1998) ISBN: 0471170828

83 Kandel, Abraham & Backer, Eric. Computer-Assisted Reasoning in Cluster Analysis. Prentice Hall PTR, (May 11, 1995), ISBN: 0133418847

84 Krzanowski, Wojtek. Principles of Multivariate Analysis: A User's Perspective (Oxford Statistical Science Series, No 22 (Paper)). Oxford University Press; (December 2000), ISBN: 0198507089

85 Witten, Ian H. & Frank, Eibe. Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques with Java Implementations. Morgan Kaufmann; (October 11, 1999), ISBN: 1558605525

86 Denison David G. T. (Editor), Christopher C. Holmes, Bani K. Mallick, Adrian F. M. Smith. Bayesian Methods for Nonlinear Classification and Regression (Wiley Series in Probability and Statistics). John Wiley & Sons; (July 2002), ISBN: 0471490369

87 Ghose, Arup K. & Viswanadhan, Vellarkad N.. Combinatorial Library Design and Evaluation Principles, Software, Tools, and Applications in Drug Discovery. ISBN: 0-8247-0487-8

88 Chothia C. et al. (1992) J. Molecular Biology 227, 799-817

89 Al-Lazikani, et al. (1997) J. Molecular Biology 273(4), 927-948

90 Chothia, et al. (1986) Science, 223,755-758

91 Whitelegg, N.R.u. & Rees, A.R (2000). Prot. Eng., 12, 815-824

92 Guex, N. and Peitsch, M.C. (1997) Electrophoresis 18, 2714-2723

93 Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 405-410

- 94 Pearson and Lipman (1988) PNAS USA 85: 2444-2448
- 95 Smith and Waterman (1981) J. Mol Biol. 147: 195-197
- 96 Voet & Voet, Biochemistry, 2nd Edition, (Wiley) 5 1995.
- 97 Gram et al., (1992) PNAS USA, 89:3576-3580
- 98 Barbas et al., (1994) PNAS USA, 91:3809-3813
- 99 Schier et al., (1996) J. Mol. Biol. 263:551-567
- 100 Marks et al (1992) Bio/Technology 10:779-783
- 101 Kay, B.K., Winter, J., and McCafferty, J. (1996) Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual, San Diego: Academic Press
- 102 Hunter W. M. and Greenwood F. C. (1962) Nature 15 194:495
- 103 Plückthun, A. (1991) Bio/Technology 9: 545-551
- 104 Chadd HE and Chamow SM (2001) Current Opinion in Biotechnology 12: 188-194
- 105 Andersen DC and Krummen L (2002) Current Opinion in Biotechnology 13: 117
- 106 Larrick JW and Thomas DW (2001) Current Opinion in Biotechnology 12:411-418
- 107 Sambrook and Russell, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3rd edition, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- 108 Ausubel et al. eds., Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 4th edition 1999 25
- 109 Robinson, J. R. ed., (1978) Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., New York
- 110 Ledermann J.A. et al. (1991) Int. J. Cancer 47: 659-664

- 111 Bagshawe K.D. et al. (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915-922
- 112 Desgeorges et al. (1997) J. Rheumatol 24:1510
- 113 Yokota et al. (2005) Arth & Rheum 52(3): 818-25
- 5 114 Klouche et al., (1999) J. Immunol. 163(8) 4583-9
- 115 Oh et al., (2001) J. Immunol. 166: 2695-704
- 116 Fasshauer et al., (2003) Horm. Metab. Res. 35(3) 147-52
- 117 Marz et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci USA 95(6) 10 3251-6
- 118 Modur et al., (1997) J. Clin. Invest. 100(1) 2752-6
- 119 Murakami-Morl et al., (1996) Cell Growth Differ. 7(12) 1697-703
- 120 Vaughan, T. J., et al. (1996) Nature Biotech. 14, 309-15 314.
- 121 Hutchings, C. (2001) Generation of Naïve Human Antibody Libraries, in Antibody Engineering, R. Kontermann and S. Dubel, Editors. Springer Laboratory Manuals, Berlin. p. 93
- 122 Hawkins et al (1992) Journal of Molecular Biology 20 226, 889-896
- 123 Persic L et al. (1997) Gene 187, 9-18.
- 124 Mach et al (1992) Anal. Biochem. 200(1): 20-26
- 125 Osbourn (1996) Immunotechnology. 2, 181-196
- 126 Bannister et al (2006) Biotechnology and 25 Bioengineering, 94: 931-937
- 127 McCafferty et al (1994) Appl. Biochem. Biotech. 47: 157-71
- 128 Clackson and Lowman (2004) A Practical Approach, Oxford University Press

- 129 Thompson (1996) J. Molecular Biology. 256. 77-88
- 130 <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>
- 131 Foote J & Winter G (1992) J. Molecular biology  
224(2) 487-99
- 5 132 Karlsson et al (1991) J. Immunol Methods 145 (1-2)  
229-240
- 133 Lu et al. (1995) Blood. 86: 3123-3131
- 134 Kitamura T et al (1989) J. Cellular Physiology 140.  
323-334

Tabela 7

| Numeração<br>de Kabet | MCDR1 |    |    | MCDR2 |    |    |    |    |    |    |    |    |    | MCDR3 |    |    |    |    |    |    |    |    |    | LCDR1 |    |    |     | LCDR2 |      |      |     | LCDR3 |  |  |  |
|-----------------------|-------|----|----|-------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-------|----|----|-----|-------|------|------|-----|-------|--|--|--|
|                       | 31    | 32 | 33 | 34    | 35 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58    | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 95 | 96 | 97    | 98 | 99 | 100 | 100A  | 100B | 100C | 101 | 102   |  |  |  |
| CAN022D10             | S     | N  | Y  | M     | I  | D  | L  | Y  | Y  | A  | G  | D  | T  | Y     | Y  | A  | D  | S  | V  | K  | G  | W  | A  | D     | H  | Y  | Y   | Y     | I    | -    | D   | V     |  |  |  |
| Anticorpo2            |       |    |    |       | T  |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    | R  |    |    |    | G     |    |    |     |       |      |      |     |       |  |  |  |
| Anticorpo3            |       |    |    |       | V  |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    | H   |       |      |      |     |       |  |  |  |
| Anticorpo4            |       |    |    |       | T  |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    | G     |    |    |     |       | A    |      |     |       |  |  |  |
| Anticorpo5            |       |    |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    | G     |    |    |     | A     |      |      |     |       |  |  |  |
| Anticorpo7            |       |    |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    | P   | A     | W    | V    | L   |       |  |  |  |
| Anticorpo8            |       |    |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    | P   | R     |      |      | H   |       |  |  |  |
| Anticorpo10           |       |    |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    | E  | E     | E  | G  | R   | G     |      |      |     |       |  |  |  |
| Anticorpo14           |       |    |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    | N   | P     | H    | I    |     |       |  |  |  |
| Anticorpo16           |       |    |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    | P   | P     |      |      | L   |       |  |  |  |
| Anticorpo17           |       |    |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    | P   | P     |      |      | M   |       |  |  |  |
| Anticorpo18           |       |    |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    | P   | P     | W    |      | L   |       |  |  |  |
| Anticorpo19           |       |    |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    | P   | S     | H    | L    | I   |       |  |  |  |
| Anticorpo21           |       |    |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    | P   | S     | H    |      |     |       |  |  |  |
| Anticorpo22           |       |    |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    | N   | N     | T    | Y    | I   |       |  |  |  |
| Anticorpo23           |       |    |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |    |    | A   | P     | W    | V    | L   |       |  |  |  |

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> AstraZeneca AB

MedImmune Limited

<120> Composto

<130> 102483-1 CAT082 IL-6 ligando

<150> US60/861,704

<151> 2006-11-30

<160> 185

<170> CAT version 1.0

<210> 1

<211> 360

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CAN022D10

<400> 1

|                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------|-----|
| gaagtgcagc tgggtgcagtc tgggggaggc ttgatccagc cggggggggtc cctgagactc | 60  |
| tctgtgcag cctctgggtt caccatcagc agcaactaca tgatttgggt cgcgcaggct    | 120 |
| ccaggggaagg ggctggagtg ggtctccgat ctttattatt atgotgggtga cacatattac | 180 |
| gcagactccg tgaagggccg attcaccatg tccagagaca tttccaagaa caccgtgtat   | 240 |

cttcaaata acagcctgag agccgaggac acgggtgtct attattgtgc gagatgggcc 300

gatgaccact actattacat tgacgtctgg ggcaggggca ccctgggtcac cgtctcgagt 360

<210> 2

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CAN022D10

<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Asn

20

25

30

Tyr Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ser Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Val Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Trp Ala Asp Asp His Tyr Tyr Tyr Ile Asp Val Trp Gly Arg

100

105

110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CAN022D10

&lt;400&gt; 3

Ser Asn Tyr Met Ile

5

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CAN022D10

&lt;400&gt; 4

Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

5

10

15

Gly

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CAN022D10

<400> 5

Trp Ala Asp Asp His Tyr Tyr Tyr Ile Asp Val

5

10

<210> 6

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CAN022D10

<400> 6

gacatcgtga tgacccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggccagtc gggattagt agctgggtgg cctgggtatca gcagaaacca 120

gggagagccc ctaaggtcct gatctataag gcatctactt tagaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagatcttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgtaggac gttcgggcaa 300

gggaccaagc tggagatcaa acgt

324

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CAN022D10

&lt;400&gt; 7

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro Lys Val Leu Ile

35

40

45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CAN022D10

<400> 8

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

5

10

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CAN022D10

<400> 9

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser

5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CAN022D10

<400> 10

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp Thr

5

<210> 11

<211> 360

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 02

<400> 11

|                                                                       |     |
|-----------------------------------------------------------------------|-----|
| gagggtgcagc tgggtgcagtc aggggggaggc ttgatccagc cggggggggtc cctgagactc | 60  |
| tcctgtgcag cctctgggtt caccatcagc agcaactaca tgacttgggt ccgtcaggct     | 120 |
| ccagggaagg ggctggagtg ggtctccgat ctttattatt atgctgggtga cacatattac    | 180 |
| gcagactccg tgagggggccg attcaccatg tccagagaca tttccaagaa caccgtgtat    | 240 |
| cttcaaatgg acagcctgag agccgaggac acgggtgtct attattgtgc gagatgggccc    | 300 |
| gatggccact actattacat tgacgtctgg ggcggggggca ccctgggcac cgtctcgagt    | 360 |

<210> 12

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 02

<400> 12

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Asn

20

25

30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ser Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Arg Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Val Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Trp Ala Asp Gly His Tyr Tyr Tyr Ile Asp Val Trp Gly Gly

100

105

110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 02

<400> 13

Ser Asn Tyr Met Thr

5

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 02

<400> 14

Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Arg

5

10

15

Gly

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 02

<400> 15

Trp Ala Asp Gly His Tyr Tyr Tyr Ile Asp Val

5

10

<210> 16

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 02

<400> 16

gacatcgtga tgaccacgtc cccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcact 60

atcacttgcc gggccagtca gggattagt agctgggtga cctgggtatca gcagaaacca 120

gggagagccc ctaaggctct gatctataag gcatctactt tagaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcacctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagtg ccccgaggac gttcggccaa 300

gggaccaagc tggagctcaa acgt 324

<210> 17

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Anticorpo 02

&lt;400&gt; 17

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20

25

30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro Lys Val Leu Ile

35

40

45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Pro Trp

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg

100

105

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Anticorpo 02

<400> 18

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Thr

5

10

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 02

<400> 19

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser

5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 02

<400> 20

Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Pro Trp Thr

5

<210> 21

<211> 360

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 03

<400> 21

```

cagggtacagc tgggtgcagtc tggggggaggc ttgatccagc cggggggggtc cctgagactc   60
tctgtgcag cctctgggtt caccatcagc agcaactaca tggtttgggt ccgtcaggct   120
ccggggaagg ggctggagtg ggtctccgat ctttattatt atgctgggtga cacatattac   180
gcagactccg tgaagggccg attcacctg tccagagaca ttccaagaa caccgtgtat   240
cttcaaatga acagcctgag agccgaggac acgggtgtct attattgtgc gagatgggcc   300
gatgaccact actatcacat tgacgtctgg ggcaggggca ccctggtcac cgtctcgagt   360

```

<210> 22

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 03

<400> 22

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Asn

20

25

30

Tyr Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ser Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Val Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Trp Ala Asp Asp His Tyr Tyr His Ile Asp Val Trp Gly Arg

100

105

110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Anticorpo 03

&lt;400&gt; 23

Ser Asn Tyr Met Val

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 03

<400> 24

Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

5

10

15

Gly

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 03

<400> 25

Trp Ala Asp Asp His Tyr Tyr His Ile Asp Val

5

10

<210> 26

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 03

<400> 26

```

gacatcgtga tgacccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgcc gggccagtca ggggtattagt agctggttgg cctggatatca gcagaaacca    120
gggagagccc ctaaggcctt gatctataag gcatctactt tagaaagtgg ggtcccatca    180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct    240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgtaggac gttcggccaa    300

gggaccaagc tggagatcaa acgt                                           324

```

<210> 27

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 03

<400> 27

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro Lys Ala Leu Ile

35

40

45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Anticorpo 03

&lt;400&gt; 28

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

5

10

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 03

<400> 29

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser

5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 03

<400> 30

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp Thr

5

<210> 31

<211> 360

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 04

<400> 31

gaggtgcagc tgggtgcagtc aggggggaggc ttgatccagc cggggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctgggtt caccgtcagc agcaactaca tgacttgggt ccgacaggct 120

ccaggggaagg ggctggagtg ggtctccgat ctttattatt atgctggcga cacgtattac 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatg tccagagaca tttccaagaa caccgtgtac 240

cttcaaatac acagcctaag agccgaggac acgggtgtct attattgtgc gagatggggc 300

gatggccact actattacgc tgacgtctgg ggcaggggca ccctgggtctc cgtctcgagt 360

<210> 32

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 04

<400> 32

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn

20

25

30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ser Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Val Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Trp Ala Asp Gly His Tyr Tyr Tyr Ala Asp Val Trp Gly Arg

100

105

110

Gly Thr Leu Val Ser Val Ser Ser

115

120

<210> 33

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 04

<400> 33

Ser Asn Tyr Met Thr

5

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 04

<400> 34

Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

5

10

15

Gly

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 04

<400> 35

Trp Ala Asp Gly His Tyr Tyr Tyr Ala Asp Val

5

10

<210> 36

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 04

<400> 36

gacatcgtga tgacccagtc tccctccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggccagtca gggaattagt agctgggttg cctggatatca gcagaaacca 120

gggagagccc ctaaggtctt gatctataag gcatctacgt tagaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagatttcg catcttacta ctgtcaacag agttacagtg ccccgaggac gttcggccaa 300

gggaccaagc tggagctcaa acgt 324

<210> 37

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 04

<400> 37

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro Lys Val Leu Ile

35

40

45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Pro Trp

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg

100

105

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Anticorpo 04

&lt;400&gt; 38

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

5

10

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Anticorpo 04

&lt;400&gt; 39

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser

5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 04

<400> 40

Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Pro Trp Thr

5

<210> 41

<211> 360

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 05

<400> 41

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggggggaggc ttgatccagc cggggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcgg cctctggggt caccatcagc agcaactaca tgatttgggt ccgtcaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctccgat ctttattatt atgctggcga cacgtattac 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatg tccagagaca tttccaagaa caccgtgtac 240

cttcaaata acagcctgag agccgaggac acgggtgtct attattgtgc gagatgggcc 300

gatggccact actattacgc tgacgtctgg ggcaggggca ccctggtctc cgtctcgagt 360

<210> 42

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 05

<400> 42

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Asn

20

25

30

Tyr Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ser Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Val Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Trp Ala Asp Gly His Tyr Tyr Tyr Ala Asp Val Trp Gly Arg

100

105

110

Gly Thr Leu Val Ser Val Ser Ser  
 115 120

<210> 43

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 05

<400> 43

Ser Asn Tyr Met Ile  
 5

<210> 44

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 05

<400> 44

Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 5 10 15

Gly

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 05

<400> 45

Trp Ala Asp Gly His Tyr Tyr Tyr Ala Asp Val

5

10

<210> 46

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 05

<400> 46

gacatcgtga tgaccagtc tccccccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggccagtc ggggaattagt agctgggttg cctgggtatca gcagaaacca 120

gggagagccc ctaaggtctt gatctataag gcatctacat tagaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagatttcg catcttacta ctgtcaacag agttacagtg ccccgaggac gtttggccaa 300

gggaccaagc tggagatcaa acgt

324

<210> 47

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 05

<400> 47

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Pro Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro Lys Val Leu Ile

35

40

45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Pro Trp

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

<210> 48

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 05

<400> 48

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

5

10

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 05

<400> 49

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser

5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 05

<400> 50

Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Pro Trp Thr

5

<210> 51

<211> 360

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 07

<400> 51

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtccagc cggggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggggtt caccatcagc agcaactaca tgatttgggt ccgtcaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctccgat ctttattatt atgctgggtga cacatattac 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatg tccagagaca ttccaagaa caccgtgtat 240

cttcaaata acagcctgag agccgaggac acggctgtct attattgtgc gagatggggc 300

gatgaccacc cggcctgggt ggacctctgg ggcaggggca ccctgggtcac cgtctcctca 360

<210> 52

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Anticorpo 07

&lt;400&gt; 52

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Asn

20

25

30

Tyr Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ser Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Val Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Trp Ala Asp Asp His Pro Ala Trp Val Asp Leu Trp Gly Arg

100

105

110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 07

<400> 53

Ser Asn Tyr Met Ile

5

<210> 54

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 07

<400> 54

Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

5

10

15

Gly

<210> 55

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 07

&lt;400&gt; 55

Trp Ala Asp Asp His Pro Ala Trp Val Asp Leu

5

10

&lt;210&gt; 56

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Anticorpo 07

&lt;400&gt; 56

gacatccaga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggccagtc gggattagt agctgggtgg cctggatatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaaggtctt gatctataag gcactactt tagaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccacagcag tctgcaacct 240

gatgatattg caacttacta ctgtcaacag agttggctcg gcgggtcggt cgccaaggg 300

accaagctgg agatcaaacg t 321

&lt;210&gt; 57

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

<223> Anticorpo 07

<400> 57

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile

35

40

45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Trp Leu Gly Gly Ser

85

90

95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

<210> 58

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 07

<400> 58

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

5

10

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 07

<400> 59

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser

5

<210> 60

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 07

<400> 60

Gln Gln Ser Trp Leu Gly Gly Ser

5

<210> 61

<211> 360

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 08

<400> 61

```

gaagtgcagc tgggtgcagtc tgggggaggc ttgatccagc cggggggggtc cctgagactc   60
tctgtgcag cctctgggtt caccatcagc agcaactaca tgatttgggt ccgtcaggct   120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctccgat ctttattatt atgctgggtga cacatattac   180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatg tccagagaca tttccaagaa cacctgttat   240
cttcaaata gaagcctgag agccgaggac acgggtgtct attattgtgc gagatgggcc   300
gatgaccacc cccggtacat cgaccactgg ggcaggggca ccctggtcac cgtctcgagt   360

```

<210> 62

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 08

<400> 62

```

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
          5              10              15

```

```

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Asn

```

20

25

30

Tyr Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ser Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Val Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Trp Ala Asp Asp His Pro Arg Tyr Ile Asp His Trp Gly Arg

100

105

110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

&lt;210&gt; 63

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Anticorpo 08

&lt;400&gt; 63

Ser Asn Tyr Met Ile

5

<210> 64

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 08

<400> 64

Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

5

10

15

Gly

<210> 65

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 08

<400> 65

Trp Ala Asp Asp His Pro Arg Tyr Ile Asp His

5

10

<210> 66

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 08

<400> 66

```

gacatcgtga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggccagtc gggattagt agctgggtgg cctgggtatca gcagaaacca 120
gggagagccc ctaaggtctt gatctataag gcatctactt tagaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttggctcg gcgggtcggt cggccaaggg 300
accaagctgg agatcaaacg t 321

```

<210> 67

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 08

<400> 67

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
      5              10              15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
      20              25              30

```

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro Lys Val Leu Ile

35

40

45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Trp Leu Gly Gly Ser

85

90

95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

<210> 68

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 08

<400> 68

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

5

10

<210> 69

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 08

<400> 69

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser

5

<210> 70

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 08

<400> 70

Gln Gln Ser Trp Leu Gly Gly Ser

5

<210> 71

<211> 360

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 10

<400> 71

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttggtccagc cggggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctgggtt caccatcagc agcaactaca tgatttgggt ccgtcaggct 120  
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctccgat ctttattatt atgctgggtga cacatattac 180  
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatg tccagagaca tttccaagaa caccgtgtat 240  
 cttcaaatac acagcctgag agccgaggac acggctgtct attattgtgc gagatgggag 300  
 gaggagggga gggggtacat tgacgtctgg ggcaggggca ccctggtcac cgtctcctca 360

<210> 72

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 10

<400> 72

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Asn  
 20 25 30

Tyr Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Val Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Trp Glu Glu Glu Gly Arg Gly Tyr Ile Asp Val Trp Gly Arg  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 73

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 10

<400> 73

Ser Asn Tyr Met Ile

5

<210> 74

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 10

<400> 74

Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

5

10

15

Gly

<210> 75

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 10

<400> 75

Trp Glu Glu Glu Gly Arg Gly Tyr Ile Asp Val

5

10

<210> 76

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 10

<400> 76

gacatccaga tgaccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggccagtc gggattagt agctgggttg cctgggtatca gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaaggctct gatctataag gcctctactt tagaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccctcagcag tctgcaacct 240  
 gatgattttg caacttacta ctgtcaacag agttggctcg gcgggtcgtt cggccaaggg 300  
 accaagctgg agatcaaacg t 321

<210> 77

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 10

<400> 77

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile

35

40

45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Trp Leu Gly Gly Ser  
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 78

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 10

<400> 78

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala  
5 10

<210> 79

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 10

<400> 79

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser

5

<210> 80

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 10

<400> 80

Gln Gln Ser Trp Leu Gly Gly Ser

5

<210> 81

<211> 363

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 14

<400> 81

gaagtgcagc tgggtgcagtc tggggggaggc ttgatccagc cggggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggggt caccatcagc agcaactaca tgatttgggt ccgtcaggct 120

ccagggaagg ggcctggagt ggtctccgat ctttattatt atgctgggtga cacatattac 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatg tccagagaca tttccaagaa caccgtgtat 240

cttcaaata acagcctgag agccgaggac acgggtgtct attattgtgc gagatgggcc 300

gatgaccaca actaccccca cattgacgtc tggggcaggg gcaccctggt caccgtctcg 360

agt 363

<210> 82

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 14

<400> 82

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Asn

20

25

30

Tyr Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ser Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Val Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Trp Ala Asp Asp His Asn Tyr Pro His Ile Asp Val Trp Gly

100

105

110

Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

&lt;210&gt; 83

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Anticorpo 14

&lt;400&gt; 83

Ser Asn Tyr Met Ile

5

&lt;210&gt; 84

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Anticorpo 14

&lt;400&gt; 84

Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

5

10

15

Gly

<210> 85

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 14

<400> 85

Trp Ala Asp Asp His Asn Tyr Pro His Ile Asp Val

5

10

<210> 86

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 14

<400> 86

gacatcgtga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggccagtca gggattagt agctggttgg cctggatatca gcagaaacca 120

gggagagccc ctaaggtctt gatctataag gcatctactt tagaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtgccgcc cactacgccg ccccgaggac gttcggccaa 300

gggaccaagc tggagatcaa acgt 324

<210> 87

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 14

<400> 87

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro Lys Val Leu Ile

35

40

45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Ala His Tyr Ala Ala Pro Trp

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

<210> 88

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 14

<400> 88

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

5

10

<210> 89

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 14

<400> 89

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser

5

<210> 90

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 14

<400> 90

Ala Ala His Tyr Ala Ala Pro Trp Thr

5

<210> 91

<211> 360

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 16

<400> 91

|                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------|-----|
| gaagtgcagc tgggtgcagtc tgggggaggc ttgatccagc cggggggggtc cctgagactc | 60  |
| tcctgtgcag cctctgggtt caccatcagc agcaactaca tgatttgggt ccgtcaggct   | 120 |
| ccagggaagg ggctggagtg ggtctccgat ctttattatt atgctggtga cacatattac   | 180 |
| gcagactctg tgaagggccg attcaccatg tccagagaca tttccaagaa caccgtgtat   | 240 |
| cttcaaatga acagcctgag agccgaggac acgggtgtct attattgtgc gagatgggcc   | 300 |
| gatgaccacc cccctacat cgacctgtgg ggcaggggca ccctggtcac cgtctcgagt    | 360 |

<210> 92

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 16

<400> 92

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Asn

20

25

30

Tyr Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ser Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Val Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Trp Ala Asp Asp His Pro Pro Tyr Ile Asp Leu Trp Gly Arg

100

105

110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 93

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 16

<400> 93

Ser Asn Tyr Met Ile

5

<210> 94

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 16

<400> 94

Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

5

10

15

Gly

<210> 95

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 16

<400> 95

Trp Ala Asp Asp His Pro Pro Tyr Ile Asp Leu

5

10

<210> 96

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 16

<400> 96

gacatcgtga tgacccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggccagtca gggattagat agctgggttg cctgggtatca gcagaaacca 120

gggagagccc ctaaggctct gatctataag gcatctactt tagaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggtac tgggacagat ttactctca ccatcagcag totgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttgggtcg gcgggtcgtt cggccaaggg 300

accaagctgg agatcaaacg t 321

<210> 97

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 16

<400> 97

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro Lys Val Leu Ile

35

40

45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Trp Leu Gly Gly Ser

85

90

95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

<210> 98

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 16

<400> 98

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

5

10

<210> 99

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 16

<400> 99

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser

5

<210> 100

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 16

<400> 100

Gln Gln Ser Trp Leu Gly Gly Ser

5

<210> 101

<211> 360

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 17

<400> 101

|                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------|-----|
| gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc cggggggggtc cctgagactc | 60  |
| tcctgtgcag cctctggggt caccatcagc agcaactaca tgatttgggt ccgtcaggct   | 120 |
| ccaggggaagg ggcctggagtg ggtctccgat ctttattatt atgctggtga cacatattac | 180 |
| gcagactccg tgaagggccg attcaccatg tccagagaca tttccaagaa caccgtgtat   | 240 |
| cttcaaatac acagcctgag agccgaggac acggctgtct attattgtgc gagatgggcc   | 300 |
| gatgaccacc cccctacat cgacatgtgg ggcaggggca ccctggtcac cgtctcctca    | 360 |

<210> 102

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 17

<400> 102

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Asn

20

25

30

Tyr Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ser Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Val Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Trp Ala Asp Asp His Pro Pro Tyr Ile Asp Met Trp Gly Arg

100

105

110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

&lt;210&gt; 103

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Anticorpo 17

&lt;400&gt; 103

Ser Asn Tyr Met Ile

5

<210> 104

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 17

<400> 104

Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

5

10

15

Gly

<210> 105

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 17

<400> 105

Trp Ala Asp Asp His Pro Pro Tyr Ile Asp Met

5

10

<210> 106

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 17

<400> 106

```

gacatccaga tgacccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60

atcacttgcc gggccagtca gggattagt agctgggtgg cctgggtatca gcagaaacca      120

gggaaagccc ctaaggtctt gatctataag gcatctactt tagaaagtgg ggtcccatca      180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct      240

gatgatcttg caacttacta ctgtcaacag agttggctcg gcgggtcgtt cggccaaggg      300

accaagctgg agatcaaacg t                                              321

```

<210> 107

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 17

<400> 107

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile

35

40

45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Trp Leu Gly Gly Ser

85

90

95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

&lt;210&gt; 108

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Anticorpo 17

&lt;400&gt; 108

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

5

10

&lt;210&gt; 109

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 17

<400> 109

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser

5

<210> 110

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 17

<400> 110

Gln Gln Ser Trp Leu Gly Gly Ser

5

<210> 111

<211> 360

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 18

&lt;400&gt; 111

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc cggggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggggt caccatcagc agcaactaca tgatttgggt ccgtcaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctccgat ctttattatt atgctgggtga cacatattac 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatg tccagagaca tttccaagaa caccgtgtat 240

cttcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtct attattgtgc gagatgggccc 300

gatgaccacc cccctgggat cgacctctgg ggcagggggca ccttggtcac cgtctcctca 360

&lt;210&gt; 112

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Anticorpo 18

&lt;400&gt; 112

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Asn

20 25 30

Tyr Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Val Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Trp Ala Asp Asp His Pro Pro Trp Ile Asp Leu Trp Gly Arg

100

105

110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

&lt;210&gt; 113

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Anticorpo 18

&lt;400&gt; 113

Ser Asn Tyr Met Ile

5

&lt;210&gt; 114

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 18

<400> 114

Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

5

10

15

Gly

<210> 115

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 18

<400> 115

Trp Ala Asp Asp His Pro Pro Trp Ile Asp Leu

5

10

<210> 116

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 18

<400> 116

gacatccaga tgacccagtc tccttcacac ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggccagtca ggggtattagt agctgggttg cctgggtatca gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaaggtctt gatctataag gcatctactt tagaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gatgattttg caacttacta ctgtcaacag agttgggtcg gcggtcggtt cggccaaggg 300  
 accaagctgg agatcaaacg t 321

<210> 117

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 18

<400> 117

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile

35

40

45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Trp Leu Gly Gly Ser  
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 118

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 18

<400> 118

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala  
 5 10

<210> 119

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 18

<400> 119

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser

5

<210> 120

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 18

<400> 120

Gln Gln Ser Trp Leu Gly Gly Ser

5

<210> 121

<211> 360

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 19

<400> 121

gaagtgcagc tggatgcagtc tgggggagggc ttgatccagc cggggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggggt caccatcagc agcaactaca tgatttgggt ccgtcaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctccgat ctttattatt atgctgggtga cacatattac 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatg tccagagaca tttccaagaa caccgtgtat 240

cttcaaataga acagcctgag agccgaggac acgggtgtct attattgtgc gagatgggcc 300

gatgaccacc cctccacact cgacatctgg ggcaggggca ccttggtcac cgtctcgagt 360

<210> 122

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 19

<400> 122

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Asn

20

25

30

Tyr Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ser Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Val Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Trp Ala Asp Asp His Pro Ser His Leu Asp Ile Trp Gly Arg

100

105

110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 123

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 19

<400> 123

Ser Asn Tyr Met Ile

5

<210> 124

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 19

<400> 124

Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

5

10

15

Gly

<210> 125

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 19

<400> 125

Trp Ala Asp Asp His Pro Ser His Leu Asp Ile

5

10

<210> 126

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 19

<400> 126

gacatcgtga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggccagtca gggattagt agctgggtgg cctggatatca gcagaaacca 120

gggagagccc ctaaggcttt gatctataag gcactactt tagaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttggctcg gcgggtcgtt cggccaaggg 300

accaagctgg agatcaaacg t

321

<210> 127

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 19

<400> 127

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro Lys Val Leu Ile

35

40

45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Trp Leu Gly Gly Ser

85

90

95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

<210> 128

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 19

<400> 128

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

5

10

<210> 129

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 19

<400> 129

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser

5

<210> 130

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 19

<400> 130

Gln Gln Ser Trp Leu Gly Gly Ser

5

<210> 131

<211> 360

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 21

<400> 131

gaagtgcagc tggatgcagtc tgggggaggc ttgatccagc cggggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctgggtt caccatcagc agcaactaca tgatttgggt ccgtcaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctccgat ctttattatt atgctggtga cacatattac 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatg tccagagaca ttccaagaa caccgtgtat 240

cttcaaata acagcctgag agccgaggac acgggtgtct attattgtgc gagatgggcc 300

gatgaccacc cctcccacat tgacgtctgg ggcaggggca ccctggtcac cgtctcgagt 360

<210> 132

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 21

<400> 132

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Asn

20

25

30

Tyr Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ser Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Val Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Trp Ala Asp Asp His Pro Ser His Ile Asp Val Trp Gly Arg

100

105

110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 133

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 21

<400> 133

Ser Asn Tyr Met Ile

5

<210> 134

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 21

<400> 134

Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

5

10

15

Gly

<210> 135

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 21

<400> 135

Trp Ala Asp Asp His Pro Ser His Ile Asp Val

5

10

<210> 136

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 21

<400> 136

gacatogtga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggccagtc gggattagt agctgggtgg cctgggtatca gcagaaacca 120

gggagagccc ctaaggtctt gatctataag gcatctactt tagaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttggctcg gcgggtcgtt cggccaaggg 300

accaagctgg agatcaaacg t 321

<210> 137

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Anticorpo 21

&lt;400&gt; 137

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro Lys Val Leu Ile

35

40

45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Trp Leu Gly Gly Ser

85

90

95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

&lt;210&gt; 138

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

<223> Anticorpo 21

<400> 138

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

5

10

<210> 139

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 21

<400> 139

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser

5

<210> 140

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 21

<400> 140

Gln Gln Ser Trp Leu Gly Gly Ser

5

<210> 141

<211> 363

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 22

<400> 141

gaagtgcagc tgggtgcagtc tgggggaggc ttgatccagc cggggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctgggtt caccatcagc agcaactaca tgatttgggt ccgtcaggct 120

ccaggggaagg ggctggagtg ggtctccgat ctttattatt atgctgggtga cacatattac 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatg tccagagaca ttccaagaa caccgtgtat 240

cttcaaatga acagcctgag agccgaggac acgggtgtct attattgtgc gagatgggcc 300

gatgaccaca acaacaccta cattgacgtc tggggcaggg gcaccctggt caccgtctcg 360

agt

363

<210> 142

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 22

<400> 142

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Asn

20

25

30

Tyr Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ser Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Val Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Trp Ala Asp Asp His Asn Asn Thr Tyr Ile Asp Val Trp Gly

100

105

110

Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 143

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 22

<400> 143

Ser Asn Tyr Met Ile

5

<210> 144

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 22

<400> 144

Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

5

10

15

Gly

<210> 145

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 22

<400> 145

Trp Ala Asp Asp His Asn Asn Thr Tyr Ile Asp Val

5

10

<210> 146

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 22

<400> 146

```

gacatcgtga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgcc gggccagtc gggattagt agctggttgg cctggatatca gcagaaacca      120
gggagagccc ctaaggtctt gatctataag gcactactt tagaaagtgg ggtcccatca      180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccacagcag tctgcaacct      240
gaagattttg caacttacta ctgtgccgcc cactacgccg ccccgaggac gttcggccaa      300
gggaccaagc tggagatcaa acgt                                           324

```

<210> 147

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 22

<400> 147

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro Lys Val Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Ala His Tyr Ala Ala Pro Trp  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 148

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 22

<400> 148

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala  
 5 10

<210> 149

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 22

<400> 149

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser

5

<210> 150

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 22

<400> 150

Ala Ala His Tyr Ala Ala Pro Trp Thr

5

<210> 151

<211> 360

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 23

&lt;400&gt; 151

gaagtgcagc tgggtgcagtc tggggggaggc ttgatccagc cggggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggggtt caccatcagc agcaactaca tgatttgggt ccgtcaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctccgat ctttattatt atgctggtga cacatattac 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatg tccagagaca tttccaagaa caccgtgtat 240

cttcaaatac acagcctgag agccgaggac acgggtgtct attattgtgc gagatggggc 300

gatgaccacg cccoctgggt cgacctctgg ggcaggggca ccctggtcac cgtctcgagt 360

&lt;210&gt; 152

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Anticorpo 23

&lt;400&gt; 152

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Asn

20

25

30

Tyr Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ser Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Val Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Trp Ala Asp Asp His Ala Pro Trp Val Asp Leu Trp Gly Arg

100

105

110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 153

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 23

<400> 153

Ser Asn Tyr Met Ile

5

<210> 154

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 23

<400> 154

Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

5

10

15

Gly

<210> 155

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 23

<400> 155

Trp Ala Asp Asp His Ala Pro Trp Val Asp Leu

5

10

<210> 156

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 23

&lt;400&gt; 156

gacatcgtga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggccagtca gggattagt agctggttgg cctggatatca gcagaaacca 120

gggagagccc ctaaggtctt gatctataag gcatctactt tagaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttggctcg gcgggtcgtt cggccaaggg 300

accaagctgg agatcaaacg t 321

&lt;210&gt; 157

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Anticorpo 23

&lt;400&gt; 157

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro Lys Val Leu Ile

35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Trp Leu Gly Gly Ser  
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 158

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 23

<400> 158

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala  
5 10

<210> 159

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 23

<400> 159

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser

5

<210> 160

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticorpo 23

<400> 160

Gln Gln Ser Trp Leu Gly Gly Ser

5

<210> 161

<211> 212

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Full length IL-6

<400> 161

Met Asn Ser Phe Ser Thr Ser Ala Phe Gly Pro Val Ala Phe Ser Leu

1

5

10

15

Gly Leu Leu Leu Val Leu Pro Ala Ala Phe Pro Ala Pro Val Pro Pro

20

25

30

Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln Pro Leu Thr

35

40

45

Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile

50

55

60

Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser

65

70

75

80

Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala

85

90

95

Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu

100

105

110

Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr

115

120

125

Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln

130

135

140

Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn

145

150

155

160

Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu

165

170

175

Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His

180

185

190

Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala

195

200

205

Leu Arg Gln Met

210

&lt;210&gt; 162

&lt;211&gt; 203

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; HIS FLAG alvejado IL-6

&lt;400&gt; 162

Met Gly Ser Ser His His His His His His Asp Tyr Lys Asp Asp Asp

1

5

10

15

Asp Lys His Met Val Pro Pro Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala

20

25

30

Pro His Arg Gln Pro Leu Thr Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile

35

40

45

Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn

50

55

60

Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn

65

70

75

80

Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly

85

90

95

Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu

100

105

110

Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu

115

120

125

Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe

130

135

140

Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro

145

150

155

160

Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp

165

170

175

Leu Gln Asp Met Thr Thr His Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe  
 180 185 190

Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala Leu Arg Gln Met  
 195 200

<210> 163

<211> 358

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> IL-6Ra soluble

<400> 163

Met Leu Ala Val Gly Cys Ala Leu Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ala Pro  
 1 5 10 15

Gly Ala Ala Leu Ala Pro Arg Arg Cys Pro Ala Gln Glu Val Ala Arg  
 20 25 30

Gly Val Leu Thr Ser Leu Pro Gly Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Pro  
 35 40 45

Gly Val Glu Pro Glu Asp Asn Ala Thr Val His Trp Val Leu Arg Lys  
 50 55 60

Pro Ala Ala Gly Ser His Pro Ser Arg Trp Ala Gly Met Gly Arg Arg  
 65 70 75 80

Leu Leu Leu Arg Ser Val Gln Leu His Asp Ser Gly Asn Tyr Ser Cys  
 85 90 95

Tyr Arg Ala Gly Arg Pro Ala Gly Thr Val His Leu Leu Val Asp Val  
 100 105 110

Pro Pro Glu Glu Pro Gln Leu Ser Cys Phe Arg Lys Ser Pro Leu Ser  
 115 120 125

Asn Val Val Cys Glu Trp Gly Pro Arg Ser Thr Pro Ser Leu Thr Thr  
 130 135 140

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

Phe Gln Glu Pro Cys Gln Tyr Ser Gln Glu Ser Gln Lys Phe Ser Cys  
 165 170 175

Gln Leu Ala Val Pro Glu Gly Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Val Ser Met  
 180 185 190

Cys Val Ala Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Ser Lys Thr Gln Thr Phe  
 195 200 205

Gln Gly Cys Gly Ile Leu Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn Ile Thr Val  
 210 215 220

Thr Ala Val Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser Val Thr Trp Gln Asp  
 225 230 235 240

Pro His Ser Trp Asn Ser Ser Phe Tyr Arg Leu Arg Phe Glu Leu Arg  
 245 250 255

Tyr Arg Ala Glu Arg Ser Lys Thr Phe Thr Thr Trp Met Val Lys Asp  
 260 265 270

Leu Gln His His Cys Val Ile His Asp Ala Trp Ser Gly Leu Arg His  
 275 280 285

Val Val Gln Leu Arg Ala Gln Glu Glu Phe Gly Gln Gly Glu Trp Ser  
 290 295 300

Glu Trp Ser Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu Ser Arg Ser  
 305 310 315 320

Pro Pro Ala Glu Asn Glu Val Ser Thr Pro Met Gln Ala Leu Thr Thr  
325 330 335

Asn Lys Asp Asp Asp Asn Ile Leu Phe Arg Asp Ser Ala Asn Ala Thr  
340 345 350

Ser Leu Pro Val Gln Asp  
355

<210> 164

<211> 468

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> IL-6Ra transmembrana

<400> 164

Met Leu Ala Val Gly Cys Ala Leu Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ala Pro  
1 5 10 15

Gly Ala Ala Leu Ala Pro Arg Arg Cys Pro Ala Gln Glu Val Ala Arg  
20 25 30

Gly Val Leu Thr Ser Leu Pro Gly Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Pro  
35 40 45

Gly Val Glu Pro Glu Asp Asn Ala Thr Val His Trp Val Leu Arg Lys

50

55

60

Pro Ala Ala Gly Ser His Pro Ser Arg Trp Ala Gly Met Gly Arg Arg

65

70

75

80

Leu Leu Leu Arg Ser Val Gln Leu His Asp Ser Gly Asn Tyr Ser Cys

85

90

95

Tyr Arg Ala Gly Arg Pro Ala Gly Thr Val His Leu Leu Val Asp Val

100

105

110

Pro Pro Glu Glu Pro Gln Leu Ser Cys Phe Arg Lys Ser Pro Leu Ser

115

120

125

Asn Val Val Cys Glu Trp Gly Pro Arg Ser Thr Pro Ser Leu Thr Thr

130

135

140

Lys Ala Val Leu Leu Val Arg Lys Phe Gln Asn Ser Pro Ala Glu Asp

145

150

155

160

Phe Gln Glu Pro Cys Gln Tyr Ser Gln Glu Ser Gln Lys Phe Ser Cys

165

170

175

Gln Leu Ala Val Pro Glu Gly Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Val Ser Met

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Cys Val Ala Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Ser Lys Thr Gln Thr Phe |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Gln Gly Cys Gly Ile Leu Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn Ile Thr Val |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Thr Ala Val Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser Val Thr Trp Gln Asp |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| 240                                                             |     |     |
| Pro His Ser Trp Asn Ser Ser Phe Tyr Arg Leu Arg Phe Glu Leu Arg |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Tyr Arg Ala Glu Arg Ser Lys Thr Phe Thr Thr Trp Met Val Lys Asp |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Leu Gln His His Cys Val Ile His Asp Ala Trp Ser Gly Leu Arg His |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Val Val Gln Leu Arg Ala Gln Glu Glu Phe Gly Gln Gly Glu Trp Ser |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Glu Trp Ser Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu Ser Arg Ser |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| 320                                                             |     |     |

Pro Pro Ala Glu Asn Glu Val Ser Thr Pro Met Gln Ala Leu Thr Thr  
325 330 335

Asn Lys Asp Asp Asp Asn Ile Leu Phe Arg Asp Ser Ala Asn Ala Thr  
340 345 350

Ser Leu Pro Val Gln Asp Ser Ser Ser Val Pro Leu Pro Thr Phe Leu  
355 360 365

Val Ala Gly Gly Ser Leu Ala Phe Gly Thr Leu Leu Cys Ile Ala Ile  
370 375 380

Val Leu Arg Phe Lys Lys Thr Trp Lys Leu Arg Ala Leu Lys Glu Gly  
385 390 395 400

Lys Thr Ser Met His Pro Pro Tyr Ser Leu Gly Gln Leu Val Pro Glu  
405 410 415

Arg Pro Arg Pro Thr Pro Val Leu Val Pro Leu Ile Ser Pro Pro Val  
420 425 430

Ser Pro Ser Ser Leu Gly Ser Asp Asn Thr Ser Ser His Asn Arg Pro  
435 440 445

Asp Ala Arg Asp Pro Arg Ser Pro Tyr Asp Ile Ser Asn Thr Asp Tyr  
 450 455 460

Phe Phe Pro Arg  
 465

<210> 165

<211> 183

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> IL-6 madura

<400> 165

Val Pro Pro Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln  
 1 5 10 15

Pro Leu Thr Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu  
 20 25 30

Asp Gly Ile Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met  
 35 40 45

Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro  
 50 55 60

Lys Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu  
65 70 75 80

Thr Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr  
85 90 95

Leu Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg  
100 105 110

Ala Val Gln Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys  
115 120 125

Ala Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala  
130 135 140

Ser Leu Leu Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met  
145 150 155 160

Thr Thr His Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser  
165 170 175

Leu Arg Ala Leu Arg Gln Met  
180

<210> 166

<211> 918

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Humano gp130

<400> 166

Met Leu Thr Leu Gln Thr Trp Leu Val Gln Ala Leu Phe Ile Phe Leu

1 5 10 15

Thr Thr Glu Ser Thr Gly Glu Leu Leu Asp Pro Cys Gly Tyr Ile Ser

20 25 30

Pro Glu Ser Pro Val Val Gln Leu His Ser Asn Phe Thr Ala Val Cys

35 40 45

Val Leu Lys Glu Lys Cys Met Asp Tyr Phe His Val Asn Ala Asn Tyr

50 55 60

Ile Val Trp Lys Thr Asn His Phe Thr Ile Pro Lys Glu Gln Tyr Thr

65 70 75 80

Ile Ile Asn Arg Thr Ala Ser Ser Val Thr Phe Thr Asp Ile Ala Ser

85 90 95

Leu Asn Ile Gln Leu Thr Cys Asn Ile Leu Thr Phe Gly Gln Leu Glu

100

105

110

Gln Asn Val Tyr Gly Ile Thr Ile Ile Ser Gly Leu Pro Pro Glu Lys

115

120

125

Pro Lys Asn Leu Ser Cys Ile Val Asn Glu Gly Lys Lys Met Arg Cys

130

135

140

Glu Trp Asp Gly Gly Arg Glu Thr His Leu Glu Thr Asn Phe Thr Leu

145

150

155

160

Lys Ser Glu Trp Ala Thr His Lys Phe Ala Asp Cys Lys Ala Lys Arg

165

170

175

Asp Thr Pro Thr Ser Cys Thr Val Asp Tyr Ser Thr Val Tyr Phe Val

180

185

190

Asn Ile Glu Val Trp Val Glu Ala Glu Asn Ala Leu Gly Lys Val Thr

195

200

205

Ser Asp His Ile Asn Phe Asp Pro Val Tyr Lys Val Lys Pro Asn Pro

210

215

220

Pro His Asn Leu Ser Val Ile Asn Ser Glu Glu Leu Ser Ser Ile Leu

•



355                      360                      365

Thr Leu Thr Arg Trp Lys Ser His Leu Gln Asn Tyr Thr Val Asn Ala  
370 375 380

Thr Lys Leu Thr Val Asn Leu Thr Asn Asp Arg Tyr Leu Ala Thr Leu  
385 390 395 400

Thr Val Arg Asn Leu Val Gly Lys Ser Asp Ala Ala Val Leu Thr Ile  
405 410 415

Pro Ala Cys Asp Phe Gln Ala Thr His Pro Val Met Asp Leu Lys Ala  
420 425 430

Phe Pro Lys Asp Asn Met Leu Trp Val Glu Trp Thr Thr Pro Arg Glu  
435 440 445

Ser Val Lys Lys Tyr Ile Leu Glu Trp Cys Val Leu Ser Asp Lys Ala  
450 455 460

Pro Cys Ile Thr Asp Trp Gln Gln Glu Asp Gly Thr Val His Arg Thr  
465 470 475 480

Tyr Leu Arg Gly Asn Leu Ala Glu Ser Lys Cys Tyr Leu Ile Thr Val  
485 490 495

Thr Pro Val Tyr Ala Asp Gly Pro Gly Ser Pro Glu Ser Ile Lys Ala  
500 505 510

Tyr Leu Lys Gln Ala Pro Pro Ser Lys Gly Pro Thr Val Arg Thr Lys  
515 520 525

Lys Val Gly Lys Asn Glu Ala Val Leu Glu Trp Asp Gln Leu Pro Val  
530 535 540

Asp Val Gln Asn Gly Phe Ile Arg Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Arg Thr  
545 550 555 560

Ile Ile Gly Asn Glu Thr Ala Val Asn Val Asp Ser Ser His Thr Glu  
565 570 575

Tyr Thr Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Thr Leu Tyr Met Val Arg Met  
580 585 590

Ala Ala Tyr Thr Asp Glu Gly Gly Lys Asp Gly Pro Glu Phe Thr Phe  
595 600 605

Thr Thr Pro Lys Phe Ala Gln Gly Glu Ile Glu Ala Ile Val Val Pro  
610 615 620



Val Cys Leu Ala Phe Leu Leu Thr Thr Leu Leu Gly Val Leu Phe Cys  
625 630 635 640

Phe Asn Lys Arg Asp Leu Ile Lys Lys His Ile Trp Pro Asn Val Pro  
645 650 655

Asp Pro Ser Lys Ser His Ile Ala Gln Trp Ser Pro His Thr Pro Pro  
660 665 670

Arg His Asn Phe Asn Ser Lys Asp Gln Met Tyr Ser Asp Gly Asn Phe  
675 680 685

Thr Asp Val Ser Val Val Glu Ile Glu Ala Asn Asp Lys Lys Pro Phe  
690 695 700

Pro Glu Asp Leu Lys Ser Leu Asp Leu Phe Lys Lys Glu Lys Ile Asn  
705 710 715 720

Thr Glu Gly His Ser Ser Gly Ile Gly Gly Ser Ser Cys Met Ser Ser  
725 730 735

Ser Arg Pro Ser Ile Ser Ser Ser Asp Glu Asn Glu Ser Ser Gln Asn  
740 745 750

Thr Ser Ser Thr Val Gln Tyr Ser Thr Val Val His Ser Gly Tyr Arg

755

760

765

His Gln Val Pro Ser Val Gln Val Phe Ser Arg Ser Glu Ser Thr Gln

770

775

780

Pro Leu Leu Asp Ser Glu Glu Arg Pro Glu Asp Leu Gln Leu Val Asp

785

790

795

800

His Val Asp Gly Gly Asp Gly Ile Leu Pro Arg Gln Gln Tyr Phe Lys

805

810

815

Gln Asn Cys Ser Gln His Glu Ser Ser Pro Asp Ile Ser His Phe Glu

820

825

830

Arg Ser Lys Gln Val Ser Ser Val Asn Glu Glu Asp Phe Val Arg Leu

835

840

845

Lys Gln Gln Ile Ser Asp His Ile Ser Gln Ser Cys Gly Ser Gly Gln

850

855

860

Met Lys Met Phe Gln Glu Val Ser Ala Ala Asp Ala Phe Gly Pro Gly

865

870

875

880

Thr Glu Gly Gln Val Glu Arg Phe Glu Thr Val Gly Met Glu Ala Ala

885

890

895

Thr Asp Glu Gly Met Pro Lys Ser Tyr Leu Pro Gln Thr Val Arg Gln

900

905

910

Gly Gly Tyr Met Pro Gln

915

<210> 167

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Vh3\_DP-86\_(3-66) FW1

<400> 167

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser

20

25

30

<210> 168

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Vh3\_DP-86\_(3-66) FW2

<400> 168

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser

5

10

<210> 169

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Vh3\_DP-86\_(3-66) FW3

<400> 169

Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln

5

10

15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20

25

30

<210> 170

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Vh3\_DP-86\_(3-66) FW4

<400> 170

Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

5

10

<210> 171

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Vk1\_L12 FW1

<400> 171

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 172

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Vk1\_L12 FW2

<400> 172

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile Tyr

5

10

15

<210> 173

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Vkl\_L12 FW3

<400> 173

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr

5

10

15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

20

25

30

<210> 174

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Vkl\_L12 FW4

<400> 174

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

5

10

<210> 175

<211> 212

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Phe102Glu mutant full length IL-6

&lt;400&gt; 175

Met Asn Ser Phe Ser Thr Ser Ala Phe Gly Pro Val Ala Phe Ser Leu

1 5 10 15

Gly Leu Leu Leu Val Leu Pro Ala Ala Phe Pro Ala Pro Val Pro Pro

20 25 30

Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln Pro Leu Thr

35 40 45

Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile

50 55 60

Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser

65 70 75 80

Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala

85 90 95

Glu Lys Asp Gly Cys Glu Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu

100 105 110

Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr

115 120 125

Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln  
 130 135 140

Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn  
 145 150 155 160

Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu  
 165 170 175

Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His  
 180 185 190

Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala  
 195 200 205

Leu Arg Gln Met  
 210

<210> 176

<211> 212

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Ser204Glu mutante IL-6 comprimento total

&lt;400&gt; 176

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

Gly Leu Leu Leu Val Leu Pro Ala Ala Phe Pro Ala Pro Val Pro Pro  
                   20                    25                    30

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

Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile  
                   50                    55                    60

Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser  
                   65                    70                    75                    80

Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala  
                   85                    90                    95

Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu  
                   100                    105                    110

Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr  
                   115                    120                    125

Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln  
130 135 140

Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn  
145 150 155 160

Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu  
165 170 175

Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His  
180 185 190

Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ala  
195 200 205

Leu Arg Gln Met  
210

<210> 177

<211> 212

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Arg207Glu mutante comprimento total IL-6

<400> 177

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

Gly Leu Leu Leu Val Leu Pro Ala Ala Phe Pro Ala Pro Val Pro Pro  
 20 25 30

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

Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile  
 50 55 60

Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser  
 65 70 75 80

Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala  
 85 90 95

Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu  
 100 105 110

Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr  
 115 120 125

Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln

130 135 140

Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn  
145 150 155 160

Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu  
165 170 175

Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His  
180 185 190

Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Glu Ala  
195 200 205

Leu Arg Gln Met  
210

<210> 178  
<211> 212  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Phe106Glu mutante comprimento total IL-6

<400> 178

Met Asn Ser Phe Ser Thr Ser Ala Phe Gly Pro Val Ala Phe Ser Leu

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1   | 5   | 10  | 15  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Leu | Leu | Leu | Val | Leu | Pro | Ala | Ala | Phe | Pro | Ala | Pro | Val | Pro | Pro |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Gly | Glu | Asp | Ser | Lys | Asp | Val | Ala | Ala | Pro | His | Arg | Gln | Pro | Leu | Thr |
|     |     |     | 35  |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Ser | Ser | Glu | Arg | Ile | Asp | Lys | Gln | Ile | Arg | Tyr | Ile | Leu | Asp | Gly | Ile |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     |     | 60  |     |     |     |
| Ser | Ala | Leu | Arg | Lys | Glu | Thr | Cys | Asn | Lys | Ser | Asn | Met | Cys | Glu | Ser |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |
| Ser | Lys | Glu | Ala | Leu | Ala | Glu | Asn | Asn | Leu | Asn | Leu | Pro | Lys | Met | Ala |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Glu | Lys | Asp | Gly | Cys | Phe | Gln | Ser | Gly | Glu | Asn | Glu | Glu | Thr | Cys | Leu |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Val | Lys | Ile | Ile | Thr | Gly | Leu | Leu | Glu | Phe | Glu | Val | Tyr | Leu | Glu | Tyr |
|     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Leu | Gln | Asn | Arg | Phe | Glu | Ser | Ser | Glu | Glu | Gln | Ala | Arg | Ala | Val | Gln |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |

Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn  
 145                      150                      155                      160

Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu  
                     165                      170                      175

Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His  
                     180                      185                      190

Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala  
                     195                      200                      205

Leu Arg Gln Met  
                     210

<210> 179

<211> 212

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Gln211Ala mutante comprimento total IL-6

<400> 179

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

Gly Leu Leu Leu Val Leu Pro Ala Ala Phe Pro Ala Pro Val Pro Pro

20

25

30

Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln Pro Leu Thr

35

40

45

Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile

50

55

60

Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser

65

70

75

80

Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala

85

90

95

Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu

100

105

110

Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr

115

120

125

Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln

130

135

140

Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn  
 145 150 155 160

Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu  
 165 170 175

Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His  
 180 185 190

Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala  
 195 200 205

Leu Arg Ala Met  
 210

<210> 180

<211> 212

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Arg58Glu mutante comprimento total IL-6

<400> 180

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

Gly Leu Leu Leu Val Leu Pro Ala Ala Phe Pro Ala Pro Val Pro Pro  
20 25 30

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

Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Glu Tyr Ile Leu Asp Gly Ile  
50 55 60

Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser  
65 70 75 80

Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala  
85 90 95

Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu  
100 105 110

Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr  
115 120 125

Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln  
130 135 140

Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn  
145 150 155 160

Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu  
165 170 175

Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His  
180 185 190

Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala  
195 200 205

Leu Arg Gln Met  
210

<210> 181

<211> 212

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Glu200Trp mutante comprimento total IL-6

<400> 181

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

Gly Leu Leu Leu Val Leu Pro Ala Ala Phe Pro Ala Pro Val Pro Pro

20

25

30

Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln Pro Leu Thr

35

40

45

Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile

50

55

60

Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser

65

70

75

80

Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala

85

90

95

Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu

100

105

110

Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr

115

120

125

Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln

130

135

140

Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn

145                                      150                                      155                                      160

Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu

165                                      170                                      175

Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His

180                                      185                                      190

Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Trp Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala

195                                      200                                      205

Leu Arg Gln Met

210

<210> 182

<211> 212

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Arg207Leu mutante comprimento total IL-6

<400> 182

Met Asn Ser Phe Ser Thr Ser Ala Phe Gly Pro Val Ala Phe Ser Leu

1                                      5                                      10                                      15

Gly Leu Leu Leu Val Leu Pro Ala Ala Phe Pro Ala Pro Val Pro Pro

20

25

30

Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln Pro Leu Thr

35

40

45

Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile

50

55

60

Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser

65

70

75

80

Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala

85

90

95

Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu

100

105

110

Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr

115

120

125

Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln

130

135

140

Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn

145

150

155

160

Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu

165

170

175

Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His

180

185

190

Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Leu Ala

195

200

205

Leu Arg Gln Met

210

<210> 183

<211> 33

<212> DNA

<213> *Macaca fascicularis*

<220>

<223> Iniciador macIL6\_5'NdeI

<400> 183

ttatcatatg gtactcccag gagaagattc caa

33

<210> 184

<211> 30

<212> DNA

<213> *Macaca fascicularis*

<220>

<223> Iniciador macIL6\_3'NheI

<400> 184

ttatgctagc ctacatttgc cgaagagccc

30

<210> 185

<211> 32

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Iniciador hIL6\_5'NdeI

<400> 185

ttatacatat ggtacccccca ggagaagatt cc

32

## REIVINDICAÇÕES

1. Membro de ligação isolado para IL-6 humana, caracterizado pelo fato de que se liga a IL-6 humana com uma  $K_D$  de não mais que 30 pM conforme definido por ressonância de plasma de superfície.

5                   2. Membro de ligação de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a  $K_D$  não é de mais 10 pM.

                  3. Membro de ligação isolado para IL-6 humana, caracterizado pelo fato de que se liga a IL-6 humana no resíduo Phe102 e/ou Ser204, a numeração do resíduo sendo definida de acordo com a sequência de  
10 aminoácidos de IL-6 humana completa de SE ID NO: 161.

                  4. Membro de ligação de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o membro de ligação se liga a IL-6 humana no resíduo Arg207.

                  5. Membro de ligação isolado para IL-6 humana, caracterizado  
15 pelo fato de que o membro de ligação tem um  $IC_{50}$  de menos de 1 nM em um ensaio de inibição de liberação de VEGF de fibroblasto sinoviais humanos estimulados com 0,6 pM de IL-1 $\beta$  humana e 2,4 nM de IL-6R $\alpha$  humana solúvel.

                  6. Membro de ligação de acordo com qualquer um das  
20 reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o membro de ligação se liga a IL-6 de cinomolgo e em que IL-6 de cinomolgo tem um  $IC_{50}$  menos de 10 vezes diferente do  $IC_{50}$  de IL-6 humana não marcada em um ensaio de fluorescência resolvido por tempo para inibição de ligação de IL-6 humana marcada ao membro de ligação imobilizado em um suporte, em que a  
25 IL-6 humana marcada está em uma concentração final igual a duas vezes a  $K_d$  de sua interação com o membro de ligação.

                  7. Membro de ligação de acordo com qualquer um das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que tem um  $IC_{50}$  de menos de 100 pM em um ensaio de inibição de proliferação de células TF-1

em resposta a 20 pM de IL-6 humana.

8. Membro de ligação isolado para IL-6 humana, caracterizado pelo fato de compreender um grupo de CDRs: HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 e LCDR3, em que o grupo de CDRs tem 22 ou menos alterações de aminoácidos de um grupo de CDRs em que:

HCDR1 tem sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;

HCDR2 tem sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4;

HCDR3 tem sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 115;

LCDR1 tem sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;

LCDR2 tem sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 e

LCDR3 tem sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 120 e

em que

o membro de ligação tem um  $IC_{50}$  de menos de 100 pM em um ensaio de inibição de proliferação de células TF-1 em resposta a 20 pM de IL-6 humana.

9. Membro de ligação isolado para IL-6 humana de acordo com qualquer um das reivindicações 1 até 7, caracterizado pelo fato de compreender um grupo de CDRs: HCDR1, HCDR2 HCDR3, LCDR1, LCDR2 e LCDR3, em que o grupo de CDRs tem 22 ou menos alterações de aminoácidos de um grupo de CDRs em que:

HCDR1 tem sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;

HCDR2 tem sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4;

HCDR3 tem sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 115;

LCDR1 tem sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;

LCDR2 tem sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 e

LCDR3 tem sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 120.

10. Membro de ligação de acordo com a reivindicação 8 ou reivindicação 9, caracterizado pelo fato de compreender um grupo de CDRs que tem 20 ou menos substituições de um grupo de CDRs em que:

HCDR1 tem sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;  
 HCDR2 tem sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4;  
 HCDR3 tem sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 115;  
 LCDR1 tem sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;  
 5 LCDR2 tem sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 e  
 LCDR3 tem sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 120;

e em que o membro de ligação opcionalmente tem uma inserção de um resíduo para aumentar o comprimento da HCDR3 em relação à SEQ ID NO: 115 e/ou tem uma inserção de um resíduo para aumentar o comprimento de  
 10 LCDR3 em relação à SEQ ID NO: 120.

11. Membro de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 até 10, caracterizado pelo fato de compreender uma HCDR1 em que o resíduo de Kabat 35 é Ile, Thr ou Val.

12. Membro de ligação de acordo com a reivindicação 11,  
 15 caracterizado pelo fato de que HCDR1 é SEQ ID NO: 3.

13. Membro de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 até 12, caracterizado pelo fato de compreender uma HCDR2 em que o resíduo de Kabat 64 é Lys ou Arg.

14. Membro de ligação de acordo com a reivindicação 13,  
 20 caracterizado pelo fato de que HCDR2 tem sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

15. Membro de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 até 14, caracterizado pelo fato de que:

resíduo de Kabat 95 em HCDR3 é Trp e/ou em que resíduo de  
 25 Kabat 101 em HCDR3 é Asp.

16. Membro de ligação de acordo com qualquer um das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que compreende uma HCDR3 em que:

Resíduo de Kabat 96 é Ala ou Glu;

Resíduo de Kabat 97 é Asp, Glu ou Asn;

Resíduo de Kabat 98 é Asp Gly, Glu ou His;

Resíduo de Kabat 99 é His, Gly ou Thr;

Resíduo de Kabat 100 é Pro, Tyr, Asn, Arg, Trp ou Ala;

5 Resíduo de Kabat 100A é Pro, Tyr, Ala, Arg, Thr, Gly, Asn ou Ser;

Resíduo de Kabat 100B é Trp, Tyr, His, Gln, Pro ou Thr;

Resíduo de Kabat 100C é Ile, Ala, Val, His, Tyr ou Leu e

Resíduo de Kabat 102 é Leu, Val, His, Met ou Ile.

10 17. Membro de ligação de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que HCDR3 tem sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 115.

15 18. Membro de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 até 17, caracterizado pelo fato de que resíduo de Kabat 34 é Ala ou Thr.

19. Membro de ligação de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que LCDR1 é SEQ ID NO: 8.

20 20. Membro de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 até 19, caracterizado pelo fato de que LCDR2 é SEQ ID NO: 9.

21. Membro de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de compreender um LCDR3 em que:

Resíduo de Kabat 89 é Gln, Met ou Ala;

25 Resíduo de Kabat 90 é Gln, Asn, Ser ou Ala;

Resíduo de Kabat 91 é Ser, Asn, Gly, Ala ou His;

Resíduo de Kabat 92 é Trp, Tyr, Ser, Lys ou Phe;

Resíduo de Kabat 93 é Leu, Ser, Lys, Arg ou Ala;

Resíduo de Kabat 94 é Gly, Thr, Ala ou Pro;

Resíduo de Kabat 96 é Gly ou Trp e

Resíduo de Kabat 97 é Ser ou Thr.

22. Membro de ligação de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de compreender uma LCDR3 que tem sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 120.

23. Membro de ligação isolado para IL-6 humana, caracterizado pelo fato de compreender uma HCDR3 e LCDR3 e/ou um grupo de CDRs de qualquer dos anticorpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 ou 23.

24. Membro de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de compreender um grupo de CDRs: HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 e LCDR3, em que:

HCDR1 é SEQ ID NO: 3;

HCDR2 é SEQ ID NO: 4;

HCDR3 é SEQ ID NO: 115;

LCDR1 é SEQ ID NO: 8;

LCDR2 é SEQ ID NO: 9; e

LCDR3 é SEQ ID NO: 80.

25. Membro de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o membro de ligação compreende uma molécula de anticorpo compreendendo um domínio VH de anticorpo e um domínio VL de anticorpo, em que a molécula de anticorpo compreende o citado grupo de CDRs, em que o domínio VH compreende HCDR1, HCDR2, HCDR3 e uma estrutura e o domínio VL compreende LCDR1, LCDR2, LCDR3 e uma estrutura.

26. Membro de ligação de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que a molécula de anticorpo compreende uma região constante de anticorpo.

27. Membro de ligação de acordo com a reivindicação 26,

caracterizado pelo fato de que a molécula de anticorpo é uma IgG1.

28. Membro de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 até 27, caracterizado pelo fato de que as regiões estruturais do domínio VH e/ou VL são tornadas de linhagem germinativa para sequências de segmento gênico de linhagem germinativa humana.

29. Membro de ligação de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o domínio VH de anticorpo compreende regiões estruturais tornadas de linhagem germinativa para estrutura de linhagem germinativa humana Vh3\_DP-86\_(3-66).

30. Membro de ligação de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o domínio VH compreende regiões estruturais FR1, FR2, FR3 e FR4 tendo sequências de aminoácidos em que FR1 é SEQ ID NO: 167, FR2 é SEQ ID NO: 168, FR3 é SEQ ID NO: 169 e FR4 é SEQ ID NO: 170.

31. Membro de ligação de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o domínio VH de anticorpo tem a sequência de aminoácidos de domínio VH mostrada em SEQ ID NO: 112.

32. Membro de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações 28 até 31, caracterizado pelo fato de que o domínio VL de anticorpo compreende regiões estruturais tornadas de linhagem germinativa para estrutura de linhagem germinativa humana Vk1\_L12.

33. Membro de ligação de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que o domínio VL compreende regiões estruturais FR1, FR2, FR3 e FR4 tendo sequências de aminoácidos em que FR1 é SEQ ID NO: 171, FR2 é SEQ ID NO: 172, FR3 é SEQ ID NO: 173 e FR4 é SEQ ID NO: 174.

34. Membro de ligação de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o domínio VL de anticorpo tem a sequência de aminoácidos de domínio VL mostrada em SEQ ID NO: 117.

35. Molécula de anticorpo isolada, caracterizada pelo fato de compreender uma cadeia pesada compreendendo sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 112 e uma cadeia leve compreendendo sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 117.

5 36. Molécula de anticorpo isolada que se liga a IL-6, caracterizada pelo fato de que a molécula de anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos de domínio VH que possui pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 112 e uma sequência de aminoácidos de domínio VL que possui pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO:  
10 117.

37. Molécula de anticorpo de acordo com a reivindicação 35 ou reivindicação 36, caracterizada pelo fato de que a molécula de anticorpo é uma IgG.

15 38. Molécula de anticorpo de acordo com a reivindicação 37, caracterizada pelo fato de que a IgG é IgG1.

39. Domínio VH isolado, caracterizado pelo fato de ser de uma molécula de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações 25 até 38.

20 40. Domínio VL isolado, caracterizado pelo fato de ser de uma molécula de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações 25 até 38.

25 41. Composição, caracterizada pelo fato de compreender um membro de ligação isolado como definido em qualquer uma das reivindicações 1 até 34, ou uma molécula de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações 35 até 38 e um excipiente farmacologicamente aceitável.

42. Composição, caracterizada pelo fato de compreender um membro de ligação isolado como definido em qualquer uma das reivindicações 1 até 34, ou uma molécula de anticorpo como definida em

qualquer uma das reivindicações 35 até 38, para uso em um método de tratamento do corpo humano ou animal por terapia.

43. Composição de acordo com a reivindicação 42 caracterizada pelo fato de ser para uso no tratamento de um distúrbio associado com IL-6.

44. Uso de um membro de ligação isolado como definido em qualquer uma das reivindicações 1 até 34, ou uma molécula de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações 35 até 38, caracterizado pelo fato de ser para a fabricação de um medicamento para tratar um distúrbio associado com IL-6.

45. Composição de acordo com a reivindicação 43 ou uso de acordo com a reivindicação 44, caracterizada pelo fato de que o distúrbio é uma doença inflamatória e/ou auto-imune.

46. Composição ou uso de acordo com a reivindicação 45, caracterizada pelo fato de que o distúrbio é artrite reumatóide, osteoartrite, caquexia, doença pulmonar obstrutiva crônica, artrite idiopática juvenil, asma, lúpus eritematoso sistêmico, doença inflamatória do intestino, doença de Crohn ou aterosclerose.

47. Composição ou uso de acordo com a reivindicação 45, caracterizada pelo fato de que o distúrbio é artrite reumatóide.

48. Composição de acordo com a reivindicação 43 ou uso de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo fato de que o distúrbio é um tumor e/ou câncer.

49. Método para tratar um distúrbio associado com IL-6 em um indivíduo, caracterizado pelo fato de compreender administrar um membro de ligação como definido em qualquer uma das reivindicações 1 até 34, ou uma molécula de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações 35 até 38, ao indivíduo.

50. Método de acordo com a reivindicação 49, caracterizado

pelo fato de que o distúrbio é uma doença inflamatória e/ou auto-imune.

51. Método de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que o distúrbio é artrite reumatóide, osteoartrite, caquexia, doença pulmonar obstrutiva crônica, artrite idiopática juvenil, asma, lúpus eritematoso sistêmico, doença inflamatória do intestino, doença de Crohn ou aterosclerose.

52. Método de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que o distúrbio é artrite reumatóide.

53. Método de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de que o distúrbio é um tumor e/ou câncer.

54. Molécula de ácido nucleico isolado, caracterizada pelo fato de compreender uma sequência de nucleotídeo codificando um membro de ligação como definido em qualquer uma das reivindicações 1 até 34, um domínio VH como definido na reivindicação 39, um domínio VL como definido na reivindicação 40, ou uma molécula de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações 35 até 38.

55. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de ser transformada *in vitro* com ácido nucleico como definido na reivindicação 54.

56. Método para produzir um membro de ligação, uma molécula de anticorpo ou um domínio VH ou VL de anticorpo, caracterizado pelo fato de compreender cultivar células hospedeiras como definidas na reivindicação 55 sob condições para produção do membro de ligação, molécula de anticorpo ou domínio VH ou VL de anticorpo.

57. Método de acordo com a reivindicação 55, caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente isolar e/ou purificar o membro de ligação, molécula de anticorpo, domínio VH ou domínio VL.

58. Método de acordo com a reivindicação 56 ou reivindicação 57, caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente formular o membro de ligação, molécula de anticorpo, domínio VH ou domínio VL em

uma composição compreendendo pelo menos um componente adicional.

59. Método para produzir um domínio de ligação a antígeno de anticorpo para IL-6, caracterizado pelo fato de compreender:

5       prover, por meio de adição, deleção substituição ou inserção  
de um ou mais aminoácidos na sequência de aminoácidos de um domínio VH  
parental compreendendo HCDR1, HCDR2 e HCDR3, em que as HCDR1,  
HCDR2 e HCDR3 de domínio VH parental são um grupo de HCDRs como  
mostrado na Tabela 7, um domínio VH que é uma sequência de aminoácidos  
variantes do domínio VH parental e opcionalmente combinando o domínio  
10   VH assim provido com um ou mais domínios VL para prover uma ou mais  
combinações VH/VL; e

testar o citado domínio VH que é uma sequência de  
aminoácidos variante do domínio VH parental ou a combinação ou  
combinações VH/VL para identificar um domínio de ligação a antígeno de  
15   anticorpo para IL-6.

60. Método de acordo com a reivindicação 59, caracterizado  
pelo fato de que o citado um ou mais domínios VL são providos por meio de  
adição, deleção substituição ou inserção de um ou mais aminoácidos na  
sequência de aminoácidos de um domínio VL parental compreendendo  
20   LCDR1, LCDR2 e LCDR3, em que as LCDR1, LCDR2 e LCDR3 de  
domínio VL parental são um grupo VL de CDRs como mostrado na Tabela 7,  
produzindo um ou mais domínios VL cada um dos quais é uma sequência de  
aminoácidos variantes do domínio VL parental.

61. Método de acordo com a reivindicação 59 ou reivindicação  
25   60, caracterizado pelo fato de que o citado domínio VH que é uma sequência  
de aminoácidos variante do domínio VH parental é provido por mutagênese  
de CDR.

62. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações  
59 até 61, caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente produzir o

domínio de ligação a antígeno de anticorpo como um componente de uma molécula de anticorpo de IgG, scFv ou Fab.

63. Método para produzir um membro de ligação que se liga a IL-6, caracterizado pelo fato de compreender:

- 5                   prover ácido nucleico de partida codificando um domínio VH ou um repertório de partida de ácidos nucleicos cada um codificando um domínio VH, em que o domínio VH ou domínio VH ou compreendem uma HCDR1, HCDR2 e/ou HCDR3 a ser substituída ou não possuem uma região codificante de HCDR1, HCDR2 e/ou HCDR3;
- 10                  combinar o citado ácido nucleico de partida ou repertório de partida com ácido nucleico doador ou ácidos nucleicos doadores codificando ou produzidos por mutação da sequência de aminoácidos de uma HCDR1, HCDR2 e/ou HCDR3 mostrada na Tabela 7, tal que o citado ácido nucleico doador seja ou ácidos nucleicos doadores sejam inserido(s) na região CDR1,
- 15                  CDR2 e/ou CDR3 no ácido nucleico de partida ou repertório de partida, para prover um repertório de produto de ácido nucleicos codificando domínio VH;
- expressar os ácidos nucleicos do citado repertório de produto para produzir domínios VH;
- combinar opcionalmente os citados domínios VH de produto
- 20                  com um ou mais domínios VL;
- selecionar um membro de ligação para IL-6, membro de ligação o qual compreende um domínio VH de produto e opcionalmente um domínio VL; e
- recuperar o citado membro de ligação ou ácido nucleico que o
- 25                  codifica.

64. Método de acordo com a reivindicação 63, caracterizado pelo fato de que os ácidos nucleicos doadores são produzidos por mutação da citada HCDR1 e/ou HCDR2.

65. Método de acordo com a reivindicação 63, caracterizado

pelo fato de que o ácido nucleico doador é produzido por mutação de HCDR3.

5 66. Método de acordo com a reivindicação 63, caracterizado pelo fato de compreender prover o ácido nucleico doador por mutação aleatória de ácido nucleico.

67. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 59 até 66, caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente aderir um domínio VH de produto, que está compreendido no membro de ligação recuperado, a uma região constante de anticorpo.

10 68. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 59 até 67, caracterizado pelo fato de compreender prover uma molécula de anticorpo de IgG, scFv ou Fab compreendendo o domínio VH e um domínio VL de produto.

15 69. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 59 até 68, caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente testar o domínio de ligação a antígeno de anticorpo ou membro de ligação que se liga a IL-6 pela habilidade de neutralizar IL-6.

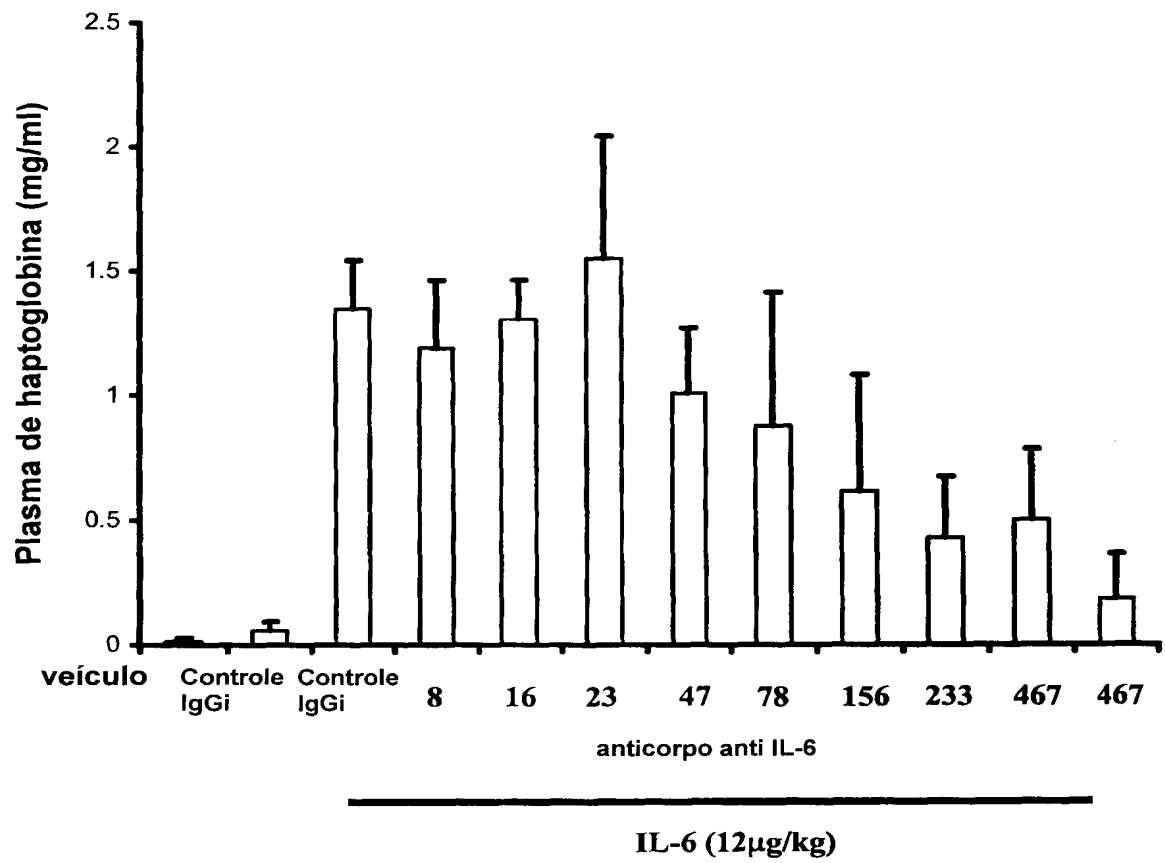
20 70. Método de acordo com a reivindicação 69, caracterizado pelo fato de que um membro de ligação que compreende uma molécula de anticorpo que se liga a e neutraliza IL-6 é obtido.

71. Método de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que a molécula de anticorpo é um scFv.

72. Método de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que a molécula de anticorpo é uma IgG.

25 73. Método para produzir uma composição de molécula de anticorpo, caracterizado pelo fato de compreender obter uma molécula de anticorpo usando um método como definido em qualquer uma das reivindicações 56 até 72 e formular a molécula de anticorpo em uma composição compreendendo pelo menos um componente adicional.

Figura 1



RESUMO

“MEMBRO DE LIGAÇÃO ISOLADO PARA IL-6 HUMANA, MOLÉCULA DE ANTICORPO ISOLADA, DOMÍNIOS VH E VL ISOLADOS, COMPOSIÇÃO, USO DE UM MEMBRO DE LIGAÇÃO ISOLADO, OU UMA MOLÉCULA DE ANTICORPO, MÉTODO PARA TRATAR UM DISTÚRBO ASSOCIADO COM IL-6 EM UM INDIVÍDUO, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, CÉLULA HOSPEDEIRA, E, MÉTODOS PARA PRODUZIR UM MEMBRO DE LIGAÇÃO, UMA MOLÉCULA DE ANTICORPO OU UM DOMÍNIO VH OU VL DE ANTICORPO, PARA PRODUZIR UM DOMÍNIO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DE ANTICORPO PARA IL-6 E PARA PRODUZIR UMA COMPOSIÇÃO DE MOLÉCULA DE ANTICORPO”

Membros de ligação, p. ex., moléculas de anticorpo humano, que se ligam a interleucina-6 (IL-6) e neutralizam seus efeitos biológicos. Uso de membros de ligação para IL-6 em tratamento médico, p. ex., para tratar tumores e doenças inflamatórias associadas a IL-6.