

---

(11) Número de Publicação: **PT 2391650 E**

(51) Classificação Internacional:

**C07K 16/24** (2014.01) **A61K 39/395** (2014.01)  
**A61K 39/00** (2014.01)

---

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

---

(22) Data de pedido: **2008.12.18**

(30) Prioridade(s): **2007.12.20 US 15633 P**  
**2008.06.06 US 59378 P**  
**2008.09.08 US 95191 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2011.12.07**

(45) Data e BPI da concessão: **2014.10.15**  
**009/2015**

(73) Titular(es):

**XOMA (US) LLC**  
**2910 SEVENTH STREET BERKELEY, CA 94710**  
**US**

(72) Inventor(es):

(74) Mandatário:  
**ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS**  
**RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA**  
**PT**

---

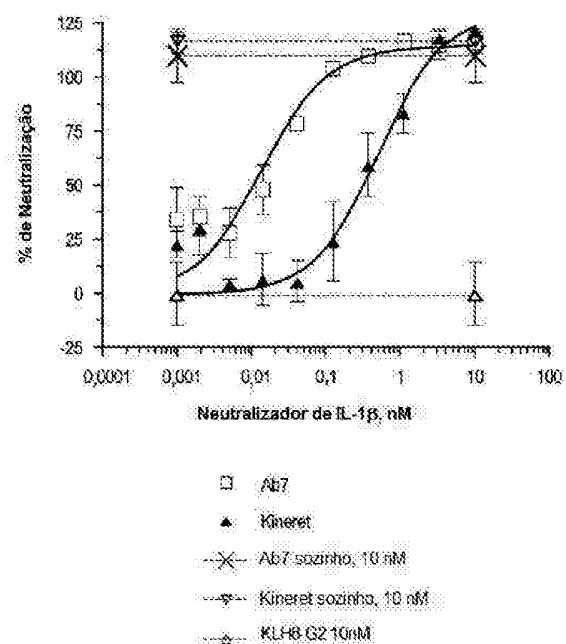
(54) Epígrafe: **MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DE GOTA**

(57) Resumo:

SÃO DIVULGADOS MÉTODOS PARA O TRATAMENTO E/OU PREVENÇÃO DE GOTA, COMPREENDENDO A ADMINISTRAÇÃO A UM INDIVÍDUO DE UMA QUANTIDADE EFICAZ DE ANTICORPO ANTI-IL-1&#61538; OU SEU FRAGMENTO.

**RESUMO****"MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DE GOTÁ"**

São divulgados métodos para o tratamento e/ou prevenção de gota, compreendendo a administração a um indivíduo de uma quantidade eficaz de anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento.

**FIG. 1**

**DESCRIÇÃO****"MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DE GOTÁ"****CAMPO DE INVENÇÃO**

A invenção refere-se a anticorpos IL-1 $\beta$  e seus fragmentos para serem utilizados no tratamento e/ou prevenção de gota. Tais anticorpos ou fragmentos podem ser utilizados para tratar um indivíduo que sofre de gota ou para prevenir a ocorrência da mesma num indivíduo em risco.

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

A presente divulgação é dirigida a anticorpos IL-1 $\beta$  e seus fragmentos para serem utilizados no tratamento e/ou prevenção de gota num indivíduo. Tais anticorpos ou fragmentos podem ser utilizados para tratar um indivíduo mamífero (e.g., humano) que sofre de gota ou para prevenir a ocorrência da mesma num indivíduo em risco.

A gota é uma forma de artrite aguda que origina dor grave e tumefacção nas articulações. A artrite gotosa contribuiu para um número estimado de 3,9 milhões de visitas em ambulatório nos Estados Unidos em 2002. Ao contrário de outras doenças reumáticas, a etiologia da gota está bem caracterizada, a sua fisiopatologia é bem

compreendida e a doença é facilmente diagnosticada. Para muitos doentes, a terapia com fármacos anti-inflamatórios não esteróides (NSAIDs) ou corticosteróides para ataques agudos e a prevenção de recorrência com agentes que reduzem os níveis de ácido úrico no soro são altamente eficazes. No entanto, estas terapias não são suficientes para muitos doentes comgota aguda, crónica ou refractária devido à sua ausência de eficácia clínica adequada, toxicidades associadas ou devido a doenças comórbidas.

A gota é a precipitação de cristais no tecido, geralmente nas e ao redor das articulações, que originam muito frequentemente artrite aguda ou crónica recorrente.

A doença é marcada por depósitos de cristais de urato monossódico (MSU) no tecido, geralmente nas e ao redor das articulações e no líquido e revestimento sinovial, e geralmente por uma quantidade excessiva de ácido úrico no sangue. Ocorre uma inflamação intensa da articulação à medida que os glóbulos brancos deglutem os cristais de ácido úrico, originando dor, aquecimento e vermelhidão dos tecidos da articulação. A artrite gotosa é devido à libertação induzida por cristais de urato monossódico de citocinas pró-inflamatórias a partir de leucócitos. Entre as muitas citocinas implicadas, a IL-1 pode ter um papel especial na rede inflamatória, já que os cristais de MSU estimulam a libertação de IL-1 pelos monócitos e células mononucleares sinoviais. As crises de gota aguda surgem geralmente de repente, desaparecem após 5 a 10 dias, e podem manter-se recorrentes.

A IL-1 $\beta$  é uma citocina pró-inflamatória segregada por um número de tipos de células diferentes incluindo monócitos e macrófagos. Quando libertada como parte de uma reacção inflamatória, a IL-1 $\beta$  produz uma gama de efeitos biológicos, principalmente mediados através da indução de outros mediadores inflamatórios tais como corticotrofina, factor plaquetário-4, prostaglandina E2 (PGE2), IL-6 e IL-8. A IL-1 $\beta$  induz efeitos inflamatórios locais e sistémicos através da activação do receptor de IL-1 presente em quase todos os tipos de células. A família da interleucina-1 (IL-1) de citocinas tem sido implicada num número de estados patológicos. Os membros da família da IL-1 incluem as IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-1Ra. Embora relacionadas quanto à sua aptidão para ligarem-se aos receptores de IL-1 (IL-1R1 e IL-1R2), cada uma destas citocinas é diferente, sendo expressas por um gene diferente e possuindo uma sequência de aminoácidos primária diferente. Além disso, as actividades fisiológicas destas citocinas podem distinguir-se umas das outras.

Foram publicadas experiências que indicam o envolvimento evidente da IL-1 $\beta$  e outros mediadores inflamatórios na gota (ver, por exemplo, Petrilli et al., Joint Bone Spine (2007) 74:571-576; Pope et al., Arthritis Rheum. (2007) 56:3183-3188; Chen et al., J. Clin. Invest. (2006) 116:2073-2075; Akahoshi, T., et al., Curr. Opin. Rheumatol. (2007) 19:146-150; Martinon, F., et al., Nature (2006) 440:237-241; e Cronstein et al., Arthritis Res.

Ther. (2006) 8, Supl. 1:S3). So et al., Arthritis Res. Ther. (2007) 9(2):R28 descrevem a utilização de um antagonista do receptor de IL-1 recombinante (IL-1Ra, anakinra) num estudo aberto para o tratamento de gota aguda, realizado com administração diária de 100 mg por via subcutânea durante 3 dias. McGonagle, et al., Ann. Rheum. Dis. (2007) 66:1683-1684 descrevem a utilização de um antagonista do receptor de IL-1 recombinante (IL-1Ra, anakinra) para o tratamento de gota num doente que recebe doses subcutâneas diárias contínuas de 100 mg. A administração diária de medicações injectáveis é geralmente indesejável e pode resultar em problemas com adesão à terapêutica pelo doente, reduzindo desse modo a eficácia desta modalidade de tratamento/ ou limitando a sua conveniência. Assim, permanece uma necessidade de meios eficazes para tratar a gota, em particular de composições e métodos de tratamento que não requeiram injecções frequentes (e.g., diárias).

A WO 2007/077261 A1 descreve inibidores do inflamassoma NALP3 para serem utilizados no tratamento de gota.

A WO 2007/002261 A1 descreve *inter alia* anticorpos IL-1 $\beta$  específicos.

A WO03/010282 A1 descreve *inter alia* anticorpos IL-1 $\beta$  específicos.

A WO 2008/077145 A2 descreve anticorpos IL-1 $\beta$  do mesmo *inter alia* para serem utilizados no tratamento de Diabetes Tipo 2.

Simon et al., Journal of Biological Chemistry (1993), 268 (13), 9771-9779 descrevem o mapeamento de epítopos de neutralização de anticorpos IL-1 $\beta$ .

Dinarello et al., Current Opinion in Pharmacology (2004), 4 (4), 378-385, descrevem estratégias terapêuticas para reduzir a actividade da IL-1 no tratamento de inflamação local e sistémica utilizando moléculas de captação de IL-1 $\beta$ .

Pope et al., Arthritis & Rheumatism (2007), 56 (10), 3183-3188 descrevem o papel da interleucina-1 e do inflamassoma na gota

Nishimura et al., Journal of Leukocyte Biology (1997), 62 (4), 444-449, descrevem anticorpos de Interleucina 8 para serem utilizados no tratamento da gota.

Devido aos problemas com os tratamentos actuais são necessárias novas terapias para tratar a gota para substituir ou complementar as abordagens farmacêuticas disponíveis. A presente divulgação proporciona composições e métodos para o tratamento de gota (e.g., gota aguda, gota crónica, gota refractária). Os métodos aqui divulgados compreendem, por exemplo, a administração de um anticorpo

anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento. Os métodos que visam directamente o ligando IL-1 $\beta$  com um anticorpo, particularmente anticorpos que exibem alta afinidade, proporcionam vantagens em relação a outros métodos de tratamento potenciais, tais como os antagonistas do receptor de IL-1 $\beta$  (e.g., IL-1Ra, Anacirna). O desafio para os agentes terapêuticos à base de antagonistas do receptor de IL-1 é a necessidade desses agentes terapêuticos ocuparem um grande número de receptores, o que é uma tarefa formidável uma vez que estes receptores são largamente expressos em todas as células excepto nos glóbulos vermelhos (Dinarello, Curr. Opin. Pharmacol. 4:378-385, 2004). Na maioria das doenças imunomediadas, tais como as doenças aqui divulgadas, a quantidade de citocina IL-1 $\beta$  que é mensurável nos fluidos corporais ou está associada a células activadas é relativamente baixa.

Assim, um método de tratamento e/ou prevenção que vise directamente o ligando IL-1 $\beta$  proporcionaria uma estratégia superior, particularmente quando se administra um anticorpo IL-1 $\beta$  com alta afinidade.

#### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

A presente divulgação é dirigida a um anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento para ser utilizado no tratamento e/ou prevenção de gota num indivíduo, em que o anticorpo ou seu fragmento tem uma região variável da cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia

pesada de SEQ ID NO:6. Tais anticorpos ou seus fragmentos podem ser utilizados para tratar um indivíduo mamífero (e.g., humano) que sofre ou em risco de gota. Os anticorpos ou seus fragmentos podem ser também utilizados para prevenir a ocorrência de gota num indivíduo em risco.

Numa forma de realização da divulgação, a gota é gota crónica. Noutra forma de realização, a gota é gota aguda. Ainda noutra forma de realização, a gota é gota refractária.

Noutro aspecto, a divulgação proporciona um anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento para ser utilizado no tratamento de gota num indivíduo (e.g., indivíduo humano), em que o anticorpo ou seu fragmento tem uma região variável da cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6, em que a utilização compreende a administração (e.g., numa quantidade terapeuticamente eficaz) do anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento ao indivíduo, em que a dose do anticorpo ou fragmento é suficiente para conseguir pelo menos uma redução de 50% na dor articular. Numa forma de realização, o anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento é suficiente para conseguir pelo menos uma redução de 60% na dor articular, pelo menos uma redução de 70% na dor articular, pelo menos uma redução de 80% na dor articular, pelo menos uma redução de 90% na dor articular, pelo menos uma redução de 95% na dor articular ou uma redução de 100% na dor articular.

Noutro aspecto da divulgação, a dose do anticorpo ou fragmento é suficiente para conseguir pelo menos uma diminuição de 20% nos níveis de proteína C reactiva (CRP), pelo menos uma diminuição de 30% nos níveis de CRP, pelo menos uma diminuição de 40% nos níveis de CRP, pelo menos uma diminuição de 50% nos níveis de CRP, pelo menos uma diminuição de 60% nos níveis de CRP, pelo menos uma diminuição de 70% nos níveis de CRP, pelo menos uma diminuição de 80% nos níveis de CRP, pelo menos uma diminuição de 90% nos níveis de CRP. Numa forma de realização preferida, a dose do anticorpo ou fragmento é suficiente para conseguir pelo menos uma redução de 50% na dor articular e pelo menos uma diminuição de 20% nos níveis de CRP, pelo menos uma diminuição de 30% nos níveis de CRP, pelo menos uma diminuição de 40% nos níveis de CRP, pelo menos uma diminuição de 50% nos níveis de CRP, pelo menos uma diminuição de 60% nos níveis de CRP, pelo menos uma diminuição de 70% nos níveis de CRP, pelo menos uma diminuição de 80% nos níveis de CRP e/ou pelo menos uma diminuição de 90% nos níveis de CRP.

Noutro aspecto da divulgação, a dose do anticorpo ou fragmento é suficiente para conseguir pelo menos uma diminuição de 20% na Velocidade de Hemossedimentação (ESR), pelo menos uma diminuição de 40% na ESR, pelo menos uma diminuição de 50% na ESR, pelo menos uma diminuição de 60% na ESR, pelo menos uma diminuição de 70% na ESR, pelo menos uma diminuição de 80% na ESR, pelo menos uma diminuição de 90% na ESR. Numa forma de realização preferida, a dose do

anticorpo ou fragmento é suficiente para conseguir pelo menos uma redução de 50% na dor articular e pelo menos uma diminuição de 20% na ESR, pelo menos uma diminuição de 40% na ESR, pelo menos uma diminuição de 50% na ESR, pelo menos uma diminuição de 60% na ESR, pelo menos uma diminuição de 70% na ESR, pelo menos uma diminuição de 80% na ESR e/ou pelo menos uma diminuição de 90% na ESR

Noutro aspecto, a divulgação proporciona um anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento para ser utilizado no tratamento de gota num indivíduo (e.g., indivíduo humano), em que o anticorpo ou seu fragmento tem uma região variável da cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6, em que a utilização comprehende a administração (e.g., numa quantidade terapeuticamente eficaz) do anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento ao indivíduo, em que a dose do anticorpo ou fragmento é suficiente para conseguir pelo menos uma redução de 50% na dor articular, pelo menos uma diminuição de 20% nos níveis de CRP e pelo menos uma diminuição de 20% na ESR. Numa forma de realização, a dose do anticorpo ou fragmento é suficiente para conseguir pelo menos uma redução de 50% na dor articular, pelo menos uma diminuição de 30% nos níveis de CRP e uma diminuição de 30% na ESR. Noutra forma de realização, a dose do anticorpo ou fragmento é suficiente para conseguir pelo menos uma redução de 50% na dor articular, pelo menos uma diminuição de 40% nos níveis de CRP e uma diminuição de 40% na ESR. Noutra forma de realização, a dose do anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento é

suficiente para conseguir pelo menos uma redução de 60% na dor articular, pelo menos uma diminuição de 20% nos níveis de CRP e pelo menos uma diminuição de 20% na ESR. Noutra forma de realização, a dose do anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento é suficiente para conseguir pelo menos uma redução de 60% na dor articular, pelo menos uma diminuição de 40% nos níveis de CRP e pelo menos uma diminuição de 40% na ESR. Noutra forma de realização, a dose do anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento é suficiente para conseguir pelo menos uma redução de 60% na dor articular, pelo menos uma diminuição de 50% nos níveis de CRP e pelo menos uma diminuição de 50% na ESR. Ainda noutra forma de realização, a dose do anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento é suficiente para conseguir pelo menos uma redução de 70% na dor articular, pelo menos uma diminuição de 20% nos níveis de CRP e pelo menos uma diminuição de 20% na ESR. Noutra forma de realização, a dose do anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento é suficiente para conseguir pelo menos uma redução de 70% na dor articular, pelo menos uma diminuição de 40% nos níveis de CRP e pelo menos uma diminuição de 40% na ESR. Noutra forma de realização, a dose do anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento é suficiente para conseguir pelo menos uma redução de 70% na dor articular, pelo menos uma diminuição de 50% nos níveis de CRP e pelo menos uma diminuição de 50% na ESR.

Os anticorpos anti-IL-1 $\beta$  ou fragmentos de anticorpos para serem utilizados nos métodos aqui divulgados ligam-se geralmente a IL-1 $\beta$  com alta afinidade.

Numa forma de realização preferida, a divulgação proporciona um anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento para ser utilizado no tratamento de gota num indivíduo (e.g., indivíduo humano), em que o anticorpo ou seu fragmento tem uma região variável da cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6, em que a utilização comprehende a administração (e.g., numa quantidade terapeuticamente eficaz) do anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento ao indivíduo, em que, o anticorpo ou fragmento de anticorpo liga-se à IL-1 $\beta$  com uma constante de dissociação de cerca de 1 pM ou menos.

Noutro aspecto da divulgação, o anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento de anticorpo é um anticorpo neutralizante. Noutro aspecto da divulgação, o anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento de anticorpo liga-se a um epítopo de IL-1 $\beta$  de tal forma que o anticorpo ou fragmento ligado permite substancialmente a ligação de IL-1 $\beta$  ao receptor I de IL-1 (IL-1RI). Noutro aspecto da divulgação, o anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento de anticorpo liga-se à IL-1 $\beta$ , mas não impede substancialmente a IL-1 $\beta$  ligada de se ligar ao receptor I de IL-1 (IL-1RI). Noutro aspecto da divulgação, o anticorpo ou fragmento de anticorpo não se liga de forma detectável à IL-1 $\alpha$ , IL-1R ou IL-1Ra. Ainda noutro aspecto da divulgação, o anticorpo ou fragmento de anticorpo liga-se a um epítopo contido na sequência ESVDPKNYPKKMEKRFV-FNKIE (SEQ ID NO: 1). Noutro aspecto da divulgação, o anticorpo ou seu fragmento compete com a ligação de um anticorpo que tem a região variável da cadeia leve de SEQ ID NO:5 e a região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6.

Ainda noutro aspecto da divulgação, o anticorpo ou fragmento de anticorpo liga-se aos aminoácidos 1-34 da extremidade N-terminal da IL-1 $\beta$ . Preferencialmente, o anticorpo ou fragmento de anticorpo é manipulado humano, humanizado ou humano.

Noutro aspecto, a invenção proporciona um anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento para ser utilizado no tratamento de um indivíduo (e.g., mamífero, humano) que apresenta sintomas ou em risco de desenvolver gota, em que o anticorpo ou seu fragmento tem uma região variável da cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO: 6, em que a utilização compreende a administração do anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento ao indivíduo em uma ou mais doses.

Noutro aspecto da invenção é proporcionado um anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento para ser utilizado no tratamento de gota num indivíduo (e.g., mamífero, humano), em que o anticorpo ou seu fragmento tem uma região variável da cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO: 6, em que a utilização compreende a administração do anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento ao humano, em que a administração de uma dose inicial do anticorpo IL-1 $\beta$  ou fragmento de anticorpo é seguida da administração de uma ou mais doses subsequentes. Numa forma de realização, a administração de uma dose inicial do anticorpo ou fragmento de anticorpo é seguida da

administração de duas ou mais doses subsequentes. Noutra forma de realização, a administração de uma dose inicial do anticorpo ou fragmento de anticorpo é seguida da administração de uma ou mais doses subsequentes, e em que as referidas uma ou mais doses subsequentes são numa quantidade que é aproximadamente a mesma ou inferior à dose inicial. Noutra forma de realização, a administração de uma dose inicial do anticorpo ou fragmento de anticorpo é seguida da administração de uma ou mais doses subsequentes, e em que pelo menos uma das doses subsequentes é numa quantidade que é superior à dose inicial. Ainda noutra forma de realização, a administração do anticorpo ou fragmento de anticorpo é uma vez para cada episódio de gota aguda. No contexto destas formas de realização, é descrito um anticorpo ou fragmento de anticorpo (e.g., um anticorpo neutralizante) que liga a IL-1 $\beta$  com uma constante de dissociação inferior a 100 pM. Um tal anticorpo ou seu fragmento pode competir com a ligação de um anticorpo que tem a região variável da cadeia leve de SEQ ID NO:5 e a região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6 a IL-1 $\beta$ .

Numa forma de realização, são administradas duas ou mais, três ou mais, quatro ou mais, cinco ou mais, seis ou mais, sete ou mais, oito ou mais, nove ou mais, dez ou mais ou onze ou mais doses subsequentes do anticorpo ou seu fragmento. Noutra forma de realização, a administração da dose inicial e de cada uma ou mais doses subsequentes são separadas umas das outras por um intervalo de pelo menos cerca de duas semanas, pelo menos cerca de três semanas,

pelo menos cerca de um mês, pelo menos cerca de dois meses, pelo menos cerca de três meses, pelo menos cerca de quatro meses, pelo menos cerca de cinco meses, pelo menos cerca de seis meses, pelo menos cerca de sete meses, pelo menos cerca de oito meses, pelo menos cerca de nove meses, pelo menos cerca de dez meses, pelo menos cerca de onze meses, ou pelo menos cerca de doze meses. No contexto destas formas de realização, é descrito um anticorpo ou fragmento de anticorpo (e.g., um anticorpo neutralizante) que liga a IL-1 $\beta$  com uma constante de dissociação inferior a 100 pM. Um tal anticorpo ou seu fragmento pode competir com a ligação de um anticorpo que tem a região variável da cadeia leve de SEQ ID NO:5 e a região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6 à IL-1 $\beta$ .

Noutra forma de realização, o anticorpo ou fragmento é administrado em uma ou mais doses de 5 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento, 3 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento, 2 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento, 1 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento, 0,75 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento, 0,5 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento, 0,3 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento, 0,1 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento, 0,03 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento, 0,01 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento, 0,003 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento ou 0,001 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento. Preferencialmente, em cada uma das formas de realização supramencionadas, o anticorpo ou fragmento é administrado em uma ou mais doses de pelo menos

0,01 mg/kg de anticorpo ou fragmento, pelo menos 0,01 mg/kg de anticorpo ou fragmento, ou pelo menos 0,03 mg/kg de anticorpo ou fragmento. Preferencialmente, o anticorpo ou fragmento é administrado em uma ou mais doses de 0,001 mg/kg a 1 mg/kg, 0,001 mg/kg a 0,3 mg/kg, 0,003 mg/kg a 1 mg/kg, 0,003 mg/kg a 0,3 mg/kg. As quantidades de dosagem anteriores referem-se a mg (anticorpo ou fragmento)/kg (peso do indivíduo a ser tratado). No contexto destas formas de realização, é descrito um anticorpo ou fragmento de anticorpo (e.g., um anticorpo neutralizante), que liga a IL-1 $\beta$  com uma constante de dissociação inferior a 100 pM. Um tal anticorpo ou seu fragmento pode competir com a ligação de um anticorpo que tem a região variável da cadeia leve de SEQ ID NO:5 e a região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6 à IL-1 $\beta$ .

Noutra forma de realização, a dose inicial e a uma ou mais doses subsequentes de anticorpo ou seu fragmento são, cada, desde cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 10 mg/kg de anticorpo, desde cerca de 0,03 a cerca de 1 mg/kg de anticorpo, desde cerca de 0,03 a cerca de 0,3 mg/kg de anticorpo, desde cerca de 0,05 a cerca de 5 mg/kg de anticorpo, desde cerca de 0,05 mg/kg a cerca de 3 mg/kg de anticorpo, desde cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 3 mg/kg de anticorpo, desde cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 1 mg/kg de anticorpo, desde cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 0,5 mg/kg de anticorpo, desde cerca de 0,3 mg/kg a cerca de 5 mg/kg de anticorpo, desde cerca de 0,3 mg/kg a cerca de 3 mg/kg de anticorpo, desde cerca de 0,3 mg/kg a cerca de

1 mg/kg de anticorpo, desde cerca de 0,5 mg/kg a cerca de 5 mg/kg de anticorpo, desde cerca de 0,5 mg/kg a cerca de 3 mg/kg de anticorpo, desde cerca de 0,5 mg/kg a cerca de 1 mg/kg de anticorpo, desde cerca de 1 mg/kg a cerca de 5 mg/kg de anticorpo, ou desde cerca de 1 mg/kg a cerca de 3 mg/kg de anticorpo. Em certas formas de realização, são administradas duas ou mais, três ou mais, quatro ou mais, cinco ou mais, seis ou mais, sete ou mais, oito ou mais, nove ou mais, dez ou mais ou onze ou mais doses subsequentes do anticorpo ou fragmento. As quantidades de dosagem anteriores referem-se a mg (anticorpo ou fragmento)/kg (peso do indivíduo a ser tratado). O mesmo se aplica a seguir se é mencionada uma quantidade de dosagem. No contexto destas formas de realização, é descrito um anticorpo ou fragmento de anticorpo (e.g., um anticorpo neutralizante), que liga a IL-1 $\beta$  com uma constante de dissociação inferior a 100 pM. Um tal anticorpo ou seu fragmento pode competir com a ligação de um anticorpo que tem a região variável da cadeia leve de SEQ ID NO:5 e a região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6 à IL-1 $\beta$ .

Noutro aspecto, a invenção proporciona um anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento para ser utilizado no tratamento de gota num indivíduo (e.g., humano), em que o anticorpo ou seu fragmento tem uma região variável da cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6, em que a utilização comprehende a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento ao indivíduo como uma

dose inicial de cerca de 5 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento, 3 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento, 2 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento, 1 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento, 0,75 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento, 0,5 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento, 0,3 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento, 0,1 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento, ou 0,03 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento, e uma multiplicidade de doses subsequentes de anticorpo ou fragmento numa quantidade aproximadamente igual ou inferior à dose inicial. No contexto destas formas de realização, é descrito um anticorpo ou fragmento de anticorpo (e.g., um anticorpo neutralizante), que liga a IL-1 $\beta$  com uma constante de dissociação inferior a 100 pM. Um tal anticorpo ou seu fragmento pode competir com a ligação de um anticorpo que tem a região variável da cadeia leve de SEQ ID NO:5 e a região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6 à IL-1 $\beta$ .

Preferencialmente, nas formas de realização supramencionadas em que o anticorpo ou fragmento é administrado como uma dose inicial e uma multiplicidade de doses subsequentes, a dose de anticorpo ou fragmento é de pelo menos 0,001 mg/kg de anticorpo ou fragmento, pelo menos 0,003 mg/kg de anticorpo ou fragmento, pelo menos 0,01 mg/kg de anticorpo ou fragmento, pelo menos, 0,03 mg/kg de anticorpo ou fragmento, pelo menos 0,05 mg/kg de anticorpo ou fragmento, ou pelo menos 0,09 mg/kg de anticorpo ou fragmento. No contexto destas formas de

realização, é descrito um anticorpo ou fragmento de anticorpo (e.g., um anticorpo neutralizante), que liga a IL-1 $\beta$  com uma constante de dissociação inferior a 100 pM. Um tal anticorpo ou seu fragmento pode competir com a ligação de um anticorpo que tem a região variável da cadeia leve de SEQ ID NO:5 e a região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6 à IL-1 $\beta$ .

Ainda noutro aspecto da invenção, o anticorpo ou fragmento é administrado como uma dose fixa, independente de uma dose por proporção de peso do indivíduo. Numa forma de realização, o anticorpo ou fragmento é administrado em uma ou mais doses fixas de 1000 mg ou menos de anticorpo ou fragmento, 750 mg ou menos de anticorpo ou fragmento, 500 mg ou menos de anticorpo ou fragmento, 250 mg ou menos de anticorpo ou fragmento, 100 mg ou menos de anticorpo ou fragmento, cerca de 25 mg ou menos de anticorpo ou fragmento, cerca de 10 mg ou menos de anticorpo ou fragmento ou cerca de 1,0 mg ou menos de anticorpo ou fragmento. Noutra forma de realização, o anticorpo ou fragmento é administrado em uma ou mais doses fixas de pelo menos cerca de 0,1 mg de anticorpo ou fragmento, pelo menos cerca de 1 mg de anticorpo ou fragmento, pelo menos cerca de 5 mg de anticorpo ou fragmento, ou pelo menos cerca de 10 mg de anticorpo ou fragmento. No contexto destas formas de realização, é descrito um anticorpo ou fragmento de anticorpo (e.g., um anticorpo neutralizante), que liga a IL-1 $\beta$  com uma constante de dissociação inferior a 100 pM. Um tal anticorpo ou seu fragmento pode competir com a

ligação de um anticorpo que tem a região variável da cadeia leve de SEQ ID NO:5 e a região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6 à IL-1 $\beta$ .

Em certas formas de realização, a dose fixa é desde cerca de 1 mg a cerca de 10 mg, cerca de 1 mg a cerca de 25 mg, cerca de 10 mg a cerca de 25 mg, cerca de 10 mg a cerca de 50 mg, cerca de 10 mg a cerca de 100 mg, cerca de 25 mg a cerca de 50 mg, cerca de 25 mg a cerca de 100 mg, cerca de 50 mg a cerca de 100 mg, cerca de 50 mg a cerca de 150 mg, cerca de 100 mg a cerca de 150 mg, cerca de 100 mg a cerca de 200 mg, cerca de 150 mg a cerca de 200 mg, cerca de 150 mg a cerca de 250 mg, cerca de 200 mg a cerca de 250 mg, cerca de 200 mg a cerca de 300 mg, cerca de 250 mg a cerca de 300 mg, cerca de 250 mg a cerca de 500 mg, cerca de 300 mg a cerca de 400 mg, cerca de 400 mg a cerca de 500 mg, cerca de 400 mg a cerca de 600 mg, cerca de 500 mg a cerca de 750 mg, cerca de 600 mg a cerca de 750 mg, cerca de 700 mg a cerca de 800 mg, cerca de 750 mg a cerca de 1000 mg. Numa forma de realização preferida, a dose fixa é administrada em uma ou mais doses de cerca de 0,1 mg a cerca de 100 mg, cerca de 1,0 mg a cerca de 100 mg ou cerca de 1,0 mg a cerca de 50 mg. Noutra forma de realização preferida, a dose fixa é seleccionada do grupo consistindo de cerca de 1 mg a cerca de 10 mg, cerca de 1 mg a cerca de 25 mg, cerca de 10 mg a cerca de 25 mg, cerca de 10 mg a cerca de 100 mg, cerca de 25 mg a cerca de 50 mg, cerca de 50 mg a cerca de 100 mg, cerca de 100 mg a cerca de 150 mg, cerca de 150 mg a cerca de 200 mg, cerca de 200 mg a cerca

de 250 mg. No contexto destas formas de realização, é descrito um anticorpo ou fragmento de anticorpo (e.g., um anticorpo neutralizante), que liga a IL-1 $\beta$  com uma constante de dissociação inferior a 100 pM. Um tal anticorpo ou seu fragmento pode competir com a ligação de um anticorpo que tem a região variável da cadeia leve de SEQ ID NO:5 e a região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6 à IL-1 $\beta$ .

Noutro aspecto, a invenção proporciona um anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento para ser utilizado no tratamento de gota num indivíduo, em que o anticorpo ou seu fragmento tem uma região variável da cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6, em que a utilização compreende a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento ao indivíduo, em que a administração de uma dose inicial do anticorpo ou fragmento de anticorpo é seguida da administração de uma ou mais doses subsequentes, e em que a concentração plasmática do referido anticorpo ou fragmento de anticorpo no humano é permitida descer abaixo de um nível de cerca de 0,1 ug/mL durante um intervalo de tempo maior do que cerca de 1 semana e menor do que cerca de 6 meses entre administrações durante um curso de tratamento com a referida dose inicial e uma ou mais doses subsequentes. Numa forma de realização, a concentração plasmática do referido anticorpo ou fragmento de anticorpo é permitida descer abaixo de um nível de cerca de 0,07 ug/mL, cerca de 0,05 ug/mL, cerca de 0,03 ug/mL ou

cerca de 0,01 ug/mL durante um intervalo de tempo maior do que cerca de 1 semana e menor do que cerca de 5 meses, cerca de 4 meses, cerca de 3 meses, cerca de 2 meses, cerca de 1 mês, cerca de 3 semanas, ou cerca de 2 semanas entre administrações. Numa forma de realização, estes valores plasmáticos referem-se a valores obtidos para um indivíduo que é tratado com o anticorpo de fragmento de acordo com a invenção. Numa forma de realização, um tal indivíduo pode ser um doente que sofre de gota. No contexto destas formas de realização, é descrito um anticorpo ou fragmento de anticorpo (e.g., um anticorpo neutralizante), que liga a IL-1 $\beta$  com uma constante de dissociação inferior a 100 pM. Um tal anticorpo ou seu fragmento pode competir com a ligação de um anticorpo que tem a região variável da cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e a região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6 à IL-1 $\beta$ .

A invenção considera que o anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento a ser utilizado como aqui descrito, em que o anticorpo ou seu fragmento tem uma região variável da cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6, pode ser administrado em qualquer uma das quantidades de dose, números de administrações subsequentes e intervalos de dosagem entre administrações supramencionados, e que qualquer das quantidades de dose, números de administrações subsequentes e intervalos de dosagem entre administrações divulgados podem ser combinados entre si em regímenes alternativos para modular o benefício terapêutico. Em certas formas de realização, a

uma ou mais doses subsequentes são numa quantidade que é aproximadamente igual ou inferior à da primeira dose administrada. Noutra forma de realização, a uma ou mais doses subsequentes são numa quantidade que é aproximadamente superior à primeira dose administrada. Preferencialmente, o anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento é administrado por injecção subcutânea, intramuscular ou intravenosa. A invenção considera que cada dose de anticorpo ou fragmento pode ser administrada em um ou mais sítios. No contexto destas formas de realização, é descrito um anticorpo ou fragmento de anticorpo (e.g., um anticorpo neutralizante), que liga a IL-1 $\beta$  com uma constante de dissociação inferior a 100 pM. Um tal anticorpo ou seu fragmento pode competir com a ligação de um anticorpo que tem a região variável da cadeia leve de SEQ ID NO:5 e a região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6 à IL-1 $\beta$ .

Numa forma de realização, o anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento, em que o anticorpo ou seu fragmento tem uma região variável da cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6, é administrado em associação com pelo menos um outro tratamento medicamente aceite para a doença, condição ou complicaçāo. Noutra forma de realização, o pelo menos um outro tratamento medicamente aceite para a doença, condição ou complicaçāo é reduzido ou descontinuado, enquanto o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento é mantido a um regímen de administração constante. Noutra forma de realização, o pelo menos um outro tratamento medicamente aceite para a doença, condição

ou complicaçāo é reduzido ou descontinuado, e o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento é reduzido. Noutra forma de realização, o pelo menos um outro tratamento medicamente aceite para a doença, condiçāo ou complicaçāo é reduzido ou descontinuado, e o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento é aumentado. Ainda noutra forma de realização, o pelo menos um outro tratamento medicamente aceite para a doença, condiçāo ou complicaçāo é mantido e o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento é reduzido ou descontinuado. Ainda noutra forma de realização, o pelo menos um outro tratamento medicamente aceite para a doença, condiçāo ou complicaçāo e o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento são reduzidos ou descontinuados. No contexto destas formas de realização, é descrito um anticorpo ou fragmento de anticorpo (e.g., um anticorpo neutralizante), que liga a IL-1 $\beta$  com uma constante de dissociaçāo inferior a 100 pM. Um tal anticorpo ou seu fragmento pode competir com a ligação de um anticorpo que tem a regiāo variável da cadeia leve de SEQ ID NO:5 e a regiāo variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6 à IL-1 $\beta$ .

Noutro aspecto, o anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento, em que o anticorpo ou seu fragmento tem uma regiāo variável da cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e uma regiāo variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6, para as utilizações aqui proporcionadas são em conjunto com pelo menos um método de tratamento adicional, em que o referido método de tratamento adicional comprehende a administraçāo

de pelo menos uma composição farmacêutica compreendendo um agente activo diferente do anticorpo IL-1 $\beta$  ou fragmento. Ainda noutro aspecto, as utilizações previnem ou atrasam a necessidade de pelo menos um método de tratamento adicional, em que o referido método de tratamento adicional compreende a administração de pelo menos uma composição farmacêutica compreendendo um agente activo diferente do anticorpo IL-1 $\beta$  ou fragmento. Ainda noutro aspecto, as utilizações reduzem a quantidade, frequência ou duração de pelo menos um método de tratamento adicional, em que o referido método de tratamento adicional compreende a administração de pelo menos uma composição farmacêutica compreendendo um agente activo diferente de um anticorpo IL-1 $\beta$  ou fragmento. Ainda noutra forma de realização, o tratamento com o pelo menos um agente activo é mantido. Noutra forma de realização, o tratamento com o pelo menos um agente activo é reduzido ou descontinuado, enquanto o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento é mantido num regímen de administração constante. Noutra forma de realização, o tratamento com o pelo menos um agente activo é reduzido ou descontinuado e o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento é reduzido. Noutra forma de realização, o tratamento com o pelo menos um agente activo é reduzido ou descontinuado, e o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento é aumentado. Ainda noutra forma de realização, o tratamento com o pelo menos um agente activo é mantido e o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento é reduzido ou descontinuado. Ainda noutra forma de realização, o tratamento com o pelo menos

um agente activo e o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento são reduzidos ou descontinuados. No contexto destas formas de realização, é descrito um anticorpo ou fragmento de anticorpo (e.g., um anticorpo neutralizante), que liga a IL-1 $\beta$  com uma constante de dissociação inferior a 100 pM. Um tal anticorpo ou seu fragmento pode competir com a ligação de um anticorpo que tem a região variável da cadeia leve de SEQ ID NO:5 e a região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6 à IL-1 $\beta$ .

Noutro aspecto, a invenção proporciona um anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento para ser utilizado no tratamento de gota num indivíduo, em que o anticorpo ou seu fragmento tem uma região variável da cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6, em que a utilização comprehende a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento ao indivíduo, em que a administração de uma dose inicial do anticorpo ou fragmento de anticorpo é seguida da administração de uma ou mais doses subsequentes, e em que a concentração plasmática do referido anticorpo ou fragmento de anticorpo no humano é mantida a um nível de pelo menos cerca de 0,03 ug/mL, pelo menos cerca de 0,05 ug/mL, pelo menos cerca de 0,08 ug/mL, pelo menos cerca de 0,1 ug/mL, pelo menos cerca de 0,15 ug/mL, pelo menos cerca de 0,2 ug/mL, pelo menos cerca de 0,25 ug/mL, pelo menos cerca de 0,3 ug/mL, pelo menos cerca de 0,4 ug/mL, pelo menos cerca de 0,5 ug/mL, pelo menos cerca de 0,6 ug/mL, pelo menos cerca de 0,8 ug/mL, pelo menos

cerca de 1 ug/mL, pelo menos cerca de 1,5 ug/mL, pelo menos cerca de 2 ug/mL, pelo menos cerca de 3 ug/mL, pelo menos cerca de 4 ug/mL, ou pelo menos cerca de 5 ug/mL durante um curso de tratamento com a referida dose inicial e uma ou mais doses subsequentes. Numa forma de realização, estes valores plasmáticos referem-se a valores obtidos para um indivíduo que é tratado com o anticorpo ou fragmento de acordo com a invenção. Numa forma de realização, um tal indivíduo pode ser um doente que sofre de gota. No contexto destas formas de realização, é descrito um anticorpo ou fragmento de anticorpo (e.g., um anticorpo neutralizante), que liga a IL-1 $\beta$  com uma constante de dissociação inferior a 100 pM. Um tal anticorpo ou seu fragmento pode competir com a ligação de um anticorpo que tem a região variável da cadeia leve de SEQ ID NO:5 e a região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6 à IL-1 $\beta$ .

Noutro aspecto, a invenção proporciona um anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento para ser utilizado no tratamento de gota num indivíduo, em que o anticorpo ou seu fragmento tem uma região variável da cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6, em que a utilização compreende a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento ao indivíduo, em que o anticorpo ou seu fragmento tem uma IC<sub>50</sub> inferior à de um antagonista do receptor de IL-1 $\beta$  num ensaio de inibição de IL-1 $\beta$  em sangue inteiro humano que mede a produção de IL-8 induzida por IL-1 $\beta$ . Numa forma de realização, o anticorpo ou fragmento tem

uma  $IC_{50}$  que é inferior a cerca de 90%, 80%, 70%, 60%, 50% da  $IC_{50}$  de um antagonista do receptor de IL-1 $\beta$  num ensaio de inibição de IL-1 $\beta$  em sangue inteiro humano que mede a produção de IL-8 induzida por IL-1 $\beta$ . Numa outra forma de realização, o anticorpo ou fragmento tem uma  $IC_{50}$  que é inferior a cerca de 40%, 30%, 20%, 10% da  $IC_{50}$  de um antagonista do receptor de IL-1 $\beta$  num ensaio de inibição de IL-1 $\beta$  em sangue inteiro humano que mede a produção de IL-8 induzida por IL-1 $\beta$ . Numa forma de realização preferida, o anticorpo ou fragmento tem uma  $IC_{50}$  que é inferior a cerca de 8%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% da  $IC_{50}$  de um antagonista do receptor de IL-1 $\beta$  num ensaio de inibição de IL-1 $\beta$  em sangue inteiro humano que mede a produção de IL-8 induzida por IL-1 $\beta$ . Numa forma de realização, o antagonista do receptor de IL-1 $\beta$  é anacina (i.e., Kineret®). No contexto destas formas de realização, é descrito um anticorpo ou fragmento de anticorpo (e.g., um anticorpo neutralizante), que liga a IL-1 $\beta$  com uma constante de dissociação inferior a 100 pM. Um tal anticorpo ou seu fragmento pode competir com a ligação de um anticorpo que tem a região variável da cadeia leve de SEQ ID NO:5 e a região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6 à IL-1 $\beta$ .

Noutro aspecto, a invenção proporciona um anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento para ser utilizado no tratamento de gota num indivíduo, em que o anticorpo ou seu fragmento tem uma região variável da cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6, em que a utilização compreende a administração de uma

quantidade terapeuticamente eficaz do referido anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento ao indivíduo, em que o anticorpo ou seu fragmento proporciona inibição *in vivo* da libertação de IL-6 estimulada por IL-1 $\beta$  em murganhos em comparação com um anticorpo de controlo utilizando um ensaio que é descrito por Economides et al., *Nature Med.*, 9:47-52 (2003). Numa forma de realização o anticorpo ou fragmento proporciona inibição *in vivo* da libertação de IL-6 estimulada por IL-1 $\beta$  em murganhos de pelo menos cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50% em comparação com o anticorpo de controlo. Numa outra forma de realização, o anticorpo ou fragmento proporciona inibição *in vivo* da libertação de IL-6 estimulada por IL-1 $\beta$  em murganhos de pelo menos cerca de 60%, 70%, 80%, 90%, 95% em comparação com o anticorpo de controlo. Numa forma de realização, o anticorpo de controlo é um anticorpo de controlo de isotipo. No contexto destas formas de realização, é descrito um anticorpo ou fragmento de anticorpo (e.g., um anticorpo neutralizante), que liga a IL-1 $\beta$  com uma constante de dissociação inferior a 100 pM. Um tal anticorpo ou seu fragmento pode competir com a ligação de um anticorpo que tem a região variável da cadeia leve de SEQ ID NO: e a região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6 a IL-1 $\beta$ .

Noutro aspecto, a invenção proporciona um anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento para ser utilizado no tratamento de gota num indivíduo, em que o anticorpo ou seu fragmento tem uma região variável da cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia pesada de SEQ ID

NO:6, em que a utilização comprehende a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento ao indivíduo, em que o anticorpo ou seu fragmento inibe a produção de citocinas induzida por *Staphylococcus epidermidis* em sangue inteiro humano em comparação com um controlo onde não é utilizado qualquer anticorpo. Numa forma de realização o anticorpo ou fragmento proporciona um maior nível de inibição da produção de citocinas induzida por *Staphylococcus epidermidis* em sangue inteiro humano em pelo menos cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50% em comparação com o controlo. Numa outra forma de realização, o anticorpo ou fragmento proporciona um maior nível de inibição de produção de citocinas induzida por *Staphylococcus epidermidis* em sangue inteiro humano em pelo menos cerca de 60%, 70%, 80%, 90%, 95% em comparação com o controlo. Numa forma de realização, as citocinas inibidas são IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-1Ra, TNF $\alpha$  ou IFN $\gamma$ . No contexto destas formas de realização, é descrito um anticorpo ou fragmento de anticorpo (e.g., um anticorpo neutralizante), que liga a IL-1 $\beta$  com uma constante de dissociação inferior a 100 pM. Um tal anticorpo ou seu fragmento pode competir com a ligação de um anticorpo que tem a região variável da cadeia leve de SEQ ID NO:5 e a região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6 à IL-1 $\beta$ .

Noutro aspecto, a invenção divulga um anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento para ser utilizado no tratamento de gota, em que o anticorpo ou seu fragmento tem uma região variável da cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e uma

região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6 e o qual tem uma IC<sub>50</sub> inferior à de um antagonista do receptor de IL-1 $\beta$  num ensaio de inibição de IL-1 $\beta$  em sangue inteiro humano que mede a produção de IL-8 induzida por IL-1 $\beta$ . Numa forma de realização, o antagonista do receptor de IL-1 $\beta$  é anakinra (*i.e.*, Kineret $\circledR$ ). No contexto destas formas de realização, é descrito um anticorpo ou fragmento de anticorpo (*e.g.*, um anticorpo neutralizante), que liga a IL-1 $\beta$  com uma constante de dissociação inferior a 100 pM. Um tal anticorpo ou seu fragmento pode competir com a ligação de um anticorpo que tem a região variável da cadeia leve de SEQ ID NO:5 e a região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6 à IL-1 $\beta$ .

Noutro aspecto da invenção, é considerado um medicamento para ser utilizado no tratamento ou prevenção de gota compreendendo um anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento, em que o anticorpo ou seu fragmento tem uma região variável da cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6. Em qualquer uma das utilizações, o medicamento pode ser coordenado com tratamento que utiliza um segundo agente activo. Noutra forma de realização da invenção, é considerada uma associação sinérgica do anticorpo da invenção para ser utilizado no tratamento de um doente que apresenta sintomas ou em risco de desenvolver uma doença ou condição como aquí divulgada, em que o medicamento é coordenado com um tratamento que utiliza um segundo agente activo. São consideradas formas de realização de qualquer uma das utilizações

supramencionadas em que a quantidade do anticorpo ou fragmento de ligação à IL-1 $\beta$  no medicamento está numa dose eficaz para reduzir a dosagem do segundo agente activo necessário para conseguir um efeito terapêutico. No contexto destas formas de realização, é descrito um anticorpo ou fragmento de anticorpo (e.g., um anticorpo neutralizante), que liga a IL-1 $\beta$  com uma constante de dissociação inferior a 100 pM. Um tal anticorpo ou seu fragmento pode competir com a ligação de um anticorpo que tem a região variável da cadeia leve de SEQ ID NO:5 e a região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6 à IL-1 $\beta$ .

Ainda noutro aspecto da divulgação, é proporcionado um artigo de fabrico, compreendendo um recipiente, uma composição dentro do recipiente que compreende um anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento, em que o anticorpo ou seu fragmento tem uma região variável da cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6, e uma bula contendo instruções para administrar o anticorpo ou fragmento a um humano necessitado de tratamento de acordo com as utilizações supramencionadas da invenção. Numa forma de realização, o recipiente compreende ainda um transportador, excipiente ou diluente farmaceuticamente adequado. Numa forma de realização relacionada, a composição dentro do recipiente compreende ainda um segundo agente activo. No contexto destas formas de realização, é descrito um anticorpo ou fragmento de anticorpo (e.g., um anticorpo neutralizante), que liga a IL-1 $\beta$  com uma constante de dissociação inferior a 100 pM. Um tal anticorpo ou

seu fragmento pode competir com a ligação de um anticorpo que tem a região variável da cadeia leve de SEQ ID NO:5 e a região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6 à IL-1 $\beta$ .

São também considerados kits na presente divulgação. Numa forma de realização, um kit compreende uma quantidade terapêutica ou profilacticamente eficaz de um anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento, em que o anticorpo ou seu fragmento tem uma região variável da cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6, embalado num recipiente, tal como um frasquinho ou frasco, e compreendendo ainda uma etiqueta fixa ou embalada com o recipiente, descrevendo a etiqueta o conteúdo do recipiente e proporcionando indicações e/ou instruções no que se refere à utilização do conteúdo do recipiente para o tratamento ou prevenção de uma doença ou condição de acordo com as utilizações supramencionadas da invenção. Numa forma de realização, o recipiente compreende ainda um transportador, excipiente ou diluente farmaceuticamente adequado. Numa forma de realização relacionada, o recipiente contém ainda um segundo agente activo. No contexto destas formas de realização, é descrito um anticorpo ou fragmento de anticorpo (e.g., um anticorpo neutralizante), que liga a IL-1 $\beta$  com uma constante de dissociação inferior a 100 pM. Um tal anticorpo ou seu fragmento pode competir com a ligação de um anticorpo que tem a região variável da cadeia leve de SEQ ID NO:5 e a região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6 à IL-1 $\beta$ .

Numa forma de realização, o artigo de fabrico, kit ou medicamento é para ser utilizado no tratamento ou prevenção de gota num indivíduo. Noutra forma de realização, as instruções de uma bula de um artigo de fabrico ou etiqueta de um kit compreendem instruções para a administração do anticorpo ou fragmento de acordo com qualquer das quantidades de dose, números de administrações subsequentes e intervalos de dosagem entre administrações supramencionados, bem como qualquer associação de quantidades de dose, números de administrações subsequentes e intervalos de dosagem entre administrações aqui descritos. No contexto de ainda outra forma de realização, a qual é descrita no contexto da presente invenção, o recipiente do kit ou artigo de fabrico é uma seringa pré-cheia. Nestas formas de realização, pode utilizar-se, por exemplo, um anticorpo ou fragmento de anticorpo (e.g., um anticorpo neutralizante) que liga a IL-1 $\beta$  com uma constante de dissociação inferior a 100 pM. Um tal anticorpo ou seu fragmento pode competir com a ligação de um anticorpo que tem a região variável da cadeia leve de SEQ ID NO:5 e a região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6 à IL-1 $\beta$ .

Noutro aspecto da divulgação, é proporcionado um anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento descrito para ser utilizado no tratamento da libertação, induzida por cristais de urato monossódico (MSU), de uma citocina pró-inflamatória num indivíduo (e.g., indivíduo humano), em que o anticorpo ou seu fragmento tem uma região variável da cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia

pesada de SEQ ID NO:6, em que a referida utilização compreende a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento ao indivíduo. Numa forma de realização, a citocina pró-inflamatória é IL-1 $\beta$ . Noutra forma de realização, a citocina pró-inflamatória é IL-6. No contexto destas formas de realização, é descrito um anticorpo ou fragmento de anticorpo (e.g., um anticorpo neutralizante), que liga a IL-1 $\beta$  com uma constante de dissociação inferior a 100 pM. Um tal anticorpo ou seu fragmento pode competir com a ligação de um anticorpo que tem a região variável da cadeia leve de SEQ ID NO:5 e a região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6 à IL-1 $\beta$ .

**BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

A Fig. 1 é um gráfico que mostra os resultados de uma experiência de inibição de IL-1 $\beta$  *in vitro* para o anticorpo designado AB7 e para o Kineret<sup>®</sup> que envolve produção de IL-8 induzida por IL-1.

A Fig. 2A é um gráfico que mostra os resultados de uma experiência de inibição de IL-1 $\beta$  *in vivo* para os anticorpos designados AB5 e AB7 que envolve a libertação de IL-6 estimulada por IL-1.

A Fig. 2B é um gráfico que mostra os resultados de uma experiência de inibição de IL-1 $\beta$  *in vivo* para os anticorpos designados AB7 que envolve a libertação de IL-6

estimulada por IL-1, e que compara a inibição da IL-1 $\beta$  humana (painel A) contra a de murganho (painel B).

A Fig. 3 é um gráfico que mostra as concentrações séricas após administração de 0,1, 1 ou 10 mg/kg de um anticorpo anti-IL-1 $\beta$  em ratazanas.

A Fig. 4 é um gráfico que mostra as concentrações séricas após administração de 0,3 ou 3 mg/kg de um anticorpo anti-IL-1 $\beta$  em Macacos cinomolgos.

A Fig. 5 é um gráfico que modela os perfis de concentração plasmática de um anticorpo anti-IL-1 $\beta$  em Macacos cinomolgos após cinco doses mensais de 0,1, 0,3, 1 ou 3 mg/kg.

A Fig. 6 é um quadro que mostra a redução da produção de citocinas induzida por *Staphylococcus epidermidis* em sangue inteiro humano por tratamento com um anticorpo anti-IL-1 $\beta$ .

A Fig. 7 é um gráfico que mostra a farmacocinética do AB7 em humanos após administração de uma dose de 0,01 mg/kg de anticorpo.

A Fig. 8 é um gráfico que mostra as concentrações séricas após administração de 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, ou 1,0 mg/kg de um anticorpo anti-IL-1 $\beta$  em indivíduos humanos com diabetes Tipo 2.

A Figura 9 é um gráfico que mostra a alteração percentual mediana na CRP no dia 28 após administração de 0,01, 0,03, 0,1, 0,3 ou 1,0 mg/kg de um anticorpo anti-IL-1 $\beta$  a indivíduos humanos com diabetes Tipo 2.

A Fig. 10A e 10B são gráficos que mostram a eficácia de um anticorpo anti-IL-1 $\beta$  num modelo degota aguda induzida por cristais de MSU em murganho.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA

A presente invenção é dirigida a um anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento para ser utilizado no tratamento de gota (e.g., gota aguda, gota crónica, gota refractária) num indivíduo, em que o anticorpo ou seu fragmento tem uma região variável da cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6, em que a utilização comprehende a administração ao indivíduo de uma ou mais doses de um anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento. Devido aos problemas com os tratamentos actuais, são necessárias novas terapias para tratar a gota para substituir ou complementar as abordagens farmacêuticas disponíveis. As utilizações aqui divulgadas comprehendem, por exemplo, a administração de um anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento, em que o anticorpo ou seu fragmento tem uma região variável da cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6. As utilizações que visam directamente o ligando IL-1 $\beta$  com um anticorpo, em

particular anticorpos que exibem alta afinidade, proporcionam vantagens em relação a outros métodos de tratamento potenciais, tais como os antagonistas do receptor de IL-1 $\beta$  (e.g., IL-1Ra, Anakinra, Kineret®). O desafio para os agentes terapêuticos baseados em antagonistas do receptor de IL-1 é a necessidade de esse agente terapêutico ocupar um grande número de receptores, o que é uma tarefa formidável uma vez que estes receptores são largamente expressos em todas as células excepto nos glóbulos vermelhos (Dinarello, Curr. Opin. Pharmacol. 4:378-385, 2004). Na maioria das doenças imunomedidas, tais como as doenças aqui divulgadas, a quantidade de citocina IL-1 $\beta$  que é mensurável nos fluidos corporais ou associada a células activadas é relativamente baixa. Como se ilustra nos Exemplos abaixo, nós determinamos surpreendentemente que os anticorpos, tais como aqueles aqui divulgados, podem ser utilizados para conseguir o nível de actividade desejado ao longo de uma gama larga de doses, incluindo a doses muito baixas. Assim, um método de tratamento e/ou prevenção que vise directamente o ligando IL-1 $\beta$  proporcionaria uma estratégia superior.

A IL-1 $\beta$  é uma citocina pró-inflamatória segregada por um número de tipos de células diferentes incluindo monócitos e macrófagos. Quando libertada como parte de uma reacção inflamatória, a IL-1 $\beta$  produz uma gama de efeitos biológicos, principalmente mediados através da indução de outros mediadores inflamatórios tais como corticotrofina, factor plaquetário-4, prostaglandina E2 (PGE2), IL-6 e IL-

8. A IL-1 $\beta$  induz efeitos inflamatórios locais e sistémicos através da activação do receptor de IL-1 presente em quase todos os tipos de células.

A família da interleucina-1 (IL-1) de citocinas tem sido implicada em vários estados patológicos tais como artrite reumatóide (RA), osteoartrite, doença de Crohn, colite ulcerosa (UC), choque séptico, doença pulmonar obstrutiva crónica (COPD), asma, doença do enxerto contra o hospedeiro, aterosclerose, leucemia de células T do adulto, mieloma múltiplo, esclerose múltipla, acidente vascular cerebral e doença de Alzheimer. Os membros da família da IL-1 incluem IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e IL-1Ra. Embora relacionadas quanto à sua aptidão para ligarem-se aos receptores de IL-1 (IL-1R1, IL-1R2), cada uma destas citocinas é expressa por um gene diferente e tem uma sequência de aminoácidos primária diferente. Além disso, as actividades fisiológicas destas citocinas podem distinguir-se umas das outras.

Os compostos que rompem a sinalização do receptor de IL-1 foram investigados como agentes terapêuticos para tratar doenças mediadas pela IL-1, tais como, por exemplo, algumas das doenças supramencionadas. Estes compostos incluem a IL-1Ra recombinante (Amgen Inc., Thousand Oaks, CA), péptido "armadilha" do receptor de IL-1 (Regeneron Inc., Tarrytown, NY), bem como anticorpos IL-1 $\beta$  de origem animal e anticorpos IL-1 $\beta$  recombinantes e seus fragmentos.

Como se referiu acima, o polipéptido antagonista

do receptor de IL-1 (IL-1Ra) foi sugerido para ser utilizado no tratamento de gota (So et al., 2007, *ibid*; McGonagle et al., 2007, *ibid*), mas permanece a necessidade de um meio eficaz para tratar a gota, em particular daqueles que não requeiram injecções repetidas, diárias. Um desafio adicional para os agentes terapêuticos baseados em antagonistas do receptor de IL-1 é a necessidade desses agentes terapêuticos ocuparem um grande número de receptores, o que é uma tarefa formidável uma vez que estes receptores são amplamente expressos em todas as células excepto nos glóbulos vermelhos (Dinarello, *Curr. Opin. Pharmacol.* 4:378-385, 2004). Na maioria das doenças imunomediadas, tais como as doenças aqui divulgadas, a quantidade de citocina IL-1 $\beta$  que é mensurável nos fluidos corporais ou associada a células activadas é relativamente baixa. Assim, um método de tratamento e/ou prevenção que vise directamente o ligando IL-1 $\beta$  é uma estratégia superior, em particular quando se administra um anticorpo IL-1 $\beta$  com alta afinidade.

A presente invenção proporciona um anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento para ser utilizado no tratamento e/ou prevenção de gota num indivíduo (e.g., mamífero, humano), em que o anticorpo ou seu fragmento tem uma região variável da cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6.

Como se mostra no Exemplo 1 abaixo, nós determinámos surpreendentemente que um tal anticorpo (e.g., com

afinidade muito alta) pode ser de longe um inibidor mais potente da via de IL-1 do que é o IL-Ra (e.g., Kineret<sup>®</sup>), e proporciona uma oportunidade para conseguir um efeito terapêutico a uma dose menor e/ou com administração menos frequente do que a necessária para outros fármacos, tais como o IL-1Ra recombinante.

Tais utilizações como aqui descritas com um anticorpo IL-1 $\beta$  ou fragmento podem incluir o tratamento de um indivíduo que sofre de gota (e.g., gota aguda, gota crónica, gota refractária). As utilizações podem também incluir a prevenção da ocorrência de gota (e.g., gota aguda, gota crónica, gota refractária) num indivíduo em risco.

**Anticorpos, Anticorpos Humanizados e Anticorpos Manipulados Humanos**

Os anticorpos de ligação a IL-1 (e.g., IL-1 $\beta$ ) descritos no contexto da presente divulgação podem ser proporcionados como anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais (mAbs), anticorpos recombinantes, anticorpos quiméricos, anticorpos enxertados com CDR, anticorpos totalmente humanos, anticorpos de cadeia simples e/ou anticorpos biespecíficos, bem como fragmentos, incluindo variantes e derivados dos mesmos, proporcionados por técnicas conhecidas, incluindo, mas se limitando a dissociação enzimática, síntese de péptidos ou técnicas recombinantes.

Os anticorpos compreendem geralmente dois polipéptidos de cadeia pesada e dois polipéptidos de cadeia leve, embora se considere também os anticorpos de domínio único possuindo uma cadeia pesada e uma cadeia leve, e anticorpos de cadeia pesada desprovidos de cadeias leves. Existem cinco tipos de cadeias pesadas, chamadas alfa, delta, epsilon, gama e mu, com base na sequência de aminoácidos do domínio constante da cadeia pesada. Estes diferentes tipos de cadeias pesadas dão origem a cinco classes de anticorpos, IgA (incluindo IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>), IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente, incluindo quatro subclasses de IgG, nomeadamente IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>. Existem também dois tipos de cadeias leves, chamadas kappa ( $\kappa$ ) ou lambda ( $\lambda$ ) com base na sequência de aminoácidos dos domínios constantes. Um anticorpo de comprimento total inclui um domínio constante e um domínio variável. A região constante não tem de estar presente num fragmento de ligação a antigénio de um anticorpo. Os fragmentos de ligação a antigénio de um anticorpo aqui divulgado podem incluir os fragmentos de anticorpos Fab, ' , F(ab')<sub>2</sub> e F(v) . Como se discute em mais pormenor abaixo, os fragmentos de ligação à IL-1 $\beta$  abrangem fragmentos de anticorpos e polipéptidos de ligação a antigénio que ligarão a IL-1 $\beta$ .

Cada uma das sequências das cadeias pesadas e cadeias leves de um anticorpo, ou seu fragmento de ligação a antigénio, inclui uma região variável com três regiões determinantes de complementaridade (CDRs) bem como regiões estruturais não-CDR (FRs) . Os termos "cadeia pesada" e

"cadeia leve," como aqui utilizados, significam a região variável da cadeia pesada e a região variável da cadeia leve, respectivamente, salvo indicação em contrário. As CDRs da cadeia pesada são aqui referidas como CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3. As CDRs da cadeia leve são aqui referidas como CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3. As regiões variáveis e CDRs numa sequência de anticorpo podem ser identificadas (i) de acordo com regras gerais que foram desenvolvidas na técnica ou (ii) alinhando as sequências contra uma base de dados de regiões variáveis conhecidas. Os métodos de identificação destas regiões são descritos em Kontermann e Dubel, eds., *Antibody Engineering*, Springer, New York, NY, 2001, e Dinarello et al., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley and Sons Inc., Hoboken, NJ, 2000. As bases de dados de sequências de anticorpos são descritas e podem ser acedidas através da base de dados "The Kabatman" em [www.bioinf.org.uk/abs](http://www.bioinf.org.uk/abs) (mantida por A.C. Martin no Department of Biochemistry & Molecular Biology University College London, Londres, Inglaterra) e VBASE2 em [www.vbase2.org](http://www.vbase2.org), como descrito em Retter et al., *Nucl. Acids Res.*, 33 (Edição de base de dados): D671-D674 (2005). O sítio da internet da base de dados "Kabatman" inclui também regras gerais empíricas para identificar CDRs. O termo "CDR," como aqui utilizado, é como definido em Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*, 5th ed., U.S. Department of Health and Human Services, 1991, salvo indicação em contrário.

Os anticorpos policlonais são preferencialmente

gerados em animais por injecções subcutâneas (sc) ou intraperitoneais (ip) múltiplas do antigénio relevante e um adjuvante. Uma resposta de anticorpos melhorada pode ser obtida conjugando o antigénio relevante com uma proteína que é imunogénica na espécie a ser imunizada, e.g., hemocianina de lapa californiana, albumina de soro, tiroglobulina bovina ou inibidor de tripsina de soja utilizando um agente bifuncional ou de derivatização, por exemplo, éster de maleimidobenzoílo sulfossuccinimida (conjugação através de resíduos de cisteína), N-hidroxissuccinimida (através de resíduos de lisina), glutaraldeído, anidrido succínico ou outros agentes conhecidos na técnica.

Anticorpo monoclonal refere-se a um anticorpo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogéneos. Os anticorpos monoclonais são geralmente altamente específicos e podem ser dirigidos contra um único sítio antigénico, em contraste com as preparações de anticorpos convencionais (policlonais) que incluem tipicamente anticorpos diferentes dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos). Além da sua especificidade, os anticorpos monoclonais são vantajosos na medida em que são sintetizados por cultura homogénea, não contaminada por outras imunoglobulinas com especificidades e características diferentes.

Os anticorpos monoclonais a serem utilizados de acordo com a presente invenção podem ser preparados pelo método de hibridoma inicialmente descrito por Kohler et

al., (Nature, 256:495-7, 1975) ou podem ser preparados por métodos de ADN recombinante (ver, e.g., Patente U.S. nº 4,816,567). Os anticorpos monoclonais podem ser também isolados de bibliotecas de anticorpos em fagos utilizando as técnicas descritas em, por exemplo, Clackson et al., (Nature 352:624-628, 1991) e Marks et al., (J. Mol. Biol. 222:581-597, 1991).

No método de hibridoma, um murganho ou outro animal hospedeiro apropriado, tal como um hamster ou macaco Macaca, é imunizado como aqui descrito para induzir linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que se ligarão especificamente à proteína utilizada para imunização. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Os linfócitos são em seguida fundidos com células de mieloma utilizando um agente de fusão adequado, tal como polietilenoglicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, p. 59-103 (Academic Press, 1986)).

As células de hibridoma assim preparadas são aplicadas e cultivadas num meio de cultura adequado que contém preferencialmente uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou sobrevivência das células de mieloma parentais, não fundidas. Por exemplo, se as células de mieloma parentais carecem da enzima hipoxantina guanina fosforribosil-transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas incluirão tipicamente hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT), substâncias essas que impedem o crescimento de células deficientes em HGPRT.

As células de mieloma preferidas são aquelas que fundem eficazmente, suportam uma produção de alto nível estável do anticorpo pelas células produtoras de anticorpos seleccionadas e são sensíveis a um meio. As linhas de células de mieloma humano e de heteromieloma de murganho-humano foram também descritas para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, p. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)). As linhas de mieloma murídeas ilustrativas incluem aquelas provenientes dos tumores de murganho MOP-21 e M.C.-11 disponíveis do Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. EUA, e células SP-2 ou X63-Ag8-653 disponíveis do American Type Culture Collection, Rockville, Md. EUA.

O meio de cultura no qual as células de hibridoma são cultivadas é analisado em relação à produção de anticorpos monoclonais dirigidos contra o antigénio. Preferencialmente, a especificidade de ligação dos anticorpos monoclonais produzidos pelas células de hibridoma é determinada por imunoprecipitação ou por um ensaio de ligação in vitro, tal como radioimunoensaio (RIA) ou ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). A afinidade de ligação do anticorpo monoclonal pode ser, por exemplo, determinada por análise de Scatchard (Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980)).

Depois de serem identificadas células de hibridoma que produzem anticorpos da especificidade, afinidade e/ou actividade desejadas, os clones podem ser subclonados por procedimentos de diluição limitante e cultivados por métodos correntes (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, p. 59-103 (Academic Press, 1986)). Os meios de cultura adequados para este efeito incluem, por exemplo, meio DMEM ou RPMI-1640. Além disso, as células de hibridoma podem ser cultivadas *in vivo* como tumores ascíticos num animal. Os anticorpos monoclonais segregados pelos subclones são adequadamente separados do meio de cultura, líquido ascítico ou soro por procedimentos de purificação de imunoglobulina convencionais tais como, por exemplo, proteína A-Sepharose, cromatografia em hidroxiapatite, gel electroforese, diálise ou cromatografia de afinidade.

Considera-se ainda que os anticorpos da invenção podem ser utilizados como fragmentos mais pequenos de ligação a antígeno do anticorpo bem conhecidos na técnica e aqui descritos.

A presente invenção abrange anticorpos de ligação a IL-1 (e.g., IL-1 $\beta$ ) que incluem duas cadeias pesadas de comprimento total e duas cadeias leves de comprimento total. Alternativamente, os anticorpos de ligação à IL-1 $\beta$  podem ser construções tais como anticorpos de cadeia simples ou "mini" anticorpos que retêm a actividade de ligação à IL-1 $\beta$ . Tais construções podem ser preparadas por

métodos conhecidos na técnica tais como, por exemplo, a clonagem mediada por PCR e montagem de anticorpos de cadeia simples para expressão em *E. coli* (como descrito em *Antibody Engineering, The practical approach series*, J. McCafferty, H. R. Hoogenboom, e D. J. Chiswell, editores, Oxford University Press, 1996). Neste tipo de construção, as porções variáveis das cadeias pesada e leve de uma molécula de anticorpo são amplificadas por PCR a partir de ADNc. Os produtos resultantes de amplificação são em seguida montados, por exemplo, num segundo passo de PCR, através de um ADN de ligação que codifica uma unidade de ligação proteica flexível constituída pelos aminoácidos Gly e Ser. Esta unidade de ligação permite que as porções variáveis da cadeia pesada e leve se dobram de tal forma que a cavidade de ligação de antigénio é regenerada e o antigénio é ligado com afinidades frequentemente comparáveis às da molécula de imunoglobulina dimérica de comprimento total parental.

Os anticorpos e fragmentos de ligação à IL-1 (e.g., IL-1 $\beta$ ) da presente invenção abrangem variantes dos anticorpos, fragmentos e sequências ilustrativos aqui divulgados. As variantes incluem péptidos e polipéptidos que compreendem uma ou mais substituições, supressões e/ou adições à sequência de aminoácidos que têm a mesma ou substancialmente a mesma afinidade e especificidade de ligação ao epítopo que um ou mais dos anticorpos, fragmentos e sequências ilustrativos aqui divulgados. Assim, as variantes incluem péptidos e polipéptidos compreendendo uma

ou mais substituições, supressões e/ou adições da sequência de aminoácidos aos anticorpos, fragmentos e sequências ilustrativos aqui divulgados, em que essas substituições, supressões e/ou adições não originam alterações substanciais na afinidade e especificidade da ligação ao epítopo. Por exemplo, uma variante de um anticorpo ou fragmento pode resultar de uma ou mais alterações a um anticorpo ou fragmento, em que o anticorpo ou fragmento mudado tem a mesma ou substancialmente a mesma afinidade e especificidade de ligação ao epítopo que a sequência de partida. As variantes podem ser naturais, tais como variantes alélicas ou de excisão-união, ou podem ser artificialmente construídas. As variantes podem ser preparadas a partir das moléculas de ácido nucleico correspondentes que codificam as referidas variantes. As variantes dos presentes anticorpos e fragmentos de ligação à IL-1 $\beta$  podem ter alterações nas sequências de aminoácidos das cadeias leve e/ou pesada que são naturais ou são introduzidos por manipulação *in vitro* das sequências nativas utilizando técnicas de ADN recombinante. As variantes naturais incluem variantes "somáticas" que são geradas *in vivo* nas sequências de nucleótidos da linha germinal correspondente durante a geração de uma resposta de anticorpos a um抗原 estranho.

As variantes de anticorpos de ligação e fragmentos de ligação à IL-1 (e.g., IL-1 $\beta$ ) podem ser também preparadas por técnicas de mutagénese. Por exemplo, podem ser introduzidas alterações de aminoácidos de forma aleatória ao longo de uma região de codificação de

anticorpo e as variantes resultantes podem ser rastreadas quanto à afinidade de ligação à IL-1 $\beta$  ou quanto a outra propriedade. Alternativamente, as alterações de aminoácidos podem ser introduzidas em regiões seleccionadas de um anticorpo IL-1 $\beta$ , tais como nas CDRs da cadeia leve e/ou pesada, e/ou nas regiões estruturais, e os anticorpos resultantes podem ser rastreados quanto à ligação à IL-1 $\beta$  ou alguma outra actividade. As alterações de aminoácidos incluem uma ou mais substituições de aminoácidos numa CDR, que vão desde uma única diferença de aminoácido até à introdução de múltiplas trocas de aminoácidos numa dada CDR, tal como a CDR3. Noutro método, a contribuição de cada resíduo dentro de uma CDR para a ligação à IL-1 $\beta$  pode ser avaliada substituindo pelo menos um resíduo dentro da CDR por alanina. Lewis et al. (1995), Mol. Immunol. 32: 1065-72. Os resíduos que não são ideais para a ligação à IL-1 $\beta$  podem ser depois mudados para determinar uma sequência mais ideal. São também abrangidas variantes geradas por inserção de aminoácidos para aumentar o tamanho de uma CDR, tal como a CDR3. Por exemplo, a maioria das sequências de CDR3 da cadeia leve têm nove aminoácidos de comprimento. As sequências das cadeias leves de um anticorpo que são mais curtas do que nove resíduos podem ser optimizadas para ligação à IL-1 $\beta$  por inserção de aminoácidos apropriados para aumentar o comprimento da CDR.

As variantes podem ser também preparadas por "recombinação aleatória da cadeia" de cadeias leves ou pesadas. Marks et al. (1992), Biotechnology 10: 779-83. Uma

cadeia leve (ou pesada) simples pode ser combinada com uma biblioteca possuindo um reportório de cadeias pesadas (ou leves) e a população resultante é rastreada em relação a uma actividade desejada, tal como ligação à IL-1 $\beta$ . Isto permite a pré-selecção de uma amostra maior de cadeias pesadas (ou leves) diferentes em combinação com uma cadeia leve (ou pesada) simples do que é possível com bibliotecas que compreendem reportórios de ambas as cadeias, pesada e leve.

Os anticorpos e fragmentos de ligação à IL-1 (e.g., IL-1 $\beta$ ) da presente invenção abrangem derivados dos anticorpos, fragmentos e sequências ilustrativos aqui divulgados. Os derivados incluem polipéptidos ou péptidos, ou variantes, fragmentos ou derivados dos mesmos, que foram modificados quimicamente. Os exemplos incluem a ligação covalente de um ou mais polímeros, tais como polímeros solúveis em água, e hidratos de carbono, açúcares, fosfatos e/ou outras moléculas desse tipo ligadas no N ou ligadas no O. Os derivados são modificados de uma maneira que é diferente dos péptidos ou polipéptidos naturais ou de partida, quer no tipo ou localização das moléculas ligadas. Os derivados incluem ainda a supressão de um ou mais grupos químicos que estão naturalmente presentes no péptido ou polipéptido.

Os anticorpos e fragmentos de ligação à IL-1 $\beta$  da presente invenção podem ser biespecíficos. Os anticorpos ou fragmentos biespecíficos podem ser de várias configurações.

Por exemplo, os anticorpos biespecíficos podem assemelhar-se aos anticorpos simples (ou fragmentos de anticorpos) mas têm dois sítios de ligação a antigénio diferentes (regiões variáveis). Os anticorpos biespecíficos podem ser produzidos por técnicas químicas (Kranz et al. (1981), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 5807), por técnicas de "polidoma" (Pat. U.S. nº 4,474,893) ou por técnicas de ADN recombinante. Os anticorpos biespecíficos da presente invenção podem ter especificidades de ligação para pelo menos dois epítopos diferentes, pelo menos um dos quais é um epítopo de IL-1 $\beta$ . Os anticorpos e fragmentos de ligação à IL-1 $\beta$  podem ser também heteroanticorpos. Os heteroanticorpos são dois ou mais anticorpos, ou fragmentos de ligação do anticorpo (Fab) ligados em conjunto, possuindo cada anticorpo ou fragmento uma especificidade diferente.

As técnicas para criar versões de ADN recombinante das regiões de ligação a antigénio das moléculas de anticorpo que evitam a geração de anticorpos monoclonais são consideradas para os presentes anticorpos e fragmentos de ligação à IL-1 (e.g., IL-1 $\beta$ ). O ADN é clonado num sistema de expressão bacteriano. Um exemplo de uma tal técnica adequada para a prática desta invenção utiliza um sistema vector lambda de bacteriófago que tem uma sequência líder que faz com que a proteína Fab expressa migre para o espaço periplasmático (entre a membrana celular e a parede celular bacteriana) ou seja segregada. Pode-se gerar e rastrear rapidamente um grande número de fragmentos Fab funcionais para aqueles que se ligam à IL-1 $\beta$ . Tais agentes

de ligação à IL-1 $\beta$  (fragmentos Fab com especificidade para um polipéptido de IL-1 $\beta$ ) estão especificamente incluídos dentro dos anticorpos e fragmentos de ligação à IL-1 $\beta$  da presente invenção.

Os presentes anticorpos e fragmentos de ligação à IL-1 (e.g., IL-1 $\beta$ ) podem ser anticorpos humanizados ou manipulados humanos. Como aqui utilizado, um anticorpo humanizado, ou fragmento de ligação a抗igénio do mesmo, é um polipéptido recombinante que compreende uma porção de um sítio de ligação a抗igénio de um anticorpo não humano e uma porção das regiões estruturais e/ou constantes de um anticorpo humano. Um anticorpo manipulado humano ou fragmento de anticorpo é um anticorpo não humano (e.g., murganho) que foi manipulado modificando (e.g., suprimindo, inserindo ou substituindo) aminoácidos em posições específicas de forma a reduzir ou eliminar qualquer imunogenicidade detectável do anticorpo modificado num humano.

Os anticorpos humanizados incluem anticorpos quiméricos e anticorpos enxertados com CDR. Os anticorpos quiméricos são anticorpos que incluem uma região variável de um anticorpo não humano ligada a uma região constante humana. Assim, nos anticorpos quiméricos, a região variável é principalmente não humano e a região constante é humana. Os anticorpos quiméricos e os métodos para os preparar são descritos em Morrison, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6841-6855 (1984), Boulianne, et al., Nature, 312: 643-

646 (1984), e Publicação de Pedido PCT WO 86/01533. Embora possam ser menos imunogénicos do que um anticorpo monoclonal de mурганho, as administrações de anticorpos químéricos foi associada a respostas humanas anti-anticorpo de mурганho (HAMA) à porção não humana dos anticorpos. Os anticorpos químéricos podem ser também produzidos por excisão-união dos genes de uma molécula de anticorpo de mурганho de especificidade de ligação a antígeno apropriada em conjunto com genes de uma molécula de anticorpo humano de actividade biológica apropriada, tal como a aptidão para activar o complemento humano e mediar a ADCC. Morrison et al. (1984), Proc. Natl. Acad. Sci., 81: 6851; Neuberger et al. (1984), Nature, 312: 604. Um exemplo é a substituição de uma região Fc por aquela de um isotipo diferente.

Os anticorpos enxertados com CDR são anticorpos que incluem as CDRs de um anticorpo "dador" não humano ligadas à região estrutural de um anticorpo "receptor" humano. Em geral, os anticorpos enxertados com CDR incluem mais sequências de anticorpo humano do que os anticorpos químéricos porque incluem tanto sequências da região constante como sequências da região variável (estrutural) de anticorpos humanos. Assim, por exemplo, um anticorpo humanizado enxertado com CDR da invenção pode compreender uma cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos contíguos (e.g., cerca de 5 ou mais, 10 ou mais, ou até mesmo 15 ou mais resíduos de aminoácidos contíguos) da região estrutural de um anticorpo humano

(e.g., FR-1, FR-2 ou FR-3 de um anticorpo humano) ou, opcionalmente, a maioria ou a totalidade da região estrutural inteira de um anticorpo humano. Os anticorpos enxertados com CDR e métodos para os preparar são descritos em, Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986), Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988), e Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)). Métodos que podem ser utilizados para produzir anticorpos humanizados são também descritos nas Patentes U.S. 4,816,567, 5,721,367, 5,837,243 e 6,180,377. Os anticorpos enxertados com CDR são considerados menos propensos do que os anticorpos quiméricos para induzir uma reacção imunológica contra porções de anticorpos não humanos. No entanto, foi relatado que são necessárias sequências estruturais dos anticorpos dadores para a afinidade de ligação e/ou especificidade do anticorpo dador, presumivelmente porque estas sequências estruturais afectam a dobragem da porção de ligação ao antigénio do anticorpo dador. Por conseguinte, quando sequências de CDR dadoras, não humanas são enxertadas em sequências estruturais humanas inalteradas, o anticorpo enxertado com CDR resultante pode exibir, nalguns casos, perda de avidez de ligação relativamente ao anticorpo dador não humano original. Ver, e.g., Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988), e Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988).

Os anticorpos manipulados humanos incluem, por exemplo, os anticorpos "recobertos" ("veneered") e os anticorpos preparados utilizando a tecnologia HUMAN

ENGINEERING<sup>TM</sup> (ver, por exemplo, Patentes U.S. 5,766,886 e 5,869,619). A tecnologia HUMAN ENGINEERING<sup>TM</sup> está comercialmente disponível e envolve a alteração de um anticorpo ou fragmento de anticorpo não humano, tal como um anticorpo ou fragmento de anticorpo de murganho ou quimérico, efectuando alterações específicas à sequência de aminoácidos do anticorpo de forma a produzir um anticorpo modificado com imunogenicidade reduzido num humano que, no entanto, retém as propriedades de ligação desejáveis dos anticorpos não humanos originais. Em geral, a técnica envolve a classificação dos resíduos de aminoácidos de um anticorpo não humano (e.g., murganho) como resíduos de "baixo risco", "risco moderado" ou "alto risco". A classificação é realizada utilizando um cálculo de risco/recompensa total que avalia os benefícios previstos da realização de uma substituição particular (e.g., para a imunogenicidade em humanos) contra o risco de que a substituição afectará a dobragem e/ou propriedades de ligação ao antigénio do anticorpo resultante. Assim, uma posição de baixo risco é uma para a qual se prevê que uma substituição seja benéfica porque se prevê que reduza a imunogenicidade sem afectar significativamente as propriedades de ligação ao antigénio. Uma posição de risco moderado é uma para a qual se prevê que uma substituição reduza a imunogenicidade, mas que é mais propensa a afectar a dobragem da proteína e/ou a ligação ao antigénio. As posições de alto risco contêm resíduos que estão muito provavelmente envolvidos na dobragem apropriada ou ligação ao antigénio. Em geral, as posições de baixo risco de um anticorpo não humano são

substituídas por resíduos humanos, as posições de alto risco são raramente substituídas e as substituições de humanização em posições de risco moderado são por vezes feitas, embora não de forma indiscriminada. As posições com prolinas na sequência da região variável de um anticorpo não humano são geralmente classificadas como pelo menos posições de risco moderado.

O resíduo de aminoácido humano particular a ser substituído numa dada posição de baixo risco ou risco moderado de uma sequência de anticorpo não humano (e.g., murganho) pode ser seleccionado alinhando uma sequência de aminoácidos das regiões variáveis de um anticorpo não humano com a região correspondente de uma sequência de anticorpo humano específica ou consenso. Os resíduos de aminoácidos em posições de baixo risco ou risco moderado na sequência não humana podem ser substituídos pelos resíduos correspondentes na sequência do anticorpo humano de acordo com o alinhamento. As técnicas para preparar proteínas manipuladas humanas são descritas em mais pormenor em Studnicka et al., Protein Engineering, 7: 805-814 (1994), Patentes U.S. 5,766,886, 5,770,196, 5,821,123 e 5,869,619, e Publicação de Pedido PCT WO 93/11794.

Os anticorpos "recobertos" são anticorpos não humanos ou humanizados (e.g., anticorpos quiméricos ou enxertados com CDR) que foram manipulados por engenharia para substituir certos resíduos de aminoácidos expostos aos solventes de forma a reduzir ainda mais a sua imunoge-

nicidade ou melhorar a sua função. Presume-se que os resíduos superficiais de um anticorpo quimérico são menos propensos para afectar a dobragem apropriada do anticorpo e mais propensos para desencadear uma reacção imunológica, o recobrimento de um anticorpo quimérico pode incluir, por exemplo, a identificação de resíduos expostos aos solventes na região estrutural não humana de um anticorpo quimérico e a substituição de pelo menos um deles pelos resíduos superficiais correspondentes de uma região estrutural humana. O recobrimento pode ser realizado por qualquer técnica de manipulação adequada, incluindo a utilização da tecnologia HUMAN ENGINEERING<sup>TM</sup> descrita acima.

Numa abordagem diferente, uma recuperação da avidez de ligação pode ser conseguida por "desumanização" de um anticorpo enxertado com CDR. A desumanização pode incluir o restabelecimento de resíduos das regiões estruturais do anticorpo dador para o anticorpo enxertado com CDRs, restabelecendo, desse modo, a dobragem apropriada. "Desumanização" semelhante pode ser conseguida (i) incluindo porções da região estrutural do "dador" no anticorpo "receptor" ou (ii) enxertando porções da região estrutural do anticorpo "dador" no anticorpo receptor (juntamente com as CDRs do dador enxertadas).

Para uma discussão adicional sobre anticorpos, anticorpos humanizados, manipulado humano e métodos para a sua preparação, ver Kontermann e Dubel, eds., *Antibody Engineering*, Springer, New York, NY, 2001.

Os anticorpos humanizados ou manipulados humanos ilustrativos incluem anticorpos de IgG, IgM, IgE, IgA e IgD. Os presentes anticorpos podem ser de qualquer classe (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD, etc.) ou isotipo e podem compreender uma cadeia leve kappa ou lambda. Por exemplo, um antícorpo humano pode compreender uma cadeia pesada de IgG ou fragmento definido, tal como pelo menos um dos isotipos, IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. Como um outro exemplo, os presentes anticorpos ou fragmentos podem compreender uma cadeia pesada de IgG1 e uma cadeia leve de IgG1.

Os presentes anticorpos e fragmentos podem ser anticorpos humanos, tais como anticorpos que ligam polipeptídos de IL-1 $\beta$  e são codificados por sequências de ácidos nucleicos que são variantes somáticas naturais da sequência de ácido nucleico da imunoglobulina humana da linha germinal, e fragmentos, variantes sintéticas, derivados e fusões das mesmas. Tais anticorpos podem ser produzidos por qualquer método conhecido na técnica, tal como através da utilização de mamíferos transgénicos (tais como murganhos transgénicos) nos quais o reportório de imunoglobulina nativo foi substituído por genes V humanos no cromossoma do mamífero. Tais mamíferos parecem ter uma recombinação VDJ e hipermutação somática dos genes do antícorpo da linha germinal humana de uma maneira normal, produzindo, assim, anticorpos de alta afinidade com sequências completamente humanas.

Os anticorpos humanos para uma proteína alvo podem ser também produzidos utilizando animais transgénicos que não têm qualquer produção de imunoglobulina endógena e são manipulados para conter loci de imunoglobulina humana. Por exemplo, a WO 98/24893 divulga animais transgénicos que têm um lócus de Ig humana em que os animais não produzem imunoglobulinas endógenas funcionais devido à inactivação dos loci endógenos das cadeias pesada e leve. A WO 91/00906 divulga também hospedeiros mamíferos não primatas transgénicos capazes de construir uma resposta imunológica a um imunogénio, em que os anticorpos têm regiões constantes e/ou variáveis de primata, e em que os loci de codificação de imunoglobulinas endógenas estão substituídos ou inactivados. A WO 96/30498 e a Patente US nº 6,091,001 divulgam a utilização do sistema Cre/Lox para modificar o lócus de imunoglobulina num mamífero, tal como para substituir a totalidade ou uma porção da região constante ou variável para preparar uma molécula de anticorpo modificada. A WO 94/02602 divulga hospedeiros mamíferos não humanos que têm loci de Ig endógena inactivados e loci de Ig humana funcionais. A Patente U.S. nº 5,939,598 divulga métodos de preparação de murganhos transgénicos em que os murganhos carecem de cadeias pesadas endógenas e expressam um lócus de imunoglobulina exógeno que compreende uma ou mais regiões constantes xenogénicas. Ver também, Patente U.S. nº 6,114,598, 6,657,103 e 6,833,268.

Utilizando um animal transgénico descrito acima, pode ser produzida uma resposta imunológica para uma

molécula antigénica seleccionada, e as células produtoras de anticorpos podem ser retiradas do animal e utilizadas para produzir hibridomas que segregam anticorpos monoclonais humanos. Os protocolos de imunização, adjuvantes, e semelhantes são conhecidos na técnica, e são utilizados na imunização, por exemplo, de um mурганho transgénico como descrito em WO 96/33735. Esta publicação divulga anticorpos monoclonais contra uma variedade de molécula antigénicas incluindo IL-6, IL-8, TNFa, CD4 humano, selectina L, gp39 e toxina do tétano. Os anticorpos monoclonais podem ser testados quanto à aptidão para inibir ou neutralizar a actividade biológica ou efeito fisiológico da proteína correspondente. A WO 96/33735 divulga que os anticorpos monoclonais contra IL-8, provenientes de células imunitárias de mурганhos transgénicos imunizados com IL-8, bloquearam as funções induzidas por IL-8 do neutrófilo. Anticorpos monoclonais humanos com especificidade para o antigénio utilizado para imunizar animais transgénicos são também divulgados em WO 96/34096 e pedido de patente U.S. nº 20030194404; e pedido de patente U.S. nº 20030031667.

Os animais transgénicos adicionais úteis para preparar anticorpos monoclonais incluem o Medarex HuMAb-MOUSE®, descrito na Pat. U.S. nº 5,770,429 e Fishwild, et al. (Nat. Biotechnol. 14:845-851, 1996), o qual contém sequências génicas de genes de anticorpos humanos não rearranjados que codificam as cadeias pesada e leve de anticorpos humanos. A imunização de um HuMAb-MOUSE® possibilita a produção de anticorpos monoclonais totalmente humanos para a proteína alvo.

Também, Ishida et al. (Cloning Stem Cells. 4:91-102, 2002) descreve o Murganho TransChromo (TCMOUSE™) que compreende segmentos de tamanho megabase de ADN humano e que incorpora os loci da imunoglobulina humana (hIg) completa. O TCMOUSE™ tem um reportório completamente variado de hIgs, incluindo todas as subclasses de IgGs (IgG1-G4). A imunização do TCMOUSE™ com vários抗igenos humanos produz respostas de anticorpos que compreendem anticorpos humanos.

Ver também Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Brugermann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993); e Pat. U.S. nº 5,591,669, Patente U.S. nº 5,589,369, Patente U.S. nº 5,545,807; e Publicação de Patente U.S. nº 20020199213. A Publicação de Patente U.S. nº 20030092125 descreve métodos para desviar a resposta imunológica de um animal para o epítopo desejado. Os anticorpos humanos podem ser também gerados por células B activadas *in vitro* (ver Pat. U.S. nº 5,567,610 e 5,229,275).

Os anticorpos humanos podem ser também gerados através da triagem *in vitro* de bibliotecas de apresentação de anticorpos. Ver Hoogenboom et al. (1991), J. Mol. Biol. 227: 381; e Marks et al. (1991), J. Mol. Biol. 222: 581. Várias bibliotecas de apresentação em fagos contendo anticorpos foram descritas e podem ser facilmente

preparadas. As bibliotecas podem conter uma diversidade de sequências de anticorpos humanos, tais como os fragmentos Fab, Fv e scFv humano, que podem ser rastreados contra um alvo apropriado. As bibliotecas de apresentação em fagos podem compreender péptidos ou proteínas diferentes de anticorpos que podem ser rastreados para identificar agentes de ligação selectivos da IL-1 $\beta$ .

O desenvolvimento de tecnologias de preparação de reportórios de genes de anticorpos humanos recombinantes, e a apresentação dos fragmentos de anticorpos codificados na superfície de bacteriófago filamentoso, proporcionou um meio para preparar directamente anticorpos humanos. Os anticorpos produzidos pela tecnologia de fago são produzidos como fragmentos de ligação a antigénio-geralmente fragmentos Fv ou Fab-em bactérias e, por isso, carecem de funções efectoras. As funções efectoras podem ser introduzidas por uma de duas estratégias: Os fragmentos podem ser manipulados quer nos anticorpos completos para expressão em células de mamíferos, ou em fragmentos de anticorpos biespecíficos com um segundo sítio de ligação capaz de desencadear uma função efectora.

A invenção considera um método de produção de um anticorpo específico para um alvo ou porção de ligação ao antigénio do mesmo compreendendo os passos de sintetizar uma biblioteca de anticorpos humanos em fago, rastrear a biblioteca com a proteína alvo ou uma porção da mesma, isolar o fago que liga o alvo e obter o anticorpo a partir

do fago. A título de exemplo, um método de preparação da biblioteca de anticorpos para ser utilizada nas técnicas de apresentação em fagos compreende os passos de imunizar um animal não humano que compreende loci de imunoglobulina humana com o antigénio alvo ou uma porção antigénica do mesmo para gerar uma resposta imunológica, extraír as células produtoras de anticorpos do animal imunizado; isolar o ARN das células extraídas, transcrever de forma inversa o ARN para produzir ADNc, amplificar o ADNc utilizando um iniciador e inserir o ADNc num vector de apresentação em fagos para que os anticorpos sejam expressos no fago. Os anticorpos específicos para o alvo recombinantes da invenção podem ser obtidos deste modo.

Os processos de apresentação em fagos imitam a selecção imunológica através da apresentação de reportórios de anticorpos na superfície de bacteriófago filamentoso, e selecção subsequente do fago pela sua ligação a um antigénio de eleição. Uma tal técnica é descrita em WO 99/10494, a qual descreve o isolamento de anticorpos agonistas de alta afinidade e funcionais para os receptores MPL e msk utilizando uma tal abordagem. Os anticorpos da invenção podem ser isolados por triagem de uma biblioteca de anticorpos combinatórios recombinantes, preferencialmente uma biblioteca de apresentação em fagos de scFv, preparada utilizando os ADNcs das  $V_L$  e  $V_H$  humanas preparados a partir de ARNm proveniente de linfócitos humanos. As metodologias para preparar e rastrear tais bibliotecas são conhecidas na técnica. Ver e.g., Patente U.S. nº 5,969,108.

Existem kits comercialmente disponíveis para gerar bibliotecas de apresentação em fagos (e.g., o Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, nº de catálogo 27-9400-01; e o kit de apresentação em fagos Stratagene SurfZAP.TM., nº de catálogo 240612). Existem também outros métodos e reagentes que podem ser utilizados na geração e triagem de bibliotecas de apresentação de anticorpos (ver, e.g., Ladner et al. Pat. U.S. nº 5,223,409; Kang et al. Publicação PCT nº WO 92/18619; Dower et al. Publicação PCT nº WO 91/17271; Winter et al. Publicação PCT nº WO 92/20791; Markland et al. Publicação PCT nº WO 92/15679; Breitling et al. Publicação PCT nº WO 93/01288; McCafferty et al. Publicação PCT nº WO 92/01047; Garrard et al. Publicação PCT nº WO 92/09690; Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay et al. (1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85; Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281; McCafferty et al., Nature (1990) 348:552-554; Griffiths et al. (1993) EMBO J 12:725-734; Hawkins et al. (1992) J. Mol. Biol. 226:889-896; Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628; Gram et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576-3580; Garrad et al. (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137; e Barbas et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982.

Numa forma de realização, para isolar anticorpos humanos específicos para o抗ígeno alvo com as características desejadas, uma biblioteca de  $V_H$  e  $V_L$  humanas é rastreada para seleccionar fragmentos de anti-

corpos possuindo a especificidade desejada. As bibliotecas de anticorpos utilizadas neste método são preferencialmente bibliotecas de scFv preparadas e rastreadas como aqui descrito e na técnica (McCafferty et al., Publicação PCT nº WO 92/01047, McCafferty et al., (Nature 348:552-554, 1990); e Griffiths et al., (EMBO J 12:725-734, 1993). As bibliotecas de anticorpos scFv são preferencialmente rastreadas utilizando a proteína alvo como o antigénio.

Alternativamente, o fragmento Fd ( $V_H-C_H1$ ) e a cadeia leve ( $V_L-C_L$ ) dos anticorpos são clonados separadamente por PCR e recombinados de forma aleatória em bibliotecas de apresentação em fagos combinatórias, as quais podem ser depois seleccionadas para ligação a um antigénio particular. Os fragmentos Fab são expressos na superfície do fago, *i.e.*, fisicamente ligados aos genes que os codificam. Desse modo, a selecção de Fab por ligação ao antigénio selecciona simultaneamente as sequências de codificação de Fab, as quais podem ser amplificadas subsequentemente. Através de vários ciclos de ligação ao antigénio e reamplificação, um procedimento designado por bateamento ("panning"), o Fab específico para o antigénio é enriquecido e finalmente isolado.

Em 1994 foi descrita uma abordagem para a humanização de anticorpos, chamada "selecção guiada". A selecção guiada utiliza o poder da técnica de apresentação em fagos para a humanização de anticorpos monoclonais de murganho (ver Jespers, L. S., et al., Bio/Technology 12,

899-903 (1994)). Para isto, o fragmento Fd do anticorpo monoclonal de murganho pode ser apresentado em combinação com uma biblioteca de cadeias leves humanas, e a biblioteca de Fab híbridos resultante pode ser depois seleccionada com o antigénio. O fragmento Fd de murganho daquele proporciona uma cadeia molde para guiar a selecção. Subsequentemente, as cadeias leves humanas seleccionadas são combinadas com uma biblioteca de fragmentos Fd humanos. A selecção da biblioteca resultante produz Fab completamente humano.

Uma variedade de procedimentos foi descrita para derivar anticorpos humanos de bibliotecas de apresentação em fagos (ver, por exemplo, Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Pat. U.S. nº 5,565,332 e 5,573,905; Clackson, T., e Wells, J. A., TIBTECH 12, 173-184 (1994)). Em particular, a selecção e evolução in vitro de anticorpos derivados de bibliotecas de apresentação em fagos tornou-se uma ferramenta poderosa (ver Burton, D. R., e Barbas III, C. F., Adv. Immunol. 57, 191-280 (1994); Winter, G., et al., Annu. Rev. Immunol. 12, 433-455 (1994); publicação de patente U.S. nº 20020004215 e WO 92/01047; publicação de patente U.S. nº 20030190317; e Patente U.S. nº 6,054,287 e 5,877,293.

Watkins, "Screening of Phage-Expressed Antibody Libraries by Capture Lift," Methods in Molecular Biology, Antibody Phage Display: Methods and Protocols 178: 187-193 (2002), e publicação de patente U.S. nº 20030044772,

publicada em 6 de Março de 2003, descrevem métodos para rastrear bibliotecas de anticorpos expressos em fagos ou outras moléculas de ligação por elevação de captura, um método que envolve a imobilização das moléculas de ligação candidatas num suporte sólido.

Os fragmentos Fv são apresentados na superfície do fago, pela associação de uma cadeia expressa como uma fusão da proteína de fago (e.g., com o gene III M13) com a cadeia complementar expressa como um fragmento solúvel. Considera-se que o fago pode ser um fago filamentoso tal como um dos fagos da classe I: fd, M13, f1, If1, Ike, ZJ/Z, Ff e um dos fagos da classe II Xf, Pf1 e Pf3. O fago pode ser M13, ou fd ou um seu derivado.

Uma vez seleccionados os segmentos  $V_L$  e  $V_H$  humanos iniciais, são realizadas experiências de "mistura e combinação", nas quais pares diferentes dos segmentos  $V_L$  e  $V_H$  inicialmente seleccionados são rastreados para a ligação ao alvo, para seleccionar combinações de pares  $V_L/V_H$  preferidas. Adicionalmente, para melhorar ainda mais a qualidade do anticorpo, os segmentos  $V_L$  e  $V_H$  do(s) par(es)  $V_L/V_H$  preferido(s) pode(m) ser mutado(s) de forma aleatória, preferencialmente dentro de qualquer região CDR1, CDR2 ou CDR3 da  $V_H$  e/ou  $V_L$ , num processo análogo ao processo de mutação somática in vivo responsável pela maturação da afinidade de anticorpos durante uma resposta imunológica natural. Esta maturação da afinidade in vitro pode ser conseguida amplificando regiões  $V_L$  e  $V_H$  utilizando

iniciadores de PCR complementares às CDR1, CDR2 e CDR3 de VH, ou CDR1, CDR2 e CDR3 de VL, respectivamente, iniciadores esses que foram "fortificados" com uma mistura aleatória das quatro bases nucleotídicas em certas posições para que os produtos de PCR resultantes codifiquem segmentos  $V_L$  e  $V_H$  nos quais foram introduzidas mutações aleatórias nas regiões CDR3 de  $V_H$  e/ou  $V_L$ . Estes segmentos  $V_L$  e  $V_H$  mutados de forma aleatória podem ser novamente rastreados para a ligação ao antígeno alvo.

Após triagem e isolamento de um antícorpo específico para o alvo a partir de uma biblioteca de apresentação de imunoglobulinas recombinantes, o ácido nucleico que codifica o antícorpo seleccionado pode ser recuperado a partir do pacote de apresentação (e.g., do genoma de fago) e subclonado noutros vectores de expressão por técnicas de ADN recombinante correntes. Se desejado, o ácido nucleico pode ser ainda manipulado para criar outras formas de antícorpo da invenção, como descrito abaixo. Para expressar um antícorpo humano recombinante isolado por triagem de uma biblioteca combinatória, o ADN que codifica o antícorpo é clonado num vector de expressão recombinante e introduzido numa célula hospedeira de mamífero, como aqui descrito.

Considera-se que o método de apresentação em fagos pode ser realizado numa estirpe de mutação de bactérias ou células hospedeiras. Uma estirpe de mutação é uma célula hospedeira que tem um defeito genético que faz

com que o ADN replicado dentro da mesma sofra mutação em relação ao seu ADN parental. Os exemplos de estirpes de mutação são NR9046mutD5 e NR9046 mut T1.

Considera-se também que o método de apresentação em fagos pode ser realizado utilizando um fago auxiliar. Este é um fago que é utilizado para infectar células contendo um genoma de fago defeituoso e que actua para complementar o defeito. O genoma de fago defeituoso pode ser um fagomídeo ou um fago com alguma função que codifica sequências de genes removidas. Os exemplos de fagos auxiliares são M13K07, M13K07 gene III nº 3; e um fago que apresenta ou codifica uma molécula de ligação fundida com uma proteína do capsídeo.

Os anticorpos são também gerados via métodos de triagem de apresentação em fagos utilizando a abordagem combinatória dupla hierárquica como divulgada na WO 92/01047, na qual uma colónia individual contendo um clone da cadeia H ou L é utilizada para infectar uma biblioteca completa de clones que codificam a outra cadeia (L ou H) e o membro de ligação específica de duas cadeias resultante é seleccionado de acordo com técnicas de apresentação em fagos tais como aquelas ali descritas. Esta técnica é também divulgada em Marks et al, (Bio/Technology, 10:779-783, 1992).

Métodos de apresentação de péptidos na superfície de células de levedura e microbianas foram também

utilizados para identificar anticorpos específicos para o antigénio. Ver, por exemplo, Patente U.S. nº 6,699,658. As bibliotecas de anticorpos podem ser ligadas a proteínas de levedura, tais como aglutinina, que mimetizam eficazmente a apresentação de anticorpos na superfície celular pelas células B do sistema imunitário.

Além dos métodos de apresentação em fagos, os anticorpos podem ser isolados utilizando métodos de apresentação em ARNm de ribossomas e métodos de apresentação em células microbianas. A selecção de polipeptídos utilizando apresentação em ribossomas é descrita em Hanes et al., (Proc. Natl Acad Sci USA, 94:4937-4942, 1997) e Pat. U.S. nº 5,643,768 e 5,658,754 concedidas a Kawasaki. A apresentação em ribossomas é também útil para a análise mutacional rápida em grande escala de anticorpos. A abordagem de mutagénese selectiva proporciona também um método de produção de anticorpos com actividades melhoradas que podem ser seleccionados utilizando técnicas de apresentação ribossómicas.

Os anticorpos e fragmentos de ligação à IL-1 (e.g., IL-1 $\beta$ ) podem compreender uma ou mais porções que não se ligam a IL-1 $\beta$  mas, em vez disso, são responsáveis por outras funções, tais como semivida circulante, efeito citotóxico directo, marcação detectável ou activação da cascata do complemento endógena ou citotoxicidade celular endógena do receptor. Os anticorpos ou fragmentos podem compreender a totalidade ou uma porção da região constante

e podem ser de qualquer isotipo, incluindo IgA (e.g., IgA1 ou IgA2), IgD, IgE, IgG (e.g. IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4), ou IgM. Além de, ou em vez de, compreender uma região constante, os compostos de ligação ao antigénio da invenção podem incluir um epítopo marcador, um epítopo de receptor de recuperação, uma unidade de marcação para efeitos de diagnóstico ou purificação, ou uma unidade citotóxica tal como um radionuclídeo ou toxina.

A região constante (quando presente) dos presentes anticorpos e fragmentos pode ser do tipo  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ ,  $\gamma 4$ ,  $\mu$ ,  $\beta 2$ , ou  $\delta$  ou  $\epsilon$ , preferencialmente do tipo  $\gamma$ , mais preferencialmente do tipo  $\gamma$ , enquanto a parte constante de uma cadeia leve humana pode ser do tipo  $\kappa$  ou  $\lambda$  (a qual inclui os subtipos  $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  e  $\lambda_3$ ) mas é preferencialmente do tipo  $\kappa$ .

As variantes incluem também anticorpos ou fragmentos compreendendo uma região Fc modificada, em que a região Fc modificada compreende pelo menos uma modificação de aminoácido relativamente a uma região Fc de tipo selvagem. A região Fc variante pode ser concebida, relativamente a uma molécula comparável que compreende a região Fc de tipo selvagem, de forma a ligar os receptores de Fc com uma maior ou menor afinidade.

Por exemplo, os presentes anticorpos e fragmentos de ligação à IL-1 $\beta$  podem compreender uma região Fc modificada. A região Fc refere-se a polipeptídos naturais

ou sintéticos homólogos ao domínio C-terminal da IgG que é produzido por digestão da IgG com papaína. A Fc da IgG tem um peso molecular de aproximadamente 50 kD. Nos presentes anticorpos e fragmentos, pode utilizar-se uma região Fc inteira ou apenas uma porção de melhoria da semivida. Além disso, muitas modificações da sequência de aminoácidos são aceitáveis, uma vez que a actividade nativa não é, em todos os casos, necessária ou desejada.

Se desejado, a região Fc pode ser mutada, para inibir a sua aptidão para fixar o complemento e ligar o receptor de Fc com alta afinidade. Para a Fc da IgG murídea, a substituição dos resíduos de Glu 318, Lys 320 e Lys 322 por Ala torna a proteína incapaz de dirigir a ADCC. Substituição de Leu 235 por Glu inibe a aptidão da proteína para ligar o receptor de Fc com alta afinidade. Várias mutações para a IgG humana são também conhecidas (ver, e.g., Morrison et al., 1994, *The Immunologist* 2: 119 124 e Brekke et al., 1994, *The Immunologist* 2: 125).

Nalgumas formas de realização, os presentes anticorpos ou fragmentos são proporcionados com uma região Fc modificada, em que uma região Fc natural é modificada para aumentar a semivida do anticorpo ou fragmento num ambiente biológico, por exemplo, a semivida no soro ou uma semivida medida por um ensaio *in vitro*. Métodos de modificação da forma original de uma região Fc de uma IgG são também descritos na Patente U.S. nº 6,998,253.

Em certas formas de realização, pode ser desejável modificar o anticorpo ou fragmento para aumentar a sua semivida no soro, por exemplo, adicionando moléculas tais como PEG ou outros polímeros solúveis em água, incluindo polímeros de polissacáridos, aos fragmentos de anticorpos para aumentar a semivida. Isto pode ser também conseguido, por exemplo, por incorporação de um epítopo de ligação ao receptor de recuperação no fragmento de anticorpo (e.g., por mutação da região apropriada no fragmento de anticorpo ou por incorporação do epítopo num marcador peptídico que é depois fundido com o fragmento de anticorpo em qualquer extremidade ou no centro, e.g., por síntese de ADN ou péptidos) (ver, Publicação Internacional nº WO96/32478). O epítopo de ligação ao receptor de recuperação refere-se a um epítopo da região Fc de uma molécula de IgG (e.g., IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, ou IgG<sub>4</sub>) que é responsável pelo aumento da semivida sérica in vivo da molécula de IgG.

Um epítopo de ligação ao receptor de recuperação pode incluir uma região em que qualquer um ou mais resíduos de aminoácidos de uma ou duas voltas de um domínio Fc são transferidos para uma posição análoga do fragmento de anticorpo. Ainda mais preferencialmente, são transferidos três ou mais resíduos de uma ou duas voltas do domínio Fc. Ainda mais preferido, o epítopo é retirado do domínio CH2 da região Fc (e.g., de uma IgG) e transferido para a região CH1, CH3 ou V<sub>H</sub>, ou para mais do que uma dessas regiões, do anticorpo. Alternativamente, o epítopo é retirado do

domínio CH2 da região Fc e transferido para a região CL ou região VL, ou ambas, do fragmento de anticorpo. Ver também os Pedidos internacionais WO 97/34631 e WO 96/32478, os quais descrevem variantes de Fc e a sua interacção com o receptor de recuperação.

A mutação de resíduos dentro dos sítios de ligação ao receptor de Fc pode resultar em função efectora alterada, tal como actividade ADCC ou CDC alterada, ou semivida alterada. As mutações potenciais incluem inserção, supressão ou substituição de um ou mais resíduos, incluindo substituição por alanina, uma substituição conservadora, uma substituição não conservadora ou substituição por um resíduo de aminoácido correspondente na mesma posição de uma subclasse de IgG diferente (e.g. substituição de um resíduo de IgG1 por um resíduo de IgG2 correspondente nessa posição). Por exemplo, foi relatado que a mutação da serina na posição de aminoácido 241 da IgG4 por prolina (presente nessa posição nas IgG1 e IgG2) levou à produção de um anticorpo homogéneo, bem como ao prolongamento da semivida no soro e melhoria da distribuição no tecido em comparação com a IgG4 quimérica original. (Angal et al., Mol Immunol. 30:105-8, 1993).

Os fragmentos de anticorpos são porções de um anticorpo de comprimento total intacto, tal como uma região de ligação ao抗原 ou variável do anticorpo intacto. Os exemplos de fragmentos de anticorpos incluem os fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> e Fv; diacorpos; anticorpos

lineares; moléculas de anticorpo de cadeia simples (e.g., scFv); fragmentos de anticorpos multiespecíficos tais como biespecíficos, triespecíficos, e anticorpos multiespecíficos (e.g., diacorpos, triacorpos, tetracorpos); minicorpos; anticorpos recombinantes quelantes; tricorpos ou bicorpos; intracorpos; nanocorpos; imunofármacos modulares pequenos (SMIP), adnectinas, proteínas de fusão de imunoglobulina de domínio de ligação; anticorpos camelizados; anticorpos contendo  $V_{HH}$ ; e quaisquer outros polipéptidos preparados a partir de fragmentos de anticorpos.

A presente invenção inclui fragmentos de anticorpos de ligação à IL-1 $\beta$  compreendendo qualquer uma das sequências das cadeias pesadas ou leves anteriores e que ligam a IL-1 $\beta$ . O termo fragmentos como aqui utilizados refere-se a quaisquer 3 ou mais aminoácidos contíguos (e.g., 4 ou mais, 5 ou mais 6 ou mais, 8 ou mais, ou até mesmo 10 ou mais aminoácidos contíguos) do anticorpo e abrange os fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> e F(v), ou as regiões variáveis da cadeia leve ou pesada individuais, ou porção das mesmas. Os fragmentos de ligação à IL-1 $\beta$  incluem, por exemplo, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv e scFv. Estes fragmentos carecem do fragmento Fc de um anticorpo intacto, são eliminados mais rapidamente da circulação e podem ter menos ligação não específica ao tecido do que um anticorpo intacto. Ver Wahl et al. (1983), J. Nucl. Med., 24: 316-25. Estes fragmentos podem ser produzidos a partir de anticorpos intactos utilizando métodos bem conhecidos, por exemplo por dissociação proteolítica com enzimas tais como

papaína (para produzir fragmentos Fab) ou pepsina (para produzir fragmentos F(ab')<sub>2</sub>).

Na técnica encontram-se bem descritos ensaios *in vitro* e baseados em células para serem utilizados na determinação da ligação da IL-1 $\beta$  ao receptor de IL-1 de tipo I (IL-1R1), incluindo ensaios de determinação na presença de moléculas (tais como anticorpos, antagonistas ou outros inibidores) que se ligam à IL-1 $\beta$  ou IL-1RI. (ver, por exemplo, Evans et al., (1995), J. Biol. Chem. 270:11477-11483; Vigers et al., (2000), J. Biol. Chem. 275:36927-36933; Yanofsky et al., (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7381-7386; Fredericks et al., (2004), Protein Eng. Des. Sel. 17:95-106; Slack et al., (1993), J. Biol. Chem. 268:2513-2524; Smith et al., (2003), Immunity 18:87-96; Vigers et al., (1997), Nature 386:190-194; Ruggiero et al., (1997), J. Immunol. 158:3881-3887; Guo et al., (1995), J. Biol. Chem. 270:27562-27568; Svenson et al., (1995), Eur. J. Immunol. 25:2842-2850; Arend et al., (1994), J. Immunol. 153:4766-4774). O receptor de IL-1 de tipo I recombinante, incluindo o receptor de IL-1 de tipo I humano, para tais ensaios está facilmente disponível a partir de uma variedade de fontes comerciais (ver, por exemplo, R&D Systems, SIGMA). O receptor de IL-1 de tipo I pode ser também expresso a partir de uma construção ou vector de expressão introduzido numa célula hospedeira apropriada utilizando biologia molecular padrão e técnicas de transfecção conhecidas na matéria. O receptor de IL-1 de tipo I expresso pode ser depois isolado e purificado para

ser utilizado em ensaios de ligação ou, alternativamente, utilizado directamente numa forma associada a células.

Por exemplo, a ligação de IL-1 $\beta$  ao receptor de IL-1 de tipo I pode ser determinada imobilizando um anticorpo de ligação à IL-1 $\beta$ , pondo em contacto a IL-1 $\beta$  com o anticorpo imobilizado e determinando se a IL-1 $\beta$  foi ligada ao anticorpo, e pondo em contacto uma forma solúvel de IL-1RI com o complexo de IL-1 $\beta$  ligada/anticorpo e determinando se o IL-1RI solúvel se ligou ao complexo. O protocolo pode incluir também pôr o IL-1RI solúvel em contacto com o anticorpo imobilizado antes do contacto com a IL-1 $\beta$ , para confirmar que o IL-1RI solúvel não se liga ao anticorpo imobilizado. Este protocolo pode ser realizado utilizando um instrumento Biacore<sup>®</sup> para análise cinética das interacções de ligação. Um tal protocolo pode ser também utilizado para determinar se um anticorpo ou outra molécula permite ou bloqueia a ligação de IL-1 $\beta$  ao receptor de IL-1 de tipo I.

Para outros ensaios de ligação de IL-1 $\beta$  / IL-1RI, a permissão ou bloqueio da ligação de IL-1 $\beta$  ao receptor de IL-1 de tipo I pode ser determinado comparando a ligação de IL-1 $\beta$  ao IL-1RI na presença ou ausência de anticorpos IL-1 $\beta$  ou seus fragmentos de ligação à IL-1 $\beta$ . O bloqueio é identificado no resultado do ensaio como uma redução designada da ligação de IL-1 $\beta$  ao receptor de IL-1 de tipo I na presença de anticorpos anti-IL-1 $\beta$  ou seus fragmentos de ligação à IL-1 $\beta$ , em comparação com uma amostra de controlo

que contém o tampão ou diluente correspondente mas não contém um anticorpo IL-1 $\beta$  ou seu fragmento de ligação à IL-1 $\beta$ . O resultado do ensaio pode ser visto qualitativamente como indicando a presença ou ausência de bloqueio, ou pode ser visto quantitativamente como indicando uma percentagem ou número de vezes de redução na ligação devido à presença do anticorpo ou fragmento.

Alternativa ou adicionalmente, quando um anticorpo de ligação à IL-1 $\beta$  ou fragmento de ligação à IL-1 $\beta$  bloqueia substancialmente a ligação de IL-1 $\beta$  ao IL-1RI, a ligação de IL-1 $\beta$  ao IL-1RI é reduzida em pelo menos 10 vezes, alternativamente pelo menos cerca de 20 vezes, alternativamente pelo menos cerca de 50 vezes, alternativamente pelo menos cerca de 100 vezes, alternativamente pelo menos cerca de 1 000 vezes, alternativamente pelo menos cerca de 10 000 vezes, ou mais, em comparação com a ligação das mesmas concentrações de IL-1 $\beta$  e IL-1RI na ausência do anticorpo ou fragmento. Como outro exemplo, quando um anticorpo de ligação à IL-1 $\beta$  ou fragmento de ligação à IL-1 $\beta$  permite substancialmente a ligação de IL-1 $\beta$  ao IL-1RI, a ligação de IL-1 $\beta$  ao IL-1RI é pelo menos cerca de 90%, alternativamente pelo menos cerca de 95%, alternativamente pelo menos cerca de 99%, alternativamente pelo menos cerca de 99,9%, alternativamente pelo menos cerca de 99,99%, alternativamente pelo menos cerca de 99,999%, alternativamente pelo menos cerca de 99,9999%, alternativamente idêntica, de forma substancial, à ligação das mesmas concentrações de IL-1 $\beta$  e IL-1RI na ausência do anticorpo ou fragmento.

No contexto da presente invenção são descritos anticorpos de ligação à IL-1 $\beta$  ou fragmentos de ligação à IL-1 $\beta$  que se ligam ao mesmo epítopo ou substancialmente ao mesmo epítopo que um ou mais dos anticorpos ilustrativos aqui descritos. Alternativa ou adicionalmente, os anticorpos de ligação à IL-1 $\beta$  ou fragmentos de ligação à IL-1 $\beta$  competem com a ligação de um anticorpo que tem as sequências das regiões variáveis do AB7, descrito no pedido US número 11/472813 ou WO 2007/002261 (sequências mostradas abaixo). Como um exemplo, quando um anticorpo de ligação à IL-1 $\beta$  ou fragmento de ligação à IL-1 $\beta$  compete com a ligação de um anticorpo que tem a região variável da cadeia leve de SEQ ID NO:5 e a região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6, a ligação de um anticorpo que tem a região variável da cadeia leve de SEQ ID NO:5 e a região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6 à IL-1 $\beta$  pode ser reduzida em pelo menos cerca de 2 vezes, alternativamente pelo menos cerca de 5 vezes, alternativamente pelo menos cerca de 10 vezes, alternativamente pelo menos cerca de 20 vezes, alternativamente pelo menos cerca de 50 vezes, alternativamente pelo menos cerca de 100 vezes, alternativamente pelo menos cerca de 1 000 vezes, alternativamente pelo menos cerca de 10 000 vezes, ou mais, se a ligação é medida na presença do anticorpo de ligação à IL-1 $\beta$  ou fragmento de ligação à IL-1 $\beta$ . O anticorpo de ligação à IL-1 $\beta$  ou fragmento de ligação à IL-1 $\beta$  pode estar presente em excesso do anticorpo que tem a região variável da cadeia leve de SEQ ID NO:5 e a região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6, por exemplo um

excesso de pelo menos cerca de 2 vezes, alternativamente pelo menos cerca de 5 vezes, alternativamente pelo menos cerca de 10 vezes, alternativamente pelo menos cerca de 20 vezes, alternativamente pelo menos cerca de 50 vezes, alternativamente pelo menos cerca de 100 vezes, alternativamente pelo menos cerca de 1 000 vezes, alternativamente pelo menos cerca de 10 000 vezes. Alternativa ou adicionalmente, a presente invenção abrange anticorpos e fragmentos de ligação à IL-1 $\beta$  que se ligam a um epítopo contido na sequência de aminoácidos ESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIE (SEQ ID NO: 1), um epítopo ao qual se ligam os anticorpos designados AB5 e AB7 (pedido US número 11/472813, WO 2007/002261). Como aqui considerado, pode determinar-se facilmente se um antícorpo ou fragmento de ligação à IL-1 $\beta$  se liga ao mesmo epítopo ou substancialmente ao mesmo epítopo que um ou mais dos anticorpos ilustrativos, tais como por exemplo o antícorpo designado AB7, utilizando qualquer um dos vários métodos conhecidos na técnica.

Por exemplo, os resíduos de aminoácidos chave (epítopo) ligados por um antícorpo ou fragmento de ligação à IL-1 $\beta$  podem ser determinados utilizando uma matriz peptídica, tal como por exemplo, uma matriz peptídica PepSpot<sup>TM</sup> (JPT Peptide Technologies, Berlim, Alemanha), em que um varrimento de doze péptidos de aminoácidos, que se estende por toda a sequência de aminoácidos da IL-1 $\beta$ , sobrepondo-se cada péptido sobre 11 aminoácidos com o anterior, é sintetizado directamente numa membrana. A membrana que tem os péptidos é depois sondada com o

anticorpo para o qual é procurada informação de ligação ao epítopo, por exemplo a uma concentração de 2 µg/mL, durante 2 h à temperatura ambiente. A ligação de anticorpo aos péptidos ligados à membrana pode ser detectada utilizando um anticorpo secundário de cabra anti-humano (ou murganho, quando apropriado) conjugado com HRP, seguido de quimioluminescência melhorada (ECL). A(s) mancha(s) de péptidos correspondentes a resíduos ou sequências de aminoácidos particulares da proteína IL-1 $\beta$  madura, e que se classificam positivamente para a ligação ao anticorpo, são indicativos do epítopo ligado pelo anticorpo particular.

Alternativa ou adicionalmente, pode realizar-se experiências de competição de anticorpos e tais ensaios são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, para determinar se um anticorpo ou fragmento liga-se a um epítopo contido numa sequência peptídica compreendendo os aminoácidos ESVDPKN-YPKKMEKRFVFNKIE (SEQ ID NO: 1), o qual corresponde aos resíduos 83-105 da proteína IL-1 $\beta$  madura, um anticorpo de especificidade desconhecida pode ser comparado com qualquer um dos anticorpos ilustrativos (e.g., AB7) da presente invenção que se sabe que se ligam a um epítopo contido dentro desta sequência. Os ensaios de ligação de competição podem ser realizados, por exemplo, utilizando um instrumento Biacore® para análise cinética das interacções de ligação ou por ELISA. Num tal ensaio, o anticorpo de especificidade de epítopo desconhecida é avaliado quanto à sua aptidão para competir pela ligação contra o anticorpo de comparação conhecido (e.g., AB7). A competição pela

ligação a um epítopo particular é determinada por uma redução na ligação ao epítopo de IL-1 $\beta$  de pelo menos cerca de 50%, ou pelo menos cerca de 70%, ou pelo menos cerca de 80%, ou pelo menos cerca de 90%, ou pelo menos cerca de 95%, ou pelo menos cerca de 99% ou cerca de 100% para o anticorpo de comparação conhecido (e.g., AB7) e é indicativa de ligação substancialmente ao mesmo epítopo.

Face à identificação nesta divulgação de regiões de ligação à IL-1 $\beta$  em anticorpos e/ou epítopos ilustrativos reconhecidos pelos anticorpos divulgados, considera-se que podem ser gerados anticorpos adicionais com características de ligação semelhantes e utilidade terapêutica ou de diagnóstico que se assemelham às formas de realização desta divulgação.

Os fragmentos de ligação a antigénio de um anticorpo incluem fragmentos que retêm a aptidão para se ligar especificamente a um antigénio, geralmente por retenção da porção de ligação ao antigénio do anticorpo. Encontra-se bem estabelecido que a função de ligação ao antigénio de um anticorpo pode ser realizada por fragmentos de um anticorpo de comprimento total. Os exemplos de porções de ligação ao antigénio incluem (i) um fragmento Fab, o qual é um fragmento monovalente consistindo dos domínios VL, VH, CL e CH1; (ii) um fragmento F(ab')<sup>2</sup>, o qual é um fragmento bivalente que compreende dois fragmentos Fab ligados por uma ponte de dissulfureto na região charneira; (iii) um fragmento Fd, o qual é os domínios VH e

CH1; (iv) um fragmento Fv, o qual é os domínios VL e VH de um único membro de um anticorpo, (v) um fragmento dAb (Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546), o qual é um domínio VH; e (vi) uma região determinante de complementaridade (CDR) isolada. Os anticorpos de cadeia simples estão também incluídos dentro do termo porção de ligação ao antigénio de um anticorpo. Os anticorpos e fragmentos de ligação à IL-1 da presente invenção abrangem também os domínios de ligação derivados de CDR monovalentes ou multivalentes, ou monoméricos ou multiméricos (e.g. tetraméricos), com ou sem uma armação (por exemplo, armação por proteínas ou hidratos de carbono).

Os presentes anticorpos ou fragmentos de ligação à IL-1 $\beta$  podem fazer parte de moléculas de imunoadesão maiores, formadas por associação covalente ou não covalente do anticorpo ou porção de anticorpo com uma ou mais de outras proteínas ou péptidos. Os exemplos de tais moléculas de imunoadesão incluem a utilização da região central de estreptavidina para preparar uma molécula scFv tetramérica (Kipriyanov, S. M., et al. (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) e a utilização de um resíduo de cisteína, um péptido marcador e um marcador de polihistidina C-terminal para preparar moléculas scFv bivalentes e biotiniladas (Kipriyanov, S. M., et al. (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058). Os anticorpos e fragmentos compreendendo moléculas de imunoadesão podem ser obtidos utilizando técnicas de ADN recombinante correntes, como aqui descritas. As porções de ligação ao antigénio

preferidas são domínios completos ou pares de domínios completos.

Os anticorpos e fragmentos de ligação à IL-1 $\beta$  da presente invenção abrangem também fragmentos de anticorpos de domínio (dAb) (Ward et al., *Nature* 341:544-546, 1989) que consistem de um domínio  $V_H$ . Os anticorpos e fragmentos de ligação à IL-1 $\beta$  da presente invenção abrangem também diacorpos, os quais são anticorpos bivalentes nos quais os domínios  $V_H$  e  $V_L$  são expressos numa única cadeia polipeptídica, mas utilizando uma unidade de ligação que é demasiado curta para permitir o emparelhamento entre os dois domínios da mesma cadeia, obrigando desse modo os domínios a emparelhar com domínios complementares de outra cadeia e a criar dois sítios de ligação de antígeno (ver e.g., EP 404,097; WO 93/11161; Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448, 1993, e Poljak et al., *Structure* 2:1121-1123, 1994). Os diacorpos podem ser biespecíficos ou monoespecífico.

Os anticorpos e fragmentos de ligação à IL-1 $\beta$  da presente invenção abrangem também fragmentos de anticorpos de cadeia simples (scFv) que se ligam à IL-1 $\beta$ . Um scFv comprehende uma região variável da cadeia pesada do anticorpo ( $V_H$ ) operacionalmente ligada a uma região variável da cadeia leve do anticorpo ( $V_L$ ) em que a região variável da cadeia pesada e a região variável da cadeia leve, em conjunto ou individualmente, formam um sítio de ligação que liga a IL-1 $\beta$ . Um scFv pode compreender uma

região  $V_H$  região na extremidade amino-terminal e uma região  $V_L$  na extremidade carboxi-terminal. Alternativamente, o scFv pode compreender uma região  $V_L$  na extremidade amino-terminal e uma região  $V_H$  na extremidade carboxi-terminal. Além disso, embora os dois domínios do fragmento Fv,  $V_L$  e  $V_H$ , sejam codificados por genes separados, eles podem ser unidos, utilizando métodos recombinantes, por uma unidade de ligação sintética que os permite preparar como uma cadeia de proteína simples na qual as regiões  $V_L$  e  $V_H$  emparelham para formar moléculas monovalentes (conhecidas como Fv de cadeia simples (scFv); ver *e.g.*, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; e Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883).

Um scFv pode compreender ainda opcionalmente uma unidade de ligação polipeptídica entre a região variável da cadeia pesada e a região variável da cadeia leve. Tais unidades de ligação polipeptídicas compreendem geralmente entre 1 e 50 aminoácidos, alternativamente entre 3 e 12 aminoácidos, alternativamente 2 aminoácidos. Um exemplo de um péptido de ligação para unir as cadeias pesada e leve num scFv compreende a sequência de 5 aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 2). Outros exemplos compreendem uma ou mais repetições em série desta sequência (por exemplo, um polipéptido compreendendo duas a quatro repetições de Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 2) para criar unidades de ligação.

Os anticorpos e fragmentos de ligação à IL-1 $\beta$

descritos no contexto da presente invenção abrangem também anticorpos de cadeia pesada (HCAb). As exceções à estrutura  $H_2L_2$  dos anticorpos convencionais ocorrem em alguns isotipos das imunoglobulinas encontradas em camelídeos (camelos, dromedários e lamas; Hamers-Casterman et al., 1993 *Nature* 363: 446; Nguyen et al., 1998 *J. Mol. Biol.* 275: 413), tubarões-tapete (Nuttall et al., *Mol Immunol.* 38:313-26, 2001), tubarões-dormedor (Greenberg et al., *Nature* 374:168-73, 1995; Roux et al., 1998 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95: 11804) e na quimera-americana (Nguyen, et al., "Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation," 2002 *Immunogenetics* 54(1): 39-47). Estes anticorpos podem aparentemente formar regiões de ligação a抗ígeno utilizando apenas regiões variáveis da cadeia pesada, na medida em que estes anticorpos funcionais são dímeros de apenas cadeias pesadas (referidos como "anticorpos de cadeia pesada" ou "HCAbs"). Por conseguinte, algumas formas de realização dos presentes anticorpos e fragmentos de ligação à IL-1 $\beta$  podem ser anticorpos de cadeia pesada que se ligam especificamente à IL-1 $\beta$ . Por exemplo, os anticorpos de cadeia pesada que são uma classe de IgG e desprovidos de cadeias leves são produzidos por animais do género Camelidae que inclui camelos, dromedários e lamas (Hamers-Casterman et al., *Nature* 363:446-448 (1993)). Os HCabs têm um peso molecular de cerca de 95 kDa em vez dos cerca de 160 kDa de peso molecular dos anticorpos de IgG convencionais. Os seus domínios de ligação consistem apenas dos domínios variáveis da cadeia pesada, frequentemente referidos como  $V_{HH}$  para os

distinguir da  $V_H$  convencional. Muylldermans et al., *J. Mol. Recognit.* 12:131-140 (1999). O domínio variável dos anticorpos de cadeia pesada é por vezes referido como um nanocorpo (Cortez-Retamozo et al., *Cancer Research* 64:2853-57, 2004). Uma biblioteca de nanocorpos pode ser gerada a partir de um dromedário imunizado como descrito em Conrath et al., (*Antimicrob Agents Chemother* 45: 2807-12, 2001) ou utilizando métodos recombinantes.

Uma vez que o primeiro domínio constante ( $C_{H1}$ ) está ausente (eliminado durante o processamento do ARNm devido à perda de um sinal consenso de excisão-união), o domínio variável ( $V_{HH}$ ) é imediatamente seguido da região charneira, dos domínios  $C_{H2}$  e  $C_{H3}$  (Nguyen et al., *Mol. Immunol.* 36:515-524 (1999); Woolven et al., *Immunogenetics* 50:98-101 (1999)). Alguns referem que o  $V_{HH}$  camelídeo recombina com as regiões constantes de IgG2 e IgG3 que contêm os domínios charneira, CH2 e CH3 e carecem de um domínio CH1 (Hamers-Casterman et al., *supra*). Por exemplo, a IgG1 de lama é um isotipo de anticorpo convencional ( $H_2L_2$ ) no qual a  $V_H$  recombina com uma região constante que contém os domínios charneira, CH1, CH2 e CH3, enquanto as IgG2 e IgG3 de lama são isotipos apenas de cadeia pesada que carecem dos domínios CH1 e que não contêm cadeias leves.

Embora os HCAbs sejam desprovidos de cadeias leves, eles têm um reportório de ligação a antigénio. O mecanismo de geração genética de HCAbs é revisto em Nguyen

et al. *Adv. Immunol.* 79:261-296 (2001) e Nguyen et al., *Immunogenetics* 54:39-47 (2002). Os tubarões, incluindo o tubarão-dormedor, exibem domínios V monoméricos únicos que contêm receptores de抗igenios semelhantes. Irving et al., *J. Immunol. Methods* 248:31-45 (2001); Roux et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:11804 (1998).

Os  $V_{HH}$ s compreendem fragmentos de ligação a抗igenio intactos pequenos (por exemplo, fragmentos com cerca de 15 kDa, 118-136 resíduos). Foi determinado que os domínios  $V_{HH}$  camelídeos ligam-se aos抗igenios com alta afinidade (Desmyter et al., *J. Biol. Chem.* 276:26285-90, 2001), com afinidades  $V_{HH}$  tipicamente na gama nanomolar e comparáveis com aquelas dos fragmentos Fab e scFv. Os  $V_{HH}$  são altamente solúveis e mais estáveis do que os derivados correspondentes dos fragmentos scFv e Fab. Os fragmentos  $V_H$  têm sido relativamente difíceis de produzir na forma solúvel, mas podem ser obtidas melhorias na solubilidade e ligação específica quando os resíduos estruturais são alterados para serem mais semelhantes a  $V_{HH}$ . (Ver, por exemplo, Reichman et al., *J Immunol Methods* 1999, 231:25-38.) Os  $V_{HH}$ s têm substituições de aminoácidos que os tornam mais hidrófilos e previnem uma interacção prolongada com a BiP (proteína de ligação à cadeia pesada de imunoglobulina), a qual se liga normalmente à cadeia H no Reticulo Endoplasmático (ER) durante a dobragem e montagem, até ser deslocada pela cadeia L. Devido à maior hidrofilicidade dos  $V_{HH}$ s, a secreção a partir do ER é melhorada.

Os  $V_{HH}$ s funcionais podem ser obtidos por dissociação proteolítica de HCAb de um camelídeo imunizado, por clonagem directa dos genes de  $V_{HH}$  a partir de células B de um camelídeo imunizado que resulta em  $V_{HH}$ s recombinantes, ou a partir de bibliotecas naturais ou sintéticas. Os  $V_{HH}$  com especificidade de抗原 desejada podem ser também obtidos através da metodologia de apresentação em fagos. A utilização de  $V_{HH}$ s na apresentação em fagos é muito mais simples e mais eficiente em comparação com os Fabs ou scFvs, uma vez que tem de ser clonado e expresso apenas um domínio para obter um fragmento funcional de ligação a抗原. Muyldermans, Biotechnol. 74:277-302 (2001); Ghahroudi et al., FEBS Lett. 414:521-526 (1997); e van der Linden et al., J. Biotechnol. 80:261-270 (2000). Os métodos para gerar anticorpos que têm cadeias pesadas de camelídeo são também descritos nas Publicações de Patente U.S. nº 20050136049 e 20050037421.

Os métodos de apresentação em ribossomas podem ser utilizados para identificar e isolar moléculas de scFv e/ou  $V_{HH}$  que têm a actividade de ligação e afinidade desejadas. Irving et al., J. Immunol. Methods 248:31-45 (2001). A apresentação e selecção em ribossomas tem o potencial de gerar e apresentar bibliotecas maiores ( $10^{14}$ ).

Outras formas de realização proporcionam moléculas semelhantes aos  $V_{HH}$  gerados através do processo de camelização, modificando o  $V_H$  não-Camelidae, tais como  $V_{HHS}$  humanos, para melhorar a sua solubilidade e prevenir a

ligação não específica. Isto é conseguido substituindo os resíduos do lado  $V_L$  dos  $V_H$  com resíduos semelhantes ao  $V_{HH}$ , imitando desse modo os fragmentos  $V_{HH}$  mais solúveis. Espera-se que os fragmentos  $V_H$  camelizados, em particular aqueles baseados na estrutura humana, apresentem uma resposta imunológica fortemente reduzida quando administrados *in vivo* a um doente e, por conseguinte, espera-se que tenham vantagens significativas para aplicações terapêuticas. Davies et al., FEBS Lett. 339:285-290 (1994); Davies et al., Protein Eng. 9:531-537 (1996); Tanha et al., J. Biol. Chem. 276:24774-24780 (2001); e Riechmann et al., Immunol. Methods 231:25-38 (1999).

Está disponível uma grande variedade de sistemas de expressão para a produção de fragmentos de IL-1 $\beta$  incluindo fragmentos Fab, scFv e  $V_{HHS}$ . Por exemplo, os sistemas de expressão de origem procariótica e eucariótica podem ser utilizados para a produção em grande escala de fragmentos de anticorpos e proteínas de fusão de anticorpos. São particularmente vantajosos os sistemas de expressão que permitem a secreção de grandes quantidades de fragmentos de anticorpos para o meio de cultura.

A produção de Fab-scFv biespecíficos ("bicorpo") e Fab-(scFv) (2) triespecíficos ("tricorpo") é descrita em Schoonjans et al. (J Immunol. 165:7050-57, 2000) e Willems et al. (J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 786:161-76, 2003). Para os bicorpos ou tricorpos, uma molécula de scFv é fundida com uma ou ambas as cadeias VL-

CL (L) e VH-CH<sub>1</sub> (Fd), e.g., para produzir um tricorpo são fundidos dois scFvs com a extremidade C de Fab enquanto num bicorpo um scFv é fundido com a extremidade C de Fab. Um "minicorpo" que consiste de scFv fundido com CH3 através de uma unidade de ligação peptídica (sem charneira) ou através de uma charneira de IgG foi descrito em Olafsen, et al., Protein Eng Des Sel. 2004 Apr; 17(4):315-23.

Os intracorpos são anticorpos de cadeia simples que demonstram expressão intracelular e podem manipular a função proteica intracelular (Biocca, et al., EMBO J. 9:101-108, 1990; Colby et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 101:17616-21, 2004). Os intracorpos, os quais compreendem sequências sinal celulares que retêm a construção de anticorpo nas regiões intracelulares, podem ser produzidos como descrito em Mhashilkar et al (EMBO J 14:1542-51, 1995) e Wheeler et al. (FASEB J. 17:1733-5. 2003). Os transcorpos são anticorpos permeáveis a células nos quais um domínio de transdução de proteína (PTD) está fundido com anticorpos de fragmento variável de cadeia única (scFv) Heng et al., (Med Hypotheses. 64:1105-8, 2005).

Os anticorpos e fragmentos de ligação à IL-1 $\beta$  descritos no contexto da presente invenção abrangem também anticorpos que são SMIPs ou proteínas de fusão de imunoglobulina de domínio de ligação específicas para a proteína alvo. Estas construções são polipéptidos de cadeia simples compreendendo domínios de ligação a antigénio fundidos com domínios de imunoglobulina necessários para

realizar as funções efectoras de anticorpo. Ver e.g., WO03/041600, Publicação de Patente U.S. 20030133939 e Publicação de Patente US 20030118592.

Os anticorpos e fragmentos de ligação à IL-1 $\beta$  descritos no contexto da presente invenção abrangem também imunoadesinas. Uma ou mais CDRs podem ser incorporadas numa molécula quer covalentemente ou não covalentemente para a tornar imunoadesina. Uma imunoadesina pode incorporar a(s) CDR(s) como parte de uma cadeia polipeptídica maior, pode ligar covalentemente a(s) CDR(s) a outra cadeia polipeptídica, ou pode incorporar a(s) CDR(s) não covalentemente. As CDRs aqui divulgadas permitem que a imunoadesina se ligue especificamente à IL-1 $\beta$ .

Os anticorpos e fragmentos de ligação à IL-1 $\beta$  da presente invenção abrangem também miméticos de anticorpos compreendendo uma ou mais porções de ligação à IL-1 $\beta$  construídas sobre uma armação orgânica ou molecular (tal como uma armação de proteína ou hidrato de carbono). As proteínas possuindo estruturas tridimensionais relativamente definidas, geralmente referidas como armações de proteína, podem ser utilizadas como reagentes para a concepção de miméticos de anticorpos. Estas armações contêm tipicamente uma ou mais regiões que são adequadas para variação específica ou aleatória da sequência, e essa aleatorização das sequências é frequentemente realizada para produzir bibliotecas de proteínas a partir da qual podem ser seleccionados produtos desejados. Por exemplo, um

mimético de anticorpo pode compreender uma polipéptido de ligação quimérico não imunoglobulínico possuindo uma armação contendo um domínio semelhante a imunoglobulina que tem duas ou mais voltas expostas a solvente contendo uma CDR diferente de um anticorpo parental inserida em cada uma das voltas e que apresenta actividade de ligação selectiva para um ligando ligado pelo anticorpo parental. As armações proteicas não imunoglobulínicas têm sido propostas para obter proteínas com novas propriedades de ligação. (Tramontano et al., J. Mol. Recognit. 7:9, 1994; McConnell e Hoess, J. Mol. Biol. 250:460, 1995). Outras proteínas foram testadas como estruturas e foram utilizadas para apresentar resíduos aleatorizados em superfícies de hélice alfa (Nord et al., Nat. Biotechnol. 15:772, 1997; Nord et al., Protein Eng. 8:601, 1995), voltas entre hélices alfa em pacotes de hélices alfa (Ku e Schultz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6552, 1995) e voltas constrangidas por pontes dissulfureto, tais como aquelas dos inibidores pequenos de protéase (Markland et al., Biochemistry 35:8045, 1996; Markland et al., Biochemistry 35:8058, 1996; Rottgen e Collins, Gene 164:243, 1995; Wang et al., J. Biol. Chem. 270:12250, 1995). Os métodos de utilização de armações para miméticos de anticorpos são divulgados na Patente US 5,770,380 e Publicações de Patente US 2004/0171116, 2004/0266993 e 2005/0038229.

No contexto da presente invenção, os anticorpos ou fragmentos de anticorpos IL-1 $\beta$  descritos para serem utilizados de acordo com a invenção ligam-se geralmente à

IL-1 $\beta$  humana com alta afinidade (e.g., como determinado por BIACORE), tal como por exemplo com uma constante de dissociação da ligação no equilíbrio ( $K_D$ ) para a IL-1 $\beta$  de cerca de 10 nM ou menos, cerca de 5 nM ou menos, cerca de 1 nM ou menos, cerca de 500 pM ou menos, ou mais preferencialmente cerca de 250 pM ou menos, cerca de 100 pM ou menos, cerca de 50 pM ou menos, cerca de 25 pM ou menos, cerca de 10 pM ou menos, cerca de 5 pM ou menos, cerca de 3 pM ou menos, cerca de 1 pM ou menos, cerca de 0,75 pM ou menos, cerca de 0,5 pM ou menos, ou cerca de 0,3 pM ou menos. A constante de dissociação pode ser medida utilizando Biacore (GE Healthcare), e a medição utilizando Biacore pode ser preferida quando a constante de dissociação é superior a cerca de 10 pM. Alternativa ou adicionalmente, a constante de dissociação pode ser medida utilizando KinExA (Sapidyne Instruments, Inc), e a medição utilizando KinExA pode ser preferida quando a constante de dissociação é inferior a cerca de 10 pM.

Os anticorpos ou fragmentos descritos no contexto da presente invenção podem, por exemplo, ligar-se à IL-1 $\beta$  com uma IC<sub>50</sub> de cerca de 10 nM ou menos, cerca de 5 nM ou menos, cerca de 2 nM ou menos, cerca de 1 nM ou menos, cerca de 0,75 nM ou menos, cerca de 0,5 nM ou menos, cerca de 0,4 nM ou menos, cerca de 0,3 nM ou menos, ou até mesmo cerca de 0,2 nM ou menos, como determinada pelo ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Preferencialmente, o anticorpo ou fragmento de anticorpo da presente invenção não reage de forma cruzada com qualquer alvo diferente da

IL-1. Por exemplo, os anticorpos e fragmentos descritos no contexto da presente invenção podem ligar-se à IL-1 $\beta$ , mas não se ligam de forma detectável à IL-1 $\alpha$ , ou têm pelo menos cerca de 100 vezes (e.g., pelo menos cerca de 150 vezes, pelo menos cerca de 200 vezes ou até mesmo pelo menos cerca de 250 vezes) maior selectividade na sua ligação de IL-1 $\beta$  relativamente à sua ligação de IL-1 $\alpha$ . Os anticorpos ou fragmentos descritos de acordo com a presente invenção podem, em certas formas de realização, inibir a expressão induzida por IL-1 $\beta$  da IL-6 sérica num animal em pelo menos 50% (e.g., pelo menos 60%, pelo menos 70% ou até mesmo pelo menos 80%) em comparação com o nível de IL-6 sérica num animal estimulado com IL-1 $\beta$  que não foi administrado com um antícorpo ou fragmento da invenção. Os anticorpos podem ligar a IL-1 $\beta$  mas permitem ou permitem substancialmente a ligação do ligando IL-1 $\beta$  ligado ao receptor de IL-1 de tipo I (IL-1RI). Em contraste com muitos anticorpos de ligação à IL-1 $\beta$  conhecidos que bloqueiam ou interferem substancialmente com a ligação da IL-1 $\beta$  ao IL-1RI, os anticorpos designados AB5 e AB7 (número de pedido US 11/472813, WO 2007/002261) ligam-se selectivamente ao ligando IL-1 $\beta$ , mas permitem a ligação do ligando IL-1 $\beta$  ligado ao IL-1RI. Por exemplo, o antícorpo designado AB7 liga-se a um epítopo de IL-1 $\beta$  mas continua a permitir que a IL-1 $\beta$  ligada se ligue ao IL-1RI. Em certas formas de realização, o antícorpo pode diminuir a afinidade de interacção da IL-1 $\beta$  ligada para se ligar ao IL-1RI. Por conseguinte, a invenção proporciona, num aspecto relacionado, a utilização de um antícorpo de ligação à IL-

$1\beta$  ou fragmento de anticorpo de ligação à IL-1 $\beta$  que tem pelo menos uma das características supramencionadas. Qualquer um dos anticorpos, fragmentos de anticorpos ou polipeptídos anteriores da invenção podem ser humanizados ou manipulados humanos, como aqui descrito.

De acordo com a invenção, o AB7 (número de pedido US 11/472813, WO2007/002261) pode ser utilizado de acordo com a invenção. O número de pedido US 11/472813 e WO2007/002261 divulgam também o AB5. As sequências das regiões variáveis de AB5 e AB7 (também referido como XOMA 052) são como se segue:

**AB5**

*CADEIA LEVE*  
DIQMTQTSSLASALGDRVTISCRASQDISNYLSWYQQKPDGTVKLLIYYTSKLHS  
GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCLQGKMLPWTFGGGTKLEIK (SEQ  
ID NO: 3)

As sequências sublinhadas representam (da esquerda para a direita) CDR1, 2 e 3.

*CADEIA PESADA*  
QVTLKESGPGILKPSQTLSLTCSFGFSLSTSGMVGWIRQPSGKGLEWLAHIWW  
DGDESYNPSLKTQLTISKDTSRNQVFLKITSVDTVDTATYFCARNRYDPPWFVD  
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 4)

As sequências sublinhadas representam (da esquerda para a direita) CDR1, 2 e 3.

**AB7**

*CADEIA LEVE*  
DIQMTQSTSSLASAVGDRVITCRASQDISNYLSWYQQKPGKAVKLLIYYTSKLH  
SGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQQEDFATYFCLQGKMLPWTFGQGTKLEIK  
(SEQ ID NO: 5)

As sequências sublinhadas representam (da esquerda para a direita) CDR1, 2 e 3.

*CADEIA PESADA*  
QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCSFGFSLSTSGMGVGWIRQPSGKGLEWLAHIW  
WDGDESYNPSLKSRLTISKDTSKNQVSLKITSVTAADTAVYFCARNRYDPPWFV  
DWGQQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 6)

As sequências sublinhadas representam (da esquerda para a direita) CDR1, 2 e 3.

Os anticorpos e fragmentos de anticorpos aqui descritos podem ser preparados por qualquer método adequado. Os métodos de preparação adequados de tais anticorpos e fragmentos de anticorpos são conhecidos na técnica. Outros métodos de preparação dos anticorpos e fragmentos de anticorpos são como aqui descritos como parte da invenção. O anticorpo, fragmento de anticorpo ou polipeptídeo da invenção, como aqui descrito, pode ser isolado ou purificado até qualquer grau. Como aqui utilizado, um composto isolado é um composto que foi removido do seu ambiente natural. Um composto purificado é um composto cuja pureza foi aumentada, de tal forma que o composto existe numa forma

que é mais pura do que existe (i) no seu ambiente natural ou (ii) quando inicialmente sintetizado e/ou amplificado sob condições laboratoriais, em que "pureza" é um termo relativo e não significa necessariamente "pureza absoluta."

**Composições Farmacêuticas**

Os anticorpos e fragmentos de anticorpo de ligação à IL-1 (e.g., IL-1 $\beta$ ) para serem utilizados de acordo com a presente invenção podem ser formulados em composições, especialmente composições farmacêuticas, para serem utilizadas nos métodos aqui. Tais composições compreendem uma quantidade terapêutica ou profilacticamente eficaz de um anticorpo ou fragmento de anticorpo de ligação à IL-1 $\beta$  da invenção em mistura com um transportador adequado, e.g., um agente farmaceuticamente aceitável. Tipicamente, os anticorpos e fragmentos de anticorpo de ligação à IL-1 $\beta$  da invenção são suficientemente purificados para administração a um animal antes da formulação numa composição farmacêutica.

Os agentes farmaceuticamente aceitáveis incluem transportadores, excipientes, diluentes, antioxidantes, conservantes, corantes, aromatizantes e agentes de diluição, emulsionantes, agentes de suspensão, solventes, enchimentos, agentes de volume, tampões, veículos de administração, agentes de tonicidade, co-solventes, humectantes, complexantes, agentes tampão, antimicrobianos e tensioactivos.

O soro fisiológico tamponado neutro ou soro fisiológico misturado com albumina são transportadores apropriados ilustrativos. As composições farmacêuticas podem incluir antioxidantes tais como ácido ascórbico; polipéptidos de baixo peso molecular; proteínas, tais como albumina de soro, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrófilos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, arginina ou lisina; monossacáridos, dissacáridos e outros hidratos de carbono incluindo glucose, manose ou dextrinas; agentes quelantes tais como EDTA; açúcar álcoois tais como manitol ou sorbitol; contra-iões formadores de sais tais como sódio; e/ou tensioactivos não iónicos tais como Tween, pluronics, ou polietilenoglicol (PEG). Também a título de exemplo, os agentes de melhoria da tonicidade adequados incluem halogenetos de metais alcalinos (preferencialmente cloreto de sódio ou potássio), manitol, sorbitol e semelhantes. Os conservantes adequados incluem cloreto de benzalcónio, timerosal, álcool fenetílico, metilparabeno, propilparabeno, clorexidina, ácido sórbico e semelhantes. O peróxido de hidrogénio pode ser também utilizado como conservante. Os co-solventes adequados incluem glicerina, propilenoglicol e PEG. Os complexantes adequados incluem cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina ou hidroxi-propil-beta-ciclodextrina. Os tensioactivos ou humectantes adequados incluem ésteres de sorbitano, polissorbatos tais como polissorbato 80, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal e semelhantes. Os tampões podem ser tampões convencionais tais como acetato, borato,

citrato, fosfato, bicarbonato ou Tris-HCl. O tampão de acetato pode ser de cerca de pH 4-5,5, e o tampão de Tris pode ser de cerca de pH 7-8,5. Agentes farmacêuticos adicionais são definidos em Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990.

A composição pode estar na forma líquida ou numa forma liofilizada ou seca por congelação e pode incluir um ou mais lioprotectores, excipientes, tensioactivos, aditivos estruturais de alto peso molecular e/ou agentes de volume (ver, por exemplo, Patentes US 6,685,940, 6,566,329 e 6,372,716). Numa forma de realização é incluído um lioprotector, o qual é um açúcar não redutor tal como sacarose, lactose ou trealose. A quantidade de lioprotector geralmente incluída é tal que, após reconstituição, a formulação resultante será isotónica, embora as formulações hipertónicas ou ligeiramente hipotónicas possam ser também adequadas. Além disso, a quantidade de lioprotector deve ser suficiente para prevenir uma quantidade inaceitável de degradação e/ou agregação da proteína na liofilização. As concentrações de lioprotectores ilustrativas para açúcares (e.g., sacarose, lactose, trealose) na formulação pré-liofilizada são desde cerca de 10 mM a cerca de 400 mM. Noutra forma de realização, é incluído um tensioactivo, tal como por exemplo, tensioactivos não iónicos e tensioactivos iónicos tais como polissorbatos (e.g. polissorbato 20, polissorbato 80); poloxâmeros (e.g. poloxâmero 188); éteres fenílicos de poli(etilenoglicol) (e.g. Triton); dodecilsul-

fato de sódio (SDS); laurilsulfato de sódio; octilglicósido sódico; lauril-, miristil-, linoleil- ou estearil-sulfobetaina; lauril-, miristil-, linoleil- ou estearil-sarcosina; linoleil-, miristil- ou cetil-betaína; lauro-amidopropil-, cocamidopropil-, linoleamidopropil-, miristamidopropil-, palmidopropil- ou isoestearamidopropil-betaína (e.g. lauroamidopropilo); miristamidopropil-, palmidopropil- ou isoestearamidopropil-dimetilamina; metilco-coil-taurato sódico ou metilofeil-taurato dissódico; e a série MONAQUAT<sup>TM</sup> (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.), polietil glicol, polipropil glicol, e copolímeros de etileno e propilenoglicol (e.g. Pluronics, PF68 etc). As quantidades ilustrativas de tensioactivo que podem estar presentes na formulação pré-liofilizada são desde cerca de 0,001-0,5%. Os aditivos estruturais de alto peso molecular (e.g. enchimentos, aglutinantes) podem incluir, por exemplo, goma-arábica, albumina, ácido algínico, fosfato de cálcio (dibásico), celulose, carboximetilcelulose, carboximetilcelulose sódica, hidroxietilcelulose, hidroxipropilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, celulose microcristalina, dextrano, dextrina, dextratos, sacarose, tilose, amido pré-gelatinizado, sulfato de cálcio, amilose, glicina, bentonite, maltose, sorbitol, etilcelulose, hidrogenofosfato dissódico, difosfato sódico, pirossulfito dissódico, poli(álcool vinílico), gelatina, glucose, goma de guar, glucose líquida, açúcar compressível, silicato de alumínio e magnésio, maltodextrina, poli(óxido de etileno), polimetacrilatos, povidona, alginato de sódio, tragacanta celulose microcristalina, amido e zeína. As concentrações

ilustrativas de aditivos estruturais de alto peso molecular são desde 0,1% a 10% em peso. Noutras formas de realização, pode ser incluído um agente de volume (e.g., manitol, glicina).

As composições podem ser adequadas para administração parentérica. As composições ilustrativas são adequadas para injecção ou infusão num animal por qualquer via disponível para o especialista, tais como as vias intra-articular, subcutânea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimatoso), intracerebroventricular, intramuscular, intra-ocular, intra-arterial, intralesional, intra-rectal, transdérmica, oral e inalada. Uma formulação parentérica tipicamente será um estéril, apirogénica, solução aquosa isotónica, opcionalmente contendo farmaceuticamente aceitável conservantes.

Os exemplos de solventes não aquosos são propilenoglicol, polietilenoglicol, óleos vegetais tais como azeite, e ésteres orgânicos injectáveis tais como oleato de etilo. Os transportadores aquosos incluem água, soluções, emulsões ou suspensões alcoólicas/aquosas, incluindo soro fisiológico e meios tamponados. Os veículos parentéricos incluem solução de cloreto de sódio, dextrose de Ringer, dextrose e cloreto de sódio, Ringer lactado ou óleos fixos. Os veículos intravenosos incluem regeneradores líquidos e nutrientes, regeneradores electrólitos, tais como aqueles baseados em dextrose de Ringer, e semelhantes. Podem estar também presentes conservantes e outros aditivos, tais como,

por exemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes que-lantes, gases inertes e semelhantes. Ver, em geral, Remington's Pharmaceutical Science, 16th Ed., Mack Eds., 1980.

As composições farmacêuticas aqui descritas podem ser formuladas para administração controlada ou sustentada de uma maneira que proporciona concentração local de libertação sustentada do produto (e.g., bolus, efeito de depósito) e/ou maior estabilidade ou semivida num ambiente local particular. A invenção considera que em certas formas de realização essas composições podem incluir uma quantidade significativamente maior de anticorpo ou fragmento no depósito inicial, enquanto a quantidade eficaz de anticorpo ou fragmento efectivamente libertada e disponível em qualquer ponto no tempo para estar de acordo com a divulgação aqui é uma quantidade muito menor do que o depósito inicial. As composições podem incluir a formulação de anticorpos de ligação à IL-1 $\beta$ , fragmentos de anticorpos, ácidos nucleicos ou vectores da invenção com preparações em partículas de compostos poliméricos tais como poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), etc., bem como agentes tais como uma matriz biodegradável, microesferas injectáveis, partículas microcapsulares, microcápsulas, esférulas de partículas bioerodíveis, lipossomas e dispositivos de administração implantáveis que proporcionam uma libertação controlada ou sustentada do agente activo, o qual pode ser depois administrado como uma injecção de depósito. As técnicas de formulação de tais meios de administração sustentada ou controlada são conhecidas e foi

desenvolvida e utilizada uma variedade de polímeros para a libertação controlada e administração de fármacos. Tais polímeros são tipicamente biodegradáveis e biocompatíveis. Os hidrogeles poliméricos, incluindo aqueles preparados por complexação de segmentos poliméricos ou polipeptídicos enantioméricos, e os hidrogeles com propriedades sensíveis à temperatura ou pH, podem ser desejáveis para proporcionar um efeito de depósito de fármaco devido às condições suaves e aquosas envolvidas na retenção de agentes proteicos bioactivos (e.g., anticorpos). Ver, por exemplo, a descrição de micropartículas poliméricas porosas de libertação controlada para a administração de composições farmacêuticas na Publicação de Pedido PCT WO 93/15722.

Os materiais adequados para este efeito incluem polilactídeos (ver, e.g., Patente U.S. 3,773,919), polímeros de poli-(ácidos a-hidroxicarboxílicos), tais como poli-(ácido D-(-)-3-hidroxibutírico) (EP 133,988A), copolímeros de ácido L-glutâmico e gama L-glutamato de etilo (Sidman et al., *Biopolymers*, 22: 547-556 (1983)), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 15: 167-277 (1981) e Langer, *Chem. Tech.*, 12: 98-105 (1982)), etileno acetato de vinilo, ou poli-(ácido D(-)-3-hidroxibutírico). Outros polímeros biodegradáveis incluem poli(lactonas), poli(acetais), poli(ortoésteres) e poli(ortocarbonatos). As composições de libertação sustentada podem incluir também lipossomas, os quais podem ser preparados por qualquer um dos vários métodos conhecidos na técnica (ver, e.g., Eppstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,

82: 3688-92 (1985)). O próprio transportador, ou os seus produtos de degradação, devem ser não tóxicos no tecido alvo e não devem agravar ainda mais a condição. Isto pode ser determinado por triagem de rotina em modelos animais do distúrbio alvo ou, se esses modelos não estiverem disponíveis, em animais normais.

A microencapsulação de proteínas recombinantes para libertação sustentada foi realizada com sucesso com a hormona de crescimento humano (rhGH), interferão- (rhIFN--), interleucina-2 e MN rgp120. Johnson et al., *Nat. Med.*, 2:795-799 (1996); Yasuda, *Biomed. Ther.*, 27:1221-1223 (1993); Hora et al., *Bio/Technology* 8:755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems," in *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, Powell e Newman, eds, (Plenum Press: New York, 1995), p. 439-462; WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399; e Pat. U.S. nº 5,654,010. As formulações de libertação sustentada destas proteínas foram desenvolvidas utilizando polímero de poli-ácido láctico-coglicólico (PLGA) devido à sua biocompatibilidade e vasta gama de propriedades biodegradáveis. Os produtos de degradação de PLGA, os ácidos láctico e glicólico podem ser rapidamente eliminados do corpo humano. Além do mais, a degradabilidade deste polímero pode ser dependente do seu peso molecular e composição. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer," in: M. Chasin and R. Langer (Eds.), *Biodegradable Polymers as Drug Delivery*

Systems (Marcel Dekker: New York, 1990), p. 1-41. Os exemplos adicionais de composições de libertação sustentada incluem, por exemplo, EP 58,481A, Pat. U.S. nº 3,887,699, EP 158,277A, Patente Canadiana nº 1176565, U. Sidman et al., Biopolymers 22, 547 [1983], R. Langer et al., Chem. Tech. 12, 98 [1982], Sinha et al., J. Control. Release 90, 261 [2003], Zhu et al., Nat. Biotechnol. 18, 24 [2000], e Dai et al., Colloids SurfB Biointerfaces 41, 117 [2005].

São também considerados polímeros bioadesivos para serem utilizados nas ou com as composições da presente invenção. Os bioadesivos são materiais sintéticos e naturais capazes de aderir a substratos biológicos durante intervalos de tempo prolongados. Por exemplo, o Carbopol e policarbofilo são ambos derivados reticulados sintéticos do poli(ácido acrílico). Os sistemas de administração bioadesivos com base em substâncias naturais incluem, por exemplo, ácido hialurónico, também conhecido como hialuronano. O ácido hialurónico é um mucopolissacárido natural consistindo de resíduos de D-glucurónico e N-acetil-D-glucosamina. O ácido hialurónico encontra-se na matriz de tecidos extracelulares de vertebrados, incluindo nos tecidos conjuntivos, bem como no líquido sinovial e no vítreo e humor aquoso do olho. Os derivados esterificados de ácido hialurónico têm sido utilizados para produzir microesferas para serem utilizadas em administrações que são biocompatíveis e biodegradáveis (ver, por exemplo, Cortivo et al., Biomaterials (1991) 12:727-730; Publicação Europeia nº 517,565; Publicação Internacional nº WO 96/29998; Illum et

al., J. Controlled Rel. (1994) 29:133-141). As composições contendo ácido hialurónico ilustrativas da presente invenção compreendem um polímero de éster de ácido hialurónico numa quantidade de aproximadamente 0,1% a cerca de 40% (p/p) de um anticorpo ou fragmento de ligação à IL-1 $\beta$  relativamente ao polímero de ácido hialurónico.

Podem ser utilizadas matrizes poliméricas biodegradáveis e não biodegradáveis para administrar as composições de acordo com a invenção, e tais matrizes poliméricas podem compreender polímeros naturais ou sintéticos. As matrizes biodegradáveis são preferidas. O intervalo de tempo ao longo do qual ocorre a libertação baseia-se na selecção do polímero. Tipicamente, a libertação ao longo de um período que vai desde entre poucas horas e três até doze meses é muito desejável. Os polímeros sintéticos ilustrativos que podem ser utilizados para formar o sistema de administração biodegradável incluem: polímeros de ácido láctico e ácido glicólico, poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, polialquilenoglicóis, poli(óxidos de alquíleno), polialquíleno tereftalatos, poli(álcoois vinílicos), poli(éteres vinílicos), poli(ésteres vinílicos), poli(halogenetos de vinilo), polivinilpirrolidona, poliglicolídeos, polissiloxanos, polianidridos, poliuretanos e seus copolímeros, poli(ácido bético), poli(ácido valérico), alquilcelulose, hidroxialquilceluloses, éteres de celulose, ésteres de celulose, nitroceluloses, polímeros de ésteres acrílicos e metacrílicos, metilcelulose, etilcelulose, hidroxipropilcelulose, hidroxi-propilmetylcelulose, hidro-

xibutilmetilcelulose, acetato de celulose, propionato de celulose, acetato butirato de celulose, acetato ftalato de celulose, carboxiletilcelulose, triacetato de celulose, sal de sulfato de sódio de celulose, poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), poli(acrilato de octadecilo), polietileno, polipropileno, poli(etilenoglicol), poli(óxido de etileno), poli(tereftalato de etileno), poli(álcoois vinílicos), poli(acetato de vinilo), poli(cloreto de vinilo), poliestireno e polivinilpirrolidona. Os polímeros naturais ilustrativos incluem alginato e outros polissacáridos incluindo dextrano e celulose, colagénio, derivados químicos dos mesmos (substituições, adições de grupos químicos, por exemplo, alquilo, alquileno, hidroxilações, oxidações e outras modificações rotineiramente feitas pelos especialistas na técnica), albumina e outras proteínas hidrófilas, zeína e outras prolaminas e proteínas hidrófobas, copolímeros e misturas dos mesmos. Em geral, estes materiais degradam por hidrólise enzimática ou exposição à água in vivo, por erosão da superfície ou do volume. O polímero está opcionalmente na forma de um hidrogel (ver, por exemplo, WO 04/009664, WO 05/087201, Sawhney, et al., Macromolecules, 1993, 26, 581-587,) que pode absorver até cerca de 90% do seu peso em água e, além disso, está opcionalmente reticulado com iões multivalentes ou outros polímeros.

Os sistemas de administração incluem também sistemas não poliméricos que são lípidos incluindo esteróis tais como colesterol, ésteres de colesterol e ácidos gordos ou gorduras neutras tais como mono-, di- e tri-glicéridos; sistemas de libertação de hidrogel; sistemas silásticos; sistemas à base de péptidos; revestimentos de cera; comprimidos prensados utilizando aglutinantes e excipientes convencionais; implantes parcialmente fundidos; e semelhantes. Os exemplos específicos incluem, mas não se limitam a: (a) sistemas de erosão nos quais o produto está contido numa forma dentro de uma matriz tais como aqueles descritos na Pat. U.S. nº 4,452,775, 4,675,189 e 5,736,152 e (b) sistemas de difusão nos quais um produto permeia a uma velocidade controlado de um polímero tal como descrito na Pat. U.S. nº 3,854,480, 5,133,974 e 5,407,686. Os lipossomas contendo o produto podem ser preparados por métodos métodos conhecidos, tais como por exemplo (DE 3,218,121; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688-3692 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030-4034 (1980); EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; EP 142,641; pedido de patente Japonesa 83-118008; Pat. U.S. nº 4,485,045 e 4,544,545; e EP 102,324).

Uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo ou fragmento de ligação à IL-1 $\beta$  pode ser formulado para inalação, tal como por exemplo, como um pó seco. As soluções de inalação podem ser também formuladas num propelente liquefeito para administração em aerossol.

Ainda noutra formulação, as soluções podem ser nebulizadas. As composições farmacêuticas adicionais para administração pulmonar incluem aquelas descritas, por exemplo, na Publicação de Pedido PCT WO 94/20069, a qual divulga a administração pulmonar de proteínas quimicamente modificadas. Para administração pulmonar, o tamanho de partícula deve ser adequado para administração ao pulmão distal. Por exemplo, o tamanho de partícula pode ser desde 1  $\mu\text{m}$  até 5  $\mu\text{m}$ ; contudo, podem ser utilizadas partículas maiores, por exemplo, se cada partícula for razoavelmente porosa.

Certas formulações contendo anticorpos ou fragmentos de anticorpos de ligação à IL-1 $\beta$  podem ser administradas por via oral. As formulações administradas desta maneira podem ser formuladas com ou sem os transportadores habitualmente utilizados na formulação de formas de dosagem sólidas tais como comprimidos e cápsulas. Por exemplo, uma cápsula pode ser concebida para libertar a porção activa da formulação no ponto do tracto gastrointestinal onde a biodisponibilidade é maximizada e a degradação pré-sistémica é minimizada. Podem ser incluídos agentes adicionais para facilitar a absorção de um agente de ligação selectivo. Podem ser também utilizados diluentes, aromatizantes, ceras de baixo ponto de fusão, óleos vegetais, lubrificantes, agentes de suspensão, desintegrantes de comprimidos e aglutinantes.

Outra preparação pode envolver uma quantidade eficaz de um anticorpo ou fragmento de ligação à IL-1 $\beta$  numa

mistura com excipientes não tóxicos que são adequados para o fabrico de comprimidos. Ao dissolver os comprimidos em água estéril, ou outro veículo apropriado, podem ser preparadas soluções na forma de dose unitária. Os excipientes adequados incluem, mas não se limitam a, diluentes inertes, tais como carbonato de cálcio, carbonato ou bicarbonato de sódio, lactose ou fosfato de cálcio; ou aglutinantes, tais como amido, gelatina ou goma-arábica; ou lubrificantes tais como estearato de magnésio, ácido esteárico ou talco.

As formulações farmacêuticas adequadas e/ou preferidas podem ser determinadas face à presente divulgação e ao conhecimento geral da tecnologia de formulação, dependendo da via de administração pretendida, forma de administração e dosagem desejada. Independentemente do modo de administração, uma dose eficaz pode ser calculada de acordo com o peso corporal do doente, área de superfície corporal ou tamanho do órgão. Outras afinações dos cálculos para determinar a dosagem apropriada do tratamento envolvendo cada uma das formulações aqui descritas são rotineiramente feitos na técnica e estão dentro do âmbito das tarefas realizadas rotineiramente na técnica. As dosagens apropriadas podem ser apuradas através da utilização de dados dose-resposta apropriados.

Formulações adicionais serão evidentes à luz da presente divulgação, incluindo formulações envolvendo anticorpos e fragmentos de ligação à IL-1 $\beta$  em associação com um ou mais outros agentes terapêuticos. Por exemplo,

nalgumas formulações, um anticorpo de ligação à IL-1 $\beta$ , fragmento de anticorpo, ácido nucleico, ou vector da invenção é formulado com um segundo inibidor de uma via de sinalização da IL-1. Os segundos inibidores representativos incluem, mas não se limitam a, anticorpos, fragmentos de anticorpos, péptidos, polipéptidos, compostos, ácidos nucleicos, vectores e composições farmacêuticas, tais como, por exemplo, aqueles descritos em US 6899878, US 2003022869, US 20060094663, US 20050186615, US 20030166069, WO/04022718, WO/05084696, WO/05019259. Por exemplo, uma composição pode compreender um anticorpo de ligação à IL-1 $\beta$ , fragmento de anticorpo, ácido nucleico ou vector da invenção em associação com outro anticorpo de ligação à IL-1 $\beta$ , fragmento, ou um ácido nucleico ou vector que codifica um tal anticorpo ou fragmento.

As composições farmacêuticas podem compreender anticorpos ou fragmentos de ligação à IL-1 $\beta$  em associação com outros agentes activos. Tais associações são aquelas úteis para a sua finalidade pretendida. As associações que fazem parte desta invenção podem ser anticorpos e fragmentos IL-1 $\beta$ , tais como, por exemplo, aqueles aqui descritos, e pelo menos um agente adicional. Os exemplos de agentes activos que podem ser utilizados em associação definidos abaixo são para efeito ilustrativo e não pretendem estar limitados. A associação pode incluir também mais do que um agente adicional, e.g., dois ou três agentes adicionais se a associação for tal que a composição preparada pode realizar a sua função pretendida.

A invenção considera ainda que as composições farmacêuticas compreendendo um ou mais outros agentes activos podem ser administradas separadamente dos anticorpos ou fragmentos de ligação à IL-1 $\beta$ , e essas administrações separadas podem ser realizadas no mesmo ponto ou pontos diferentes no tempo, tal como por exemplo nos mesmos ou em dias diferentes. A administração dos outros agentes activos pode ser de acordo com as práticas médicas correntes conhecidas na técnica ou a administração pode ser modificada (e.g., intervalos mais longos, dosagens mais pequenas, início retardado) quando utilizada em conjunto com administração de anticorpos ou fragmentos de ligação à IL-1 $\beta$ , tais como aqui divulgados.

Os agentes activos ou associações com os presentes anticorpos ou fragmentos incluem indometacina, fármacos anti-inflamatórios não esteróides (NSAIDs) tais como aspirina, ibuprofeno, e outros derivados de ácido propiónico (alminoprofeno, benoxaprofeno, ácido buclóxico, carprofeno, fenbufeno, fenoprofeno, fluprofeno, flurbiprofeno, indoprofeno, cetoprofeno, mioprofeno, naproxeno, oxaprozina, pirprofeno, pranoprofeno, suprofeno, ácido tiaprofénico e tioxaprofeno), derivados de ácido acético (indometacina, acemetacina, alclofenac, clidanac, diclofenac, fenclofenac, ácido fenclóxico, fentiazac, fuirofenac, ibufenac, isoxepac, oxpinaç, sulindac, tiopinac, tolmetina, zidometacina e zomepirac), derivados de ácido fenâmico (ácido flufenâmico, ácido meclofenâmico, ácido

mefenâmico, ácido niflúmico e ácido tolfenâmico), derivados de ácido bifenilcarboxílico (diflunisal e flufenisal), oxicams (isoxicam, piroxicam, sudoxicam e tenoxicam), salicilatos (ácido acetilsalicílico, sulfassalazina) e as pirazolonas (apazona, bezpiperilona, feprazona, mofebutazona, oxifenbutazona, fenilbutazona). Outras associações incluem inibidores de ciclooxygenase-2 (COX-2), aquaréticos, glucocorticóides orais, glucocorticóides intra-articulares, colquicina, inibidores da xantina-oxidase, allopurinol, agentes uricossúricos, sulfpirazona, febuxostat, probenecida, fenofibrato, benemid, antagonistas do receptor de angiotensina II, losartan, tiazidas, PEG-uricase, bicarbonato de sódio, ácido etilenodiaminotetraacético. Outros agentes activos para associação incluem esteróides tais como prednisolona, prednisona, metilprednisolona, betametasona, dexametasona, ou hidrocortisona. Uma tal associação pode ser especialmente vantajosa, uma vez que um ou mais efeitos secundários do esteróide podem ser reduzidos ou até mesmo eliminados diminuindo gradualmente a dose de esteróide necessária quando se trata doentes em associação com os presentes anticorpos e fragmentos.

É ainda considerado que um anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento administrado a um indivíduo de acordo com a invenção pode ser administrado em associação com tratamento com pelo menos um agente activo adicional, tal como por exemplo qualquer um dos agentes activos supramencionados. Numa forma de realização, o tratamento com o pelo menos um agente activo é mantida. Noutra forma de realização, o

tratamento com o pelo menos um agente activo é reduzido ou descontinuado (e.g., quando o indivíduo está estável) durante o curso do tratamento com anticorpo IL-1 $\beta$  (e.g., com o anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento mantido num regímen de administração constante. Noutra forma de realização, o tratamento com o pelo menos um agente activo é reduzido ou descontinuado (e.g., quando o indivíduo está estável) e o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento é reduzido (e.g., dose menor, administração menos frequente, regímen de tratamento mais curto). Noutra forma de realização, o tratamento com o pelo menos um agente activo é reduzido ou descontinuado (e.g., quando o indivíduo está estável) e o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento é aumentado (e.g., dose maior, administração mais frequente, regímen de tratamento mais longo). Ainda noutra forma de realização, o tratamento com o pelo menos um agente activo é mantido e tratamento com o anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento é reduzido ou descontinuado (e.g., dose menor, administração menos frequente, regímen de tratamento mais curto). Ainda noutra forma de realização, o tratamento com o pelo menos um agente activo e o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento são reduzidos ou descontinuados (e.g., dose menor, administração menos frequente, regímen de tratamento mais curto).

As composições farmacêuticas utilizadas na invenção podem incluir uma quantidade terapeuticamente eficaz ou uma quantidade profilacticamente eficaz dos anticorpos ou fragmentos de ligação à IL-1 $\beta$ . Uma quantidade

terapeuticamente eficaz refere-se a uma quantidade eficaz, às dosagens e durante os períodos de tempo necessários, para conseguir o resultado terapêutico desejado. Uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo ou porção de anticorpo pode variar de acordo com factores tais como o estado patológico, idade, género e peso do indivíduo, e a aptidão do anticorpo ou porção de anticorpo para desencadear uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz é também uma em que quaisquer efeitos tóxicos ou prejudiciais do anticorpo ou porção de anticorpo são superados pelos efeitos terapeuticamente benéficos. Uma quantidade profilacticamente eficaz refere-se a uma quantidade eficaz, às dosagens e durante os períodos de tempo necessários, para conseguir o resultado profiláctico desejado.

Uma quantidade terapêutica ou profilacticamente eficaz de uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo ou fragmento de ligação à IL-1 $\beta$  dependerá, por exemplo, dos objectivos terapêuticos tais como a indicação para a qual a composição está a ser utilizada, a via de administração e a condição do indivíduo. As composições farmacêuticas são administradas numa quantidade terapêutica ou profilacticamente eficaz para tratar uma condição relacionada com a IL-1.

### **Métodos de Utilização**

Os anticorpos anti-IL-1 $\beta$  ou fragmentos como aqui

proporcionados, em que o anticorpo ou seu fragmento tem uma região variável da cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6, são para ser utilizados no tratamento e/ou prevenção de gota num indivíduo. Tais abordagens podem ser utilizadas para tratar um indivíduo mamífero (e.g., humano) que sofre de gota ou para prevenir a ocorrência da mesma num indivíduo em risco.

Os termos "prevenção", "prevenir", "prevenindo", "supressão", "suprimir", "suprimindo", "inibir" e "inibição" como aqui utilizados referem-se a um curso de ação (tal como a administração de um composto ou composição farmacêutica) iniciado de uma maneira (e.g., antes do início de um sintoma clínico de um estado ou condição patológico) de forma a prevenir, suprimir ou reduzir, temporária ou permanentemente, o início de uma manifestação clínica do estado ou condição patológico. Essa prevenção, supressão ou redução não tem de ser absoluta para ser útil.

Os termos "tratamento", "tratar" e "tratando" como aqui utilizados referem-se a um curso de ação (tal como a administração de um composto ou composição farmacêutica) iniciada após o aparecimento de um sintoma clínico de um estado ou condição patológico de forma a eliminar, reduzir, suprimir ou melhorar, temporária ou permanentemente, uma manifestação clínica ou progressão do estado ou condição patológico. Esse tratamento não tem de ser absoluto para ser útil.

O termo "necessitado de tratamento" como aqui utilizado refere-se a uma avaliação feita por um prestador de cuidados de que um doente requer ou beneficiará do tratamento. Esta avaliação é feita com base numa variedade de factores que estão no âmbito da especialidade de um prestador de cuidados, mas que inclui o conhecimento de que o indivíduo está doente, ou estará doente, como resultado de uma condição que pode ser tratada por um método ou composto da divulgação.

O termo "necessitado de prevenção" como aqui utilizado refere-se a uma avaliação feita por um prestador de cuidados de que um doente requer ou beneficiará de prevenção. Esta avaliação é feita com base numa variedade de factores que estão no âmbito da especialidade de um prestador de cuidados, mas que inclui o conhecimento de que o indivíduo estará doente ou pode ficar doente, como resultado de uma condição que pode ser prevenida por um método ou composto da divulgação.

O termo "quantidade terapeuticamente eficaz" como aqui utilizado refere-se a uma quantidade de um composto (e.g., anticorpo), quer sozinha ou como parte de uma composição farmacêutica, que é capaz de ter qualquer efeito positivo, detectável em qualquer sintoma, aspecto ou características de um estado ou condição patológico quando administrada a um doente (e.g., como uma ou mais doses). Esse efeito não tem de ser absoluto para ser benéfico.

Numa forma de realização, o anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento, em que o anticorpo ou seu fragmento tem uma região variável da cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6, é administrado a um indivíduo com gota e o indivíduo recebe também pelo menos um outro tratamento medicamente aceite (e.g., medicação, fármaco, terapêutica, agente activo) para a doença, condição ou complicaçāo. Noutra forma de realização, o pelo menos um outro tratamento medicamente aceite para a doença, condição ou complicaçāo é reduzido ou descontinuado (e.g., quando o indivíduo está estável), enquanto o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento é mantido num regímen de administração constante. Noutra forma de realização, o pelo menos um outro tratamento medicamente aceite para a doença, condição ou complicaçāo é reduzido ou descontinuado (e.g., quando o indivíduo está estável) e o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento é reduzido (e.g., dose menor, administração menos frequente, regímen de tratamento mais curto). Noutra forma de realização, o pelo menos um outro tratamento medicamente aceite para a doença, condição ou complicaçāo é reduzido ou descontinuado (e.g., quando o indivíduo está estável) e o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento é aumentado (e.g., dose maior, administração mais frequente, regímen de tratamento mais longo). Ainda noutra forma de realização, o pelo menos um outro tratamento medicamente aceite para a doença, condição ou complicaçāo é mantido e o tratamento com o anticorpo

anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento é reduzido ou descontinuado (e.g., dose menor, administração menos frequente, regimen de tratamento mais curto). Ainda noutra forma de realização, o pelo menos um outro tratamento medicamente aceite para a doença, condição ou complicaçao e o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento são reduzidos ou descontinuados (e.g., dose menor, administração menos frequente, regimen de tratamento mais curto).

Nas utilizações preferidas de tratamento ou prevenção de gota, o anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento, em que o anticorpo ou seu fragmento tem uma região variável da cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6, é administrado ao indivíduo de acordo com os números de doses, quantidades por dose e/ou intervalos entre administrações supramencionados. Alternativamente, o anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento pode ser administrado como uma ou mais doses iniciais das quantidades supramencionadas que são inferiores a uma ou mais quantidades das doses subsequentes. Ao proporcionar a(s) dose(s) inicial(ais) numa quantidade inferior, a eficácia e/ou tolerabilidade do tratamento pode ser melhorada. Por exemplo, numa forma de realização não limitativa da invenção, podem ser administradas uma ou mais dose iniciais (e.g., 1, 2, 3, 4, 5) de uma quantidade de anticorpo ou fragmento  $\leq$ 1 mg/kg (e.g.,  $\leq$ 0,9 mg/kg,  $\leq$ 0,8 mg/kg,  $\leq$ 0,7 mg/kg,  $\leq$ 0,6 mg/kg,  $\leq$ 0,5 mg/kg,  $\leq$ 0,4 mg/kg,  $\leq$ 0,3 mg/kg,  $\leq$ 0,2 mg/kg,  $\leq$ 0,1 mg/kg,  $\leq$ 0,05 mg/kg,  $\leq$ 0,03 mg/kg,  $\leq$ 0,01 mg/kg), seguida de uma ou mais doses subsequentes

numa quantidade maior do que a(s) dose(s) inicial(ais) (e.g.,  $\geq 0,01$  mg/kg,  $\geq 0,03$  mg/kg,  $\geq 0,1$  mg/kg,  $\geq 0,3$  mg/kg  $\geq 0,5$  mg/kg,  $\geq 0,6$  mg/kg,  $\geq 0,7$  mg/kg,  $\geq 0,8$  mg/kg,  $\geq 0,9$  mg/kg,  $\geq 1,0$  mg/kg,  $\geq 1,5$  mg/kg,  $\geq 2$  mg/kg,  $\geq 2,5$  mg/kg,  $\geq 3$  mg/kg,  $\geq 3,5$  mg/kg,  $\geq 4$  mg/kg,  $\geq 4,5$  mg/kg,  $\geq 5$  mg/kg). A invenção considera que cada dose de anticorpo ou fragmento pode ser administrada em um ou mais sítios.

As utilizações de tratamento ou prevenção de uma doença ou condição de acordo com a presente invenção podem utilizar um plano predeterminado ou de "rotina" para a administração do anticorpo ou fragmento. Como aqui utilizado um plano de rotina refere-se a um intervalo de tempo designado predeterminado entre administrações da dose. O plano de rotina pode abranger períodos de tempo que são idênticos ou que diferem de duração, desde que o plano seja predeterminado. Qualquer combinação particular seria coberta pelo plano de rotina desde que se determinasse antes do tempo que o plano apropriado envolve a administração num certo dia.

A invenção considera ainda que os anticorpos IL-1 $\beta$  ou fragmentos, em que o anticorpo ou seu fragmento tem uma região variável da cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6, utilizados de acordo com a invenção aqui proporcionada, podem ser administrados em conjunto com métodos de tratamento e composições farmacêuticas (e.g., agentes activos) mais tradicionais. Tais composições podem incluir, por exemplo,

fármacos anti-inflamatórios não esteróides (NSAIDs) corticosteróides, hormona adrenocorticotrópica e colquicinas. Em certas formas de realização, os anticorpos e fragmentos utilizados de acordo com a invenção podem prevenir ou atrasar a necessidade de métodos de tratamento ou composições farmacêuticas adicionais. Noutras formas de realização, os anticorpos ou fragmentos podem reduzir a quantidade, frequência ou duração de métodos de tratamento ou composições farmacêuticas adicionais.

Alternativamente, as utilizações de tratamento ou prevenção de uma doença ou condição de acordo com a presente invenção podem utilizar um plano de administração do anticorpo ou fragmento que se baseia na presença de sintomas de doença e/ou alterações em qualquer uma das avaliações aqui como um meio para determinar quando administrar uma ou mais doses subsequentes. Analogamente, esta abordagem pode ser utilizada como um meio para determinar se uma dose subsequente deve ser aumentada ou diminuída, com base no efeito de uma dose anterior.

O diagnóstico de tais doenças ou condições em doentes, ou alternativamente o risco de desenvolver tais doenças ou condições pode ser de acordo com práticas médicas correntes conhecidas na técnica. Após administração de um anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento, as avaliações clínicas para um efeito de tratamento ou prevenção na gota são bem conhecidos na técnica e podem ser utilizadas como um meio para seguir a eficácia dos métodos da invenção. Por

exemplo, a resposta ao tratamento degota pode ser avaliada com base numa avaliação clínica do episódio degota aguda que inclui a avaliação por um médico que avalia a vermelhidão, sensibilidade à dor e tumefacção (nenhum dos quais é atribuível a outras causas), uma avaliação global pelo médico, uma auto-avaliação da dor pelo indivíduo, uma avaliação global pelo doente e/ou um HAQ. Numa forma de realização, a eficácia do tratamento é avaliada por uma redução na dor articular de pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou cerca de 100%. Noutra forma de realização, a redução na dor articular ocorre em menos de cerca de 48 horas, menos de cerca de 36 horas, menos de cerca de 24 horas. A avaliação clínica dagota aguda pode incluir uma ou mais das seguintes componentes:

**Avaliações pelo Médico:**

- Avaliação Global pelo Médico (escala análoga de 10 pontos)
- Avaliação de eritema pelo médico (escala análoga de 10 pontos)
- Avaliação do aquecimento pelo médico (escala análoga de 10 pontos)
- Avaliação da tumefacção pelo médico (escala análoga de 10 pontos)

**Avaliações pelo Indivíduo:**

- Avaliação Global pelo Doente (escala análoga de 10 pontos)

- Dor em repouso (escala análoga de 10 pontos)
- Dor na sustentação de peso/movimento (escala análoga de 10 pontos)
- Questionário de Avaliação da Saúde (HAQ)

Podem ser também determinados um ou mais critérios secundários, tais como por exemplo os níveis de proteína C reactiva (CRP) e/ou a velocidade de hemossedimentação (ESR) para avaliar a eficácia do tratamento. Uma diminuição nos níveis de CRP de  $\geq 0,2$ ,  $\geq 0,4$ ,  $\geq 0,6$ ,  $\geq 0,8$ ,  $\geq 1,0$ ,  $\geq 1,4$ ,  $\geq 1,8$ ,  $\geq 2,2$ ,  $\geq 2,6$ ,  $\geq 3,0$  mg/L; alternativamente uma diminuição de  $>20\%$ ,  $>30\%$ ,  $>40\%$ ,  $>50\%$ ,  $>60\%$ ,  $>70\%$ ,  $>80\%$ ,  $>90\%$ ,  $>95\%$  dos níveis de pré-tratamento é indicativa de efeito terapêutico. Uma diminuição na ESR de  $>20\%$ ,  $>30\%$ ,  $>40\%$ ,  $>50\%$ ,  $>60\%$ ,  $>70\%$ ,  $>80\%$ ,  $>90\%$ ,  $>95\%$ ,  $>98\%$  dos níveis de pré-tratamento é indicativa de efeito terapêutico. A divulgação proporciona um método de tratamento de gota num indivíduo (e.g., indivíduo humano), compreendendo o método a administração (e.g., numa quantidade terapeuticamente eficaz) de um anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento ao indivíduo, em que a dose do anticorpo ou fragmento é suficiente para conseguir pelo menos uma redução de 50% na dor articular e pelo menos uma diminuição de 20% nos níveis de CRP, pelo menos uma diminuição de 30% nos níveis de CRP, pelo menos uma diminuição de 40% nos níveis de CRP, pelo menos uma diminuição de 50% nos níveis de CRP, pelo menos uma diminuição de 60% nos níveis de CRP, pelo menos uma diminuição de 70% nos níveis de CRP, pelo menos uma diminuição de 80% nos níveis de CRP, e/ou pelo menos uma

diminuição de 90% nos níveis de CRP. Numa forma de realização preferida, a dose do anticorpo ou fragmento é suficiente para conseguir pelo menos uma redução de 50% na dor articular e pelo menos uma diminuição de 20% na ESR, pelo menos uma diminuição de 40% na ESR, pelo menos uma diminuição de 50% na ESR, pelo menos uma diminuição de 60% na ESR, pelo menos uma diminuição de 70% na ESR, pelo menos uma diminuição de 80% na ESR e/ou pelo menos uma diminuição de 90% na ESR.

A divulgação proporciona também uma utilização de tratamento de gota num indivíduo (e.g., indivíduo humano), em que a utilização comprehende a administração (e.g., numa quantidade terapeuticamente eficaz) de um anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento ao indivíduo, em que o anticorpo ou seu fragmento tem uma região variável da cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6 e em que a dose do anticorpo ou fragmento é suficiente para conseguir pelo menos uma redução de 50% na dor articular, pelo menos uma diminuição de 20% nos níveis de CRP e pelo menos uma diminuição de 20% na ESR. Numa forma de realização, a dose do anticorpo ou fragmento é suficiente para conseguir pelo menos uma redução de 50% na dor articular, pelo menos uma diminuição de 30% nos níveis de CRP e uma diminuição de 30% na ESR. Noutra forma de realização, a dose do anticorpo ou fragmento é suficiente para conseguir pelo menos uma redução de 50% na dor articular, pelo menos uma diminuição de 40% nos níveis de CRP e uma diminuição de 40% na ESR. Noutra forma de

realização, a dose do anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento é suficiente para conseguir pelo menos uma redução de 60% na dor articular, pelo menos uma diminuição de 20% nos níveis de CRP e pelo menos uma diminuição de 20% na ESR. Noutra forma de realização, a dose do anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento é suficiente para conseguir pelo menos uma redução de 60% na dor articular, pelo menos uma diminuição de 40% nos níveis de CRP e pelo menos uma diminuição de 40% na ESR. Noutra forma de realização, a dose do anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento é suficiente para conseguir pelo menos uma redução de 60% na dor articular, pelo menos uma diminuição de 50% nos níveis de CRP e pelo menos uma diminuição de 50% na ESR. Ainda noutra forma de realização, a dose do anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento é suficiente para conseguir pelo menos uma redução de 70% na dor articular, pelo menos uma diminuição de 20% nos níveis de CRP e pelo menos uma diminuição de 20% na ESR. Noutra forma de realização, a dose do anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento é suficiente para conseguir pelo menos uma redução de 70% na dor articular, pelo menos uma diminuição de 40% nos níveis de CRP e pelo menos uma diminuição de 40% na ESR. Noutra forma de realização, a dose do anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento é suficiente para conseguir pelo menos uma redução de 70% na dor articular, pelo menos uma diminuição de 50% nos níveis de CRP e pelo menos uma diminuição de 50% na ESR. Numa forma de realização, os níveis de CRP pode ser medido por um ensaio ELISA para CRP ultra-sensível. Noutra forma de realização, a ESR pode ser medida por um Método de ensaio de ESR Westergren.

**EXEMPLOS**

Os seguintes exemplos pretendem apenas ilustrar adicionalmente a prática da presente invenção, mas não devem ser interpretados como limitando de qualquer modo o seu âmbito.

**EXEMPLO 1****Inibição de IL-1 $\beta$  utilizando um anticorpo IL-1 $\beta$  de alta afinidade num ensaio baseado em células *in vitro*, com produção de IL-8 induzida por IL-1 como uma leitura**

O efeito inibidor do anticorpo específico para IL-1 $\beta$  foi comparado com um inibidor não anticorpo da via do IL-1, Kineret<sup>®</sup> (anakinra), o qual é um antagonista do receptor de IL-1 recombinante (IL-1Ra). Foi recolhido sangue periférico fresco, heparinizado de dadores saudáveis. Foram colocados 180  $\mu$ L de sangue inteiro numa placa de 96 poços e incubados com várias concentrações do anticorpo AB7 (número de pedido US 11/472,813, WO 2007/002261) e rhIL-1 $\beta$  100 pM. Para amostradas tratadas com Kineret<sup>®</sup>, o Kineret<sup>®</sup> e rhIL-1 $\beta$  foram combinados 1:1 antes de misturar com sangue. As amostras foram incubadas durante 6 horas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. As células do sangue inteiro foram em seguida submetidas a lise com 50  $\mu$ L de Triton X-100 a 2,5%. A concentração de interleucina-8 (IL-8) nos lisados transparentes foi doseada por ELISA (kit de ELISA

Quantikine human IL-8, R&D Systems) de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações de IL-8 nas amostras tratadas com AB7 e Kineret® foram comparadas com uma amostra de controlo tratada com controlo anti-KLH. Os resultados são representados na Fig. 1 e resumidos no Quadro 6. A IC<sub>50</sub> é a concentração de anticorpo necessária para inibir 50% da IL-8 libertada por estimulação com IL-1β.

Quadro 1

	IC <sub>50</sub> (pM)
AB7	1,9 pM
Kineret®	53,4 pM

Estes resultados demonstram a potência *in vitro* do AB7, como medida pela inibição da libertação de IL-8 estimulada por IL-1β. Os resultados que mostram uma maior potência em comparação com o Kineret® indicam que o anticorpo terá eficácia inibidora de IL-1β *in vivo*.

#### **EXEMPLO 2**

**Inibição *in vivo* da actividade biológica da IL-1β humana utilizando anticorpos específicos para IL-1β, como medida pelo impacto na libertação de IL-6 estimulada por IL-1β**

Para confirmar a eficácia *in vivo* do AB7, a sua aptidão para bloquear a actividade biológica de IL-1β

humana foi testada em murganhos. Os detalhes do ensaio encontram-se descritos em Economides et al., *Nature Med.*, 9: 47-52 (2003). Resumidamente, murganhos C57/B16 machos (Jackson Laboratory Bar Harbor, Maine) foram injectados por via intraperitoneal com doses tituladas de AB7, outro anticorpo IL-1 $\beta$ , AB5, ou um anticorpo de controlo. Vinte e quatro horas após injecção do anticorpo, os murganhos foram injectados por via subcutânea com IL-1 $\beta$  humana recombinante (rhIL-1 $\beta$ ) (de PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ) a uma dose de 1  $\mu$ g/kg. Duas horas após a injecção de rhIL-1 $\beta$  (tempo de resposta de pico de IL-6), os murganhos foram sacrificados, e o sangue foi recolhido e processado em relação ao soro. Os níveis séricos de IL-6 foram doseados por ELISA (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ) de acordo com o protocolo do fabricante. A percentagem de inibição foi calculada a partir da razão da IL-6 detectada no soro de animais experimentais para a IL-6 detectada no soro de animais de controlo (multiplicada por 100).

Os resultados são apresentados na Figura 2A. A aptidão para inibir a actividade da IL-1 $\beta$  *in vivo* foi avaliada como uma função dos níveis séricos de IL-6 estimulados pela IL-1 $\beta$ . Como ilustrado pela Figura 2A, os anticorpos AB7 e AB5 foram eficazes na inibição da actividade da IL-1 $\beta$  humana *in vivo*. Estes resultados mostram também que uma única injecção de AB7 ou AB5 pode bloquear a acção sistémica da estimulação pela IL-1 $\beta$  e que tais anticorpos são úteis para a inibição da actividade da IL-1 $\beta$  *in vivo*.

Uma experiência semelhante foi realizada para demonstrar adicionalmente a aptidão do AB7 para neutralizar a IL-1 $\beta$  de murganho *in vivo*, para suportar a utilização deste anticorpo em modelos de doença em murganhos. Foi determinado que o AB7 tem uma afinidade para a IL-1 $\beta$  humana que é ~10 000 vezes maior do que a afinidade para a IL-1 $\beta$  de murganho, e uma potência *in vitro* no ensaio D10.G4.1 que é ~ 1 000 vezes maior do que aquela para a IL-1 $\beta$  de murganho. No modelo de murganho C57BL/6 com leitura de IL-6, os murganhos foram injectados com AB7 (3 ou 300  $\mu$ g) ou controlo de veículo PBS i.p. 24 horas antes de uma injecção s.c. de IL-1 $\beta$  (20 ng) humana (Figura 2B, painel A) ou de murganho (Figura 2B, painel B). Foi colhido sangue 2 horas mais tarde e as amostras de soro foram analisadas para os níveis de IL-6 por ELISA. Estes dados mostram supressão máxima dos níveis de IL-6 (~75%) induzidos pela IL-1 $\beta$  humana a 3  $\mu$ g (painel A), enquanto foi demonstrada supressão submáxima dos níveis de IL-6 (~50%) induzidos pela IL-1 $\beta$  de murganho com 300  $\mu$ g (painel B). Estes resultados são coerentes com a observação de afinidade e potência *in vitro* de longe maiores do anticorpo AB7 para a IL-1 $\beta$  humana, em comparação com a IL-1 $\beta$  de murganho. Além disso, os dados indicam que este anticorpo pode ser utilizado para modelos de doença *in vivo* em murganho com uma dose apropriada maior do que seria necessária para o tratamento de indivíduos humanos, onde o anticorpo tem afinidade e potência de longe superiores. No caso de outros anticorpos IL-1 $\beta$ , tais como por exemplo outros anticorpos

aqui divulgados e/ou citados, que não apresentam afinidade e potência in vitro significativamente menores para a IL-1 $\beta$  de murganho pode não ser necessário ajustes das doses para níveis mais altos nos modelos em murganho.

**EXEMPLO 3**

**Farmacocinética de um anticorpo anti-IL-1 $\beta$  após administração de uma única dose intravenosa ou subcutânea em ratazanas**

A fim de examinar o perfil farmacocinético, um anticorpo IL-1 $\beta$  designado AB7 foi administrado em ratazanas macho adultas como um bolus intravenoso (IV) na veia da cauda a doses de 0,1, 1,0 ou 10 mg/kg (Grupos 1, 2 e 3, respectivamente) ou uma dose subcutânea (SC) entre as omoplatas a 1,0 mg/kg (Grupo 4). Foram colhidas amostras de sangue através da cânula da veia jugular ou do seio retroorbital em tempos especificados durante até 91 dias após administração. As amostras de sangue foram centrifugadas para se obter o soro. As amostras foram analisadas quanto à concentração de anticorpo anti-IL-1 $\beta$  utilizando um ensaio ELISA à base de fosfatase alcalina como se segue.

A IL-1 $\beta$  (Preprotech) foi diluída até 0,5  $\mu$ g/mL em PBS e foram adicionados 50  $\mu$ L desta solução aos poços de placas microtípico Nunc-Immuno Maxisorp (VWR) e incubados de um dia para o outro a 2-8°C. A solução de antígeno foi retirada e foram adicionados 200  $\mu$ L de tampão de bloqueio

[1% de albumina de soro bovino (BSA) em PBS 1X contendo 0,05% de Tween 20] a todos poços e incubados durante 1 hora à temperatura ambiente. Depois do bloqueio, os poços foram lavados três vezes com tampão de lavagem (PBS 1X, contendo 0,05% de Tween 20). Os padrões, amostras e controlos foram diluídos em diluente de amostras (25% de Soro de Ratazana em PBS 1X contendo 1% de BSA e 0,05% de Tween 20). Foram preparadas soluções padrão de anticorpo anti-IL-1 $\beta$  como diluições por desdobramentos sucessivos desde 2000 até 0,24 ng/mL. Cada repetição e diluição dos padrões, amostras e controlos (50  $\mu$ L) foram transferidas para as placas microtípico bloqueadas e incubadas durante 1 hora a 37° C. Após incubação, os poços foram lavados 3 vezes com tampão de lavagem. O anticorpo IgG de cabra anti-humano (H+L) conjugado com fosfatase alcalina (Southern Biotech Associates Inc, Birmingham, AL) foi diluído a 1/1000 em diluente de conjugado (1% de BSA em PBS 1X contendo 0,05% de Tween 20). Foram adicionados cinquenta  $\mu$ L do conjugado diluído a todos os poços excepto aos poços BRANCOS, os quais receberam apenas 50  $\mu$ L de diluente de conjugado. As placas foram incubadas durante 1 hora a 37° C e em seguida todos os poços foram lavados 3 vezes com tampão de lavagem e 3 vezes com água desionizada. O substrato fosfato de p-nitrofenilo (1 mg/mL em tampão de 10% de dietanolamina, pH 9,8) foi adicionado a todos os poços e o desenvolvimento de cor foi deixado prosseguir durante 1 hora à temperatura ambiente, após o que foram adicionados 50  $\mu$ L de NaOH 1 N para parar a reacção. A absorbância a 405 nm foi determinada utilizando um Leitor de Placas SPECTRAmax M2

(Molecular Devices, Menlo Park, CA) e uma curva de calibração foi então representada graficamente como  $A_{405}$  contra ng/mL de padrão de anticorpo. Foi realizada uma análise de regressão e foram determinadas as concentrações para amostras e controlos por interpolação da curva de calibração. O limite de quantificação foi 40 ng/mL.

Como se mostra na Figura 3, as concentrações séricas decaíram bi-exponencialmente entre os grupos de administração IV. Foi realizada uma análise compartmental sobre os dados dos animais individuais e foi determinada a média dos parâmetros de farmacocinética resultantes para cada grupo de dose excluindo aqueles animais nos quais foi gerada uma resposta RAHA. Os níveis de anticorpos anti-IL-1 $\beta$  no soro decaíram com uma semivida de fase alfa média de  $0,189 \pm 0,094$  a  $0,429 \pm 0,043$  dias (4,54 a 10,3 horas) e uma semivida de fase beta de  $9,68 \pm 0,70$  a  $14,5 \pm 1,7$  dias. Entre as ratazanas que receberam uma dose subcutânea de 1 mg/kg de AB7, os níveis séricos aumentaram até um pico de  $4,26 \pm 0,065$   $\mu$ g/mL pelos 2-3 dias, e decaíram com uma semivida de  $2,59 \pm 0,25$  dias.

**EXEMPLO 4****Farmacocinética de um anticorpo anti-IL-1 $\beta$  após administração de uma única dose intravenosa em macacos cinomolgos**

Macacos cinomolgos machos e fêmeas adultos

receberam o anticorpo anti-IL-1 $\beta$  designado AB7 como uma única injecção bolus intravenosa (IV) às doses de 0,3, 3,0 ou 30 mg/kg. Foram colhidas amostras de sangue dos animais antes da dose, 5 minutos, 4 e 8 horas após a dose no Dia 1, e Dias 2, 4, 8, 11, 15, 22, 29, 43 e 56. As amostras foram analisadas quanto à concentração de anticorpo anti-IL-1 $\beta$  utilizando um ensaio ELISA à base de fosfatase alcalina como se segue.

A solução de IL-1 $\beta$  foi diluída até 0,5  $\mu$ g/mL em PBS e foram adicionados 50  $\mu$ L desta solução aos poços de placas microtípico Nunc-Immuno Maxisorp (VWR) e incubados de um dia para o outro a 2-8°C. A solução de antígeno foi retirada e foram adicionados 200  $\mu$ L de tampão de bloqueio [1% de albumina de soro bovino (BSA) em PBS 1X contendo 0,05% de Tween 20] a todos os poços e, em seguida, incubados durante 1 - 4 horas à temperatura ambiente. Depois do bloqueio, os poços de cada placa foram lavados três vezes com tampão de lavagem (PBS 1X, contendo 0,05% de Tween 20). Os padrões, amostras e controlos foram diluídos em diluente de amostras (2% de Soro de Cynomolgo Normal (NCS) em PBS 1X contendo 1% de BSA e 0,05% de Tween 20). As soluções padrão de anti-IL-1 $\beta$  foram preparadas como diluições por desdobramentos sucessivos desde 8000 ng/mL. Cada repetição e diluição dos padrões, amostras e controlos (50  $\mu$ L) foram transferidas para as placas microtípico bloqueadas e incubadas durante 1 hora a 37°C. Depois da incubação primária, os poços foram lavados 3 vezes com tampão de lavagem e foram adicionados 50  $\mu$ L de rhIL-1 beta

biotinilado a todos os poços. As placas foram em seguida incubadas durante 1 hora a 37° C. Os poços foram lavados 3 vezes com tampão de lavagem e uma incubação terciária com cinquenta  $\mu$ L de estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina diluída foi adicionada a todos os poços excepto aos poços BRANCOS, os quais receberam apenas 50  $\mu$ L de diluente. As placas foram incubadas durante 30 minutos a 37° C, e em seguida todos os poços foram lavados 3 vezes com tampão de lavagem e 3 vezes com água desionizada. O substrato fosfato de p-nitrofenilo (1 mg/mL em tampão de dietanolamina a 10%, pH 9,8) foi adicionado a todos os poços. O desenvolvimento de cor foi deixado prosseguir no escuro durante 1 hora à temperatura ambiente, após o que foram adicionados 50  $\mu$ L de NaOH 1 N para parar a reacção. A absorbância a 405 nm foi determinada para todos os poços utilizando um Leitor de Placas SPECTRAmax M2 (Molecular Devices, Menlo Park, CA). Uma curva de calibração foi então representada graficamente como  $A_{405}$  contra ng/mL de padrão de anti-IL-1 $\beta$ . Foi realizada uma análise de regressão de 4 parâmetros e foram determinadas as concentrações para amostras e controlos por interpolação da curva de calibração. O limite de quantificação foi 40 ng/mL.

Para os grupos de dose única de 0,3 e 3 mg/kg, os níveis de anticorpo anti-IL-1 $\beta$  no soro decaíram com uma semivida de fase alfa média de  $9,40 \pm 2,00$  horas, seguida de uma semivida de fase beta de  $13,3 \pm 1,0$  dias (Figura 5). Nos macacos cinomolgos que receberam uma única injecção IV de 30 mg/kg, os níveis séricos de anticorpo decaíram mais

rapidamente, com uma semivida de fase alfa de  $10,9 \pm 3,2$  horas, seguida de uma semivida de fase beta de  $7,54 \pm 1,79$  dias. A modelação dos perfis de concentração no plasma-tempo das doses de 0,1, 0,3, 1 e 10 mg/kg administradas em cinco intervalos mensais foi também realizada e é mostrada na Figura 5.

**Exemplo 5****Inibição da produção de citocinas em sangue inteiro humano por um anticorpo IL-1 $\beta$** 

A medição de citocinas no sangue durante uma doença ou o tratamento de uma doença pode ser útil para determinar a gravidade da doença ou resposta a uma terapia. Geralmente, os níveis de citocinas são medidos no soro, mas este método não mede necessariamente as citocinas totais. Muitas citocinas podem estar dentro das células (intracelular). Além disso, a aptidão de uma célula para produzir uma citocina pode ser uma informação mais útil do que o nível de citocinas circulantes.

Um método de estimulação de sangue inteiro foi utilizado para determinar a produção de citocinas e o efeito do tratamento com um anticorpo anti-IL-1 $\beta$ . O sangue foi colhido de doentes para tubos heparinizados estéreis e em seguida foram adicionados 250  $\mu$ L do sangue inteiro a cada montagem de criotubos estéreis Corning de topo laranja de 4 mL como se segue:

**Série de controlo**

Todos os tubos foram pré-cheios com 550 uL de RPMI. Ao tubo 1 (controlo) foram adicionados 200 uL de RPMI e aos tubos 2-10 foram adicionados 100 uL de RPMI adicional. A cada um dos tubos 2-10 foram adicionados 100 uL de diluições de um anticorpo anti-IL-1 $\beta$  (AB7).

**Série de ensaio**

Uma série semelhante de diluições de anticorpo foi efectuada como detalhado acima.

Todos os tubos foram bem misturados utilizando um vórtex 10 segundos. Os tubos da série de controlo A1-10 receberam em seguida mais 100 uL de RPMI, foram agitados em vórtex 10 segundos, a tampa de rosca foi fixada hermeticamente e os tubos colocados na incubadora. Aos tubos da série de ensaio B1-10 foram adicionados 100 uL de *Staphylococcus epidermidis* mortos termicamente (concentração final de 1:1000 de solução-mãe que resulta numa razão bactérias:glóbulos brancos de 10:1), os tubos foram em seguida agitados em vórtex durante 10 segundos, tapados e colocados numa incubadora a 37°C. Após uma incubação de 24 horas, as culturas foram todas submetidas a lise com Triton X (0,5% final) para libertar o conteúdo das células e os lisados foram congelados. Após lise das culturas de sangue inteiro, os tubos foram submetidos a ciclos de congelação-

descongelação e os níveis de citocinas são medidos por ensaios ELISA de citocinas correntes para os TNF $\alpha$ , IL-6, IFN $\gamma$ , IL-8, IL-1 $\alpha$ , IL-1Ra e IL-1 $\beta$  humanos (R&D Systems, Minneapolis, MN).

As citocinas medidas nos tubos da série de controlo, os quais contêm apenas meio de cultura estéril e anticorpo (quando indicado), reflectem o nível de estimulação espontâneo. Em indivíduos saudáveis, encontra-se níveis muito baixos das várias citocinas quando medidas após 24 horas de incubação. Nos doentes com doenças não tratadas, os níveis podem ser mais altos. Os tubos da série de ensaio continham adicionalmente uma quantidade definida de *Staphylococcus epidermidis* mortos termicamente, o que estimula a produção de um número de citocinas. Se o tratamento com anticorpo anti-IL-1 $\beta$  é eficaz, isto reflectir-se-á por uma produção reduzida de citocinas.

Como se mostra na Figura 6, o anticorpo anti-IL-1 $\beta$  de alta afinidade AB7 foi muito eficaz na inibição da produção de IL-1 $\beta$  em sangue humano. Numa média de três amostras humanas, o anticorpo inibiu a produção de IL-1 $\beta$  induzida por *Staphylococcus epidermidis* em 50% a 0,1 pM e em 75% a 3 pM. A 100 pM, a inibição foi 100%. O interferão gama (IFN $\gamma$ ) foi induzido por *Staphylococcus epidermidis* e o AB7 reduziu o IFN $\gamma$  induzido por *Staphylococcus epidermidis* em 75% a 100 pM.

**Exemplo 6****Farmacocinética de um anticorpo anti-IL-1 $\beta$  após administração de uma única dose intravenosa em humanos**

A farmacocinética de um anticorpo IL-1 $\beta$  possuindo as propriedades supramencionadas foi demonstrada num estudo clínico humano de fase I. Especificamente, um estudo clínico humano de duplo cego, controlado por placebo foi realizado em doentes com diabetes Tipo 2 e os dados inicialmente obtidos de cinco doentes que receberam o anticorpo IL-1 $\beta$  designado AB7 (descrito acima) a uma dose de 0,01 mg/kg através de infusão intravenosa a velocidade constante foram utilizados para examinar a farmacocinética.

No Dia 1 do estudo, o anticorpo foi administrado através de uma infusão intravenosa de velocidade constante de 30 minutos. As avaliações de segurança, incluindo o registo de eventos desfavoráveis, exames físicos, sinais vitais, ensaios laboratoriais clínicos (e.g., química do sangue, hematologia, exame de urina), níveis de citocinas no plasma e electrocardiogramas (ECGs) foram realizadas utilizando práticas médicas correntes conhecidas na técnica. As amostras de sangue foram colhidas antes da administração da dose e nos dias 0, 1, 2, 3, 4, 7, 9 $\pm$ 1, 11 $\pm$ 1, 14 $\pm$ 1, 21 $\pm$ 2, 28 $\pm$ 2, 42 $\pm$ 3 e 56 $\pm$ 3 após administração para avaliar os níveis de anticorpo IL-1 $\beta$  (farmacocinética). A análise preliminar da farmacocinética do anticorpo IL-1 $\beta$  em indivíduos que receberam uma única dose IV de 0,01 mg/kg

mostrou perfis concentração sérica-tempo com uma semivida terminal de 22 dias, eliminação de 2,9 mL/dia/kg e volume de distribuição do compartimento central de 50 mL/kg, muito semelhante ao volume sérico (Figura 7).

A análise interina dos dados de farmacocinética após administração IV de uma dose única de AB7 (XOMA 052) em indivíduos ao longo dos grupos de dose de 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, ou 1,0 mg/kg confirmou adicionalmente os perfis de concentração sérica-tempo com uma semivida terminal of 22 dias, eliminação de 2,54 mL/dia/kg e volume de distribuição do compartimento central de 41,3 mL/kg, muito semelhante ao volume sérico (Figura 8).

### **Exemplo 7**

#### **Efeitos de um anticorpo IL-1 $\beta$ na CRP em indivíduos humanos com diabetes Tipo 2**

A proteína C reactiva (CRP), a qual é libertada pelo fígado em resposta a vários estímulos de stress, incluindo a IL-6, produzida em resposta à IL-1, foi também medida no soro aos mesmos pontos no tempo que as amostras de PK para determinar a actividade do anticorpo em indivíduos humanos. Uma dose única de XOMA 052 reduziu os níveis de proteína C reactiva ultra-sensível (usCRP), uma medição padrão da inflamação sistémica associada a múltiplas doenças e um indicador de risco cardíaco, em todos os grupos de dose tratados em comparação com o

placebo. Como se mostra na Figura 9, aos 28 dias após uma dose única de XOMA 052, as percentagens medianas de redução da usCRP foram de 33, 46, 47, 36 e 26 para os grupos de doses 0,01, 0,03, 0,1, 0,3 e 1,0 mg/kg, respectivamente, em comparação com os 4 por cento para o placebo. A actividade resultante de uma única administração de anticorpo a uma dose de 0,01 mg/kg indica que podem ser mesmo utilizadas doses mais baixas.

**Exemplo 8****Utilização de um anticorpo IL-1 $\beta$  no tratamento de gota num modelo animal**

A eficácia de um anticorpo IL-1 $\beta$ , tal como um anticorpo possuindo as propriedades supramencionadas ou como aqui descrito, foi avaliada num modelo de murganho agudo de gota. O modelo de murganho agudo de gota avalia a aptidão de um agente terapêutico para bloquear a peritonite aguda induzida por cristais de urato monossódico (MSU) (Martinon et al., 2006, *Nature* 440:237-241). Especificamente, a peritonite foi induzida injectando 0,5 mg de cristais de MSU no espaço peritoneal de murganhos Balb/c. Os murganhos foram tratados 2 horas antes por injecção intraperitoneal de anticorpo de controlo de isotipo ou anticorpo anti-IL-1 $\beta$  XOMA 052 (também aqui referido como AB7, descrito acima) a 10 mg/kg. Para comparação, um grupo de murganhos recebeu Anacinra a 30 mg/kg aos mesmo tempo que a injecção de MSU. Após 6 horas, foi realizada lavagem

peritoneal e o líquido de lavagem foi centrifugado para recolher as células. As células foram contadas e uma fracção foi utilizada para citocentrifugação e contagens diferenciais de leucócitos. A peritonite foi medida calculando o número de neutrófilos na lavagem. O número de neutrófilos é determinado multiplicando a contagem de células totais na lavagem pela percentagem de neutrófilos na contagem diferencial. Como se mostra nas Figuras 8A e 8B, o anticorpo XOMA 052 foi capaz de bloquear a infiltração de neutrófilos e macrófagos, e reduzir a peritonite induzida pelos cristais de MSU relativamente ao controlos de PBS e isotipo ( $p < 0,05$ , teste t desemparelhado). Não houve qualquer diferença significativa entre o tratamento com 10 mg/kg de XOMA 052 e 30 mg/kg de Anacinra no modelo de murganho.

**Exemplo 9****Utilização de um anticorpo IL-1 $\beta$  no tratamento de gota**

Os anticorpos IL-1 $\beta$  ou fragmentos, tais como aqueles que têm as propriedades supramencionadas ou aqui descritas, podem ser administrados a um indivíduo (e.g., doente humano) para tratamento terapêutico e/ou prevenção de gota. Especificamente, num exemplo, um anticorpo IL-1 $\beta$  XOMA 052 (também conhecido como AB7, descrito acima) é utilizado para o tratamento terapêutico de doentes que apresentam sinais e sintomas de gota. A segurança e

eficácia do anticorpo IL-1 $\beta$  para a gota são demonstradas em um ou mais estudos clínicos humanos, incluindo por exemplo um ensaio da seguinte concepção em indivíduos com gota aguda recorrente.

Os indivíduos podem ser incluídos no estudo se satisfazem todos os seguintes critérios:

- Gota aguda diagnosticada por observação de critérios dos Critérios de 1977 para a Classificação de Artrite Aguda de Gota Primária (American Rheumatism Association, ACR). Um diagnóstico de gota aguda é confirmado por a) a presença de cristais de urato característicos no líquido das articulações; b) um tofo provado ou suspeito de conter cristais de urato por microscopia de luz polarizada; ou c) a presença de pelo menos 7 dos seguintes 12 fenómenos clínicos, laboratoriais ou radiográficos:

- Mais do que um ataque de artrite aguda na vida
- Inflamação máxima desenvolvida em 1 dia
- Ataque de artrite monoarticular
- Observação de vermelhidão nas articulações
- Primeira articulação metatarsofalângica (MTP) dolorosa ou inchada
- Ataque unilateral da primeira articulação MTP

- Ataque unilateral da articulação társica
- Tofo (comprovado ou suspeito)
- Hiperuricemias
- Tumefacção assimétrica dentro de uma articulação no raios X/exame
  - Quistos subcorticais sem erosões no raios X
  - Cultura do líquido das articulações negativa para organismos durante o ataque
- Pelo menos dois ataques de gota aguda no ano anterior
- Início do episódio agudo actual tem de ter ocorrido não mais do que 48 horas antes da administração do fármaco de estudo no Dia 0 e os sintomas do ataque agudo não podem ter diminuído significativamente antes da administração do fármaco de estudo

Foi realizado um estudo de fase 1/2, de duplo cego, controlado por placebo, de grupo paralelo, de dose única da segurança e farmacocinética do anticorpo XOMA 052 em indivíduos que sofrem de ataques de gota aguda. Os indivíduos nos grupos de dose paralelos de seis indivíduos cada (múltiplos grupos de fármaco activo e um grupo de placebo) são inscritos para receber uma única infusão IV do fármaco em estudo (anticorpo IL-1 $\beta$  ou placebo) aos níveis de dose mostrados no quadro abaixo.

Grupo de Dose	Número de Indivíduos	Regímen de Administração
A	6	Infusão IV única de anticorpo a 0,03 mg/kg
B	6	Infusão IV única de anticorpo a 0,1 mg/kg
C	6	Infusão IV única de anticorpo a 0,3 mg/kg
D	6	Infusão IV única de anticorpo a 1,0 mg/kg
E	6	Infusão IV única de anticorpo a 3,0 mg/kg
F	6	Infusão IV única de placebo

Os indivíduos que satisfazem todos os critérios de elegibilidade são inscritos, seleccionados aleatoriamente para um dos grupos de dose e administrados no Dia 0 com o fármaco de estudo (anticorpo ou placebo). Os indivíduos têm de ser medicados dentro de 48 horas do início do novo ataque de gota aguda. Um novo ataque é definido como um após pelo menos 28 dias em que o indivíduo está isento de sintomas de gota aguda.

São realizadas avaliações semanais até ao Dia 28, seguidas de avaliações bissemanais até ao Dia 56. A segurança é avaliada por medições sucessivas pré- e pós-tratamento dos sinais vitais, avaliações laboratoriais clínicas e o registo de eventos clínicos adversos. Os dados de PK são recolhidos e analisados nos pontos no tempo mostrados abaixo.

Avaliação Farmacocinética

Amostras de soro são colhidas no Dia 0 (base) antes da administração do fármaco de estudo, e em pontos no tempo seleccionados após a administração do fármaco de estudo para medição das concentrações séricas de anticorpo IL-1 $\beta$ .

A partir destas concentrações séricas são calculados os parâmetros farmacocinéticos apropriados. É esperado que estes cálculos utilizem métodos de farmacocinética compartimental e não compartimental para estimar os seguintes parâmetros: concentração máxima, eliminação do soro, semividas, volumes de distribuição e tempo de residência médio. Os métodos de análise de PK e PD de populações podem ser utilizados para compreender melhor as características PK/PD do anticorpo IL-1 $\beta$  nesta população.

A farmacocinética do anticorpo IL-1 $\beta$  é avaliada quanto à sua correlação com marcadores biológicos e resultado clínico. Além disso, é feita uma avaliação da correlação entre a exposição ao fármaco e qualquer evidência de toxicidade do fármaco.

Actividade Biológica e Clínica

Como medições da actividade biológica do anticorpo IL-1 $\beta$  em indivíduos com gota aguda recorrente, as

CRP e ESR são recolhidas como marcadores inflamatórios. O estado clínico da gota, incluindo nível de dor e evolução com o tempo, é medido através de avaliações médicas periódicas e auto-avaliações pelo indivíduo. A avaliação clínica do episódio de gota aguda inclui uma avaliação pelo médico da vermelhidão, sensibilidade à dor e tumefacção (nenhum dos quais é atribuível a outra causas), uma avaliação global pelo médico e uma auto-avaliação da dor pelo indivíduo, uma avaliação global pelo doente e um HAQ. É dado um diário aos indivíduos e solicitado que registem os seus sintomas a cada 2 horas durante o tempo de acordado nas primeiras 24 horas pós-dose, seguido de duas vezes por dia até ao Dia 7, uma vez por dia até ao Dia 14, e apenas à medida que os sintomas recorram depois disso.

A avaliação clínica de gota aguda inclui as seguintes componentes:

#### Avaliações pelo Médico:

- Avaliação Global pelo Médico (escala análoga de 10 pontos)
- Avaliação de eritema pelo médico (escala análoga de 10 pontos)
- Avaliação do aquecimento pelo médico (escala análoga de 10 pontos)
- Avaliação da tumefacção pelo médico (escala análoga de 10 pontos)

Avaliações pelo indivíduo:

- Avaliação Global pelo Doente (escala análoga de 10 pontos)
- Dor em repouso (escala análoga de 10 pontos)
- Dor na sustentação de peso/movimento (escala análoga de 10 pontos)
- Questionário de Avaliação da Saúde (HAQ)

Além disso, as seguintes avaliações são realizadas em vários pontos no tempo de recolha de amostras:

- Soro recolhido em vários pontos no tempo é utilizado para avaliar os níveis de adipocinas e citocinas que podem ser produzidas pelo tecido adiposo inflamado em doentes com gota. Tais adipocinas/citocinas incluem, por exemplo, adiponectina, resistina, leptina, visfatina, PAI 1, TNF $\alpha$ , IL-1, IL-1Ra, IL-6, IL-8, RANTES e MCP-1.
- A amostra de sangue inteiro é recolhida e analisada quanto às citocinas que podem incluir, por exemplo, TNF $\alpha$ , IL-6, IFN $\gamma$ , IL-8 e IL-1 $\alpha$ .

#### **Plano de Amostragem para PK**

Ponto no Tempo	Todos os Grupos
Day 0	
Antes da infusão	X
EOI	X
EOI + 30 ± 5 min	X
EOI + 4 h ± 15 min	X

(continuação)

Ponto no Tempo	Todos os Grupos
Dia 1 (24 ± 2 h após EOI)	X
Dia 2 (48 ± 2 h após EOI)	X
Dia 3 (72 ± 3 h após EOI)	X
Dia 4 (96 ± 3 h após EOI)	X
Dia 7	X
Dia 9	X
Dia 11	X
Dia 14	X
Dia 21	X
Dia 28	X
Dia 42	X
Dia 56	X

<sup>1</sup> As adipocinas/citocinas são analisadas utilizando amostras recolhidas em alguns ou todos os pontos no tempo de PK. As adipocinas/citocinas medidas podem incluir, por exemplo, adiponectina, resistina, leptina, visfatina, PAI-1, TNF $\alpha$ , IL-1, IL-1Ra, IL-6, IL-8, RANTES e MCP-1. EOI = fim da infusão

Com base nos resultados obtidos do primeiro estudo clínico são realizados ensaios clínicos adicionais. Esses ensaios podem incluir uma ou mais das dosagens e regímenes de administração acima, bem como ou alternativamente uma ou mais de outras dosagens de anticorpo IL-1 $\beta$ , períodos de tratamento e/ou observação mais longos e maior números de doentes por grupo (e.g., pelo menos cerca de 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000)

A utilização dos termos "um" e "uma" e "o" e "a" e referentes semelhantes no contexto da descrição da invenção (especialmente no contexto das seguintes reivindicações) são para ser interpretados como abrangendo tanto o singular como o plural, salvo indicação em contrário aqui ou claramente contradito pelo contexto. Os termos "compreendendo," "possuindo," "incluso," e "contendo" são para ser interpretados como termos de extremidades abertas (*i.e.*, que significam "incluso, mas não se limitando a,") salvo indicação em contrário. Sempre que um termo de extremidades abertas é utilizado para descrever uma característica ou elemento da invenção, é especificamente considerado que um termo de extremidades fechadas pode ser utilizado em vez do termo de extremidades abertas sem que se saia do espírito e âmbito da invenção. A recitação de gamas de valores aqui pretende apenas servir como um método abreviado de referir individualmente cada valor separado que se situa dentro da gama, salvo indicação em contrário aqui, e cada valor separado é incorporado na descrição como se fosse aqui indicado individualmente. Todos os métodos aqui descritos podem ser realizados por qualquer ordem adequada salvo indicação em contrário aqui ou quando claramente contradito pelo contexto. A utilização de quaisquer e todos exemplos, ou linguagem ilustrativa (*e.g.*, "tal como") aqui proporcionados, destinam-se a esclarecer melhor a invenção.

As formas de realização preferidas desta invenção

são descritas no contexto da divulgação da invenção, incluindo o melhor modo conhecido dos inventores para realizar a invenção. Variantes destas formas de realização preferidas podem tornar-se evidentes para aqueles que trabalham na técnica após leitura da descrição anterior. Os inventores esperam que os especialistas utilizem tais variações consoante apropriado.

Lisboa, 29 de dezembro de 2014

**REIVINDICAÇÕES**

1. Anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento de ligação à IL-1 $\beta$  para ser utilizado no tratamento de gota, em que o anticorpo ou seu fragmento tem uma região variável da cadeia leve de SEQ ID NO: 5 e uma região variável da cadeia pesada de SEQ ID NO:6.

2. Anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento de ligação à IL-1 $\beta$  para a utilização da reivindicação 1, em que a gota é gota crónica ou aguda.

3. Anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento de ligação à IL-1 $\beta$  para a utilização da reivindicação 1-2, em que, o anticorpo ou fragmento de anticorpo é administrado em uma ou mais doses de 1 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento de anticorpo.

4. Anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento de ligação à IL-1 $\beta$  para a utilização da reivindicação 3, em que a uma ou mais doses são de pelo menos 0,001 mg/kg de anticorpo ou fragmento.

5. Anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento de ligação à IL-1 $\beta$  para a utilização das reivindicações 1-4, em que o anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou fragmento é administrado por injecção subcutânea, intravenosa ou intramuscular.

6. Anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento de ligação à IL-1 $\beta$  para a utilização das reivindicações 1-5, em que a administração de uma dose inicial do anticorpo ou fragmento de anticorpo é seguida da administração de uma ou mais doses subsequentes.

7. Anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento de ligação à IL-1 $\beta$  para a utilização das reivindicações 1-5, em que a administração de uma dose inicial do anticorpo ou fragmento de anticorpo é seguida da administração de uma ou mais doses subsequentes, e em que as referidas uma ou mais doses subsequentes são numa quantidade que é aproximadamente a mesma ou inferior à dose inicial.

8. Anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento de ligação à IL-1 $\beta$  para a utilização das reivindicações 1-5, em que a administração de uma dose inicial do anticorpo ou fragmento de anticorpo é seguida da administração de uma ou mais doses subsequentes, e em que pelo menos uma das doses subsequentes é numa quantidade que é superior à dose inicial.

9. Anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento de ligação à IL-1 $\beta$  para a utilização das reivindicações 1-8, em que a dose do anticorpo ou fragmento é suficiente para conseguir pelo menos uma redução de 50% na dor articular.

10. Anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento de ligação à IL-1 $\beta$  para a utilização das reivindicações 1-9,

em que a dose do anticorpo ou fragmento é suficiente para conseguir pelo menos uma diminuição de 20% nos níveis de CRP.

11. Anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento de ligação à IL-1 $\beta$  para a utilização das reivindicações 1-10, em que a dose do anticorpo ou fragmento é suficiente para conseguir pelo menos uma diminuição de 20% na ESR.

12. Anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento de ligação à IL-1 $\beta$  para a utilização das reivindicações 1-9, em que a dose do anticorpo ou fragmento é suficiente para conseguir pelo menos uma redução de 50% na dor articular, pelo menos uma diminuição de 20% na CRP e pelo menos uma diminuição de 20% na ESR.

13. Anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento de ligação à IL-1 $\beta$  para a utilização das reivindicações 1-12, em que o referido método é em conjunto com pelo menos um método de tratamento adicional, em que o referido método de tratamento adicional comprehende a administração de pelo menos uma composição farmacêutica comprehendendo um agente activo diferente de um anticorpo IL-1 $\beta$  ou fragmento.

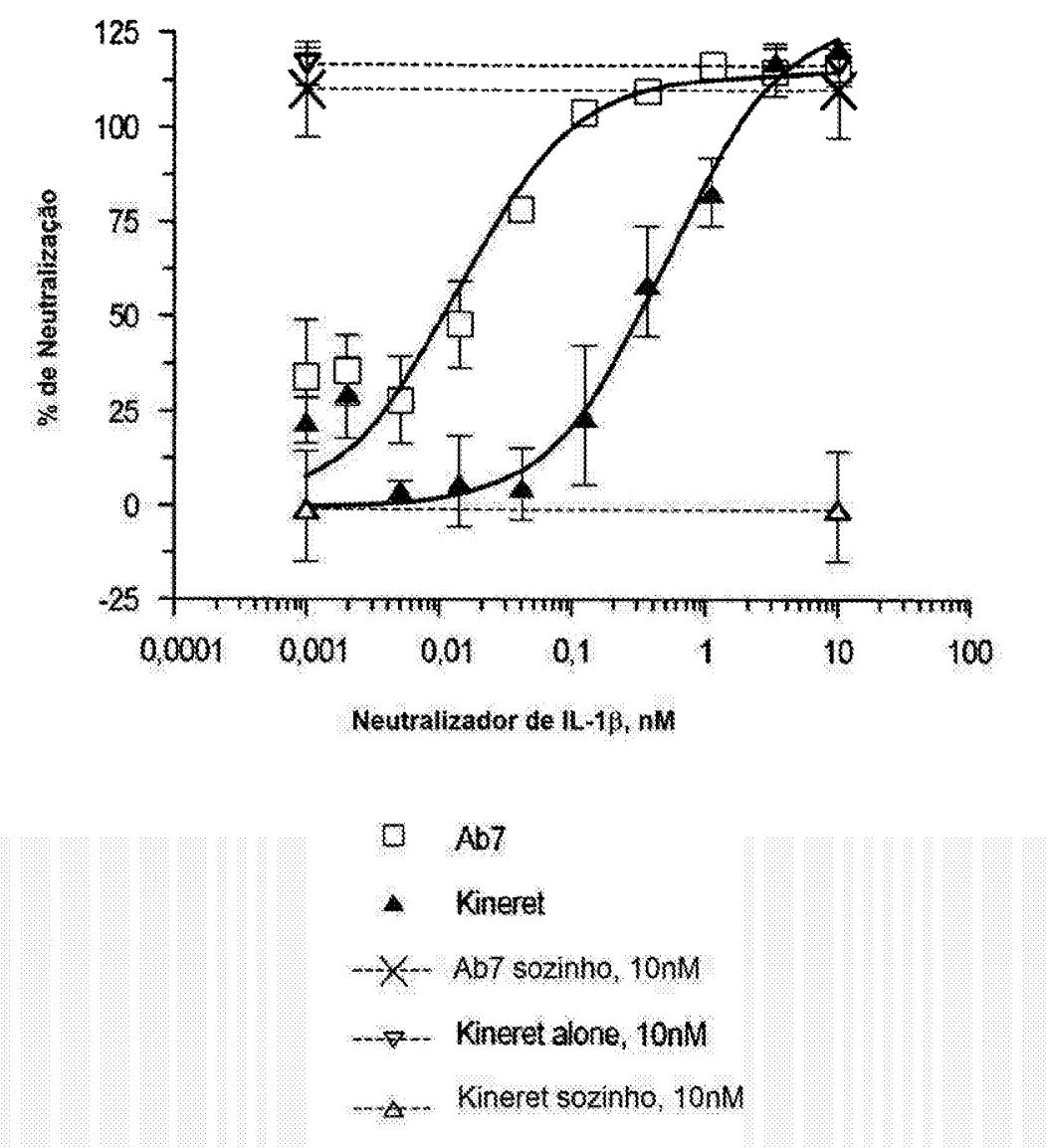
14. Anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento de ligação à IL-1 $\beta$  para a utilização da reivindicação 13, em que a referida pelo menos uma composição farmacêutica que comprehende um agente activo diferente de um anticorpo IL-1 $\beta$  ou fragmento é seleccionada do grupo consistindo de um

fármaco anti-inflamatório não esteróide (NSAID), um corticosteróide, uma hormona adrenocorticotrópica e uma colquicina.

15. Anticorpo anti-IL-1 $\beta$  ou seu fragmento de ligação à IL-1 $\beta$  para a utilização das reivindicações 1-14, em que o anticorpo ou seu fragmento tem uma IC<sub>50</sub> inferior à de um antagonista do receptor de IL-1 $\beta$  num ensaio de inibição de IL-1 $\beta$  em sangue inteiro humano que mede a produção de IL-8 induzida por IL-1 $\beta$ .

Lisboa, 29 de dezembro de 2014

FIG. 1



**PE2391650**

**2/10**

FIG. 2

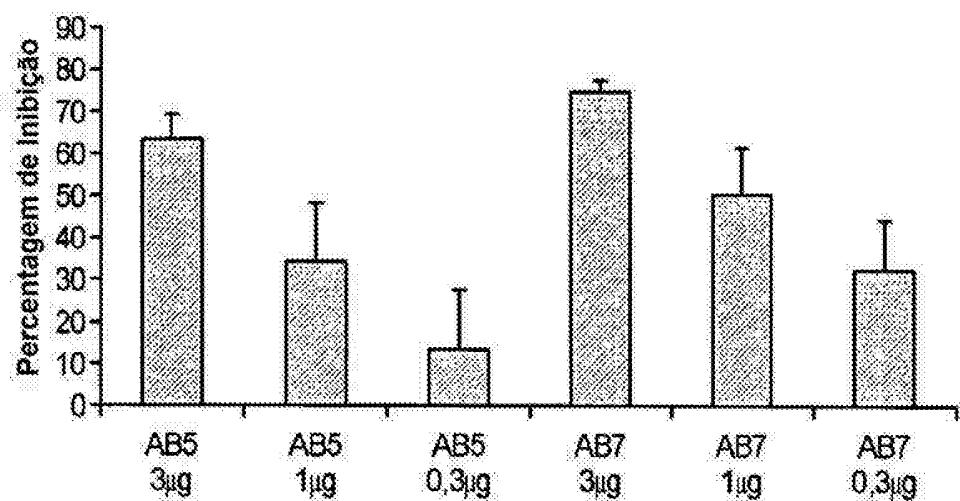


FIG. 2B

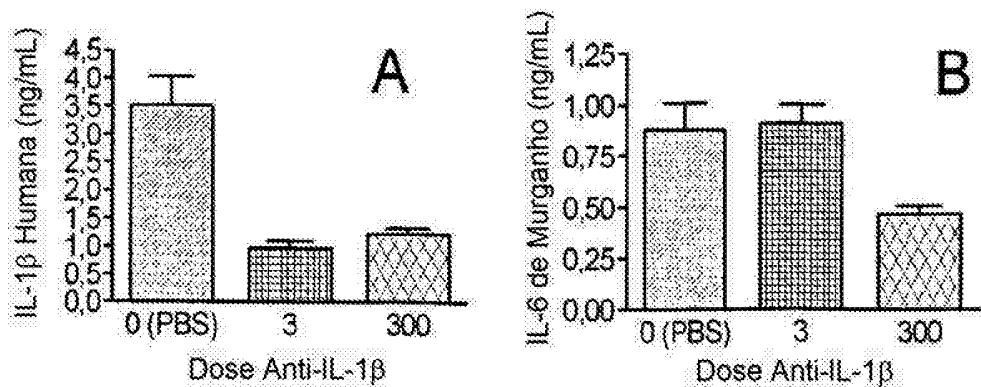


FIG. 3

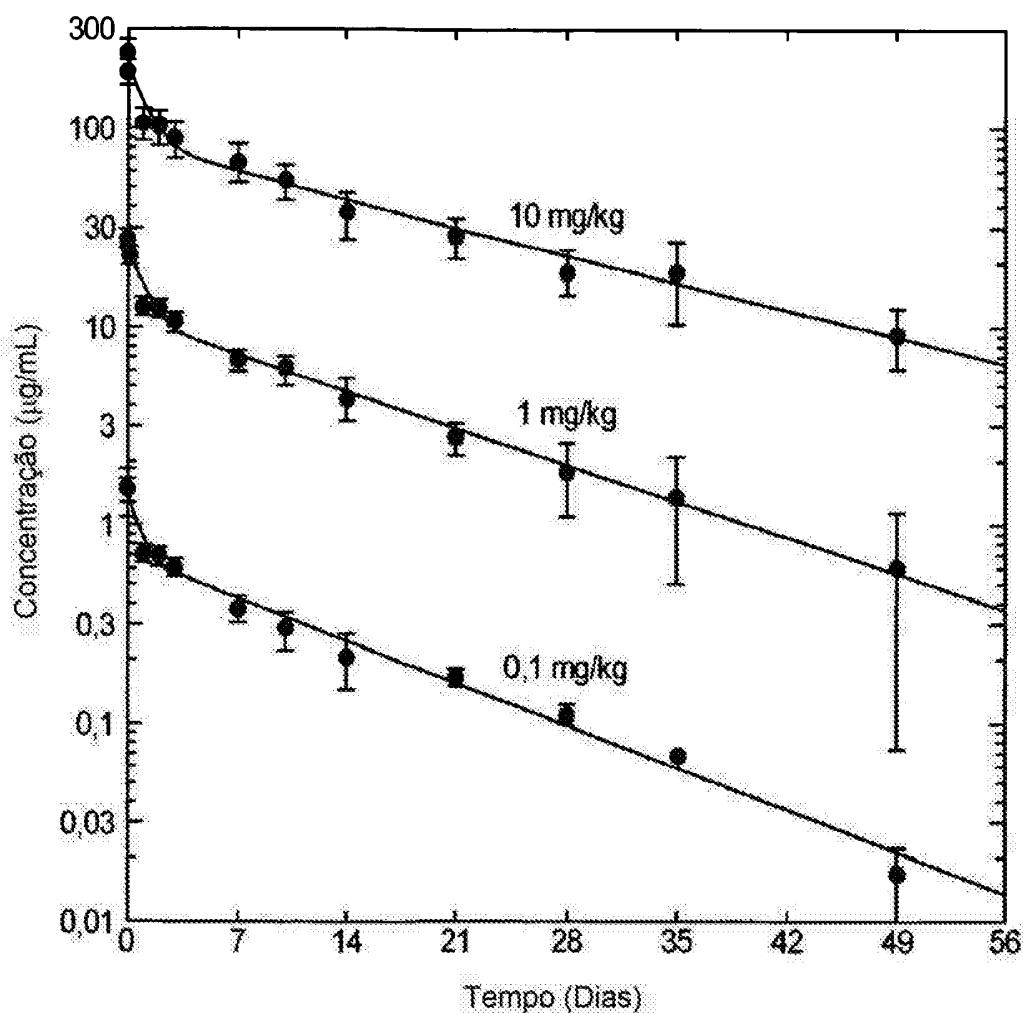


FIG. 4

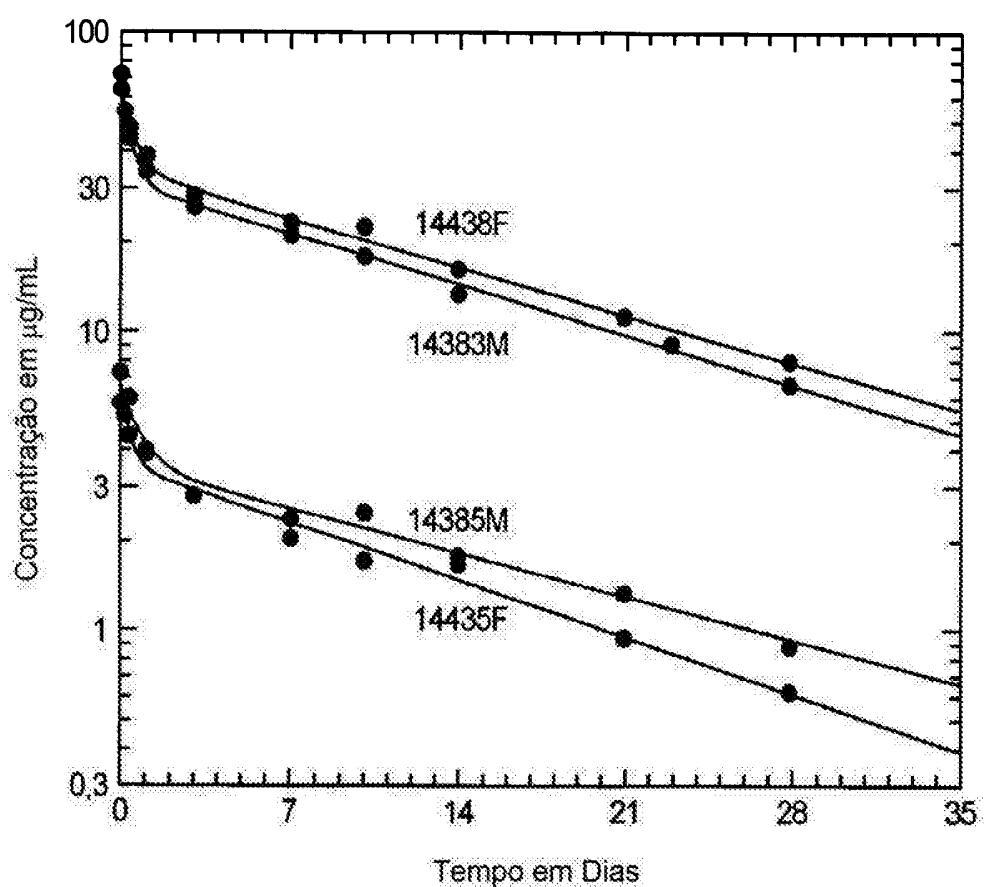
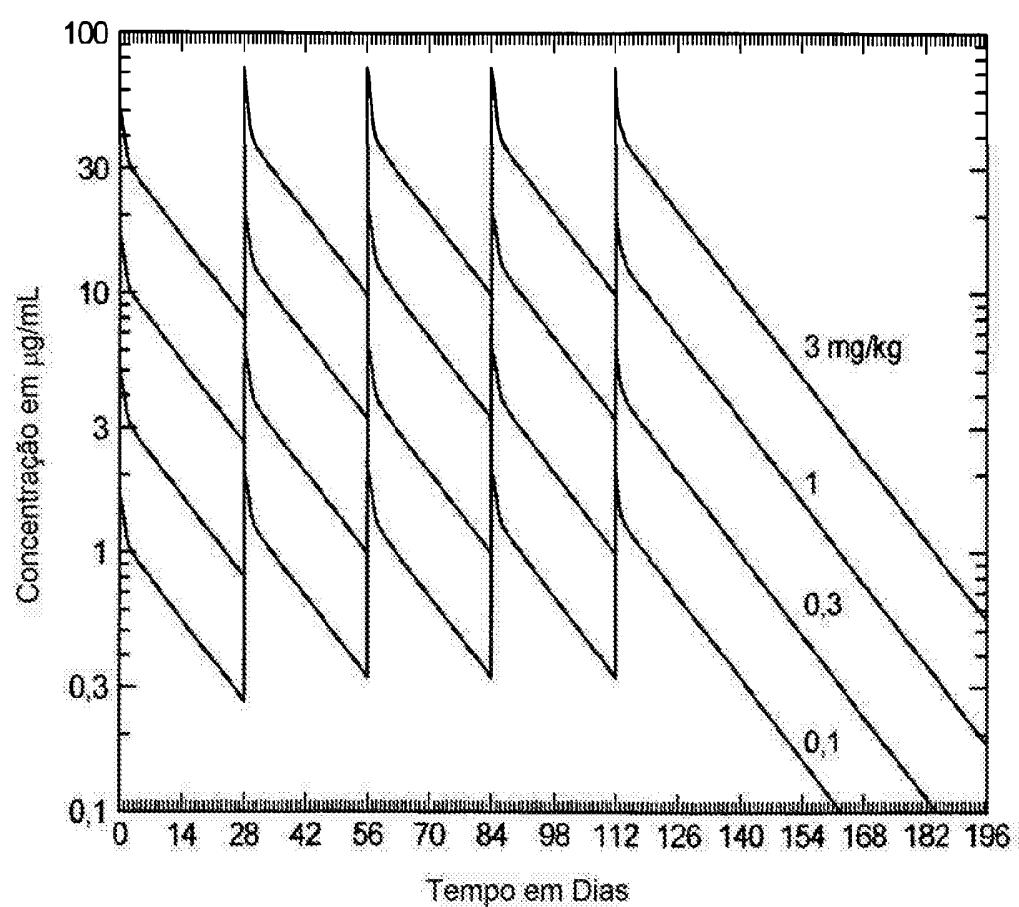


FIG. 5



**PE2391650**

**7/10**

6  
EIG  
II

FIG. 7

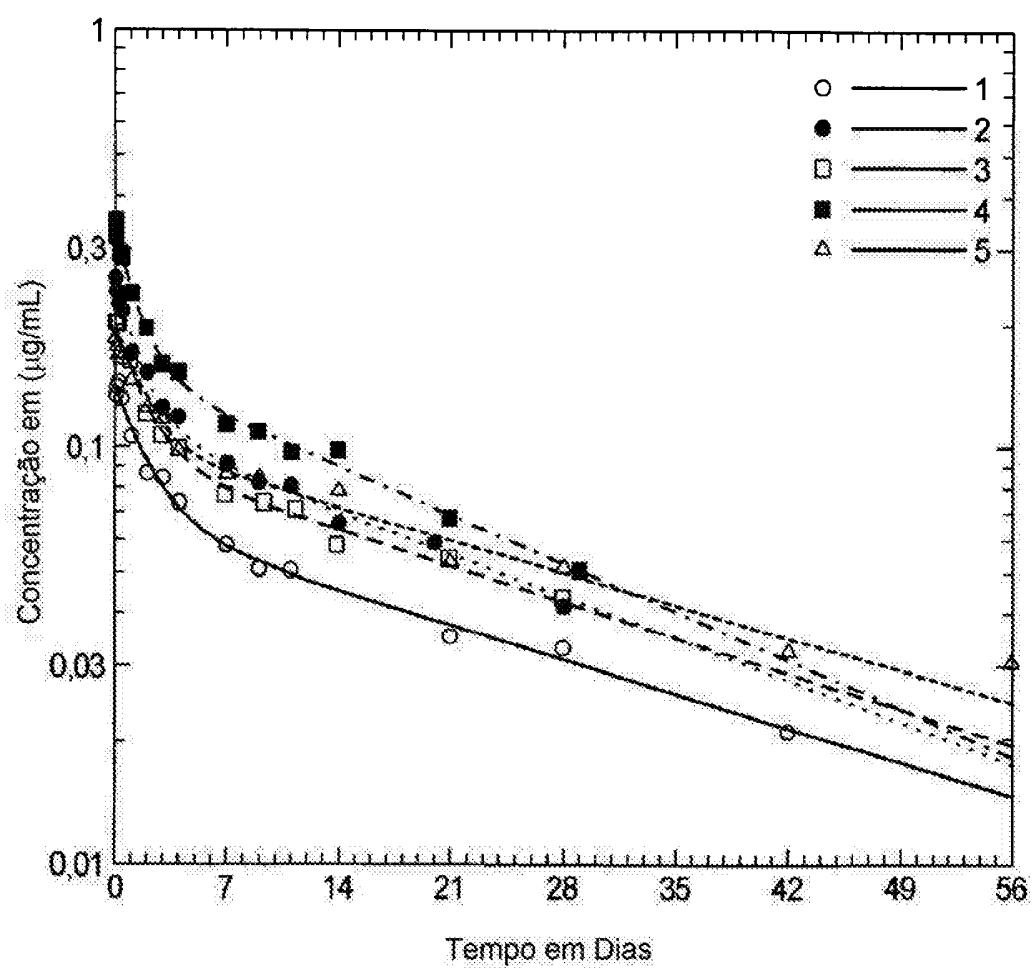
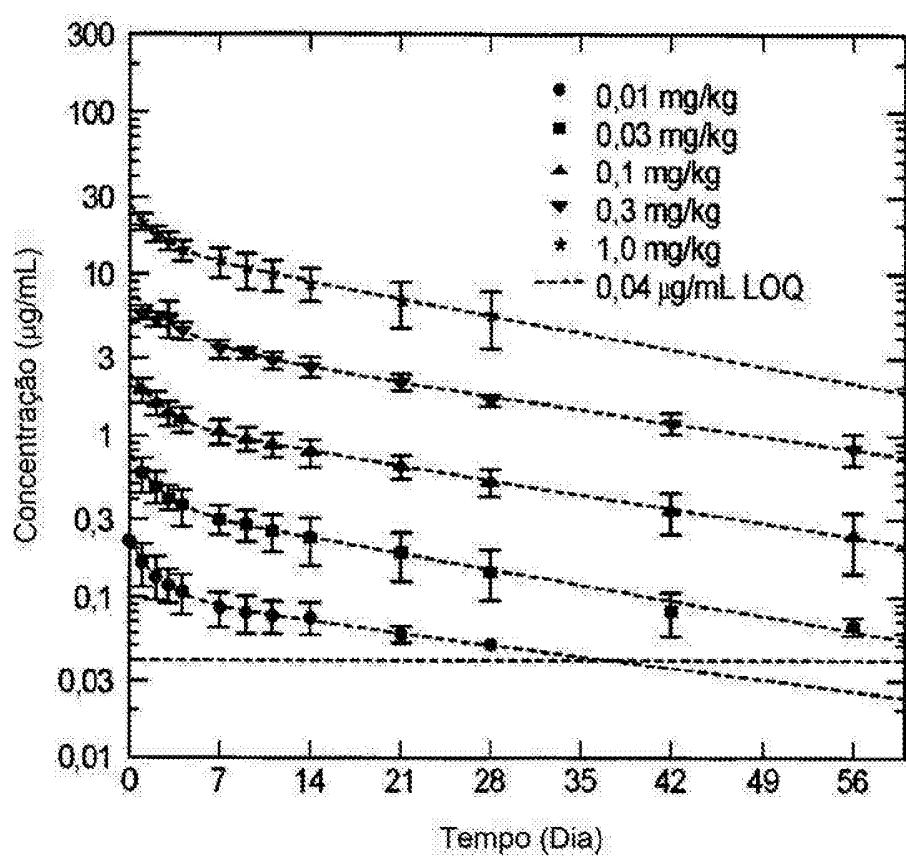


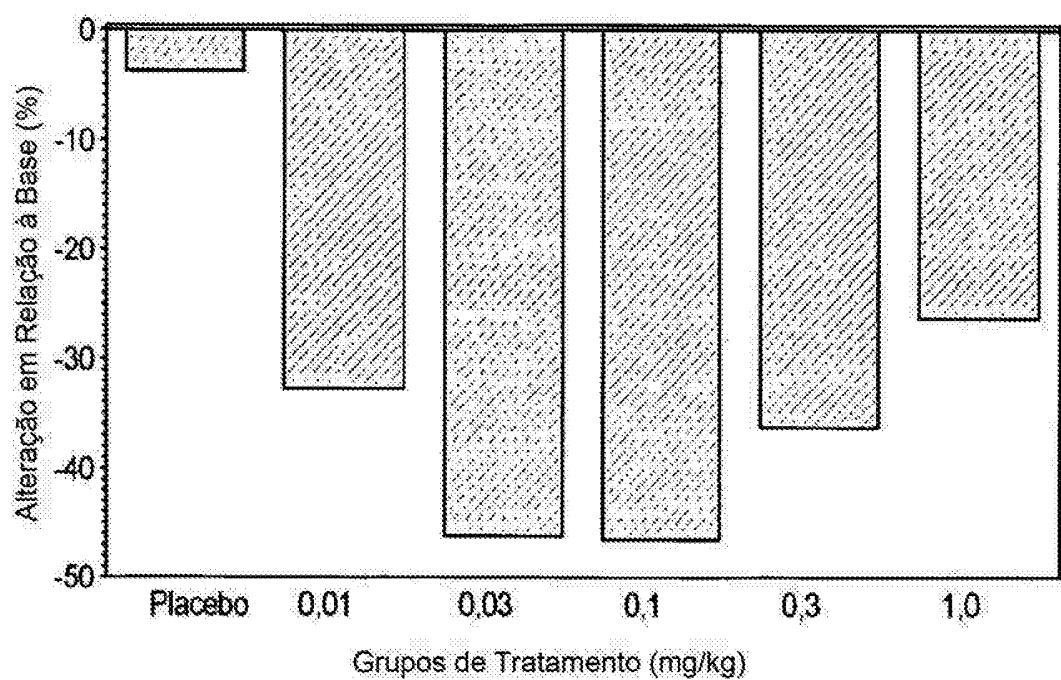
FIG. 8



$T_a = 1,42$  dias  
 $T_\beta = 22,0$  dias  
 $CL = 2,54 \text{ mL/dia/kg}$   
 $V_c = 41,3 \text{ mL/kg}$   
 $F_{\text{alfa}} = 0,061$

LOQ = Limite de Quantificação

FIG. 9



**PE2391650**

**12/10**

FIG. 10A

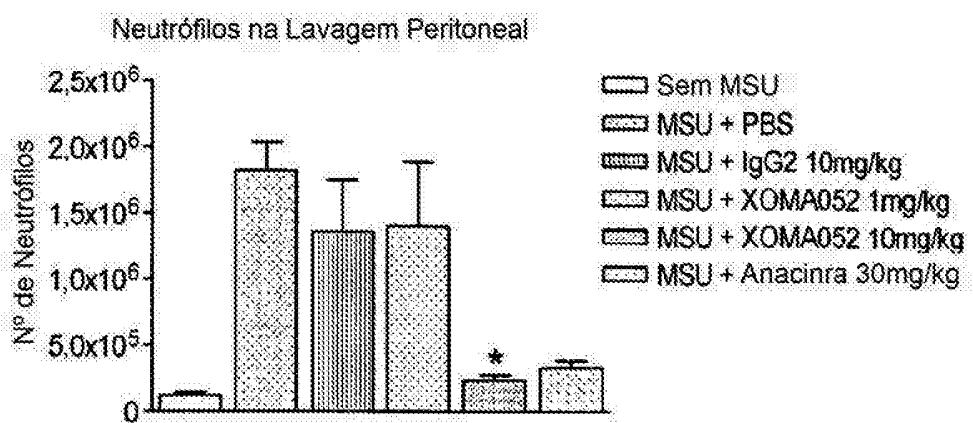
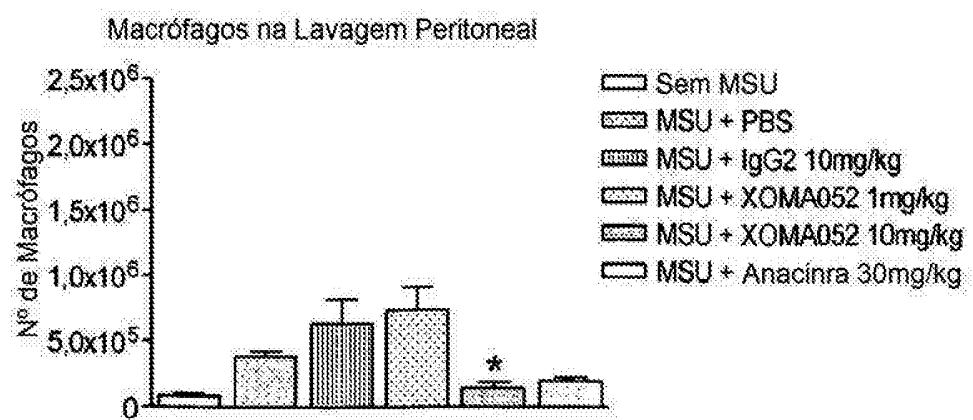


FIG. 10B



**REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO**

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

**Documentos de patentes citadas na Descrição**

- WO 2007077261 A1
- WO 2007002261 A1
- WO 03010262 A1
- WO 2008077145 A2
- US 4816567 A
- US 4474893 A
- WO 8801533 A
- US 5721387 A
- US 5837243 A
- US 6186377 B
- US 5768886 A
- US 5695619 A
- US 5770196 A
- US 5821123 A
- WO 93111794 A
- WO 9824693 A
- WO 9100008 A
- WO 8630498 A
- US 6091001 A
- WO 9402602 A
- US 5939536 A
- US 6114596 A
- US 6667103 B
- US 6813268 B
- WO 9623735 A
- WO 9824108 A
- US 20030194404 A
- US 20030031667 A
- US 5770429 A
- US 5591689 A
- US 5588369 A
- US 6645807 A
- US 20020199213 A
- US 20030092125 A
- US 5567610 A
- US 5229275 A
- WO 9910494 A
- US 5969108 A
- US 5223409 A, Ladner
- WO 9218818 A, Kang
- WO 9117271 A, Dower
- WO 9220791 A, Winter
- WO 9215679 A, Markland
- WO 8301288 A, Breitling
- WO 9201047 A, McCafferty
- WO 9209690 A, Garrard
- US 5565332 A
- US 5573905 A
- US 20020004215 A
- US 20030180317 A
- US 6054287 A
- US 5877293 A
- US 20030044772 A
- US 6692658 B
- US 5843768 A
- US 5658754 A
- US 6098253 B
- WO 9632478 A
- WO 9734631 A
- US 51472813 B
- WO 2007002261 A
- EP 404397 A
- WO 9311181 A
- US 200301136049 A
- US 20030037421 A
- WO 03041609 A
- US 20030193039 A
- US 20030118592 A
- US 5770360 A
- US 20040171116 A
- US 20040266923 A
- US 20050038229 A
- US 6695940 B
- US 6588329 B
- US 6372716 B
- WO 9315722 A
- US 3773919 A
- EP 133988 A
- WO 9703582 A
- WO 9810072 A
- WO 9607399 A
- US 5654010 A
- EP 58481 A
- US 3897699 A
- EP 1582777 A
- CA 1176565
- EP 517565 A
- WO 9623939 A
- WO 04000964 A
- WO 02007231 A
- US 4452775 A
- US 4675189 A
- US 5735182 A
- US 3854480 A
- US 5133974 A
- US 5407666 A
- DE 3218121

- EP 52322 A
- EP 36676 A
- EP 88048 A
- EP 143949 A
- EP 142641 A
- JP 56118008 A
- US 4486045 A
- US 4544545 A
- EP 102324 A
- WO 9420369 A
- US 6899878 B
- US 20030228689 A
- US 20060094663 A
- US 20050186615 A
- US 20030166069 A
- WO 04022716 A
- WO 05084696 A
- WO 05019259 A

**Literatura que não é de patentes citada na Descrição**

- PETRILLI et al. *Joint Bone Spine*, 2007, vol. 74, 571-578
- POPE et al. *Arthritis Rheum.*, 2007, vol. 56, 3183-3188
- CHEN et al. *J. Clin. Invest.*, 2006, vol. 116, 2073-2076
- AKAHOSHI, T. et al. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 2007, vol. 19, 148-150
- MARTINON, F. et al. *Nature*, 2006, vol. 440, 237-241
- CRONSTEIN et al. *Arthritis Res. Ther.*, 2006, vol. 8 (1), 3
- SO et al. *Arthritis Res. Ther.*, 2007, vol. 9 (2), R28
- MCGONAGLE et al. *Ann. Rheum. Dis.*, 2007, vol. 66, 1683-1684
- SIMON et al. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, vol. 268 (13), 9771-9779
- DINARELLO et al. *Current Opinion in Pharmacology*, 2004, vol. 4 (4), 378-385
- POPE et al. *Arthritis & Rheumatism*, 2007, vol. 56 (10), 3183-3188
- NISHIMURA et al. *Journal of Leukocyte Biology*, 1997, vol. 62 (4), 444-449
- DINARELLO, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2004, vol. 4, 378-385
- ECONOMIDES et al. *Nature Med.*, 2003, vol. 9, 47-52
- Antibody Engineering, Springer, 2001
- DINARELLO et al. *Current Protocols in Immunology*, John Wiley and Sons Inc, 2000
- RETTER et al. *Nucl. Acids Res.*, 2005, vol. 33, D871-D874
- KABAT et al. *Sequences of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, 1991
- KOHLER et al. *Nature*, 1975, vol. 256, 495-7
- CLACKSON et al. *Nature*, 1991, vol. 352, 624-628
- MARKS et al. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597
- GODING. *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, 1986, 59-103
- KOZBOR, *J. Immunol.*, 1984, vol. 133, 3001
- BRODEUR et al. *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 1987, 51-83
- MUNSON et al. *Anal. Biochem.*, 1980, vol. 137, 220
- Antibody Engineering, The practical approach series, Oxford University Press, 1996
- LEWIS et al. *Mol. Immunol.*, 1995, vol. 32, 1065-72
- MARKS et al. *Biotechnology*, 1992, vol. 10, 779-83
- KRANZ et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, vol. 78, 5897
- MORRISON et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6841-6855
- BOULIANNE et al. *Nature*, 1984, vol. 312, 643-646
- MORRISON et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1984, vol. 81, 6851
- NEUBERGER et al. *Nature*, 1984, vol. 312, 804
- JONES et al. *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525
- RIECHMANN et al. *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [8079]
- VERHOEYEN et al. *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1538
- STUDNICKA et al. *Protein Engineering*, 1994, vol. 7, 605-614
- FISHWILD et al. *Nat. Biotechnol.*, 1998, vol. 14, 945-951
- ISHIDA et al. *Cloning Stem Cells*, 2002, vol. 4, 91-102
- JAKOBOVITS et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 3551
- JAKOBOVITS et al. *Nature*, 1993, vol. 362, 255-258
- BRUGGERMANN et al. *Year in Immunol.*, 1993, vol. 7, 33
- HOOGENBOOM et al. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 227, 381
- MARKS et al. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581
- FUCHS et al. *BioTechnology*, 1991, vol. 9, 1370-1372
- HAY et al. *Hum. Antibod. Hybridomas*, 1992, vol. 3, 81-85

- HUSE et al. *Science*, 1989, vol. 246, 1275-1281
- MCCAFFERTY et al. *Nature*, 1990, vol. 348, 552-554
- GRIFFITHS et al. *EMBO J.*, 1993, vol. 12, 725-734
- HAWKINS et al. *J. Mol. Biol.*, 1992, vol. 226, 889-896
- GRAM et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 3576-3580
- GARRAD et al. *Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 1373-1377
- HOOGENBOOM et al. *Nuc Acid Res.*, 1991, vol. 19, 4133-4137
- BARBAS et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 7978-7982
- JESPERS, L. S. et al. *Bio/Technology*, 1994, vol. 12, 893-903
- MARKS et al. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597
- CLACKSON, T. ; WELLS, J. A. *TIBTECH*, 1994, vol. 12, 173-184
- BURTON, D. R. ; BARBAS III, C. F. *Adv. Immunol.*, 1994, vol. 57, 191-280
- WINTER, G. et al. *Annu. Rev. Immunol.*, 1994, vol. 12, 433-455
- WATKINS. Screening of Phage-Expressed Antibody Libraries by Capture Lift. *Methods in Molecular Biology. Antibody Phage Display: Methods and Protocols*, 2002, vol. 178, 187-193
- MARKS et al. *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 779-783
- HANES et al. *Proc. Natl Acad. Sci USA*, 1997, vol. 94, 4937-4942
- MORRISON et al. *The Immunologist*, 1994, vol. 2, 119-124
- BREKKE et al. *The Immunologist*, 1994, vol. 2, 125
- ANGAL et al. *Mol Immunol.*, 1993, vol. 30, 105-8
- WAHL et al. *J. Nucl. Med.*, 1983, vol. 24, 316-25
- EVANS et al. *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, 11477-11483
- VIGERS et al. *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275, 36927-36933
- YANOFSKY et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, 7381-7386
- FREDERICKS et al. *Protein Eng. Des. Sel.*, 2004, vol. 17, 95-106
- SLACK et al. *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, 2513-2524
- SMITH et al. *Immunity*, 2003, vol. 18, 87-96
- VIGERS et al. *Nature*, 1997, vol. 386, 190-194
- RUGGIERO et al. *J. Immunol.*, 1997, vol. 158, 3881-3887
- GUO et al. *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, 27562-27568
- SVENSON et al. *Eur. J. Immunol.*, 1995, vol. 25, 2842-2850
- AREND et al. *J. Immunol.*, 1994, vol. 153, 4783-4774
- WARD et al. *Nature*, 1989, vol. 341, 544-546
- KIPRIYANOV, S. M. et al. *Human Antibodies and Hybridomas*, 1995, vol. 6, 93-101
- KIPRIYANOV, S. M. et al. *Mol. Immunol.*, 1994, vol. 31, 1047-1058
- HOLLIGER et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-6448
- POLJAK et al. *Structure*, 1994, vol. 2, 1121-1123
- BIRD et al. *Science*, 1988, vol. 242, 423-428
- HUSTON et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, vol. 83, 5879-5883
- HAMERS-CASTERMAN et al. *Nature*, 1993, vol. 363, 446
- NGUYEN et al. *J. Mol. Biol.*, 1996, vol. 275, 413
- NUTTALL et al. *Mol Immunol.*, 2001, vol. 38, 313-36
- GREENBERG et al. *Nature*, 1995, vol. 374, 168-73
- ROUX et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, vol. 95, 11804
- NGUYEN et al. Heavy-chain antibodies in Camelidae: a case of evolutionary innovation. *Immunogenetics*, 2002, vol. 54 (1), 39-47
- HAMERS-CASTERMAN et al. *Nature*, 1993, vol. 363, 446-448
- MUYLDERMANS et al. *J. Mol. Recognit.*, 1999, vol. 12, 131-140
- CORTEZ-RETAMOZO et al. *Cancer Research*, 2004, vol. 64, 2853-57
- CONRATH et al. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, vol. 45, 2807-12
- NGUYEN et al. *Mol. Immunol.*, 1999, vol. 36, 515-524
- WOOLVEN et al. *Immunogenetics*, 1999, vol. 50, 99-101
- NGUYEN et al. *Adv. Immunol.*, 2001, vol. 79, 261-296
- NGUYEN et al. *Immunogenetics*, 2002, vol. 54, 39-47
- IRVING et al. *J. Immunol. Methods*, 2001, vol. 243, 31-45
- ROUX et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, vol. 95, 11804
- DESMYTER et al. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, 26285-90
- REICHMAN et al. *J. Immunol. Methods*, 1999, vol. 231, 25-38
- MUYLDERMANS. *Biotechnol.* 2001, vol. 74, 277-302
- GHARROUDI et al. *FEBS Lett.*, 1997, vol. 414, 521-526

- VAN DER LINDEN et al. *J. Biotechnol.*, 2000, vol. 80, 261-270
- DAVIES et al. *FEBS Lett.*, 1994, vol. 339, 285-293
- DAVIES et al. *Protein Eng.*, 1996, vol. 9, 531-537
- TANHA et al. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, 24774-24780
- RIECHMANN et al. *Immunol. Methods*, 1999, vol. 231, 25-38
- SCHOONJANS et al. *J. Immunol.*, 2000, vol. 165, 7050-57
- WILLEMS et al. *J Chromatogr B Analyt. Technol Biomed Life Sci.*, 2003, vol. 786, 161-78
- OLAFSEN et al. *Protein Eng Des Sel.*, April 2004, vol. 17 (4), 315-23
- BIOCCHA et al. *EMBO J.*, 1990, vol. 9, 101-108
- COLBY et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2004, vol. 101, 17616-21
- MHASHILKAR et al. *EMBO J.*, 1995, vol. 14, 1542-51
- WHEELER et al. *FASEB J.*, 2003, vol. 17, 1733-5
- HENG et al. *Med Hypotheses*, 2005, vol. 64, 1105-8
- TRAMONTANO et al. *J. Mol. Recognit.*, 1994, vol. 7, 9
- MCCONNELL ; HOESS. *J. Mol. Biol.*, 1995, vol. 250, 460
- NORD et al. *Nat. Biotechnol.*, 1997, vol. 15, 772
- NORD et al. *Protein Eng.*, 1995, vol. 8, 601
- KU ; SCHULTZ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, vol. 92, 6552
- MARKLAND et al. *Biochemistry*, 1996, vol. 35, 8045
- MARKLAND et al. *Biochemistry*, 1996, vol. 35, 8058
- ROTTGEN ; COLLINS. *Gene*, 1995, vol. 164, 243
- WANG et al. *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, 12250
- Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Company, 1990
- Remington's Pharmaceutical Science, 1980 [0157]
- SIDMAN et al. *Biopolymers*, 1993, vol. 22, 547-556
- LANGER et al. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1981, vol. 15, 167-277
- LANGER. *Chem. Tech.*, 1982, vol. 12, 98-105
- EPPSTEIN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 3688-92
- JOHNSON et al. *Nat. Med.*, 1996, vol. 2, 795-799
- YASUDA. *Biomed. Ther.*, 1993, vol. 27, 1221-1223
- HORA et al. *BioTechnology*, 1990, vol. 8, 755-758
- Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Poly(lactide-Poly(glycolide) Microsphere Systems. CLELAND. Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach. Plenum Press, 1995, 439-462
- Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer. LEWIS. Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems. Marcel Dekker, 1990, 1-41
- U. SIDMAN et al. *Biopolymers*, 1993, vol. 22, 547
- R. LANGER et al. *Chem. Tech.*, 1982, vol. 12, 98
- SINHA et al. *J. Control. Release*, 2003, vol. 90, 261
- ZHU et al. *Nat. Biotechnol.*, 2000, vol. 18, 24
- DAI et al. *Colloids Surf B Biomaterials*, 2005, vol. 41, 117
- CORTIVO et al. *Biomaterials*, 1991, vol. 12, 727-730
- ILLUM et al. *J. Controlled Rel.*, 1994, vol. 29, 133-141
- SAWHNEY et al. *Macromolecules*, 1993, vol. 26, 581-587
- EPSTEIN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 3688-3692
- HWANG et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4030-4034
- MARTINON et al. *Nature*, 2006, vol. 440, 237-241