



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

(11) BR 112015009892-4 B1



(22) Data do Depósito: 05/11/2013

(45) Data de Concessão: 27/12/2022

(54) Título: ANTICORPO CONTRA IL-1 BETA, SEU MÉTODO DE PRODUÇÃO E SEU USO, SEQUÊNCIA ISOLADA DE ÁCIDO NUCLEICO, VETOR, COMPOSIÇÃO COSMÉTICA, DE DIAGNÓSTICO OU FARMACÊUTICA, E KIT

(51) Int.Cl.: A61K 39/395; C07K 16/24.

(30) Prioridade Unionista: 05/11/2012 EP 12007503.1; 05/11/2012 US 61/722,532.

(73) Titular(es): DELENEX THERAPEUTICS AG.

(72) Inventor(es): STEFANIE GRABULOVSKI; TITUS KRETZSCHMAR; SIMONE SCHMITT; ABDIJAPAR SHAMSHIEV; THORSTEN ALEXANDER SCHÄFER.

(86) Pedido PCT: PCT EP2013073009 de 05/11/2013

(87) Publicação PCT: WO 2014/068132 de 08/05/2014

(85) Data do Início da Fase Nacional: 30/04/2015

(57) Resumo: ANTICORPO CONTRA IL-1 BETA, SEU MÉTODO DE PRODUÇÃO E SEU USO, MEMBRO DE LIGAÇÃO, SEQUÊNCIA ISOLADA DE ÁCIDOS NUCLEICOS, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, COMPOSIÇÃO COSMÉTICA, DE DIAGNÓSTICO OU FARMACÊUTICA. E KIT. A presente invenção refere-se aos membros de ligação anti-IL-1 beta e, em particular, aos fragmentos de anticorpo de ligação à IL-1 beta monovalente, de potência alta que são altamente estáveis e solúveis. Tais membros de ligação podem ser usados no tratamento de doenças inflamatórias e outras doenças, como também em diagnósticos. Também fornecidos são ácidos nucleicos, vetores, células, e composições relacionados.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"ANTICORPO CONTRA IL-1 BETA, SEU MÉTODO DE PRODUÇÃO
E SEU USO, SEQUÊNCIA ISOLADA DE ÁCIDO NUCLEICO, VETOR,
COMPOSIÇÃO COSMÉTICA, DE DIAGNÓSTICO OU
FARMACÊUTICA, E KIT".**

Descrição

[001] A presente invenção refere-se a anticorpos anti-IL-1 beta humanizados, em particular fragmentos de anticorpo anti-IL-1 beta monovalentes, altamente potentes. A invenção também refere-se a ácidos nucleicos codificando tais anticorpos, vetores, células hospedeiras contendo tais sequências, composições farmacêuticas e de diagnósticos compreendendo os anticorpos ou os ácidos nucleicos, e uso dos mesmos.

Antecedentes da Invenção

[002] Interleucina-1 beta (IL-1 beta) é uma citocina pró-inflamatória que é produzida como um precursor por macrófagos ativados. Sob clivagem proteolítica, a transdução de sinal é iniciada mediante ligação da forma ativa ao receptor de IL-1 tipo I (IL-1R1) que por sua vez associa-se com a proteína acessória do receptor IL-1 de transmembrana (IL-1RAP). O complexo formado é competente da transdução de sinal. Sendo um mediador fundamental na resposta inflamatória, a citocina afeta várias atividades celulares tais como proliferação celular, diferenciação, e apoptose. Portanto, IL-1 beta foi considerada um alvo importante para uma variedade de farmacêuticos.

[003] Há uma necessidade na técnica por anticorpos com potencial terapêutico alto contra IL-1 beta humana. Para se ter sucesso terapêutico, é importante que tal anticorpo exiba características biofísicas e bioquímicas desejáveis. Por exemplo, uma vez que a IL-1 beta alvo é uma interleucina altamente eficiente que é potente em concentrações muito baixas e desse modo necessita ser

compreensivamente bloqueada, tal anticorpo necessita ser altamente potente como também altamente estável e solúvel.

Sumário da Invenção

[004] Em um primeiro aspecto, a invenção fornece um fragmento de anticorpo monovalente direcionado contra IL-1 beta tendo uma potência inferior a 50 picomolares (pM), como determinado pela metade da concentração inibitória máxima IC_{50} com respeito à inibição do efeito biológico de IL-1 beta humana.

[005] Fragmentos de anticorpos monovalentes, quer humanizados ou não, tendo valores de potência na faixa pM são particulares e não habitualmente obtidos. Além disso e tipicamente, um anticorpo perde a afinidade a seu alvo sob humanização quando comparado ao anticorpo não humano parental. Portanto, é um desafio humanizar um anticorpo de modo que os parâmetros de afinidade fiquem próximos ou iguais ao anticorpo parental. Isto é particularmente verdadeiro para fragmentos de anticorpos monovalentes compreendendo apenas uma cadeia leve e pesada variável e, portanto, liga-se ao alvo menos fortemente que os anticorpos bivalentes que exibem duas cadeias leve e pesada.

[006] Além disso, ao converter um anticorpo completo em um fragmento menor, sua potência é usualmente diminuída. Isto não só é devido à alteração inerente da valência (por exemplo, o fragmento de anticorpo pode apenas ser monovalente enquanto que uma imunoglobulina completa é bi ou multivalente) mas pode também ser causada por razões estéricas.

[007] Um anticorpo potente é particularmente útil uma vez que permite administrar quantidades mais baixas de fármaco ao paciente, assim diminuindo os custos gerais do tratamento. Além disso, uma neutralização mais completa do alvo molecular da doença torna-se exequível.

[008] Além disso, rotas de aplicação diferentes nos modelos

animais como também em terapia humana podem ser previstas ao aplicar anticorpos de potência mais alta. Por exemplo, quanto aos fármacos tópicos, embora a liberação possa ser limitada devido à função de barreira da camada epitelial, a eficácia do tratamento é restabelecida pela potência alta da quantidade limitada de moléculas de fármaco que atravessam esta barreira fisiológica.

[009] Frequentemente, a quantidade alta de um fármaco menos potente que necessita ser administrado para alcançar efeitos farmacodinâmicos similares traduz em volumes de aplicação intravenosa ou subcutânea muito mais altos que com um fármaco mais potente. Tais volumes de aplicação mais altos são uma desvantagem para o uso em animais e seres humanos por duas razões: primeiramente, a impraticabilidade de tratar pacientes com um volume alto de fármaco, e em segundo lugar, porque os anticorpos são muito caros por unidade de massa.

[0010] Portanto, quantidades mais baixas de anticorpo usado para o tratamento traduzem em custos de produção mais baixos do fármaco. Em particular, os fragmentos de anticorpo são adequados para a produção usando, por exemplo, sistemas de cultura bacteriana ou de levedura, que são de custo comparativamente inferiores que os sistemas de expressão mamíferos tipicamente usados para a produção das imunoglobulinas completas tais como IgG. A combinação de quantidades menores de fármaco a ser administradas e processos de fabricação mais baratos abrem a possibilidade de medicinas mais eficientes no custo por paciente. Desse modo, um número maior de pacientes pode se beneficiar de tal fármaco.

[0011] Parâmetros de estabilidade e de solubilidade são outros fatores cruciais para fornecer um medicamento viável. Quanto mais estável e solúvel um fármaco de anticorpo, menor o volume de administração e mais longo o tempo de meia-vida de prateleira. Os

anticorpos fornecidos aqui são altamente estáveis e solúveis, isto é, eles permanecem monoméricos durante períodos prolongados de tempo e também em concentrações altas.

[0012] Em um aspecto, um anticorpo é fornecido, em particular o fragmento de anticorpo monovalente acima, compreendendo:

(a) pelo menos uma das sequências da região de determinação de complementaridade (CDR) de cadeia pesada variável (VH) CDR-H1, CDR-H2 ou CDR-H3 como expostas em SEQ ID N^{os}.: 1, 2 e 3, respectivamente, ou variantes das mesmas; e/ou

(b) pelo menos uma das sequências de CDR de cadeia leve variável (VL) CDR-L1, CDR-L2 ou CDR-L3 como expostas em SEQ ID N^{os}.: 4, 5, e 6, respectivamente, ou variantes das mesmas.

[0013] Em outra modalidade, o anticorpo, e em particular o dito fragmento de anticorpo monovalente, compreende:

(a) pelo menos uma das sequências da região de determinação de complementaridade (CDR) de cadeia pesada variável (VH) CDR-H1, CDR-H2 ou CDR-H3 como expostas em SEQ ID N^{os}.: 155, 156 e 157, respectivamente, ou variantes das mesmas; e/ou

(b) pelo menos uma das sequências de CDR de cadeia leve variável (VL) CDR-L1, CDR-L2 ou CDR-L3

(i) como expostas em SEQ ID N^{os}.: 158, 159 e 160, respectivamente, ou variantes das mesmas, ou

(ii) como expostas em SEQ ID N^{os}.: 161, 162 e 163, respectivamente, ou variantes das mesmas.

[0014] Em algumas modalidades, o anticorpo compreende:

(a) uma VH tendo pelo menos 85% de identidade a uma sequência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 7 e SEQ ID NO: 146; e/ou

(b) uma VL tendo pelo menos 85% de identidade a uma sequência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 8, SEQ

ID NO: 136 e SEQ ID NO: 145.

[0015] O anticorpo pode compreender uma sequência ligante, sendo ou derivada de SEQ ID NO: 9. Em algumas modalidades, tal anticorpo é um fragmento de anticorpo tendo pelo menos 85% de identidade de sequência a uma sequência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 73 e SEQ ID NO: 82.

[0016] Em um aspecto, a invenção fornece membros de ligação que se ligam à IL-1 beta e competem para ligar com os anticorpos descritos aqui. O dito membro de ligação pode ser monovalente ou multivalente. Um membro de ligação multivalente preferido é bivalente. Um membro de ligação multivalente pode ser biespecífico.

[0017] Em um aspecto, a invenção fornece uma sequência de ácidos nucleicos isolada que codifica o anticorpo ou o membro de ligação revelado aqui.

[0018] Em um aspecto, um vetor compreendendo a dita sequência de ácidos nucleicos é fornecido.

[0019] Em um aspecto, a invenção fornece uma célula hospedeira compreendendo a sequência de ácidos nucleicos acima ou o vetor acima.

[0020] Em um aspecto, uma composição compreendendo o anticorpo acima, o membro de ligação acima, a sequência de ácidos nucleicos acima, o vetor acima ou a célula hospedeira acima; e ainda um veículo, diluente ou excipiente adequados. A composição é preferivelmente uma composição farmacêutica, compreendendo um veículo, diluente ou excipiente farmaceuticamente aceitáveis. Tal composição farmacêutica é preferivelmente em uma forma adequada para administração tópica, intradérmica, transdérmica, intravenosa, subcutânea, intramuscular, parenteral, sublingual, bucal, oral, nasal, intranasal, retal, local ou ocular.

[0021] Ainda fornecido é um método de tratar uma doença mediada

por IL-1 beta compreendendo administrar a um sujeito em necessidade do mesmo a composição farmacêutica acima.

[0022] Também fornecido é o anticorpo acima, o membro de ligação acima, a sequência de ácidos nucleicos acima, o vetor acima ou a célula hospedeira revelada aqui:

- i. para uso no tratamento de uma doença mediada por IL-1 beta;
- ii. para uso em diagnósticos;
- iii. para uso em cosméticos; e/ou
- iv. para propósitos de detecção.

[0023] Em ainda outro aspecto, a invenção fornece um método de produzir o anticorpo ou o membro de ligação descritos aqui, ou compreendendo (i) as etapas de cultivar a célula hospedeira acima e recuperar e purificar o fragmento de anticorpo ou o membro de ligação, respectivamente; ou (ii) o uso de um sistema livre de célula. Adicional ou alternativamente, o método pode compreender pelo menos uma etapa da síntese química de proteína.

Breve Descrição dos Desenhos

[0024] Figura 1 mostra os resultados de um ELISA para determinar a ligação de DLX2323 à IL-1 beta recombinante humana (rh) em várias concentrações. Diagramadas são as diferenças de absorbância em um comprimento de onda de 450 nm versus concentração de scFv dada em ng/ml. quadrados: DLX2323; círculos: controle.

[0025] Figura 2 é um gráfico que descreve os resultados da ligação de DLX2323 à IL-1 beta natural humana em comparação à ligação à rhIL-1 beta. IL-1 beta natural humana foi derivada de sobrenadante de células THP-1 ativadas. Diagramadas são as diferenças de absorbância a um comprimento de onda de 450 nm versus concentração de IL-1 beta dada em ng/ml. quadrados: rIL-1 beta; círculos: IL-1 beta natural.

[0026] Figura 3 mostra as comparações de DLX2323 com vários

inibidores de IL-1 beta comercialmente disponíveis para neutralização de rhIL-1 beta em um ensaio de fibroblasto humano a partir de dois experimentos independentes. Figura 3A mostra os resultados para DLX2323 e MAB201. Eixo Y para indicar liberação de IL-6 dos fibroblastos humanos em pg/ml; eixo x para indicar concentração de anticorpos em pM. Quadrados: DLX2323; círculos: MAB201 de controle. Figura 3B resume os dados para DLX2323, antagonista do receptor de rhIL-1 (ra) e canacinumab (Ilaris®). eixo Y para indicar liberação de IL-6 dos fibroblastos humanos em pg/ml; eixo x para indicar a concentração de anticorpos ou rhIL-1ra em pM. Quadrados: DLX2323; círculos: canacinumab; triângulos: rhIL-1ra.

[0027] Figura 4 mostra a eficácia *in vivo* de DLX2323 em um modelo de inflamação de camundongo induzida por IL-1 beta humana. IL-6 (pg/ml) foi quantificada em soro após o tratamento com IL-1 beta humana e ou a) DLX2323 a 5 mg/ml; b) DLX2323 a 15 mg/ml; c) canacinumab; d) scFv de controle; ou d) PBS.

[0028] Figura 5 ilustra a definição de CDR-H1 como aqui usado. Setas indicam os resíduos de CDR-H1 de acordo com a definição de Kabat (acima) ou como aqui usado (abaixo).

[0029] Figura 6 ilustra os resultados de um ensaio de ELISA em que lisados de células clareadas de variantes de DLX2323 expressos em células de *E. coli* ligados à rhIL-1 beta revestida. Diagramadas são as diferenças de absorção a um comprimento de onda de 450 nm como observado para as amostras de proteína de scFv indicadas. Analisadas foram as diluições de amostra por um fator 1:2 (colunas cinzas) ou 1:10 (colunas pretas) em tampão de ensaio.

Descrição Detalhada

[0030] A fim de que a invenção possa ser entendida mais facilmente, certos termos são primeiro definidos. A menos que do contrário definido dentro do relatório descritivo, todos termos técnicos e

científicos aqui usados têm seu significado reconhecido na técnica. Embora métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos aqui possam ser usados na prática ou testagem da invenção, métodos e materiais adequados são descritos abaixo. Todas as publicações, pedidos de patente, patentes, e outras referências mencionadas aqui são incorporadas por referência em sua totalidade. No caso de conflito, o presente relatório descritivo, incluindo as definições, prevalecerá. Os materiais, métodos, e exemplos são ilustrativos apenas e não intencionados ser limitativos.

[0031] Dentro do escopo da presente invenção, o termo "anticorpo" refere-se às imunoglobulinas completas como também aos fragmentos das mesmas. Tais imunoglobulinas completas podem ser anticorpos monoclonais, policlonais, quiméricos, humanizados, folheados ou humanos.

[0032] "Fragmentos de anticorpo" compreendem as porções de uma imunoglobulina completa que retém a especificidade de visamento da dita imunoglobulina. Muitos mas nem todos os fragmentos de anticorpo carecem pelo menos parcialmente da região constante (região Fc) da imunoglobulina completa. Em algumas modalidades, os fragmentos de anticorpo são produzidos por digestão da imunoglobulina completa. Um fragmento de anticorpo pode também ser uma construção sintética ou recombinante compreendendo partes da imunoglobulina ou cadeias da imunoglobulina (vide por exemplo HOLLIGER, P. e Hudson, J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnology* 2005, vol. 23, no. 9, págs. 1126-1136). Exemplos de fragmentos de anticorpo, sem ser limitado, incluem fragmentos scFv, Fab, Fv, Fab', F(ab')₂, dAb, VHH, nanocorpo, V(NAR) ou unidades de reconhecimento mínimo.

[0033] "Fragmentos variáveis de cadeia simples" ou "anticorpos de cadeia simples" ou "scFv" é um tipo de fragmentos de anticorpo. scFv

são proteínas de fusão compreendendo a VH e VL das imunoglobulinas conectadas por um ligante. Desse modo, elas carecem da região Fc constante presente nas imunoglobulinas completas, mas retêm a especificidade da imunoglobulina original.

[0034] Um "membro de ligação" como aqui usado refere-se às imunoglobulinas completas, fragmentos de anticorpo, andaimes de não anticorpo, e/ou outros compostos de ligação. Tal membro de ligação pode ser monovalente ou multivalente, isto é, ter um ou mais sítios de ligação de antígeno. Exemplos não limitativos de membros de ligação monovalentes incluem scFv, fragmentos Fab, dAb, VHH, DARPin, afilinas e nanocorpo. Um membro de ligação multivalente pode ter dois, três, quatro ou mais sítios de ligação de antígeno por meio dos quais um ou mais antígenos diferentes podem ser reconhecidos. Imunoglobulinas completas, fragmentos F(ab')₂, bis-scFv e diacorpo são exemplos não limitativos de membros de ligação multivalentes; nos ditos membros de ligação multivalentes exemplares, dois sítios de ligação estão presentes, isto é, o membro de ligação é bivalente.

[0035] Em uma modalidade, o membro de ligação multivalente é biespecífico, isto é, o membro de ligação é direcionado contra dois alvos diferentes ou dois sítios alvos diferentes em uma molécula alvo. Anticorpos biespecíficos são, por exemplo, revisados em MÜLLER, D. e Kontermann, R.E. Bispecific antibodies. Editado por DÜBEL, S. Weinheim: Wiley-VCH, 2007. ISBN 3527314539. págs. 345-378. Em outra modalidade, o membro de ligação multivalente compreende mais que dois, por exemplo, três ou quatro sítios de ligação diferentes para três ou quatro, respectivamente, antígenos diferentes. Tal membro de ligação é multivalente e multiespecífico, em particular tri ou tetra-específico, respectivamente.

[0036] "Andaimes de não anticorpo" são polipeptídeos de ligação de antígeno que são, por exemplo, descritos em FIELDER, M. e Skerra,

A. Non-antibody scaffolds. Editado por DÜBEL, S. Weinheim: Wiley-VCH, 2007. ISBN 3527314539. págs. 467-500; ou GILBRETH, R.N. e Koide, S. Structural insights for engineering binding proteins based on nonantibody scaffolds. *Current Opinion in Structural Biology* 2012, vol. 22, págs. 413–420. Exemplos não limitativos incluem aficorpos, moléculas de afillina, AdNectina, Anticalina, DARPinas, Knottin, domínio tipo Kunitz, Avimer, Tetranectina e trans-corpo.

[0037] "Compostos ligantes" são moléculas químicas ou biológicas que ligam-se a um alvo e que não pertence à classe das imunoglobulinas completas, fragmentos de anticorpo e andaimes de não anticorpo como definidos acima. Exemplos de compostos ligantes, sem ser limitado, incluem macrolidas (GUNDLURU, M. K. et al. Design, synthesis and initial biological evaluation of a novel pladienolide analog scaffold. *Medchemcomm*. 2011, vol. 2, págs. 904-908; PATERSON, I. et al. Total synthesis and biological evaluation of a series of macrocyclic hybrids and analogies of the antimitotic natural products dictyostatin, discodermolide and taxol. *Chem Asian J*. 2011, vol. 6, págs. 459–473; MORITA, H. et al. Synthesis of unnatural alkaloid scaffolds by exploiting plant polyketide synthase. *PNAS* 2011, vol. 108, págs. 13504-13509), polímeros impressos moleculares (HOSHINO, Y. et al. Recognition, neutralization and clearance of target peptides in the blood stream of living mice by molecular imprinted polymer nanoparticles: a plastic antibody. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, vol. 19, págs. 664-6645), aptâmeros (STREHLITZ, B., et al. Aptamers for pharmaceuticals and their application in environmental analytics. *Bioanalytical reviews* 2012, vol. 4, págs. 1-30; YE, M. et al. Generating Aptamers by Cell-SELEX for Applications in Molecular Medicine. *International Journal of Molecular Sciences* 2012, vol. 13, págs. 3341-3353), Spiegelmers (vide por exemplo, MAASCH, C. et al. Polyethylenimine-Polyplexes of Spiegelmer NOX-A50 directed against

intracellular high mobility group protein A1 (HMGA1) reduce tumor growth in vivo. *JBC* 2010, vol. 285, págs. 40012–40018), ou peptídeos (cíclicos ou lineares; vide, por exemplo, GOULD, A. et al. Cyclotides, a novel ultrastable polypeptide scaffold for drug discovery. *Curr Pharm Des.* 2011, vol. 17, págs. 4294–4307).

[0038] A " IC_{50} " ou "metade da concentração máxima inibitória" é uma medida de potência de fármaco antagonista e descreve quantitativamente a efetividade de um composto para inibir uma função biológica ou bioquímica. Esta medida indica quanto do composto é necessário para inibir em 50% um certo processo biológico ou bioquímico. Embora nenhum indicador direto de afinidade, ambos os valores são correlatados e podem ser determinados por meio da equação de Cheng-Prusoff (CHENG Y. e Prusoff W. H. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology* 1973, vol. 22, págs. 3099-3108; RAMMES, G., et al. Identification of a domain which affects kinetics and antagonistic potency of clozapine at 5-HT₃ receptors. *PLOS one* 2009, vol. 4, págs. 1-14; ZHEN, J., et al. Concentration of receptor and ligand revisited in a modified receptor binding protocol for high-affinity radioligands: [³H] spiperone binding to D₂ and D₃ dopamine receptors. *Journal of Neuroscience Methods* 2010, vol. 188, págs. 32-38).

[0039] O termo "ligação IL-1 beta específica" como aqui usado descreve que um membro de ligação liga-se à IL-1 beta com afinidade mais alta que a um antígeno estruturalmente diferente que não compreende o epítipo IL-1 beta ao qual o membro de ligação anti-IL-1 beta se liga. Ligação específica é refletida por uma constante de equilíbrio de dissociação (K_D) inferior a 1 micromolar. Esta constante pode ser determinada, por exemplo, usando Microbalança de Cristal de Quartz (QCM) em um instrumento de Attana, ou tecnologia de

Ressonância de Plasmon de Superfície (SPR) em um instrumento de BIACORE.

[0040] Como aqui usado, "IL-1 beta" refere-se à molécula como descrita, por exemplo, em Dinarello C. A., Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nature reviews* 2012, vol. 11, págs. 633-652. "hIL-1 beta" como aqui usado refere-se à IL-1 beta humana. "rIL-1 beta" refere-se à IL-1 beta recombinante. IL-1 beta recombinante pode ou não ter um resíduo de metionina amino-terminal, dependendo do método pelo qual é preparada. "rhIL-1" beta refere-se à IL-1 beta recombinante humana. rhIL-1 beta pode ser obtida, por exemplo, de Peprtech, EUA, n°. de cat. 200-01B. IL-1 beta pode também ser obtida mediante isolamento das amostras biológicas de origem humana ou não humana.

[0041] Anticorpos "humanizados" referem-se aos anticorpos compreendendo uma ou mais, tipicamente todas as seis regiões de CDR de um anticorpo de origem não humana ou suas variantes, e que a estrutura é, por exemplo, (i) uma estrutura humana, compreendendo potencialmente um ou mais resíduos de estrutura do anticorpo de origem não humana, ou (ii) uma estrutura de um anticorpo não humano modificado para aumentar a similaridade das estruturas humanas naturalmente produzidas. Métodos de humanizar anticorpos são conhecidos na técnica, vide por exemplo LEGER, O. e Saldanha, J. Antibody Drug Discovery. Editado por WOOD, C. Londres: Imperial College Press, 2011. ISBN 1848166281. págs.1-23.

[0042] "Estrutura" (FR) refere-se ao andaime do domínio de imunoglobulina variável, ou a cadeia leve variável (VL) ou cadeia pesada variável (VH), embutindo as respectivas CDRs. Uma estrutura VL e/ou VH tipicamente compreende quatro seções de estrutura, FR1, FR2, FR3 e FR4, flanqueando as regiões de CDR. Desse modo, como conhecido na técnica, uma VL tem a estrutura geral: (FR-L1) - (CDR-L1)

- (FR-L2) - (CDR-L2) - (FR-L3) - (CDR-L3) - (FR-L4), enquanto que uma VH tem a estrutura geral: (FR-H1) - (CDR-H1) - (FR-H2) - (CDR-H2) - (FR-H3) - (CDR-H3) - (FR-H4).

[0043] "CDR" refere-se às regiões hipervariáveis do anticorpo que principalmente contribuem para ligar o antígeno. Tipicamente, um sítio de ligação de antígeno compreende seis CDRs, embutido em um andaime de estrutura. Aqui, as CDRs da VL são referidas como CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 enquanto que as CDRs da VH são referidas como CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3. Estas podem ser identificadas como descrito em KABAT, E. A., et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 5ª edição. Editado por U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. NIH Publications, 1991. págs. 91-3242. Porém, CDR-H1 como aqui usada difere da definição de Kabat em que inicia-se com a posição 27 e termina antes da posição 36 (vide figura 5 para ilustração).

[0044] Como aqui usado, o sistema de numeração para identificar as posições do resíduo de aminoácido na VH e VL do anticorpo corresponde ao sistema "Aho" descrito por HONEGGER, A. e Plückthun, A. Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: An automatic modelling and analysis tool. *Journal of Molecular Biology* 2001, vol. 309, págs. 657-670. A outra publicação fornece tabelas de conversão entre o sistema de Aho e de Kabat (KABAT, E. A., et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 5ª edição. Editado por U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. NIH Publications, 1991. págs. 91-3242).

[0045] Um anticorpo ou ácido nucleico "isolado" é um sendo identificado e separado e/ou recuperado de pelo menos um componente de seu ambiente natural.

[0046] O termo "identidade" como aqui usado refere-se ao emparelhamento de sequências entre duas proteínas ou ácidos

nucleicos. As sequências de proteínas ou de ácidos nucleicos a ser comparadas são alinhadas para dar identidade máxima, por exemplo, usando ferramentas de bioinformática tais como EMBOSS Needle (alinhamento em pares; disponível em www.ebi.ac.uk). Quando a mesma posição nas sequências a ser comparadas estiver ocupada pela mesma núcleo-base ou resíduo de aminoácido, então as respectivas moléculas são idênticas naquela exata posição. Consequentemente, a "porcentagem de identidade" é uma função do número de posições emparelhadas dividido pelo número de posições comparadas e multiplicado por 100%. Por exemplo, se 6 entre 10 posições de sequência são idênticas, então a identidade é 60%. A porcentagem de identidade entre as duas sequências de proteínas pode ser determinada usando, por exemplo, o algoritmo de Needleman e Wunsch (NEEDLEMAN, S.B. e Wunsch, C.D. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *Journal of Molecular Biology* 1970, vol. 48, págs. 443-453) que foi incorporado em EMBOSS Needle, usando uma matriz BLOSUM62, uma "penalidade aberta de intervalo" de 10, uma "penalidade estendida de intervalo" de 0,5, uma falsa "penalidade de intervalo final", uma "penalidade aberta de intervalo final" de 10 e uma "penalidade estendida de intervalo final" de 0,5. Duas moléculas que têm a mesma sequência de aminoácidos ou de ácidos nucleicos primária são idênticas independente de qualquer modificação química e/ou biológica. Por exemplo, dois anticorpos que têm a mesma sequência de aminoácidos primária mas padrões de glicosilação diferentes são idênticos por esta definição. No caso de ácidos nucleicos, por exemplo, duas moléculas que têm a mesma sequência mas componentes de ligação diferentes tais como tiofosfato em vez de fosfato são idênticas por esta definição.

[0047] Sequências de proteínas "similares" são aquelas que, quando alinhadas, compartilham resíduos de aminoácido similares e

mais frequentemente, mas não obrigatoriamente, resíduos de aminoácido idênticos nas mesmas posições das sequências a ser comparadas. Resíduos de aminoácido similares são agrupados por características químicas das cadeias laterais nas famílias. As ditas famílias são descritas abaixo para "substituições de aminoácido conservadoras". A "porcentagem de similaridade" entre as sequências é o número de posições contendo resíduos idênticos ou similares nas mesmas posições de sequência das sequências a ser comparadas dividido pelo número total de posições comparadas e multiplicado por 100%. Por exemplo, se 6 entre 10 posições de sequência têm resíduos de aminoácido idênticos e 2 entre 10 posições contêm resíduos similares, então as sequências têm 80% de similaridade. A similaridade entre duas sequências pode ser determinada usando, por exemplo, EMBOSS Needle.

[0048] Uma "variante" refere-se a uma sequência de aminoácidos ou de ácidos nucleicos que diferem da sequência parental em virtude da adição (incluindo inserções), deleção e/ou substituição de um ou mais resíduos de aminoácido ou núcleo-bases ao mesmo tempo restando pelo menos uma atividade desejada da sequência de origem revelada aqui. No caso de anticorpos, tal atividade desejada pode incluir ligação antígeno-específica. Similarmente, uma sequência de ácidos nucleicos variante pode ser modificada quando comparada à sequência de origem em virtude da adição, deleção e/ou substituição de uma ou mais núcleo-bases, mas o anticorpo codificado retém a atividade desejada como descrito acima. Variantes podem ser de ocorrência natural, tais como variantes alélicas ou de *splice*, ou podem ser artificialmente construídas.

[0049] Como aqui usado, o termo "modificações conservadoras" refere-se às modificações que são física, biológica, química ou funcionalmente similares à referência correspondente, por exemplo, tem

um tamanho, forma, carga elétrica, propriedades químicas, todos similares, incluindo a habilidade para formar ligações covalentes ou de hidrogênio, ou outros. Tais modificações conservadoras incluem, mas não se limitam a, uma ou mais substituições, adições e deleções de nucleobases e de aminoácido.

[0050] Por exemplo, substituições de aminoácido conservadoras incluem aquelas em que o resíduo de aminoácido é substituído com um resíduo de aminoácido que tem uma cadeia lateral similar. Por exemplo, os resíduos de aminoácido que são não essenciais com respeito à ligação a um antígeno podem ser substituídos com outro resíduo de aminoácido da mesma família de cadeia lateral, por exemplo serina pode ser substituída por treonina. Os resíduos de aminoácido são usualmente divididos em famílias com base nas propriedades de cadeia lateral comuns, similares tais como:

1. cadeias laterais não polares (por exemplo, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina),
2. cadeias laterais polares descarregadas (por exemplo, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, prolina, cisteína, triptofano),
3. cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina, prolina),
4. cadeias laterais acídicas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico),
5. cadeias laterais beta-ramificadas (por exemplo , treonina, valina, isoleucina) e
6. cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina).

[0051] Uma substituição conservadora pode também envolver o uso de um aminoácido não natural.

[0052] Substituições não conservadoras, isto é, trocar membros de

uma família por membros de outra família, podem levar a alterações substanciais, por exemplo, com respeito à carga, momento de dipólo, tamanho, hidrofiliicidade, hidrofobicidade ou conformação do membro de ligação, o que pode leva a uma queda significativa na atividade de ligação, em particular se os aminoácidos são afetados que é essencial para ligar à molécula alvo. Uma substituição não conservadora pode também envolver o uso de um aminoácido não natural.

[0053] Modificações conservadoras e não conservadoras podem ser introduzidas nos membros de ligação parentais por uma variedade de técnicas padrões conhecidas na técnica, tais como química combinatória, mutagênese de DNA loco-dirigida, mutagênese mediada por PCR e/ou de cassete, síntese química de peptídeo/proteína, reação química que especificamente modifica os grupos reativos no membro de ligação parental. As variantes podem ser testadas através de métodos rotineiros para suas propriedades químicas, biológicas, biofísicas e/ou bioquímicas.

[0054] As reações de hibridação de ácido nucleico podem ser executadas sob condições de severidade diferentes. "Condições rigorosas" são extensamente conhecidas e publicadas na técnica. Tipicamente, durante a reação de hibridação pode ser usado um tampão com base em SSC em que SSC é 0,15 M de NaCl e 15 mM de tampão de citrato tendo um pH de 7,0. Concentrações de tampão crescentes e a presença de um agente desnaturante aumentam a severidade da etapa de hibridação. Por exemplo, condições de hibridação de severidade alta podem envolver o uso de (i) 50% (vol/vol) de formamida, 5 x SSC (0,75 M de NaCl, 0,075 M de citrato de sódio), 50 mM de fosfato de sódio (pH 6,8), 0,1% de pirofosfato de sódio, solução de 5 x Denhardt, DNA de esperma de salmão sonicado (50 µg/ml), 0,1% de SDS, e 10% de sulfato de dextrana a 42°C com lavagens a 42°C em 0,2 x SSC e 0,1% de SDS; (ii) 50% (vol/vol) de formamida com 0,1% de

albumina de soro bovino/0,1% de Ficoll/0,1% de polivinilpirrolidona/50 mM de tampão de fosfato de sódio a pH 6,5 com 750 mM de cloreto de sódio, 75 mM de citrato de sódio a 42°C, ou (iii) 10% de sulfato de dextrana, 2 x SSC, e 50% de formamida a 55°C, seguido por uma lavagem de severidade alta que consiste em 0,1 x SSC contendo EDTA a 55°C. Adicional ou alternativamente, uma, duas ou mais etapas de lavagem usando soluções de lavagem de baixa resistência iônica e temperatura alta podem ser incluídas no protocolo de hibridação usando, por exemplo, 0,015 M de cloreto de sódio/0,0015 M citrato de sódio/0,1% de dodecil sulfato de sódio a 50°C.

[0055] Vários aspectos da invenção são descritos em mais detalhes nas subseções a seguir. É entendido que as várias modalidades, preferências e faixas podem ser combinadas à vontade. Ainda, dependendo da modalidade específica, as definições, modalidades ou faixas selecionadas podem não se aplicar.

[0056] Em um primeiro aspecto, a invenção fornece um fragmento de anticorpo monovalente ligando IL-1 beta que inibe o efeito biológico de IL-1 beta humana com um IC₅₀ inferior a 50 pM. A dita IC₅₀ é preferivelmente inferior a cerca de 40 pM, mais preferivelmente inferior a cerca de 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2 ou 1 pM.

[0057] Preferivelmente, o dito fragmento de anticorpo monovalente tem um peso molecular de cerca de 50 kDa ou menor, tal como cerca de 45 kDa, 40 kDa, 35 kDa ou menor, preferivelmente cerca de 25 kDa, tal como 23, 24, 25, 26, ou 27 kDa.

[0058] Em um aspecto, a invenção fornece um anticorpo, compreendendo:

(a) pelo menos uma das sequências de CDR de VH CDR-H1, CDR-H2 ou CDR-H3 como expostas em SEQ ID N^{os}.: 1, 2 e 3, respectivamente, ou variantes das mesmas; e/ou

(b) pelo menos uma das sequências de CDR de VL CDR-L1,

CDR-L2 ou CDR-L3 como expostas em SEQ ID N^{os}.: 4, 5, e 6, respectivamente, ou variantes das mesmas.

[0059] Tal anticorpo pode compreender:

(a) pelo menos uma das sequências de CDR de VH CDR-H1, CDR-H2 ou CDR-H3 como expostas em SEQ ID N^{os}.: 155, 156 e 157, respectivamente, ou variantes das mesmas; e/ou

(b) pelo menos uma das sequências de CDR de VL CDR-L1, CDR-L2 ou CDR-L3

(i) como expostas em SEQ ID N^{os}.: 158, 159 e 160, respectivamente, ou variantes das mesmas, ou

(ii) como expostas em SEQ ID N^{os}.: 161, 162 e 163, respectivamente, ou variantes das mesmas.

[0060] Preferivelmente, o anticorpo compreende pelo menos a CDR-H3 de SEQ ID NO: 3 e a CDR-L3 de SEQ ID NO: 6 ou SEQ ID NO: 157, ou uma variante das mesmas, respectivamente. Até mesmo mais preferivelmente, o dito anticorpo compreende todas as seis CDRs de:

(i) SEQ ID N^{os}.: 1 a 6 ou variantes das mesmas;

(ii) SEQ ID N^{os}.: 155 a 160 ou variantes das mesmas; ou

(iii) SEQ ID N^{os}.: 155 a 157 e SEQ ID N^{os}.: 161 a 163 ou variantes das mesmas.

[0061] Tal anticorpo tem uma potência inibitória muito alta contra IL-1 beta humana com uma IC₅₀ inferior a 50 pM, mais preferivelmente inferior a cerca de 40 pM, 30, 20, 10, e até mesmo mais preferivelmente inferior a 5 pM e o mais preferivelmente cerca de 1 pM e menor.

[0062] Preferivelmente, o anticorpo tem uma potência inibitória contra IL-1 beta humana com uma IC₅₀ de pelo menos 2 pM, mais preferivelmente de pelo menos 1 pM.

[0063] A IC₅₀ pode ser determinada, por exemplo, usando um ensaio de potência com base em célula. Em uma modalidade, o valor

de IC₅₀ acima é determinado inibindo a liberação induzida de IL-1 beta de IL-6 de fibroblastos humanos. Tal ensaio baseia-se na observação que os fibroblastos estimulados com IL-1 beta liberam IL-6. Na presença de anticorpos inibidores de IL-1 beta, a concentração de IL-6 liberada é reduzida. Em uma modalidade preferida, células de Fibroblastos Dérmicos Humanos Normais (NHDF-Neo, por exemplo, obteníveis de Lonza Walkersville EUA, no. cat. CC-2509) são usadas. Sob incubação com uma mistura de hIL-1 beta e o anticorpo de interesse, os sobrenadantes são colhidos e examinados por um ELISA de IL-6 tal como o kit de ELISA R&D Systems Human IL-6 DuoSet (R&D Systems, no. cat. DY206). Em uma modalidade, o ensaio é o ensaio de neutralização de IL-1 beta como descrito no exemplo 3. Preferivelmente, o valor de IC₅₀ é o valor médio obtido de pelo menos três repetições independentes de tal ensaio.

[0064] O anticorpo descrito aqui pode ser uma imunoglobulina completa ou um fragmento de anticorpo, tal como um fragmento Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, Fv, nanocorpo, VHH ou unidade de reconhecimento mínimo.

[0065] Em uma modalidade preferida, o anticorpo e em particular o fragmento de anticorpo monovalente acima é um scFv. Os domínios VH e VL podem ser conectados em qualquer orientação, VL-ligante-VH ou VH-ligante-VL, por um ligante flexível. Em uma modalidade preferida, a orientação é VL-ligante-VH, isto é, a região variável de cadeia leve que está na extremidade N-terminal e a região variável de cadeia pesada que está na extremidade C-terminal do polipeptídeo.

[0066] O anticorpo é preferivelmente humanizado. Tal anticorpo humanizado pode compreender, por exemplo, na cadeia leve variável a FR-L1 de SEQ ID NO: 18, a FR-L2 de SEQ ID NO: 19, a FR-L3 de SEQ ID NO: 20 e/ou a FR-L4 de SEQ ID NO: 21 ou variantes das mesmas. Adicional ou alternativamente, o anticorpo humanizado pode

compreender a região de estrutura variável de cadeia pesada FR-H1 de SEQ ID NO: 22, 26 ou 30; a região de estrutura variável de cadeia pesada FR-H2 de SEQ ID NO: 23, 27 ou 31; a região de estrutura variável de cadeia pesada FR-H3 de SEQ ID NO: 24, 28 ou 32; e/ou a região de estrutura variável de cadeia pesada FR-H4 de SEQ ID NO: 25, 29 ou 33.

[0067] Desse modo, em uma modalidade preferida, o anticorpo compreende a sequência de VH de SEQ ID NO: 7 ou SEQ ID NO: 146, ou uma variante das mesmas, respectivamente. Tal variante tem pelo menos 85%, mais preferivelmente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% e o mais preferivelmente 100% de identidade de sequência à SEQ ID NO: 7 ou SEQ ID NO: 146. Exemplos de tais sequências de VH variantes incluem, sem ser limitadas, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 150 ou SEQ ID NO: 152.

[0068] Adicional ou alternativamente, o anticorpo revelado aqui compreende a sequência de VL selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 136 e SEQ ID NO: 145, ou uma variante das mesmas, respectivamente. Tal variante tem pelo menos 85%, mais preferivelmente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% e o mais preferivelmente 100% de identidade de sequência à SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 136 ou SEQ ID NO: 145. Exemplos de tais sequências de VL variantes incluem, sem ser limitadas a, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 139 ou SEQ ID NO: 153.

[0069] Em uma modalidade, o anticorpo compreende uma sequência de VH tendo pelo menos 85%, mais preferivelmente 90%,

91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% e o mais preferivelmente 100% de similaridade de sequência à SEQ ID NO: 7 ou SEQ ID NO: 146. Adicional ou alternativamente, o anticorpo compreende uma sequência de VL tendo pelo menos 85%, mais preferivelmente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% e o mais preferivelmente 100% de similaridade de sequência à SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 136 ou SEQ ID NO: 145.

[0070] O anticorpo compreende a VH como exposta em uma modalidade muito preferida, para SEQ ID NO: 7 e a VL como exposta em SEQ ID NO: 8. As sequências de estrutura de ambas as SEQ ID NO: 7 e SEQ ID NO: 8 são derivadas de uma imunoglobulina humana descrita em WO 03/097697 A (ESBATEch AG). Suas sequências de estrutura VH e VL foram modificadas para humanização e estabilização dos anticorpos de coelho, vide, por exemplo, WO 2009/155726 A (ESBATEch, AN ALCON BIOMEDICAL RESERCH UNIT LLC); BORRAS, L., et al. Generic approach for the generation of stable humanized single-chain Fv fragments from rabbit monoclonal antibodies. *Journal of Biological Chemistry* 2010, vol. 285, nº. 12, págs. 9054-9066. Em uma modalidade, a estrutura de VL do anticorpo relvado aqui compreende SEQ ID N^{os}.: 18-21 ou variantes das mesmas. Adicional ou alternativamente, a estrutura de VH do anticorpo compreende SEQ ID N^{os}.: 22-25, SEQ ID N^{os}.: 26-29 ou SEQ ID N^{os}.: 30-33 ou variantes das mesmas, respectivamente.

[0071] Em outra modalidade preferida, o anticorpo compreende a VH como exposta para SEQ ID NO: 146 e a VL como exposta em SEQ ID NO: 8 ou em SEQ ID NO: 145.

[0072] Em outra modalidade preferida, o anticorpo compreende a VH como exposta para SEQ ID NO: 146 e a VL como exposta em SEQ ID NO: 136.

[0073] O anticorpo, em particular no caso de um scFv, pode compreender uma sequência ligante. Tal sequência ligante tem

tipicamente dez a cerca de 25 aminoácidos. Usualmente, tal peptídeo de ligante é rico em glicinas que conferem flexibilidade como também serinas e/ou treonina para solubilidade melhorada. Em uma modalidade preferida, um ligante de (GGGGS)₄ (SEQ ID NO: 9) ou uma variante da mesma é usado. Variações do dito motivo tendo três a cinco repetições podem também ser usadas. Outros ligantes adequados são descritos, por exemplo, em ALFTHAN, K. Properties of a single-chain antibody containing different linker peptides. *Protein Engineering* 1995, vol. 8, no. 7, págs. 725-731.

[0074] Em certas modalidades, as variantes dos anticorpos fornecidos aqui são contempladas. Por exemplo, pode ser desejável melhorar a ligação do antígeno, citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC), citotoxicidade dependente de complemento (CDC), aumentar a estabilidade ou solubilidade, diminuir a imunogenicidade e/ou alterar outras propriedades biológicas, bioquímicas ou biofísicas do anticorpo. Em algumas modalidades, a variante não mostra melhoria no anticorpo parental.

[0075] Variantes dos anticorpos fornecidos aqui podem ser preparadas por engenharia de proteína e/ou química, introduzindo modificações apropriadas na sequência de ácidos nucleicos codificando o anticorpo, ou através de síntese de proteína/peptídeo. Quaisquer combinações de deleções, substituições, adições e inserções podem ser feitas à estrutura ou às CDRs, contanto que o anticorpo gerado possua as características desejadas que podem ser triadas usando métodos apropriados. De interesse particular são substituições, preferivelmente substituições conservadoras como descritas acima. Substituições conservadoras preferidas incluem:

1. Substituir alanina (A) por valina (V);
2. Substituir arginina (R) por lisina (K);
3. Substituir asparagina (N) por glutamina (Q);

4. Substituir ácido aspártico (D) por ácido glutâmico (E);
 5. Substituir cisteína (C) por serina (S);
 6. Substituir ácido glutâmico (E) por ácido aspártico (D);
 7. Substituir glicina (G) por alanina (a);
 8. Substituir histidina (H) por arginina (R) ou lisina (K);
 9. Substituir isoleucina (I) por leucina (L);
 10. Substituir metionina (M) por leucina (L);
 11. Substituir fenilalanina (F) por tirosina (Y);
 12. Substituir prolina (P) por alanina (a);
 13. Substituir serina (S) por treonina (T);
 14. Substituir triptofano (W) por tirosina (Y);
 15. Substituir fenilalanina (F) por triptofano (W); e/ou
 16. Substituir valina (V) por leucina (L)
- e vice-versa.

[0076] O anticorpo descrito aqui pode compreender uma ou mais, tal como duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze ou mais de tais substituições conservadoras.

[0077] Substituições não conservadoras podem levar a alterações mais substanciais, por exemplo, com respeito à carga, momento de dipólo, tamanho, hidrofiliicidade, hidrofobicidade ou conformação do polipeptídeo. Em uma modalidade, o anticorpo compreende uma ou mais, tais como duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze ou mais de tais substituições não conservadoras.

[0078] Modificações podem estar presentes nas CDRs ou nas sequências de estrutura. Por exemplo, as CDRs fornecidas aqui podem compreender uma, duas, três, quatro, cinco ou até mesmo mais modificações. Por exemplo, as sequências CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 consideradas como um todo são pelo menos 75%, preferivelmente pelo menos 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou mais preferivelmente 99% idênticas às CDRs

fornecidas aqui, em particular às (i) SEQ ID N^{os}.: 4, 5 e 6, ou às (ii) SEQ ID N^{os}.: 161, 162 e 163. Adicional ou alternativamente, as sequências CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 consideradas como um todo são pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 81%, 82%, 83%, 84%, 95%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou mais preferivelmente 99% idênticas às CDRs fornecidas aqui, em particular às (i) SEQ ID N^{os}.: 1, 2 e 3, ou às (ii) SEQ ID N^{os}.: 155, 156 e 157.

[0079] Em uma modalidade, as CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 consideradas como um todo são pelo menos 85%, preferivelmente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou mais preferivelmente 99% similar às CDRs fornecidas aqui. Adicional ou alternativamente, as CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3 consideradas como um todo são pelo menos 85%, preferivelmente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou mais preferivelmente 99% similares às CDRs fornecidas aqui.

[0080] Portanto, uma variante pode compreender, por exemplo, uma, duas, três, quatro ou cinco substituições em SEQ ID NO: 4. Muito preferido são substituições nas posições marcadas com X em SEQ ID NO: 14. Por exemplo, a variante pode compreender:

i. alanina (a), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W), tirosina (Y) na posição AHo 32 da cadeia leve variável;

ii. alanina (a), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W), tirosina (Y) na posição AHo 33 da cadeia leve variável; e/ou

iii. ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), metionina

(M), asparagina (N), glutamina (Q), serina (S), triptofano (W), tirosina (Y) na posição AHo 40 da cadeia leve variável.

[0081] Adicional ou alternativamente, uma variante compreende uma, duas, três, ou quatro substituições em SEQ ID NO: 5. Muito preferido são substituições nas posições marcadas com X em SEQ ID NO: 15. Por exemplo, tal variante pode compreender:

i. alanina (a), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), triptofano (W), tirosina (Y) na posição AHo 58 da cadeia leve variável; e/ou

ii. alanina (a), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W), tirosina (Y) na posição AHo 69 da cadeia leve variável.

[0082] Adicional ou alternativamente, uma variante compreende uma, duas, três, quatro, cinco ou seis substituições em SEQ ID NO: 6. Muito preferido são substituições nas posições marcadas com X em SEQ ID NO: 16. Por exemplo, tal variante pode compreender:

i. alanina (a), cisteína (C), isoleucina (I), asparagina (N), serina (S), treonina (T), valina (V) na posição AHo 109 da cadeia leve variável;

ii. alanina (a), glicina (G), prolina (P), serina (S) na posição AHo 111 da cadeia leve variável;

iii. alanina (A), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W), tirosina (Y) na posição AHo 112 da cadeia leve variável;

iv. alanina (A), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W), tirosina (Y) na posição AHo 135 da cadeia leve variável; e/ou

v. alanina (A), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W), tirosina (Y) na posição AHo 136 da cadeia leve variável.

[0083] Adicional ou alternativamente, uma variante compreende uma, duas, três, ou quatro substituições em SEQ ID NO: 1 ou em SEQ ID NO: 155. Muito preferido são substituições nas posições marcadas com X em SEQ ID NO: 11. Por exemplo, tal variante pode compreender:

i. alanina (A), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W), tirosina (Y) na posição AHo 33 da cadeia pesada variável; e/ou

ii. alanina (A), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W), tirosina (Y) na posição AHo 39 da cadeia pesada variável.

[0084] Adicional ou alternativamente, uma variante compreende uma, duas, três, quatro, cinco ou seis substituições em SEQ ID NO: 2 ou em SEQ ID NO: 156. Muito preferido são substituições nas posições marcadas com X em SEQ ID NO: 12. Por exemplo, a variante pode compreender:

i. alanina (A), cisteína (C), glicina (G), metionina (M) ou

tirosina (Y) na posição AHo 59 da cadeia pesada variável;

ii. ácido aspártico (D), asparagina (N) ou prolina (P) na posição AHo 60 da cadeia pesada variável; e/ou

iii. alanina (A), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), glicina (G), fenilalanina (F), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), serina (S), treonina (T), triptofano (W) ou tirosina (Y) na posição AHo 69 da cadeia pesada variável.

[0085] Adicional ou alternativamente, uma variante compreende uma, duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou onze substituições em SEQ ID NO: 3 ou em SEQ ID NO: 157. Muito preferido são substituições nas posições marcadas com X em SEQ ID NO: 13. Por exemplo, tal variante pode compreender:

i. alanina (A), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W), tirosina (Y) na posição AHo 110 da cadeia pesada variável;

ii. alanina (A), cisteína (C), ácido aspártico (D), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W), tirosina (Y) na posição AHo 111 da cadeia pesada variável;

iii. alanina (A), cisteína (C), fenilalanina (F), histidina (H), isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), glutamina (Q), serina (S), treonina (T), valina (V), tirosina (Y) na posição AHo 112 da cadeia pesada variável;

iv. fenilalanina (F) ou isoleucina (I) na posição AHo 113 da cadeia pesada variável;

v. alanina (A), cisteína (C), ácido glutâmico (E), glicina (G),

serina (S), treonina (T), valina (V) na posição AHo 114 da cadeia pesada variável;

vi. alanina (A), glicina (G), metionina (M) ou asparagina (N) na posição AHo 115 da cadeia pesada variável;

vii. alanina (A), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), histidina (H), asparagina (N), serina (S), treonina (T) na posição AHo 135 da cadeia pesada variável;

viii. alanina (A), cisteína (C), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), glutamina (Q), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W), tirosina (Y) na posição AHo 136 da cadeia pesada variável;

ix. alanina (A), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W), tirosina (Y) na posição AHo 137 da cadeia pesada variável; e/ou

x. alanina (A), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W), tirosina (Y) na posição AHo 138 da cadeia pesada variável.

[0086] Um tipo particularmente preferido de variante é um onde uma ou mais CDRs inteiras são substituídas. Tipicamente, as CDR-H3 e CDR-L3 contribuem significativamente para a ligação do antígeno. Por exemplo, as CDR-L1, CDR-L2, CDR-H1 e/ou CDR-H2 inteiras podem ser substituídas por uma CDR diferente de origem natural ou artificial. Em algumas modalidades, uma ou mais CDRs são substituídas por um cassete de alanina.

[0087] Em uma modalidade descrita, a variante aqui tem pelo menos 85%, mais preferivelmente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

96%, 97%, 98%, 99% e o mais preferivelmente 100% de identidade de sequência a uma sequência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 73 e SEQ ID NO: 82.

[0088] Em uma modalidade, a variante descrita aqui tem pelo menos 85%, mais preferivelmente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% e o mais preferivelmente 100% de similaridade de sequência à SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 73 e SEQ ID NO: 82.

[0089] Adicional ou alternativamente, a VH do anticorpo compreende mutações de ponto de intensificação da solubilidade. WO2009/155725 (ESBATech, uma companhia da Novartis) descreve um motivo que provou aumentar a solubilidade geral do anticorpo. Os resíduos são colocados nas posições localizadas na interface do domínio variável e do domínio constante de um anticorpo e estabilizam os fragmentos de anticorpo, em particular scFv, carecendo do domínio constante. Em particular, um, preferivelmente todos os três dos resíduos a seguir estão presentes:

i. serina (S) na posição de aminoácido da cadeia pesada 12 (de acordo com a numeração de AHo);

ii. serina (S) ou treonina (T) na posição de aminoácido da cadeia pesada 103 (de acordo com a numeração de AHo); e/ou

iii. serina (S) ou treonina (T) na posição de aminoácido da cadeia pesada 144 (de acordo com a numeração de AHo).

[0090] Em uma modalidade preferida, o anticorpo tem uma serina na posição da VH 12; uma serina na posição da VH 103; e uma treonina na posição da VH 144 (toda a numeração de AHo).

[0091] Desse modo, em uma modalidade revelada, o anticorpo aqui compreende as sequências de estrutura VH de SEQ ID N^{os}.: 30-33 ou variantes das mesmas.

[0092] Preferivelmente, um anticorpo variante como aqui usado:

(i) retém ligação específica à IL-1 beta, em particular à hIL-1

beta;

(ii) tem uma potência (IC_{50}) com respeito à inibição do efeito biológico de IL-1 beta humana inferior a 500 pM, preferivelmente inferior a 400 pM, 300pM, 200 pM, 100 pM, 50 pM, mais preferivelmente inferior a 25 pM;

(iii) é reativo cruzado com IL-1 beta de macaco cinomolgo, IL-1 beta de macaco rhesus e/ou IL-1 beta de rato; e/ou

(iv) compete com o anticorpo revelado aqui para ligar IL-1 beta, preferivelmente o IL-1 beta humana, IL-1 beta de macaco cinomolgo, IL-1 beta de macaco rhesus e/ou IL-1 beta de rato, o mais preferivelmente hIL-1 beta.

[0093] Em uma modalidade, a variante compreende uma sequência de VL selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 151 e SEQ ID NO: 153.

[0094] Adicional ou alternativamente, a variante compreende uma sequência de VH selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 152.

[0095] As variantes podem também ser preparadas por baralhamento de cadeias das cadeias leves e pesadas. Uma cadeia leve simples pode ser combinada com uma biblioteca de cadeias pesadas para render uma biblioteca de variantes. Em uma modalidade, a dita cadeia leve simples é selecionada do grupo de sequências de VL citado acima e/ou a dita biblioteca de cadeias pesadas compreende uma ou mais das sequências de VH citadas acima. Igualmente, uma cadeia pesada simples pode ser combinada com uma biblioteca de cadeias leves. Preferivelmente, a dita cadeia pesada simples é selecionada do grupo de sequências de VH citado acima e/ou a dita biblioteca de cadeias leves compreende uma ou mais das sequências de VL citadas acima.

[0096] Em uma modalidade, a variante compreende a VL de SEQ ID NO: 135 e/ou a VH de SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 150 ou SEQ ID NO: 152. Preferivelmente, a variante compreende SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87 ou SEQ ID NO: 88.

[0097] Em uma modalidade, a variante compreende a VL de SEQ ID NO: 136 e/ou a VH de SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 150 ou SEQ ID NO: 152. Preferivelmente, a variante compreende SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83 ou SEQ ID NO: 84.

[0098] Em uma modalidade, a variante compreende a VL de SEQ ID NO: 137 e/ou a VH de SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 150 ou SEQ ID NO: 152. Preferivelmente, a variante compreende SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94 ou SEQ ID NO: 95.

[0099] Em uma modalidade, a variante compreende a VL de SEQ ID NO: 139 e/ou a VH de SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 150 ou SEQ ID NO: 152. Preferivelmente, a

variante compreende SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79 ou SEQ ID NO: 80,

[00100] Em uma modalidade, a variante compreende a VL de SEQ ID NO: 141 e/ou a VH de SEQ ID NO: 142. Preferivelmente, a variante compreende SEQ ID NO: 71.

[00101] Em uma modalidade, a variante compreende a VL de SEQ ID NO: 143 e/ou a VH de SEQ ID NO: 144. Preferivelmente, a variante compreende SEQ ID NO: 72.

[00102] Em uma modalidade, a variante compreende a VL de SEQ ID NO: 145 e/ou a VH de SEQ ID NO: 146. Preferivelmente, a variante compreende SEQ ID NO: 73.

[00103] Em uma modalidade, a variante compreende a VL de SEQ ID NO: 147 e/ou a VH de SEQ ID NO: 148. Preferivelmente, a variante compreende SEQ ID NO: 74.

[00104] Em uma modalidade, a variante compreende a VL de SEQ ID NO: 149 e/ou a VH de SEQ ID No. 150. Preferivelmente, a variante compreende SEQ ID NO: 75.

[00105] Em uma modalidade, a variante compreende a VL de SEQ ID NO: 151 e/ou a VH de SEQ ID No. 152. Preferivelmente, a variante compreende SEQ ID NO: 76.

[00106] Em uma modalidade, a variante compreende a VL de SEQ ID NO: 8 e/ou a VH de SEQ ID NO: 121 ou de SEQ ID NO: 122. Preferivelmente, a variante compreende SEQ ID NO: 59 ou SEQ ID NO: 60.

[00107] Em uma modalidade, a variante compreende a VL de SEQ ID NO: 153 e/ou a VH de SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 146 ou SEQ ID NO: 152. Preferivelmente, a variante compreende SEQ ID No. 89, SEQ ID NO: 90 ou 91.

[00108] Em uma modalidade, a variante compreende a VL de SEQ ID NO: 8 e/ou a VH de SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO:

142, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 150 ou SEQ ID NO: 152.

[00109] Em uma modalidade, a variante compreende a VH de SEQ ID NO: 7 e/ou a VL de SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 139 ou SEQ ID NO: 153.

[00110] Em uma modalidade, a variante compreende uma sequência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 34 a 95 e SEQ ID NO: 154.

[00111] Um membro de ligação pode compreender qualquer uma das sequências de VL e/ou de VH mencionadas acima. Membros de ligação tendo um formato de domínio simples, tal como um nanocorpo ou uma VHH, compreendem apenas uma das sequências de VL ou de VH mencionadas acima, preferivelmente a sequência de VH. Membros de ligação multivalentes, em particular fragmentos de $F(ab')_2$, bis-scFv ou diacorpo, preferivelmente os membros de ligação biespecíficos, podem compreender uma ou mais das sequências de VL mencionadas acima e/ou uma ou mais das sequências de VH mencionadas acima.

[00112] Os anticorpos da presente invenção são particularmente estáveis. Como aqui usado, o termo "estabilidade" refere-se à propriedade biofísica do anticorpo para permanecer monomérico na solução após incubação prolongada e/ou incubação em temperatura elevada. Anticorpos instáveis tendem a dimerizar-se ou oligomerizar-se e até mesmo precipitar-se, assim diminuindo a vida de prateleira e se tornando menos adequados para aplicações farmacêuticas.

[00113] Os anticorpos fornecidos aqui e em particular o fragmento de anticorpo monovalente acima permanecem monomérico pelo menos para 75%, preferivelmente pelo menos para 80%, 85%, e o mais preferivelmente para 93% após ser incubado durante 1 mês a 37°C a uma concentração de 1 mg/ml em PBS a pH 7,2. Adicional ou alternativamente, o anticorpo permanece monomérico pelo menos para

90%, preferivelmente pelo menos para 92%, 94%, 96%, 98% mais preferivelmente para 100% após 1 mês em temperatura ambiente a uma concentração de 1 mg/ml em PBS a pH 7,2.

[00114] O grau de monômeros pode ser determinado, por exemplo, por SEC-HPLC (Cromatografia por Exclusão de Tamanho-Cromatografia Líquida de Desempenho Alto). Uma fase móvel adequada para tal testagem é, por exemplo, PBS a pH 7,2. O conteúdo de monômero pode ser quantificado por integração de pico do sinal UV280 medido durante a cromatografia de proteína. Um sistema adequado é, por exemplo, uma HPLC Dionex Summit controlada por software Chromeleon® 6.5 que também permite análise de cromatograma subsequente e quantificação de pico.

[00115] Os anticorpos revelados aqui e em particular o fragmento de anticorpo monovalente acima é também estável em concentrações mais altas, por exemplo, eles permanecem monoméricos pelo menos para 50%, preferivelmente pelo menos para 55%, 60%, 65%, 70% e o mais preferivelmente para 75% após ser incubado durante duas semanas em temperatura ambiente e/ou 4°C a uma concentração de cerca de 50 mg/ml em PBS a pH 7,2.

[00116] Além disso, os anticorpos fornecidos aqui e, em particular, o fragmento de anticorpo monovalente acima, é particularmente solúvel e, portanto, pode ser concentrado altamente sem precipitação devido à formação de agregados. Preferivelmente, os anticorpos podem ser concentrados em PBS a pH 7,2 para uma concentração de mais que 20 mg/ml sem precipitação, mais preferivelmente para uma concentração de 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml e o mais preferivelmente para 70 mg/ml em PBS a pH 7,2.

[00117] Em uma modalidade muito preferida, o anticorpo tem uma temperatura de fundição de cerca de 60°C como determinado por fluorimetria de varredura de diferencial (DSF), preferivelmente 65°C,

70°C, 71°C, 72°C, 73°C e o mais preferivelmente 74°C. Este método baseia-se nas propriedades de certas tinturas que são fluorescentes apenas em um ambiente hidrofóbico. Por exemplo, o desdobramento da proteína pode ser detectado como um aumento na fluorescência sob ligação da tintura SYPRO® Orange a uma proteína termodesnaturada (NIESEN F.H. et al. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature Protocols* 2007, vol. 2, págs. 2212-2221). A estabilidade de uma proteína pode ser desse modo analisada através de desnaturação térmica.

[00118] O anticorpo tem preferivelmente um ponto isoelétrico teórico (pI) na faixa de 5 a 10, preferivelmente 7 a 9, o mais preferivelmente cerca de 8,3. O pI teórico pode ser calculado, por exemplo, usando a ferramenta de ProtParam no Servidor ExPASy (disponível em <http://web.expasy.org/protparam/>; vide também GASTEIGER E. et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. (Em) The Proteomics Protocols Handbook. Editado por WALKER J. M. Totowa: Humana Press Inc., 2005. ISBN 9781588295934. págs. 571-607).

[00119] O anticorpo pode ser reativo cruzado com IL-1 beta de espécies não humanas, tais como, sem ser limitados, IL-1 beta de macaco cinomolgo, IL-1 beta de macaco rhesus, IL-1 beta de rato, IL-1 beta murino, IL-1 beta canino, IL-1 beta felino, IL-1 beta de sagui, IL-1 beta suíno e/ou IL-1 beta de cobaia. Preferivelmente, o anticorpo é reativo cruzado com IL-1 beta de macaco cinomolgo (por exemplo, recombinantemente produzido e disponível de Sino Biological Inc., no. cat. 90010-CNAE), IL-1 beta de macaco rhesus (por exemplo, recombinantemente produzido e disponível de R&D Systems, no. cat. 1318-RL/CF) e/ou IL-1 beta de rato (por exemplo, recombinantemente produzido e disponível de Peprotech, no. cat. 400-01B).

[00120] Preferivelmente, não há nenhuma atividade residual de IL-1

beta ao ser neutralizado com o anticorpo revelado aqui em um cenário *in vivo* e/ou *in vitro*, isto é, o anticorpo inibe completamente a ação de IL-1 beta. "Nenhuma atividade residual" como aqui usado refere-se a menos que 2% do sinal de ensaio de potência que corresponde à liberação de IL-6 dos fibroblastos humanos induzida por 10 pg/ml de IL-1 beta, preferivelmente o ensaio como descrito no exemplo 3, na presença de 60 ng/ml do anticorpo descrito aqui quando comparado a anticorpos de especificidade não relevante ou controle de veículo na mesma concentração.

[00121] A invenção também fornece um membro de ligação competindo com os anticorpos revelados aqui por ligar à IL-1 beta humana.

[00122] Como aqui usado, o termo "competindo" refere-se à competição entre os membros de ligação para ligar ao mesmo alvo. Competição pode ser determinada por ensaios de ligação competitiva em que o membro de ligação de interesse impede ou inibe ou reduz a ligação específica dos anticorpos revelados aqui a um antígeno comum (aqui, hIL-1 beta ou um fragmento do mesmo). Tais ensaios de ligação competitiva são conhecidos na técnica e incluem, sem ser limitados, radioimunoensaio direto ou indireto de fase sólida (RIA) e imunoensaio de enzima direto ou indireto de fase sólida (EIA). Tipicamente, tal ensaio envolve o uso de antígeno purificado ligado a uma superfície sólida, um membro de ligação a ser testado e o anticorpo de referência como descrito aqui. Inibição competitiva é medida determinando a quantidade de qualquer um de (i) o anticorpo de referência ligado à superfície sólida na presença do membro de ligação a ser testado, ou (ii) o membro de ligação a ser testado ligado à superfície sólida na presença do anticorpo de referência. Um membro de ligação competitivo pode ligar-se (i) ao mesmo epítopo que o anticorpo, (ii) a um epítopo de sobreposição, ou (iii) a um epítopo diferente na mesma molécula alvo mas estericamente

impedindo a ligação do anticorpo a seu alvo.

[00123] Usualmente, quando um membro de ligação competitivo estiver presente em excesso, reduzirá a ligação específica do anticorpo como descrito aqui à IL-1 beta em pelo menos 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% ou 75% ou mais. Preferivelmente, ligação do anticorpo é reduzida por pelo menos 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-97%, ou 97% ou mais.

[00124] Em uma modalidade, o membro de ligação competitivo liga-se à hIL-1 beta com uma K_D de afinidade de pelo menos cerca de 1 pM, 10 pM, 100 pM, 500 pM, 1 nM, 10 nM.

[00125] Em uma modalidade, o membro de ligação é monovalente, tal como um fragmento scFv ou um Fab. Em outra modalidade, o membro de ligação é multivalente. Tal molécula multivalente pode ser bivalente (tal como uma imunoglobulina completa ou um fragmento $F(ab')_2$) ou compreende pelo menos três sítios de ligação alvo.

[00126] O membro de ligação multivalente pode ser um anticorpo biespecífico tal como um diacorpo, um diacorpo de cadeia simples ou um scFv em tandem (vide, por exemplo, KONTERMANN, R. E. *Methods in Molecular Biology*. Editado por LO, B. Totowa, N. J.: Humana Press, 2004. ISBN 1588290921. págs. 227-242). Os ditos anticorpos biespecíficos podem perfeitamente usar ligantes mais curtos que aqueles descritos acima para scFv, isto é, tendo apenas uma a três repetições do motivo básico da SEQ ID N°: 14 (vide, por exemplo, HOLLIGER, P., et al. Diabodies: small bivalent and bispecific antibody fragments. *PNAS* 1993, vol. 90, n°. 14, págs. 6444-6448). Em outra modalidade, o membro de ligação multivalente é um triacorpo, um minicorpo ou tetracorpo.

[00127] A invenção também fornece T-corpos compreendendo os anticorpos revelados aqui. T-corpos são receptores de células T da imunoglobulina (clgTCRs) que combinam o reconhecimento de

antígeno dos anticorpos com as propriedades de sinal e efectoras do complexo de receptor de células T. Em tais construções, o anticorpo é preferivelmente um fragmento de anticorpo tal como um Fv, um Fab, um scFv ou um scFv-Fc, o mais preferivelmente um scFv. Para debate adicional do projeto geral de T-corpos e suas aplicações, vide, por exemplo, SCHIRRMANN, T. e Pecher, G. Handbook of Therapeutic Antibodies. Editado por DÜBEL, S. Weinheim: Wiley-VCH, 2009. ISBN 3527314539. págs.533-561.

[00128] A invenção ainda fornece um membro de ligação contra IL-1 beta puro (isto é, não sendo engenheirado para afinidade ou potência aumentadas) tendo uma Potência Monovalente (medida, por exemplo, como afinidade (K_D) ou potência biológica em ensaios à base de célula (IC_{50}) em unidades de mol/l) a um certo Peso Molecular (em g/mol) após normalização para o Número de Sítios de Ligação por membro de ligação, como determinado pela equação $K =$

$$\frac{\text{Potência Monovalente (mol/l)} * \text{Peso Molecular (g/mol)}}{\text{Número de Sítios de ligação}}$$

Número de Sítios de ligação

[00129] Como descrito acima, fragmentos de anticorpo monovalente tendo valores de potência na faixa picomolar são particulares e não habitualmente obtidos. A potência frequentemente correlata com o tamanho do membro de ligação: potência alta na faixa picomolar pode ser obtida através de imunoglobulinas completas, enquanto que os fragmentos de anticorpo muito pequenos tais como nanocorpo ou unidades de reconhecimento mínimas, ou andaimes de não anticorpo pequenos tais como afilinas, frequentemente mostram valores de potência mais baixos, isto é, na faixa nanomolar. Aparentemente, há um mínimo para a dita função K fornecida pelo scFv como descrito aqui: quanto menor o membro de ligação, mais alta sua potência monovalente ou afinidade, e quanto mais sítios de ligação por molécula, menor K. Por exemplo, para scFv como descrito aqui, o limite inferior de K equivale a

cerca de 50 ng/l enquanto que o limite superior de K equivale a cerca de 12.500 ng/l; para as respectivas imunoglobulinas completas, o limite inferior é igual a cerca de 150 ng/l e o limite superior de K é igual a cerca de 37.500 ng/l; para outros membros de ligação tendo pesos moleculares menores que o scFv como descrito aqui, o valor de K é $K > 500.000$ ng/l. Em uma modalidade preferida, o valor de K é cerca de 50 ng/l, 100 ng/l, 200 ng/l, 500 ng/l, 750 ng/l, 1.000 ng/l, 1.250 ng/l, 1.500 ng/l, 1.750 ng/l, 2.000 ng/l, 2.250 ng/l, ou 2.500 ng/l.

Ácidos nucleicos, vetores, células hospedeiras e método de produção

[00130] Os anticorpos descritos aqui são codificados por um ácido nucleico simples ou por dois ou mais ácidos nucleicos, por exemplo cada codificando pelo menos uma região variável. Sabendo a sequência do anticorpo ou de suas partes, os cDNAs que codificam a sequência de polipeptídeos podem ser gerados por métodos bem conhecidos na técnica, por exemplo através de síntese gênica. Estes cDNAs podem ser clonados por técnicas padrões de clonagem e de mutagênese em um vetor adequado tal como um vetor de expressão ou um vetor de clonagem. Opcionalmente, a cadeia leve variável é codificada por um ácido nucleico separado que a cadeia pesada variável do anticorpo. Ademais, sequências adicionais tais como marcadores (por exemplo, um marcador His), domínios constantes para a produção de um Fab ou uma imunoglobulina completa, ligantes, a sequência de codificação de uma segunda especificidade de ligação ou outro polipeptídeo funcional tal como uma enzima para gerar uma construção de fusão ou uma molécula biespecífica podem ser incluídas na construção genética.

[00131] Com base na estratégia de clonagem escolhida, as construções genéticas podem gerar um anticorpo tendo um ou mais resíduos adicionais na extremidade N-terminal ou C-terminal. Por exemplo, uma metionina N-terminal derivada do códon de começo ou uma alanina adicional pode estar presente em um polipeptídeo

expresso, a menos que tenha sido cortado pós-translacionalmente. Será entendido, portanto, que os anticorpos revelados aqui compreendem as sequências reveladas ao invés de consistir nas mesmas.

[00132] Em uma modalidade, a invenção fornece uma sequência de ácidos nucleicos compreendendo pelo menos 300 nucleobases, mais preferivelmente pelo menos 350, 400, 450, ou 500 nucleobases e tendo pelo menos 85%, mais preferivelmente pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência à SEQ ID NO: 17. Em uma modalidade muito preferida, a sequência de ácidos nucleicos é SEQ ID NO: 17.

[00133] Adicional ou alternativamente, a invenção fornece uma sequência de ácidos nucleicos compreendendo pelo menos 300 nucleobases, mais preferivelmente pelo menos 350, 400, 450 ou 500 nucleobases que hibridam com o ácido nucleico de SEQ ID NO: 17 sob condições de severidade alta.

[00134] Protocolos básicos de técnicas padrões de clonagem, mutagênese e de biologia molecular são descritos em, por exemplo, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (GREEN, M. e Sambrook, J. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 4ª edição. Cold Spring Harbor Laboratory, 2012. ISBN 1936113422).

[00135] Células hospedeiras apropriadas para a expressão das construções genéticas podem ser procarióticas ou eucarióticas. Células hospedeiras procarióticas adequadas são gram-negativas ou gram-positivas e incluem espécies das famílias *Escherichia*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* ou *Bacillus*. Muito preferido é *Escherichia coli*, em particular as cepas de *E. coli* BL21 (DE3) (Life Technologies™, no. cat. C6000-03) e Origami™ 2(DE3) (Novagen, cat. no 71345).

[00136] Se modificações pós-translacionais tais como glicosilação ou

fosforilação forem desejadas, as células hospedeiras eucarióticas são preferíveis. Por exemplo, micróbios eucarióticos tais como cepas comumente usadas de *Saccharomyces cerevisiae* ou *Pichia pastoris* podem servir como células hospedeiras. As células hospedeiras podem também incluir células vegetais ou animais, em particular células de insetos ou mamíferas. Células mamíferas adequadas incluem, sem ser limitadas, Células de Ovário de Hamster Chinês (CHO), Células de Rim Embrionário Humano (HEK), Células Endoteliais da Veia Umbilical Humana (HUVEC) ou células de mieloma NS0.

[00137] O anticorpo pode ser produzido através da expressão em uma célula hospedeira adequada. Por exemplo, os vetores de expressão descritos acima são introduzidos em uma célula hospedeira através de técnicas padrões tais como eletroporação ou transformação química. As células transformadas são depois cultivadas sob condições adequadas para expressão de proteína recombinante, tipicamente em meios nutricionais apropriados, opcionalmente modificados para induzir promotores, selecionar transformantes, ou amplificar as sequências de codificação de interesse. O anticorpo é recuperado da cultura e opcionalmente purificado usando técnicas padrões na técnica. O rendimento da proteína recombinante pode ser melhorado otimizando os meios e as condições de cultura tais como temperatura ou fornecimento de oxigênio. Em procariotos, o anticorpo pode ser produzido no periplasma, intracelularmente como corpos de inclusão ou ser segregados no meio. Sob colheita, a proteína pode ser purificada usando métodos bem conhecidos naquela técnica tais como filtração em gel, cromatografia de permuta de íons, cromatografia de fase invertida, interação hidrofóbica, cromatografia de modo misturado e/ou cromatografia de afinidade.

[00138] Em uma modalidade, o anticorpo é produzido em um sistema livre de células. Este tipicamente envolve transcrição *in vitro* seguida por

tradução *in vitro* dos moldes de produto de ácido nucleico codificando as proteínas descritas aqui, por exemplo, DNA de plasmídeo ou moldes de produto de PCR. Por exemplo, lisados brutos de células em desenvolvimento são usados, fornecendo as enzimas necessárias como também a maquinaria da síntese de proteína celular. Os blocos de construção necessários tais como aminoácidos ou nucleobases como também moléculas de liberação de energia e similares podem ser fornecidos de forma exógena. Sistemas de expressão livres de células podem ser, por exemplo, com base em reticulócitos lisados de coelho (por exemplo, Rabbit Reticulocyte Lysate System, Promega, no. cat. L4540), células HeLa (por exemplo, 1-Step Human In Vitro Translation Kit, Thermo Scientific, no. cat. 88881), células de insetos (por exemplo, EasyXpress Insect Kit II, Qiagen, no. cat. 32561), germes de trigo (por exemplo, Wheat Germ Extract, Promega, no. cat. L4380), ou células de *E. coli* (por exemplo, PURExpress® In Vitro Protein Synthesis Kit, NEB, no. cat. E6800S). Também, os sistemas de expressão de anticorpo livres de células otimizados podem ser usados para a geração de ligação melhorada de dissulfeto para produção. Kits comercialmente disponíveis incluem lisados de células de insetos (por exemplo, EasyXpress Disulfide Insect Kit, Qiagen, nº. cat. 32582) ou lisados de células de *E. coli* (por exemplo, EasyXpress Disulfide *E. coli* Kit, Qiagen, nº. cat. 32572). A síntese de proteína livre de células tem a vantagem, por exemplo, de ser rápida, alcançando rendimentos de produto altos, permitindo modificação fácil das condições de reação, formando um baixo grau de subprodutos ou até mesmo nenhum. A síntese de proteína livre de células pode envolver etapas biológicas e/ou químicas que não podem ser conduzidas em sistemas de produção puramente biológicos ou químicos. Por exemplo, aminoácidos não naturais ou quimicamente modificados podem ser incorporados na proteína nas posições desejadas. Proteínas de fusão ScFv-toxina foram de forma

bem sucedida produzidas em sistemas livres de células (NICHOLLS, P. J., et al. Characterization of single-chain antibody (sFv)–toxin fusion proteins produced in vitro in rabbit reticulocyte lysate. *Journal of Biological Chemistry* 1993, vol. 268, págs. 5302–5308). Desse modo, em uma modalidade, um método de produzir o anticorpo aqui descrito, o membro de ligação acima ou o T-corpo acima é fornecido compreendendo as etapas de (a) fornecer um sistema livre de células, (b) fornecer um molde de produto de ácido nucleico que codifica o anticorpo descrito aqui, o membro de ligação acima ou o T-corpo acima, (c) permitir a transcrição e a tradução do dito molde de produto de ácido nucleico; (d) recuperar; e opcionalmente (e) purificar o dito anticorpo, o dito membro de ligação ou o dito T-corpo, respectivamente.

[00139] Adicional ou alternativamente, um método de produzir o anticorpo descrito aqui compreende pelo menos uma etapa de síntese química. Por exemplo, o método pode ser completamente químico. Em outra modalidade, os sistemas de produção à base de célula ou livres de células descritos acima compreendem tal pelo menos uma etapa de síntese química.

[00140] Em uma modalidade preferida, os anticorpos descritos aqui são produzidos em um sistema baseado em célula usando um vetor de expressão para expressão intracelular em *E. coli*. Sob expressão o polipeptídeo é gerado como corpos de inclusão dentro das células que são separadas das outras partículas celulares seguido por solubilização em um agente desnaturante tal como cloridrato de guanidina (GndHCl) e redobradas por procedimentos de renaturação bem conhecidos à pessoa versada.

[00141] Será entendido que os ácidos nucleicos, vetores, células hospedeiras e método de produção descritos acima também aplicam-se aos membros de ligação (desde que sejam uma proteína) e/ou aos T-corpos descritos aqui.

Modificações químicas e/ou biológicas

[00142] Em um aspecto, o anticorpo da presente invenção é química e/ou biologicamente modificado. Tal modificação pode compreender, mas não é limitada a, glicosilação, PEGilação, HESilação, tecnologia de fusão de albumina, PASilação, marcação com tinturas e/ou radioisótopos, conjugação com enzimas e/ou toxinas, fosforilação, hidroxilação e/ou sulfação. Igualmente, qualquer membro de ligação, a sequência de ácidos nucleicos, o vetor e/ou a célula hospedeira descritos acima podem ser consequentemente modificados.

[00143] Modificações químicas e/ou biológicas podem ser conduzidas otimizar a farmacodinâmica ou solubilidade em água da proteína ou reduzir seus efeitos colaterais. Por exemplo, PEGilação, PASilação e/ou HESilação podem ser aplicadas para reduzir a velocidade de depuração renal e assim aumentar o tempo de meia-vida em plasma do anticorpo. Adicional ou alternativamente, uma modificação pode acrescentar uma funcionalidade diferente à proteína, por exemplo uma toxina para combater células cancerosas mais eficientemente, ou uma molécula de detecção para propósitos de diagnóstico.

[00144] Glicosilação refere-se a um processo que liga carboidratos a proteínas. Em sistemas biológicos, este processo é executado enzimaticamente dentro da célula como uma forma de modificação cotranslacional e/ou pós-translacional. Uma proteína, aqui o anticorpo, pode também ser quimicamente glicosilada. Tipicamente, mas não limitado, a glicosilação é (i) N-ligada a um nitrogênio de cadeias laterais de asparagina ou de arginina; (ii) O-ligada ao oxigênio de hidróxi das cadeias laterais de serina, treonina, tirosina, hidroxilisina, ou hidroxiprolina; (iii) envolve a ligação de xilose, fucose, manose, e N-acetilglucosamina a uma fosfo-serina; ou (iv) na forma de C-manosilação em que um açúcar da manose é acrescentado a um

resíduo de triptofano encontrado em uma sequência de reconhecimento específica. Padrões de glicosilação podem ser controlados, por exemplo, selecionando as linhagens celulares apropriadas, meios de cultura, modos de fabricação de engenharia de proteína e estratégias de processo (HOSSLER, P. Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology* 2009, vol. 19, no. 9, págs. 936-949).

[00145] Engenharia de proteína para controlar ou alterar o padrão de glicosilação pode envolver a deleção e/ou a adição de um ou mais sítios de glicosilação. A criação de sítios de glicosilação pode ser convenientemente realizada introduzindo a sequência de reconhecimento enzimática correspondente na sequência de aminoácidos do anticorpo ou adicionando ou substituindo um ou mais dos resíduos de aminoácido enumerados acima.

[00146] Pode ser desejável tratar com PEG o anticorpo. PEGilação pode alterar as propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas de uma proteína. Polietileno-glicol (PEG) de um peso molecular apropriado é covalentemente ligado à cadeia principal da proteína (vide, por exemplo, PASUT, G. e Veronese, F. State of the art in PEGylation: the great versatility achieved after forty years of research. *Journal of Controlled Release* 2012, vol. 161, no. 2, págs. 461-472). PEGilação pode adicionalmente reduzir a imunogenicidade protegendo a proteína PEGilada do sistema imune e/ou alterar sua farmacocinética, por exemplo aumentando a estabilidade *in vivo* do anticorpo, protegendo-o da degradação proteolítica, estendendo seu tempo de meia-vida e alterando sua biodistribuição.

[00147] Efeitos similares podem ser alcançados através de miméticos de PEG, por exemplo, HESilação ou PASilação do anticorpo. HESilação utiliza-se derivados de hidroxietil amido ("HES"), enquanto que durante a PASilação o anticorpo é ligado para conformacionalmente

desordenar as sequências de polipeptídeos compostas dos aminoácidos prolina, alanina e serina. Os ditos miméticos de PEG e compostos relacionados são, por exemplo, descritos em BINDER, U. e Skerra, A. Half-Life Extension of Therapeutic Proteins via Genetic Fusion to Recombinant PEG Mimetics, em *Therapeutic Proteins: Strategies to Modulate Their Plasma Half-Lives*. Editado por KONTERMANN, R., Weinheim, Alemanha: Wiley-VCH, 2012. ISBN: 9783527328499. págs. 63-81.

[00148] O anticorpo pode incluir um epítipo e em particular um epítipo de ligação de receptor de salvamento. Tal epítipo de ligação de receptor de salvamento tipicamente refere-se a um epítipo da região de Fc de uma molécula de IgG (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, ou IgG4) e tem o efeito de aumentar a meia-vida *in vivo* da molécula.

[00149] Adicional ou alternativamente, o anticorpo é marcado ou conjugado com uma segunda metade que designa as funções subordinadas seguindo ligação do alvo. A dita segunda metade pode ter, por exemplo, uma função efetora imunológica adicional, ser efetiva em visamento de fármaco ou útil para detecção. A segunda metade, por exemplo, pode ser ligada quimicamente ou fundida geneticamente ao anticorpo usando métodos conhecidos na técnica.

[00150] Moléculas que podem servir como segunda metade incluem, sem ser limitadas, radionuclídeos, também chamados radioisótopos (por exemplo, ^{35}S , ^{32}P , ^{14}C , ^{18}F , ^{125}I); apoenzimas; enzimas (tais como fosfatase alcalina, peroxidase de raiz-forte, beta-galactosidase ou angiogenina); cofatores; peptídeos (por exemplo, marcadores His); proteínas (incl. lectinas); carboidratos (incl. marcador de manose-6-fosfato); fluoróforos (incluindo isotiocianato de fluoresceína (FITC); ficoeritrina; verde/azul/vermelha e outras proteínas fluorescentes; aloficocianina (APC)); cromóforos; vitaminas (incluindo biotina); quelantes; antimetabólitos (por exemplo, metotrexato), lipossomas;

toxinas incluindo fármacos citotóxicos tais como taxol, gramicidina D ou colquicina; ou uma radiotoxina.

[00151] Um anticorpo marcado é particularmente útil para detecção *in vitro* e *in vivo* ou propósitos de diagnósticos. Por exemplo, um anticorpo marcado com um radioisótopo, enzima, fluoróforo ou cromóforo adequados pode ser detectado através de radioimunoensaio (RIA), ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA), ou análise de célula simples com base em fluxo de citometria (por exemplo, análise de FACS), respectivamente. Similarmente, os ácidos nucleicos e/ou vetores revelados aqui podem ser usados para propósitos de detecção ou de diagnósticos, por exemplo usando fragmentos marcados dos mesmos como sondas em ensaios de hibridação. Protocolos de marcação podem ser encontrados, por exemplo, em JOHNSON, I. e Spence, M. T. Z. Molecular Probes Handbook, A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies. Life Technologies, 2010. ISBN: 0982927916.

Composições

[00152] O anticorpo da presente invenção, qualquer membro de ligação, as sequências de ácidos nucleicos ou o vetor revelados aqui podem ser fornecidos em uma composição que adicionalmente compreende um veículo, excipiente ou diluente adequados. Muito preferido é uma composição que compreende um anticorpo descrito aqui.

[00153] Tal composição pode ser, por exemplo, uma composição de diagnósticos, uma cosmética ou uma farmacêutica. Para propósitos terapêuticos ou cosméticos, a dita composição é uma composição farmacêutica compreendendo um veículo, excipiente ou diluente farmacêuticos, isto é, não sendo tóxicos às dosagens e uma concentração empregada.

[00154] "Veículo", "excipientes" ou "diluente" adequados incluem,

sem ser limitados: (i) tampões tais como fosfato, citrato, ou outros, orgânicos ácidos; (ii) antioxidantes tais como ácido ascórbico e tocoferol; (iii) conservantes tais como 3-pentanol, cloreto de hexametônio, cloreto de benzalcônio, álcool benzílico, alquil parabeno, catecol, ou ciclo-hexanol; (iv) aminoácidos, tais como por exemplo histidina, arginina; (v) peptídeos, preferivelmente até 10 resíduos tais como polilisina; (vi) proteínas, tais como albumina de soro bovina ou humana; (vii) polímeros hidrófilos tais como polivinilpirrolidona; (viii) monossacarídeos, dissacarídeos, polissacarídeos e/ou outros carboidratos incluindo glicose, manose, sacarose, manitol, trealose, sorbitol, aminodextrana ou poliamidoaminas; (ix) agentes quelantes, por exemplo EDTA; (x) íons formadores de sal tais como sódio; (xi) complexos de metal (por exemplo complexos de Zn-proteína); e/ou (xii) tensoativos iônicos e não iônicos tais como TWEEN™, PLURONICS™ ou polietileno glicol (PEG).

[00155] Muitos dos ditos compostos exemplares têm funções diferentes e podem, por exemplo, atuar como veículo e como diluente. É também para ser entendido que a composição pode compreender mais que um de cada veículo, diluente ou excipiente.

[00156] O anticorpo, o membro de ligação, as sequências de ácidos nucleicos ou o vetor podem ser fornecidos em materiais de suporte sólidos tais como contas e micropartículas. Tipicamente, as moléculas são ligadas a tal veículo por meio de uma ligação covalente (envolvendo opcionalmente um ligante), não covalentemente ou admistão. As ditas contas e micropartículas podem compreender, por exemplo, amido, celulose, poliacrilato, polilacetato, poliglicolato, poli(lactídeo-co-glicolida), látex, ou dextrana.

Aplicações terapêuticas

[00157] As moléculas descritas aqui, em particular, o anticorpo, membro de ligação, ácido nucleico ou vetor, são úteis como um

medicamento. Tipicamente, tal medicamento compreende uma quantidade terapeuticamente efetiva das moléculas fornecidas aqui. Consequentemente, as ditas moléculas podem ser usadas para a produção de um medicamento útil no tratamento de distúrbios relacionados à IL-1 beta.

[00158] Em um aspecto, um método de tratar um distúrbio relacionado à IL-1 beta é fornecido compreendendo as etapas de administrar uma quantidade farmaceuticamente efetiva das moléculas descritas aqui, em particular o anticorpo, a um sujeito em necessidade do mesmo. Em uma modalidade, a composição farmacêutica acima (isto é, medicamento) compreendendo tal quantidade farmaceuticamente efetiva do anticorpo é administrada ao dito sujeito.

[00159] Os termos "trato" ou "tratamento" como aqui usados referem-se à administração de uma quantidade farmaceuticamente efetiva do anticorpo, membro de ligação, ácido nucleico, vetor ou célula hospedeira da presente invenção, a um sujeito em necessidade do mesmo para impedir, curar, tardar o princípio e/ou progressão, reduzir a severidade, estabilizar, modular, curar ou melhorar um ou mais sintomas de um distúrbio relacionado à IL-1 beta. Tipicamente, o anticorpo, membro de ligação, ácido nucleico, vetor ou célula hospedeira são fornecidos em uma composição farmacêutica incluindo aquelas previamente descritas aqui.

[00160] Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade na qual sob regime de dosagem aplicado rende o efeito terapêutico desejado, isto é, alcança as metas de tratamento como definidas acima. A dosagem dependerá de vários fatores incluindo o paciente e fatores clínicos (por exemplo, idade, peso, gênero, história clínica do paciente, severidade do distúrbio e/ou resposta ao tratamento), a natureza do distúrbio sendo tratado, a composição particular a ser administrada, a rota de administração, e outros fatores.

[00161] O sujeito em necessidade de tal tratamento pode ser um animal humano ou não humano, por exemplo, um camundongo, rato, coelho, macaco, cão, cavalo, vaca, galinha, cobaia ou porco. Tipicamente, o sujeito é diagnosticado com um distúrbio relacionado à IL-1 beta ou pode adquirir um tal distúrbio.

[00162] Exemplos de distúrbios relacionados à IL-1 beta em que o antagonista de IL-1 beta mostrou efeitos terapêuticos incluem, sem ser limitados, retinopatia diabética proliferativo, artrite gotosa, síndrome de Schnitzler, artrite idiopática juvenil sistêmica, artrite reumatoide, artrite gotosa aguda, artrite gotosa crônica, urticária, vasculite, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, espondilite ancilosante, osteomielite multifocal recorrente, policondrite recidivante, síndrome periódica associada à criopirina (CAPS), doença de Behçet, febre mediterrânea familiar, doença pulmonar obstrutiva crônica, polimialgia reumática, mutações de NALP3, pioderma gangrenosa, urticária idiopática crônica, osteoartrite, degeneração macular relacionada à idade úmida, síndrome de olho seco, psoríase pustular, síndrome de sinovite-acne-pustulose-hiperostose-osteíte, síndrome da ativação de macrófagos, síndrome de febre periódica adenite faringite úlcera aftosa, doença de Still de princípio adulto, deficiência da mevalonato cinase, aterosclerose, síndrome periódica associada ao receptor de TNF (TRAPS), acne vulgar e/ou acne inversa.

[00163] O termo "CAPS" ou síndrome periódica associada à criopirina será entendido para incluir cada uma dentre a síndrome autoinflamatória fria familiar (FCAS), síndrome de Muckle-Wells (MWS) e doença inflamatória multissistêmica de princípio neonatal, também conhecida como síndrome neurológica, cutânea e articular crônica infantil (CINCA).

[00164] A composição farmacêutica pode ser aplicada através de rotas de administração diferentes. Administração pode ser conduzida,

por exemplo, mas não limitada, parenteralmente, por exemplo, intramuscular, subcutânea, intravenosa como um bolo ou através de infusão contínua, intra-articular, intrassinovial, intracerebral, intracerebroespinal, intratecal, epidural, ou intraperitonealmente; oral; retal; local, urogenital; topicamente, por exemplo, à pele ou ao olho; intravítrea; intravenosa; intraocular; ótica; intranasalmente; através de inalação; dermicamente tal como intradérmica, subcutânea ou transdermicamente; sublingual; bucal, por exemplo. Preferidas são as rotas de administração tópica, retal, local, intranasal, intravenosa e/ou intradérmica.

[00165] O anticorpo da presente invenção, o membro de ligação, as sequências de ácidos nucleicos, o vetor ou célula hospedeira podem ser combinados com um ou mais compostos terapeuticamente efetivos adicionais. Ou o dito composto pode ser capaz de romper a sinalização por meio do receptor de IL-1, ou alternativamente inibir um ou mais alvos diferentes tais como, por exemplo, outros mediadores de respostas inflamatória. Tal(is) composto(s) pode(m) ser administrado(s) simultânea ou sequencialmente.

[00166] Para aplicações terapêuticas, o anticorpo pode também ser radiomarcado ou ligado a uma toxina ou ligado a outra função efetora como descrita acima.

Aplicações de diagnóstico e/ou propósitos de detecção

[00167] O anticorpo da presente invenção pode ser usado para propósitos de detecção ou de diagnósticos *in vivo* e/ou *in vitro*. Por exemplo, uma gama extensiva de imunoensaios envolvendo anticorpos para detectar a expressão em células ou tecidos específicos é conhecida à pessoa versada. Igualmente, qualquer um dentre o membro de ligação, a sequência de ácidos nucleicos, o vetor e/ou a célula hospedeira previamente descritos pode ser usado consequentemente como detalhado nesta seção.

[00168] Para tais aplicações o anticorpo, membro de ligação, a sequência de ácidos nucleicos, o vetor ou a célula hospedeira revelados aqui podem ser marcados ou não marcados. Por exemplo, um anticorpo não marcado pode ser usado e detectado por um anticorpo secundário reconhecendo um epítopo no anticorpo descrito aqui.

[00169] Em outra modalidade o anticorpo, membro de ligação, sequência de ácidos nucleicos, vetor e/ou célula hospedeira são conjugados com uma ou mais substâncias que podem ser reconhecidas por uma(s) substância(s) de detector, por exemplo, o anticorpo que é conjugado com a biotina que pode ser detectada por estreptavidina. Igualmente, os ácidos nucleicos e/ou os vetores revelados aqui podem ser usados para propósitos de detecção ou de diagnósticos, por exemplo, usando fragmentos marcados dos mesmos como sondas em ensaios de hibridação.

[00170] Em certas modalidades, quaisquer das moléculas fornecidas aqui, em particular o anticorpo, são úteis para detectar a presença de IL-1 beta, preferivelmente incluindo IL-1 beta completa, fragmentos da mesma e/ou precursores da mesma, em uma amostra, preferivelmente amostra biológica. O termo "detectar" abrange detecção quantitativa e/ou qualitativa. Em certas modalidades uma amostra biológica compreende uma célula ou tecido de pacientes humanos. Exemplos não limitativos de amostras biológicas incluem sangue, urina, fluido cérebro-espinhal, biópsia, linfa e/ou tecidos de não sangue.

[00171] Em certas modalidades, o método compreende contatar a amostra biológica com um anticorpo anti-IL-1 beta como descrito aqui sob condições permissivas para ligação do anticorpo à IL-1 beta, se presente, e detectar se um complexo é formado entre o anticorpo e IL-1 beta. Tal método pode ser um método *in vitro* ou *in vivo*. Em uma modalidade, um anticorpo anti-IL-1 beta é usado para selecionar sujeitos elegíveis para terapia com o anticorpo descrito aqui, por

exemplo, onde IL-1 beta é um biomarcador para seleção de pacientes. Similarmente, em vez do anticorpo, tal método pode envolver o uso do membro de ligação acima ou um T-corpo descrito aqui.

[00172] Em outro aspecto, o anticorpo é usado em aplicações cosméticas, por exemplo, para melhorar a aparência estética da pele.

[00173] Em um aspecto adicional, um kit é fornecido compreendendo o anticorpo, uma combinação empacotada de reagentes com instruções para executar o ensaio de detecção ou de diagnóstico. Os reagentes são tipicamente fornecidos em quantidades predeterminadas de pós secos, usualmente liofilizados, incluindo excipientes que após dissolução fornecem uma solução de reagente tendo a concentração apropriada. Outros aditivos tais como estabilizantes e/ou tampões podem também ser incluídos. Se o anticorpo for marcado com uma enzima, o kit tipicamente incluirá os substratos e cofatores correspondentes. Igualmente, qualquer um dentre o membro de ligação, a sequência de ácidos nucleicos, o vetor e/ou a célula hospedeira previamente descritos pode ser usado consequentemente como detalhado nesta seção.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

[00174] As sequências reveladas aqui são:

[00175] SEQ ID N°: 1 - CDR1 de VH

FSLSSAAMA

[00176] SEQ ID N°: 2 - CDR2 de VH

IYDSASTYYASWAKG

[00177] SEQ ID N°: 3 - CDR3 de VH

ERAIFSGDFVL

[00178] SEQ ID N°: 4 - CDR1 de VL

QASQSIDNWLS

[00179] SEQ ID N°: 5 - CDR2 de VL

RASTLAS

[00180] SEQ ID Nº: 6 - CDR3 de VL

QNTGGGVSLA

[00181] SEQ ID Nº: 7 - VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGK
GLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDT
AVYYCARERAIFSGDFVLWGQGTLVTVSS

[00182] SEQ ID Nº: 8 - VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAP
KLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQ
NTGGGVSLAFGQGTKLTVLG

[00183] SEQ ID Nº: 9 - ligante

GGGGSGGGSGGGSGGGGS

[00184] SEQ ID Nº: 10 - DLX2323

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPK
LLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNT
GGGVSLAFGQGTKLTVLGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLVE
SGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKGLE
WVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVY
YCARERAIFSGDFVLWGQGTLVTVSS

[00185] SEQ ID Nº: 11 - variante de CDR de VH CDR1

FSLSXXAMA

[00186] SEQ ID Nº: 12 - variante de CDR de VH CDR2

IIXXSASTXYASWAKG

[00187] SEQ ID Nº: 13 - variante de CDR de VH CDR3

XXXXXXXXXXXX

[00188] SEQ ID Nº: 14 - variante de CDR de VL CDR1

QASQSIXXLS

[00189] SEQ ID Nº: 15 - variante de CDR de VL CDR2

XASXLAS

[00190] SEQ ID Nº: 16 - variante de CDR de VL CDR3

QNXGXXXXIA

[00191] SEQ ID Nº: 17 - sequência de DNA de DLX2323

GAAATTGTTATGACCCAGAGCCCGAGCACCCCTGAGCGCAAGCGTT
GGTGATCGTGTGATTATTACCTGTCAGGCAAGCCAGAGCATTGAT
AATTGGCTGAGCTGGTATCAGCAGAAACCGGGTAAAGCACCGAAA
CTGCTGATTTATCGTGCAAGCACCCCTGGCAAGCGGTGTTCCGAGC
CGTTTTAGCGGTAGCGGTAGTGGTGCAGAATTTACCCTGACCATT
AGCAGCCTGCAGCCGGATGATTTTGCAACCTATTATTGTCAGAATA
CCGGTGGTGGTGTAGCATTGCATTTGGTCAGGGCACCAAAGTGA
CCGTTCTGGGTGGTGGCGGTGGATCCGGTGGGGGTGGTAGCGG
AGGTGGTGGTTCAGGCGGTGGTGGCAGCGAAGTTCAGCTGGTTG
AAAGTGGTGGTGGTCTGGTTCAGCCTGGTGGTAGCCTGCGTCTG
AGCTGTACCGCAAGCGGTTTTAGCCTGAGCAGCGCAGCAATGGC
ATGGGTTCGTCAGGCACCTGGTAAAGGTCTGGAATGGGTGGTAT
TATCTATGATAGCGCAAGCACCTATTATGCAAGCTGGGCAAAAGG
TCGTTTTACCATTAGCCGTGATACCAGTAAAAATACCGTTTACCTG
CAGATGAATAGTCTGCGTGCAGAGGATACCGCAGTGTATTATTGT
GCACGTGAACGTGCAATTTTCAGCGGTGATTTTGTCTGTGGGGT
CAGGGAACCCTGGTTACCGTTAGCAGC

[00192] SEQ ID NO: 18 - FR-L1 de FW1.4

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC

[00193] SEQ ID NO: 19 - FR-L2 de FW1.4

WYQQKPGKAPKLLIY

[00194] SEQ ID NO: 20 - FR-L3 de FW1.4

GVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQPDDFATYYC

[00195] SEQ ID NO: 21 - FR-L4 de FW1.4

FGQGTKLTVLG

[00196] SEQ ID NO: 22 - FR-H1 de rFW1.4

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASG

[00197] SEQ ID NO: 23 - FR-H2 de rFW1.4

WVRQAPGKGLEWVG

[00198] SEQ ID NO: 24 - FR-H3 de rFW1.4

RFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

[00199] SEQ ID NO: 25 - FR-H4 de rFW1.4

WGQGTLVTVSS

[00200] SEQ ID NO: 26 - FR-H1 de rFW1.4(V2)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSG

[00201] SEQ ID NO: 27 - FR-H2 de rFW1.4(V2)

WVRQAPGKGLEWVG

[00202] SEQ ID NO: 28 - FR-H3 de rFW1.4(V2)

RFTISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

[00203] SEQ ID NO: 29 - FR-H4 de rFW1.4(V2)

WGQGTLVTVSS

[00204] SEQ ID NO: 30 - FR-H1 de rFW1.4-SST

EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCTASG

[00205] SEQ ID NO: 31 - FR-H2 de rFW1.4-SST

WVRQAPGKGLEWVG

[00206] SEQ ID NO: 32 - FR-H3 de rFW1.4-SST

RFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTASYCAR

[00207] SEQ ID NO: 33 - FR-H4 de rFW1.4-SST

WGQGTTVTVSS

[00208] SEQ ID NO: 34 - CDR-L1_D32X

EIVMTQSPSTLSASVGDRIITCQASQSIXNWLSWYQQKPGKAP

KLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYY

CQNTGGGVSIAGGQGTKLTVLGSGGGGGSGGGGGSGGGGG

SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKG

LEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTA

VYYCARERAIFSGDFVLWGQGTLVTVSS

[00209] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E),

fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W) e tirosina (Y).

[00210] SEQ ID NO: 35 - CDR-L1_N33X

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDXWLSWYQQKPGKAP
 KLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQ
 NTGGGVSIAGGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
 SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKG
 LEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRADTA
 VYYCARERAIFSGDFVLWGQGTLVTVSS

[00211] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W) e tirosina (Y).

[00212] SEQ ID NO: 36 - CDR-L1_W40X

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNXLSWYQQKPGKAPK
 LLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNT
 GGGVSIAGGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVE
 SGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKGLEWVGIIY
 DSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRADTAVYYCARE
 RAIFSGDFVLWGQGTLVTVSS

[00213] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), metionina (M), asparagina (N), glutamina (Q), serina (S), triptofano (W) e tirosina (Y).

[00214] SEQ ID NO: 37 - CDR-L2_R58X

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPK
 LLIYXASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNT
 GGGVSIAGGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVE
 SGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKGLE

WVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVY
YCARERAIFSGDFVLWGQGTLVTVSS

[00215] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), triptofano (W) e tirosina (Y).

[00216] SEQ ID NO: 38 - CDR-L2_T69X

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLL
IYRASXLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNT
GGGVSIAGGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVE
SGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKGLEWV
GIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYY
CARERAIFSGDFVLWGQGTLVTVSS

[00217] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W) e tirosina (Y).

[00218] SEQ ID NO: 39 - CDR-L3_T109X

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPK
LLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNXGG
GVSIAGGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESG
GGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKGLE
WVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVY
YCARERAIFSGDFVLWGQGTLVTVSS

[00219] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), cisteína (C), isoleucina (I), asparagina (N), serina (S), treonina (T) e valina (V).

[00220] SEQ ID NO: 40 - CDR-L3_G111X

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKA
 PKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNT
 GXGVSIAFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVE
 SGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGK
 GLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDT
 AVYYCARERAIFSGDFVLWGQGTLVTVSS

[00221] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), glicina (G), prolina (P) e serina (S).

[00222] SEQ ID NO: 41 - CDR-L3_G112X

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPK
 LLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNT
 GGXVSIAFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVE
 SGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKGLE
 WVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVY
 YCARERAIFSGDFVLWGQGTLVTVSS

[00223] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W) e tirosina (Y).

[00224] SEQ ID NO: 42 - CDR-L3_V135X

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLL
 IYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNT
 GGGXSIAFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVE
 SGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKGLE
 WVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVY
 YCARERAIFSGDFVLWGQGTLVTVSS

[00225] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina

(L), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W) e tirosina (Y).

[00226] SEQ ID NO: 43 - CDR-L3_S136X

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPK
LLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQ
NTGGGVXIAFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKG
LEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTA
VYYCARERAIFSGDFVLWGQGTLVTVSS

[00227] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W) e tirosina (Y).

[00228] SEQ ID NO: 44 - CDR-H1_S33X

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPK
LLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQ
NTGGGVXIAFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSXAAMAWVRQAPGKG
LEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTA
VYYCARERAIFSGDFVLWGQGTLVTVSS

[00229] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W) e tirosina (Y).

[00230] SEQ ID NO: 45 - CDR-H1_A39X

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPK
LLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNT
GGGVXIAFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVE

SGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSXAMAWVRQAPGKGLE
 WVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVY
 YCARERAIFSGDFVLWGQGTLVTVSS

[00231] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W) e tirosina (Y).

[00232] SEQ ID NO: 46 - CDR-H2_Y59X
 EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLI
 YRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNTGGG
 VSIAFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG
 GLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSA
 STYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARERAIF
 SGDFVLWGQGTLVTVSS

[00233] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), cisteína (C), glicina (G), metionina (M) e tirosina (Y).

[00234] SEQ ID NO: 47 - CDR-H2_D60X
 EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPK
 LLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNT
 GGGVSIAFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVE
 SGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKGL
 EWVGIIYXSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAV
 YYCARERAIFSGDFVLWGQGTLVTVSS

[00235] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em ácido aspártico (D), asparagina (N) e prolina (P).

[00236] SEQ ID NO: 48 - CDR-H2_Y69X
 EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPK
 LLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQ
 NTGGGVSIAFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGG

SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKG
LEWVGIIYDSASTXYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTA
VYYCARERAIFSGDFVLWGQGTLVTVSS

[00237] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), glicina (G), fenilalanina (F), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), prolina (P), asparagina (N), serina (S), treonina (T), triptofano (W) e tirosina (Y).

[00238] SEQ ID NO: 49 - CDR-H3_R110X

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPK
LLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNT
GGGVSIAGGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVE
SGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKGLE
WVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVY
YCAREXAIFSGDFVLWGQGTLVTVSS

[00239] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W) e tirosina (Y).

[00240] SEQ ID NO: 50 - CDR-H3_A111X

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLI
YRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNT
GGGVSIAGGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVE
SGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKGLEWV
GIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RERXIFSGDFVLWGQGTLVTVSS

[00241] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), cisteína (C), ácido aspártico (D), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), metionina (M), asparagina (N),

prolina (P), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W) e tirosina (Y).

[00242] SEQ ID NO: 51 - CDR-H3_I112X

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLL
IYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNTGGG
VSIAFGQGKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG
GLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKGLEWV
GIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RERAXFSGDFVLWGQGTLVTVSS

[00243] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), cisteína (C), fenilalanina (F), histidina (H), isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), glutamina (Q), serina (S), treonina (T), valina (V) e tirosina (Y).

[00244] SEQ ID NO: 52 - CDR-H3_F113X

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPK
LLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNT
GGGVSIAGQGKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVE
SGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKGL
EWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAV
YYCARERAIXSGDFVLWGQGTLVTVSS

[00245] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em fenilalanina (F) e isoleucina (I).

[00246] SEQ ID NO: 53 - CDR-H3_S114X

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPK
LLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQ
NTGGGVSIAGQGKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGK
LEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTA
VYYCARERAIFXGDFVLWGQGTLVTVSS

[00247] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em

alanina (a), cisteína (C), ácido glutâmico (E), glicina (G), serina (S), treonina (T) e valina (V).

[00248] SEQ ID NO: 54 - CDR-H3_G115X

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPK
LLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNT
GGGVSI AFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVE
SGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKGLEWVGIIY
DSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARE
RAIFSXDFVLWGQGTLVTVSS

[00249] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), glicina (G), metionina (M) e asparagina (N).

[00250] SEQ ID NO: 55 - CDR-H3_D135X

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLL
IYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNTGGG
VSIAFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG
GLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSA
STYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARERAIF
SGXFVLWGQGTLVTVSS

[00251] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), histidina (H), asparagina (N), serina (S) e treonina (T).

[00252] SEQ ID NO: 56 - CDR-H3_F136X

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPK
LLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNT
GGGVSI AFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVE
SGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKGLE
WVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVY
YCARERAIFSGDXVLWGQGTLVTVSS

[00253] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), cisteína (C), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H),

isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), glutamina (Q), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W) e tirosina (Y).

[00254] SEQ ID NO: 57 - CDR-H3_V137X

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASG
VPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNTGGGVSIAGQGQTKLTVLGGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMA
WVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRADT
AVYYCARERAIFSGDFXLWGQGTLVTVSS

[00255] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W) e tirosina (Y).

[00256] SEQ ID NO: 58 - CDR-H3_L138X

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASG
VPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNTGGGVSIAGQGQTKLTVLGGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMA
WVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRADT
AVYYCARERAIFSGDFVXWGQGTLVTVSS

[00257] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W) e tirosina (Y).

[00258] SEQ ID NO: 59 - DLX2464

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASG
VPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNTGGGVSIAGQGQTKLTVLGGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMA
WVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRADT
AVYYCARERQIFSGDMAGWGQGTLVTVSS

[00259] SEQ ID NO: 60 - DLX2465

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASG
VPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNTGGGVSIAGQGQTKLTVLGGGG

GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMA
WVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDT
AVYYCARERNIFSGDMDLWGQGTLLTVSS

[00260] SEQ ID NO: 61 - DLX2466

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASQSIGKYLWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASG
VPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNAGGGVSIAGGQGTLLTVLGGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMA
WVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQ
MNSLRAEDTAVYYCARERNIFSGDMAGWGQGTLLTVSS

[00261] SEQ ID NO: 62 - DLX2467

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASQSIHNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASNLASG
VPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNTGGGSSIAFGGQGTLLTVLGGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSRAAMA
WVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDT
AVYYCARERMIFSGDFVLWGQGTLLTVSS

[00262] SEQ ID NO: 63 - DLX2468

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASQSIGNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASG
VPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNTGGGVHIAFGGQGTLLTVLGGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMA
WVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVY
LQMNSLRAEDTAVYYCARERNIFSGDMVLWGQGTLLTVSS

[00263] SEQ ID NO: 64 - DLX2475

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASQSIDKWLSWYQQKPGKAPKLLIYQASTLASG
VPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNTGGGVHIAFGGQGTLLTVLGGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMA
WVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYL
QMNSLRAEDTAVYYCARERAIFSGDFKLWGQGTLLTVSS

[00264] SEQ ID NO: 65 - DLX2476

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASQSISSWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASG
VPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNTGGGVSIAGGQGTLLTVLGGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMA
WVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDT
AVYYCARERDIFSGDFVWGQGTLLTVSS

[00265] SEQ ID NO: 66 - DLX2480

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASG

VPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDFATYYCQNTGGGINIAFGQGTKLTVLGGGGG
SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAW
VRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTA
VYYCARERQIFSGDFVLWGQGTLVTVSS

[00266] SEQ ID NO: 67 - DLX2543

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITTCQASQSISSWLSWYQQKPGKAPKLLIYKAS
TLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYCQNAGGGVSIAGQGKT
KLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC
TASGFSLSAAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDT
TSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARERAIFSGDFVLWGQGTLVTVSS

[00267] SEQ ID NO: 68 - DLX2529

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITTCRASQSIGNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASNLASG
VPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPEDFATYYCQNTGGGINIAFGQGTKLTVLGGGGG
SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAW
VRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTA
VYYCARERAIFSGDFVLWGQGTLVTVSS

[00268] SEQ ID NO: 69 - DLX2547

ADIVMTQSPSTLSASVGDRVITTCQASQSISSYLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTL
ASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDFATYYCQNTGGGINIAFGQGKTLE
IKRGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLS
SAAMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYL
QMNSLRAEDTAVYYCARERAIFSGDFVLWGQGTLVTVSS

[00269] SEQ ID NO: 70 - DLX2528

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITTCQASQSIGNWLAWYQQKPGKAPKLLIYQASNLAS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPDDFATYYCQNAGGATTIAFGQGTKLTVLGGG
GGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAM
AWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAED
TAVYYCARERAIFSGDFVLWGQGTLVTVSS

[00270] SEQ ID NO: 71 - DLX2585

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITTCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASG
VPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDFATYYCQNTGGGVSIAGQGKTCLTVLGGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLSSYAMS
WVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISKDTSKNTVY
LQMNSLRAEDTAVYYCARERAIFSGDFDYWGQGTLVTVSS

[00271] SEQ ID NO: 72 - DLX2545

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASG
VPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNTGGGVSIAGGQGTKLTVLGGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMA
WVRQAPGKGLEWIGIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTA
VYFCARERNIFSGDMVLWGQGTTTVTVSS

[00272] SEQ ID NO: 73 - DLX2531

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASG
VPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNTGGGVSIAGGQGTKLTVLGGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGNVQPGGSLRLSCTASGFSLSNSAMA
WVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDT
ATYYCARERAIFSGDFALWGQGTTLTVTVSS

[00273] SEQ ID NO: 74 - DLX2586

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASG
VPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNTGGGVSIAGGQGTKLTVLGGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLSSYAMS
WVRQAPGKGLEWIGIYDSASTYYASWAKGRFTISKDTSKNTVYL
QMNSLRAEDTAVYFCARERQIFSGDMDGWGQGTTLTVTVSS

[00274] SEQ ID NO: 75 - DLX2530

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASG
VPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNTGGGVSIAGGQGTKLTVLGGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGNVQPGGSLRLSCTASGFSLSDAAMA
WVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTFYASWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT
ATYYCARERNIFSGDMALWGQGTTTVTVSS

[00275] SEQ ID NO: 76 - DLX2548

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASG
VPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNTGGGVSIAGGQGTKLTVLGGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLSSYAMS
WVRQAPGKGLEWIGIYDSASTYYASWAKGRFTISKDTSKNTLYL
QMNSLRAEDTAVYFCARERQIFSGDMDGWGQGTTLTVTVSS

[00276] SEQ ID NO: 77 - DLX2676

EIVMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSIGNWLAWYQQKPGKAPKLLIYQASNLAS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPDFFATYYCQNAAGGATTIAGGQGTKLTVLGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGNVQPGGSLRLSCTASGFSLSDAAM
AWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTFYASWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED
TATYYCARERNIFSGDMALWGQGTTTVTVSS

[00277] SEQ ID NO: 78 - DLX2677

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASQSIGNWLAWYQQKPGKAPKLLIYQASNLAS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPDDFATYYCQNAGGATTIAFGQGTKLTVLGGG
GGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGNVQPGGSLRLSCTASGFSLSNSAM
AWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDNKNTVY
LQMNSLRAEDTATYYCARERAIFSGDFALWGQGTLVTVSS

[00278] SEQ ID NO: 79 - DLX2678

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASQSIGNWLAWYQQKPGKAPKLLIYQASNLAS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPDDFATYYCQNAGGATTIAFGQGTKLTVLGGG
GGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLSSYAM
SWVRQAPGKGLEWIGIIYDSASTYYASWAKGRFTISKDTSKNTL
YLQMNSLRAEDTAVYFCARERQIFSGDMDGWGQGTTVTVSS

[00279] SEQ ID NO: 80 - DLX2679

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASQSIGNWLAWYQQKPGKAPKLLIYQASNLAS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPDDFATYYCQNAGGATTIAFGQGTKLTVLGGG
GGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLSSYAM
SWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISKDTSKNTVYL
QMNSLRAEDTAVYYCARERAIFSGDFDYWGQGTLVTVSS

[00280] SEQ ID NO: 81 - DLX2680

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCRASQSIGNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASNLASG
VPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQPEDFATYYCQNTGGGINIAFGQGTKLTVLGGGGG
SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGNVQPGGSLRLSCTASGFSLSDAAMAW
VRQAPGKGLEWVGIIYDSASTFYASWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAT
YYCARERNIFSGDMALWGQGTTVTVSS

[00281] SEQ ID NO: 82 - DLX2681

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCRASQSIGNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASNLASG
VPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQPEDFATYYCQNTGGGINIAFGQGTKLTVLGGGGG
SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGNVQPGGSLRLSCTASGFSLSNSAMAW
VRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDNKNTVYL
QMNSLRAEDTATYYCARERAIFSGDFALWGQGTLVTVSS

[00282] SEQ ID NO: 83 - DLX2682

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCRASQSIGNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASNLASG
VPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQPEDFATYYCQNTGGGINIAFGQGTKLTVLGGGGG
SGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLSSYAMSW
VRQAPGKGLEWIGIIYDSASTYYASWAKGRFTISKDTSKNTLYL

QMNSLRAEDTAVYFCARERQIFSGDMDGWGQGTTVTVSS

[00283] SEQ ID NO: 84 - DLX2683

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCRASQSIGNWLSWYQQKPGKAPKLL
IYRASNLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPEDFATYYCQNTGGGI
NIAFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGG
LVQPGGSLRLSCTVSGFSLSSYAMSWVRQAPGKGLEWVGII
YDSASTYYASWAKGRFTISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARE
RAIFSGDFDYWGQGTLVTVSS

[00284] SEQ ID NO: 85 - DLX2684

EIVMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSISSWLSWYQQKPGKAPKLLI
YKASTLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQNAGGG
VSIAFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG
GNVQPGGSLRLSCTASGFSLSDAAMAWVRQAPGKGLEWVGII
YDSASTFYASWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCARE
RNIFSGDMALWGQGTTVTVSS

[00285] SEQ ID NO: 86 - DLX2685

EIVMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSISSWLSWYQQKPGKAPKLLI
YKASTLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQNAGGG
VSIAFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG
GNVQPGGSLRLSCTASGFSLSNSAMAWVRQAPGKGLEWVGII
YDSASTYYASWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCAR
ERAIFSGDFALWGQGTLVTVSS

[00286] SEQ ID NO: 87 - DLX2686

EIVMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSISSWLSWYQQKPGKAPKLLI
YKASTLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQNAGGG
VSIAFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG
GLVQPGGSLRLSCTVSGFSLSSYAMSWVRQAPGKGLEWIGIIYD
SASTYYASWAKGRFTISKDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARERQ
IFSGDMDGWGQGTTVTVSS

[00287] SEQ ID NO: 88 - DLX2687

EIVMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSISSWLSWYQQKPGKAPKLLI

YKASTLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQNAGGG
VSIAFGQGKTLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG
GLVQPGGSLRLSCTVSGFSLSSYAMSWVRQAPGKGLEWVGII
YDSASTYYASWAKGRFTISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARE
RAIFSGDFDYWGQGTLVTVSS

[00288] SEQ ID NO: 89 - DLX2689

ADIVMTQSPSTLSASVGDRVITTCQASQSISSYLSWYQQKPGKAPK
LLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQNA
GGGINIAFGQGKTKVEIKRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES
GGGNVQPGGSLRLSCTASGFSLSNSAMAWVRQAPGKGLEWV
GIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCA
RERAIIFSGDFALWGQGTLVTVSS

[00289] SEQ ID NO: 90 - DLX2690

ADIVMTQSPSTLSASVGDRVITTCQASQSISSYLSWYQQKPGKAPK
LLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQNA
GGGINIAFGQGKTKVEIKRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES
GGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLSSYAMSWVRQAPGKGLEWIGIIYD
SASTYYASWAKGRFTISKDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARERQ
IFSGDMDGWGQGTTVTVSS

[00290] SEQ ID NO: 91 - DLX2691

ADIVMTQSPSTLSASVGDRVITTCQASQSISSYLSWYQQKPGKAPK
LLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQNA
GGGINIAFGQGKTKVEIKRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES
GGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLSSYAMSWVRQAPGKGLE
WVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVY
YCARERAIIFSGDFDYWGQGTLVTVSS

[00291] SEQ ID NO: 92 - DLX2692

ADIVMTQSPSTLSASVGDRVITTCQASQSISSYLSWYQQKPGKAPK
LLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQNT
GGGINIAFGQGKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES

GGGNVQPGGSLRLSCTASGFSLSDAAMAWVRQAPGKGLE
 WVGIIYDSASTFYASWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTATY
 YCARERNIFSGDMALWGQGTTVTVSS

[00292] SEQ ID NO: 93 - DLX2693

ADIVMTQSPSTLSASVGDRVITITCQASQSISSYLSWYQQKPGKAPK
 LLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNT
 GGGINIAFGQGKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES
 GGGNVQPGGSLRLSCTASGFSLSNSAMAWVRQAPGKGLE
 WVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTATY
 YCARERAIFSGDFALWGQGTTLVTVSS

[00293] SEQ ID NO: 94 - DLX2694

ADIVMTQSPSTLSASVGDRVITITCQASQSISSYLSWYQQKPGKAPK
 LLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNT
 GGGINIAFGQGKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES
 GGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLSSYAMSWVRQAPGKGLEWIGIIYD
 SASTYYASWAKGRFTISKDT SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARERQ
 IFSGDMDGWGQGTTVTVSS

[00294] SEQ ID NO: 95 - DLX2695

ADIVMTQSPSTLSASVGDRVITITCQASQSISSYLSWYQQKPGKAPK
 LLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNT
 GGGINIAFGQGKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES
 GGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLSSYAMSWVRQAPGKGLE
 WVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISKDT SKNTVYLQMNSLRAEDTAVY
 YCARERAIFSGDFDYWGQGTTLVTVSS

[00295] SEQ ID NO: 96 - de VL CDR-L1_D32X

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIXNWLSWYQQKPGKAPK
 LLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNT
 GGGVSIAFGQGKLTVLG

[00296] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E),

fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W) e tirosina (Y).

[00297] SEQ ID NO: 97 - CDR-L1_N33X de VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDXWLSWYQQKPGKAPKLLI
YRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNTGGG
VSIAFGQGTLTVLG

[00298] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W) e tirosina (Y).

[00299] SEQ ID NO: 98 - CDR-L1_W40X de VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNXLSWYQQKPGKAPKLLI
YRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNTGGG
VSIAFGQGTLTVLG

[00300] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), metionina (M), asparagina (N), glutamina (Q), serina (S), triptofano (W) e tirosina (Y).

[00301] SEQ ID NO: 99 - CDR-L2_R58X de VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLI
YXASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNTGGG
VSIAFGQGTLTVLG

[00302] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), triptofano (W) e tirosina (Y).

[00303] SEQ ID NO: 100 - CDR-L2_T69X de VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLI

YRASXLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQNTGGG
VSIAFGQGKLTVLG

[00304] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W) e tirosina (Y).

[00305] SEQ ID NO: 101 - CDR-L3_T109X de VL
EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLI
YRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQNXGGG
VSIAFGQGKLTVLG

[00306] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), cisteína (C), isoleucina (I), asparagina (N), serina (S), treonina (T) e valina (V).

[00307] SEQ ID NO: 102 - CDR-L3_G111X de VL
EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLI
YRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQNTGXGV
SIAFGQGKLTVLG

[00308] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), glicina (G), prolina (P) e serina (S).

[00309] SEQ ID NO: 103 - CDR-L3_G112X de VL
EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLI
YRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQNTGG
XVSIAFGQGKLTVLG

[00310] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W) e tirosina (Y).

[00311] SEQ ID NO: 104 - CDR-L3_V135X de VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLI
YRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQNTGGG
XSIAFGQGTLTVLG

[00312] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W) e tirosina (Y).

[00313] SEQ ID NO: 105 - CDR-L3_S136X de VL
EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLI
YRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQNTGGG
VXIAFGQGTLTVLG

[00314] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W) e tirosina (Y).

[00315] SEQ ID NO: 106 - CDR-H1_S33X de VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLXAAMAWVRQAPGKG
LEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLR AEDT
AVYYCARERAIFSGDFVLWGQGTLTVSS

[00316] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W) e tirosina (Y).

[00317] SEQ ID NO: 107 - CDR-H1_A39X de VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSSXAMAWVRQAPGKG
LEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLMNSLR AEDT
AVYYCARERAIFSGDFVLWGQGTLTVSS

[00318] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W) e tirosina (Y).

[00319] SEQ ID NO: 108 - CDR-H2_Y59X de VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKG
LEWVGIIKDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRADT
AVYYCARERAIFSGDFVLWGQGTLVTVSS

[00320] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), cisteína (C), glicina (G), metionina (M) e tirosina (Y).

[00321] SEQ ID NO: 109 - CDR-H2_D60X de VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGK
GLEWVGIIYXSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRADT
AVYYCARERAIFSGDFVLWGQGTLVTVSS

[00322] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em ácido aspártico (D), asparagina (N) e prolina (P).

[00323] SEQ ID NO: 110 - CDR-H2_Y69X de VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGK
GLEWVGIIYDSASTXYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRADT
AVYYCARERAIFSGDFVLWGQGTLVTVSS

[00324] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), glicina (G), fenilalanina (F), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), prolina (P), asparagina (N), serina (S), treonina (T), triptofano (W) e tirosina (Y).

[00325] SEQ ID NO: 111 - CDR-H3_R110X de VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKG
LEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRADT
AVYYCAREXAIFSGDFVLWGQGTLVTVSS

[00326] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W) e tirosina (Y).

[00327] SEQ ID NO: 112 - CDR-H3_A111X de VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGK
GLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDT
AVYYCARERXIFSGDFVLWGQGTLVTVSS

[00328] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), cisteína (C), ácido aspártico (D), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W) e tirosina (Y).

[00329] SEQ ID NO: 113 - CDR-H3_I112X de VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKGL
EWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAV
YYCARERAXFSGDFVLWGQGTLVTVSS

[00330] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), cisteína (C), fenilalanina (F), histidina (H), isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), glutamina (Q), serina (S), treonina (T), valina (V) e tirosina (Y).

[00331] SEQ ID NO: 114 - CDR-H3_F113X de VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGK
GLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDT
AVYYCARERAIXSGDFVLWGQGTLVTVSS

[00332] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em fenilalanina (F) e isoleucina (I).

[00333] SEQ ID NO: 115 - CDR-H3_S114X de VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGK

GLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDT
AVYYCARERAIFXGDFVLWGQGTLVTVSS

[00334] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), cisteína (C), ácido glutâmico (E), glicina (G), serina (S), treonina (T) e valina (V).

[00335] SEQ ID NO: 116 - CDR-H3_G115X de VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKGL
EWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAV
YYCARERAIFSXDFVLWGQGTLVTVSS

[00336] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), glicina (G), metionina (M) e asparagina (N).

[00337] SEQ ID NO: 117 - CDR-H3_D135X de VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPG
KGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAED
TAVYYCARERAIFSGXFVLWGQGTLVTVSS

[00338] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), histidina (H), asparagina (N), serina (S) e treonina (T).

[00339] SEQ ID NO: 118 - CDR-H3_F136X de VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKGL
EWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAV
YYCARERAIFSGDXVLWGQGTLVTVSS

[00340] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), cisteína (C), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), glutamina (Q), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W) e tirosina (Y).

[00341] SEQ ID NO: 119 - CDR-H3_V137X de VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKGL
EWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAV
YYCARERAIFSGDFXLWGQGTLVTVSS

[00342] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W) e tirosina (Y).

[00343] SEQ ID NO: 120 - CDR-H3_L138X de VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKG
LEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTA
VYYCARERAIFSGDFVXWGQGTLVTVSS

[00344] Preferivelmente, X é selecionado do grupo que consiste em alanina (a), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), valina (V), triptofano (W) e tirosina (Y).

[00345] SEQ ID NO: 121 - DLX2464 de VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKG
LEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTA
VYYCARERQIFSGDMAGWGQGTLVTVSS

[00346] SEQ ID NO: 122 - DLX2465 de VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGK
GLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDT
AVYYCARERNIFSGDMDLWGQGTLVTVSS

[00347] SEQ ID NO: 123 - DLX2466 de VL
EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIGKYLSWYQQKPGKAPK
LLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDFFATYYCQNA
GGGVSIAFGQGTKLTVLG

[00348] SEQ ID NO: 124 - DLX2466 de VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSSDAMAWVRQAPGKG
LEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTA
VYYCARERNIFSGDMAGWGQGTLVTVSS

[00349] SEQ ID NO: 125 - DLX2467 de VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIHNWLSWYQQKPGKAPK
LLIYRASNLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQNT
GGGSSIAFGQGTKLTVLG

[00350] SEQ ID NO: 126 - DLX2467 de VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLRAAMAWVRQAPGK
GLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDT
AVYYCARERMIFSGDFVLWGQGTLVTVSS

[00351] SEQ ID NO: 127 - DLX2468 de VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIGNYLSWYQQKPGKAPKLLI
YRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQNAGGGT
SIAFGQGTKLTVLG

[00352] SEQ ID NO: 128 - DLX2468 de VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSSSAMAWVRQAPGK
GLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDT
AVYYCARERNIFSGDMVLWGQGTLVTVSS

[00353] SEQ ID NO: 129 - DLX2475 de VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDKWLSWYQQKPGKAPKLLI
YQASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQNTGGG
VHIAFGQGTKLTVLG

[00354] SEQ ID NO: 130 - DLX2475 de VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSSYAMAWVRQAPGKG
LEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTA
VYYCARERAIFSGDFKLWGQGTLVTVSS

[00355] SEQ ID NO: 131 - DLX2476 de VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSISSWLSWYQQKPGKAPKLLI
YRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQNTGGG
VSIAFGQGTKLTVLG

[00356] SEQ ID NO: 132 - DLX2476 de VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSSAMAWVRQAPGK

GLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDT
AVYYCARERDIFSGDFVGWGQGTLTVSS

[00357] SEQ ID NO: 133 - DLX2480 de VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLWSWYQQKPGKAPK
LLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQ
NTGGGINIAFGQGTKLTVLG

[00358] SEQ ID NO: 134 - DLX2480 de VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGK
GLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDT
AVYYCARERQIFSGDFVLWGQGTLTVSS

[00359] SEQ ID NO: 135 - DLX2543 de VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSISSWLWSWYQQKPGKAPK
LLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQNA
GGGVSIAGQGTKLTVLG

[00360] SEQ ID NO: 136 - DLX2529 de VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCRASQSIGNWLWSWYQQKPGKAPKLLI
YRASNLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPEDFATYYCQNTGGGI
NIAFGQGTKLTVLG

[00361] SEQ ID NO: 137 - DLX2547 de VL

ADIVMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSISSYLSWYQQKPGKAPK
LLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQNT
GGGINIAFGQGTKLEIKR

[00362] SEQ ID NO: 138 - DLX2547 de VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGK
GLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDT
AVYYCARERAIFSGDFVLWGQGTLTVSS

[00363] SEQ ID NO: 139 - DLX2528 de VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSIGNWLAWYQQKPGKAPKLLI
YQASNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPDDEFATYYCQNAGGAT
TIAFGQGTKLTVLG

[00364] SEQ ID NO: 140 - DLX2528 de VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGK
GLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDT
AVYYCARERAIFSGDFVLWGQGTLVTVSS

[00365] SEQ ID NO: 141 - DLX2585 de VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLI
YRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQNTGGG
VSIAFGQGTKLTVLG

[00366] SEQ ID NO: 142 - DLX2585 de VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLSYAMSWVRQAPGK
GLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDT
AVYYCARERAIFSGDFDYWGQGTLVTVSS

[00367] SEQ ID NO: 143 - DLX2545 de VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPK
LLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQNT
GGGVSIAGQGTKLTVLG

[00368] SEQ ID NO: 144 - DLX2545 de VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKG
LEWIGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAV
YFCARERNIFSGDMVLWGQGTTVTVSS

[00369] SEQ ID NO: 145 - DLX2531 de VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLI
YRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQNTGGG
VSIAFGQGTKLTVLG

[00370] SEQ ID NO: 146 - DLX2531 de VH

EVQLVESGGGNVQPGGSLRLSCTASGFSLSNSAMAWVRQAPGK
GLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDT
ATYYCARERAIFSGDFALWGQGTLVTVSS

[00371] SEQ ID NO: 147 - DLX2586 de VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPK

LLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQNT
GGGVSIAGGQGTKLTVLG

[00372] SEQ ID NO: 148 - DLX2586 de VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLSSYAMSWVRQAPGKG
LEWIGIIYDSASTYYASWAKGRFTISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAV
YFCARERQIFSGDMDGWGQGTLTVTVSS

[00373] SEQ ID NO: 149 - DLX2530 de VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPK
LLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQNT
GGGVSIAGGQGTKLTVLG

[00374] SEQ ID NO: 150 - DLX2530 de VH

EVQLVESGGGNVQPGGSLRLSCTASGFSLSDAAMAWVRQAPGK
GLEWVGIIYDSASTFYASWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT
ATYYCARERNIFSGDMALWGQGTTVTVSS

[00375] SEQ ID NO: 151 - DLX2548 de VL

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLI
YRASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISLQPDDEFATYYCQNTGGG
VSIAFGGQGTKLTVLG

[00376] SEQ ID NO: 152 - DLX2548 de VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLSSYAMSWVRQAPGKG
LEWIGIIYDSASTYYASWAKGRFTISKDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAV
YFCARERQIFSGDMDGWGQGTTVTVSS

[00377] SEQ ID NO: 153 DLX2544- de VL

ADIVMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSISSYLSWYQQKPGKAPK
LLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQNA
GGGINIAFGGQGTKVEIKR

[00378] SEQ ID NO: 154 - DLX2544

ADIVMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSISSYLSWYQQKPGKAPK
LLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQNA
GGGINIAFGGQGTKVEIKRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES

GGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSAAMAWVRQAPGKGLEWV
 GIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCA
 RERAIFSGDFVLWGQGTLVTVSS

[00379] SEQ ID NO: 155 - CDR-H1 de DLX2531

FSLSNSAMA

[00380] SEQ ID NO: 156 - CDR-H2 de DLX2531

IIYDSASTYYASWAKG

[00381] SEQ ID NO: 157 - CDR-H3 de DLX2531

ERAIFSGDFAL

[00382] SEQ ID NO: 158 - CDR-L1 de DLX2531

QASQSIDNWLS

[00383] SEQ ID NO: 159 - CDR-L2 de DLX2531

RASTLAS

[00384] SEQ ID NO: 160 - CDR-L3 de DLX2531

QNTGGGVSA

[00385] SEQ ID NO: 161 - CDR-L1 de DLX2681

RASQSIGNWLS

[00386] SEQ ID NO: 162 - CDR-L2 de DLX2681

RASNLAS

[00387] SEQ ID NO: 163 - CDR-L3 de DLX2681

QNTGGGINIA

EXEMPLOS

Exemplo 1 - Identificação de scFv neutralizante de rhIL-1 beta

[00388] Imunização dos coelhos: Coelhos foram imunizados com proteína de IL-1 beta humana recombinante (Peprotech, EUA, no. cat. 200-01B). Linfonodos e células de baço foram isolados após reforço final e as células foram criopreservadas.

[00389] Classificação por citometria de fluxo das células B de coelho e cultivo: células B de memória IL-1 beta-específicas foram classificadas como células simples em microplacas de 96 poços usando FACSAria III

(BD Biosciences). Os clones das células B simples foram cultivados na presença das células nutrientes.

[00390] Triagem dos clones de células B: Os sobrenadantes da cultura celular foram analisados por ELISA para a presença de IgGs anti-IL-1 beta-específicas. Brevemente, rhIL-1 beta (Peprotech, no. cat. 200-01B) foi revestida a uma concentração de 2 mcg/ml durante a noite a 4°C em microplacas de 96 poços Maxisorp em PBS. Após bloquear com 5% de leite em pó desnatado, os sobrenadantes da cultura celular foram adicionados. IgGs de IL-1 beta-específicas foram detectadas por IgG-HRP de antiovelho (Southern Biotech, no. cat. 4050-05). O ELISA foi desenvolvido com substrato BM Blue POD (Roche Applied Science). Os clones de células B específicos para rhIL-1 beta foram ainda analisados para sua capacidade de neutralização em um ensaio de fibroblasto humano.

[00391] Sequenciação das IgGs neutralizantes de IL-1 beta: todos os clones de células B de coelho produzindo anticorpos de anti-IL-1 beta foram submetidos ao isolamento de mRNA usando o RNeasy Mini Kit (Qiagen Alemanha, no. cat. 74106). mRNA foi usado como molde para transcrição reversa de acordo com o protocolo de fabricação (OneStep RT-PCR Kit, Qiagen Alemanha, no. cat. 210212). Subsequentemente, as reações de PCR usando oligonucleotídeos para especificamente amplificar as sequências de codificação de cadeias pesada e leve de IgG de coelho foram realizadas (Biometra Thermocycler T3). Os fragmentos de PCR de cadeias pesada e leve foram independentemente sequenciados (ABI, Sanger 3730xl; Microsynth AG, Balgach, Suíça), e as sequências de DNA obtidas foram traduzidas em sequências de proteína usando EMBOSS Transeq (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/>) e alinhadas usando CLUSTALW2 ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2 /](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)).

[00392] Construção dos genes de scFv de anti-IL-1 beta, e

expressão da proteína de scFv: Regiões de CDR de IgG de coelho das cadeias leve e pesada como definidas acima foram identificadas e enxertadas nas estruturas de acceptor das cadeias leve e pesada humanas compreendendo SEQ ID N^{os}.: 18-21 e 22-25, respectivamente. Os vetores de expressão bacterianos foram gerados codificando as proteínas de scFv com a cadeia leve variável N-terminal ligada pela sequência SEQ ID N^o: 9 à cadeia pesada variável C-terminal. As proteínas de ScFv foram expressas em BL21 de *E. coli* (DE3); Novagen, EUA, no. cat. 69450-3) como corpos de inclusão que foram purificados, solubilizados e as proteínas foram redobradas. Os scFvs redobrados foram purificados por cromatografia de exclusão de tamanho padrão e as frações de pico monoméricas foram colhidas. ScFvs purificados foram analisados para ligação de IL-1 beta por ELISA. ScFv que foram constatados especificamente ligar-se a rhIL-1 beta foram testados para neutralização de IL-1 beta em um ensaio de fibroblasto humano. Por este procedimento, o scFv DLX2323 e outros scFvs de anti-IL-1 beta foram identificados como inibidores potentes de IL-1 beta.

Exemplo 2 - Reconhecimento de IL-1 beta humana

[00393] Primeiramente, o reconhecimento específico de rhIL-1 beta por DLX2323 foi confirmado por ELISA (figura 1). Brevemente, rhIL-1 beta (Peprotech, no. cat. 200-01B) foi revestido a uma concentração de 2 mcg/ml durante a noite a 4°C em microplacas de 96 poços Maxisorp em PBS. Após bloquear com 5% de leite em pó desnatado, concentrações crescentes de scFvs (10 a 300 ng/ml) foram adicionadas, e os scFvs foram detectados através de Protein L-HRP (Sigma-Aldrich, no. cat. P3226). O ELISA foi desenvolvido com BM substrato de VAGEM Azul (Roche Applied Science). Como um controle negativo, scFv de especificidade irrelevante foi usado. Este resultado mostra que DLX2323 especificamente liga-se à rhIL-1 beta.

[00394] Para confirmar que DLX2323 e o scFv de controle foram reconhecidos através de Protein L-HRP e, desse modo, uma falta de sinal para ligação de rhIL-1 beta no ELISA acima não foi devido a um problema de detecção, outro experimento foi conduzido. Os scFvs foram revestidos diretamente na placa e detectados através de Protein L-HRP como descrito acima. Todos os scFvs foram revestidos a uma concentração de 2 mcg/ml em PBS. Este experimento de ELISA mostrou que DLX2323 e o scFv de controle são reconhecidos pelo agente de detecção Protein L-HRP.

[00395] Em outro ELISA (figura 2), o reconhecimento de IL-1 beta natural humana por DLX2323 foi confirmado. Como comumente conhecido, a expressão de proteínas humanas em células diferentes de células humanas poderia causar alterações, por exemplo, em modificações pós-translacionais e/ou conformação. Isto poderia conduzir a um diferencial de reconhecimento das proteínas recombinantes e naturais pelos anticorpos. IL-1 beta natural humana foi segregada através de células THP-1 (DSMZ Alemanha, no. cat. ACC 16) após estimulação com 10 ng/ml de PMA (Sigma-Aldrich, no. cat. P1585), 1 mg/ml de LPS (Sigma-Aldrich, no. cat. L4391) e 2 mM de ATP (Sigma-Aldrich, no. cat. A6559-25UMO). Os sobrenadantes celulares foram colhidos e IL-1 beta natural humana segregada foi quantificada usando o ELISA de IL-1 beta humana/IL-1F2 DuoSet (R&D Systems, no. cat. DY201). DLX2323 foi revestido em microplacas de 96 poços (Maxisorp, Nunc) a uma densidade de revestimento de 5 mcg/ml em DPBS (pH 7,4). IL-1 beta humana ou como versão recombinantemente expressa (Peprotech, no. cat. 200-01B) ou como versão nativamente segregada foi aplicada às concentrações finais variando de 0,5 a 4 ng/ml. IL-1 beta ligada foi detectada por um anticorpo de anti-hIL-1 de cabra de biotinilado (R&D Systems, no. cat. DY201) e Estreptavidina-HRP (BD Pharmingen, no. cat. 554060). O ELISA foi desenvolvido

usando substrato de BM Blue POD (Roche Applied Science). Para propósitos de quantificação, a absorbância foi medida a 450 nm usando uma leitora de microplaca VersaMax (Molecular Devices, EUA). O resultado (vide figura 2) mostra que IL-1 beta humana recombinante e natural são reconhecidas por DLX2323 em níveis comparáveis.

Exemplo 3 - Neutralização da atividade biológica de rhIL-1 beta

[00396] Anticorpos e scFvs foram testados para sua capacidade de neutralização de IL-1 beta em um ensaio de fibroblasto dérmico humano (NHDF-Neo, no. cat. CC-2509, Lonza Walkersville EUA). Ativação de tais fibroblastos com IL-1 beta leva a liberação específica de IL-6 que é quantificada por ELISA. Inibição de IL-1 beta por anticorpos específicos diminui a quantidade de IL-6 liberada de tais fibroblastos. A potência inibitória do anticorpo de anti-IL-1 beta é quantificada medindo a redução metade máxima (IC₅₀) de liberação de IL-6 induzida por IL-1 beta. Fibroblastos dérmicos humanos foram semeados nas microplacas de 96 poços a 5.000 células/poço 16-20 horas antes da adição de IL-1 beta. Os fibroblastos foram cultivados em meio basal de fibroblasto (FBM; Lonza, no. cat. CC-3131) com suplementos (hFGF-B, Insulin, FBS, GA-1000) como descrito pelo fabricante da célula (Lonza Walkersville EUA: Clonetics™ Dermal Fibroblast Cell Systems. FBM foi depois removido e as células foram lavadas uma vez com o Meio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM; Gibco, Life Technologies, no. cat. 11880) para remover os fatores de crescimento. As células foram depois incubadas por 7 horas em meios de DMEM. Os anticorpos ou scFvs e rhIL-1 beta foram pré-incubados em DMEM por 1 hora a 37° C. A mistura foi acrescentada às células a uma concentração final de 10 pg/ml de IL-1 beta. Como controle negativo, 10 pg/ml de IL-1 beta foram acrescentados às células sem qualquer anticorpo de anti-IL-1 beta. Como controle positivo, um anticorpo monoclonal de camundongo contra IL-1 beta foi aplicado (R&D Systems, EUA, no. cat. MAB201). As

células foram incubadas com a mistura de anticorpo IL-1 beta/anti-IL-1 beta por 18-24 horas, e os sobrenadantes da cultura celular foram analisados para liberação de IL-6 usando o kit Human IL-6 DuoSet ELISA de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems, EUA, no. cat. DY206).

[00397] A IC_{50} de DLX2323 foi determinada ser $3 \text{ pM} \pm 1,05$ em oito ensaios independentes.

Exemplo 4 - Comparação da potência de neutralização com inibidores IL-1 beta comercialmente disponíveis

[00398] DLX2323 foi identificado como um scFv de neutralização de IL-1 beta. A potência biológica de DLX2323 e outros inibidores foi avaliada no ensaio de fibroblastos dérmicos humanos como descrito no Exemplo 3. IL-1 beta humana recombinante foi pré-incubada com concentrações crescentes do scFv DLX2323, o anticorpo de IgG monoclonal de IL-1 beta anti-humano MAB201, o antagonista de receptor de IL-1 beta (rhIL-1ra) (R&D Systems, no. cat. 280-RA-010/CF) ou a IgG de canacinumab comercializada aprovada pela FDA (Novartis, Ilaris®) antes da adição aos poços. Foram executados dois experimentos independentes: figura 3A descreve a comparação de DLX2323 com MAB201, enquanto que a figura 3B mostra a comparação de DLX2323 com rhIL-1ra e canacinumab. Os valores de IC_{50} seguintes foram determinados: MAB201: 2-3 pM; DLX2323: 2-4 pM; rhIL-1ra: 40 pM e Canacinumab: 90 pM. Sob conclusão, o scFv DLX2323 monomérico monovalente é quase tão potente quanto o anticorpo de camundongo monoclonal bivalente MAB201. Ela mostra potência distintamente mais alta em neutralizar IL-1 beta humana que o inibidor comercializado Canacinumab e a rhIL-1ra. Além disso, DLX2323 poderia bloquear completamente liberação de IL-6 induzida por IL-1 beta.

Exemplo 5 - Solubilidade

[00399] DLX2323 foi armazenada em tampão de PBS pH 7,2 (Solução Salina Tamponada de Fosfato 1X, Gibco, Life Technologies™, no. cat. 20012). Para determinar sua solubilidade máxima, DLX2323 foi concentrada usando concentradores de centrífuga Vivaspin 20 (Sartorius Stedim Biotech, no. cat. VS2001) em temperatura ambiente. O processo de concentração foi parado a 71 mg/ml devido à viscosidade alta da amostra. A solução de proteína DLX2323 obtida era viscosa, clara, e nenhum precipitado foi observado mediante inspeção visual.

Exemplo 6 - Estabilidade

[00400] Com relação à estabilidade dos scFvs, dois processos diferentes podem ser observados que contribuem para sua instabilidade. Primeiramente, o scFv poderia ser propenso à dimerização, frequentemente seguida por oligomerização e eventualmente agregação. Em segundo lugar, a degradação de scFv, conduzindo a fragmentos menores, pode ocorrer com o passar do tempo. Para julgar se DLX2323 é estável, HPLC (Dionex, Summit System) cromatografia de exclusão de tamanho (Tosoh, TSKgel G2000SWxl, no. cat. 08540) foram desenvolvidas para determinar a porcentagem de proteína de scFv monomérica, não degradada em certos pontos de tempo em concentrações de proteína e temperaturas diferentes (por exemplo, 4°C, TA e 37°C). A porcentagem de monômero foi medida ao ponto de partida do estudo (T0) e após um mês para 1 mg/ml de DLX2323, e, em outro experimento, após duas semanas para uma solução de 50 mg/ml de DLX2323. A proteína foi formulada em PBS, pH 7,2. Os resultados do estudo de estabilidade estão listados nas tabelas 1 e 2.

TABELA 1

	conteúdo de monômero após 1 mês	Observação
DLX2323, 1 mg/ml, T0	97%	
DLX2323, 1 mg/ml, armazenado em TA	98%	

DLX2323, 1 mg/ml, armazenado a 37°C	93%	Níveis muito baixos de degradação
-------------------------------------	-----	-----------------------------------

TABELA 2

	conteúdo de monômero após duas semanas	Observações
DLX2323, 50 mg/ml, T0	97%	
DLX2323, 50 mg/ml, armazenado a 4°C	78%	dimerização
DLX2323, 50 mg/ml, armazenado em TA	76%	oligomerização
DLX2323, 50 mg/ml, armazenado a 37°C	43%	oligomerização

[00401] A estabilidade térmica de DLX2323 foi avaliada por fluorimetria de varredura de diferencial (DSF). Para esta medição, um dispositivo de PCR em tempo real (Corbett, Rotor-Gene) aqueceu DLX2323 em um gradiente térmico de 30°C para 95°C (elevando em etapas de 1°C, aguardando 5 segundos por etapa). A amostra de proteína continha 0,5 mg/ml de DLX2323 e 20x SYPRO® Orange (Sigma-Aldrich, no. cat. S5692, 5000x) em PBS. Assim que a proteína iniciasse a fundição, Sypro Orange ficava fluorescente. Esta fluorescência era medida em-linha (comprimento de onda de excitação de 470 nm; comprimento de onda de emissão de 555 nm) durante o curso do gradiente. Usando Software Rotor-Gene 6000 Série 1.7 a temperatura de fundição de ponto central (T_m) de DLX2323 foi calculada para ser 74° C.

Exemplo 7 - Reatividade cruzada

[00402] Reatividade cruzada de DLX2323 para homólogos de IL-1 beta de outras espécies que seres humanos foi avaliada em ELISA. Ligação das proteínas de IL-1 beta recombinantemente expressas foi investigada a partir das espécies a seguir: macaco cinomolgo (Sino Biological Inc., EUA, no. cat. 90010-CNAE), macaco rhesus (R&D Systems, EUA, no. cat. 1318-RL/CF), suíno (Kingfisher Biotech, EUA, no. cat. RP0297S-025), canino (Kingfisher Biotech, EUA, no. cat.

RP0085D-025), cobaia (Kingfisher Biotech, no. cat. RP0343GP-025), rato (Peprotech, no. cat. 400-01B) e camundongo (BioLegend, no. cat. 575102). Ligação de DLX2323 foi comparada aos anticorpos de controle positivos para ELISA (R&D Systems, EUA, IgG policlonal de IL-1 beta de cabra anti-humana, no. cat. AB-201-NA; BioLegend, Inc., EUA, anticorpo de IL-1 beta de anticamundongo/rato de biotina, no. cat. 503505). Brevemente, as proteínas foram revestidas a uma concentração de 2 mcg/ml durante noite a 4°C em microplacas de 96 poços Maxisorp em PBS. Após bloquear com 5% de leite em pó desnatado, concentrações crescentes (0,1 mcg/ml, 0,3 mcg/ml e 1,0 mcg/ml) de DLX2323 foram acrescentadas aos poços. Revestimento com sucesso de toda proteína foi separadamente confirmado explorando anticorpos de controle de IL-1 beta-específicos. Enquanto que DLX2323 foi detectado através de Protein L-HRP (Sigma-Aldrich, EUA, no. cat. P3226), os anticorpos de controle foram detectados por qualquer um de Estreptavidina-HRP (BD Pharmingen, EUA, no. cat. 554060) ou outros anticorpos secundários elegíveis marcados com HRP. O ELISA foi desenvolvido com substrato BM Blue POD (Roche Applied Science) e a absorbância foi medida a 450 nm. DLX2323 reconheceu quatro espécies ortólogas de IL-1 beta, a saber IL-1 beta humana, de macaco cinomolgo, macaco rhesus e de rato. Nenhuma reatividade cruzada poderia ser observada para IL-1 beta porcina, de cobaia, canina e de camundongo.

[00403] Além da reatividade cruzada de DLX2323 para homólogos de IL-1 beta de outras espécies que os seres humanos, o padrão de reconhecimento de DLX2323 que considera vários membros da família de IL-1 humana e outras citocinas foi medido: rhIL-1ra (R&D Systems, EUA, no. cat. 280-RA-010/CF), rhIL-1 alfa (PeproTech, no. cat. 200-01A), rhIL-18 (BioVision, no. cat. 4179-25), rhIL-33 (Peprotech, no. cat. 200-33), IL-36ra (R&D Systems, no. cat. 1275-IL/CF), rhTNF alfa

(Peprotech, Hamburgo, Alemanha. no. cat. 300-01A) e rhIL-6 (Peprotech, no. cat. 200-06). No ensaio de ELISA aplicado, os anticorpos a seguir serviram como controles positivos: IL-1ra anti-humana de biotina (BioLegend, no. cat. 509501), IL-1 alfa anti-humana de biotina (BioLegend, no. cat. 515703), anticorpo policlonal de IL-18 anti-humana (BioVision, no. cat. 5179-100), anticorpo de IL-33 anti-humana de biotina (Peprotech, no. cat. 500-P261Bt), scFv DLX105 de TNF alfa anti-humana (anticorpo de propriedade da Delenex descrito em WO 2006/131013 A), IL-6 anti-humana de biotina (R&D Systems, DY206, no. cat. 840114), IL-36ra anti-humana (R&D Systems, no. cat. AF1275). O ELISA foi realizado essencialmente como descrito acima. Nenhuma reatividade cruzada de DLX2323 com qualquer um destes membros da família de IL-1 testados e citocinas pôde ser detectada.

Exemplo 8 - Eficácia *in vivo*

[00404] Neste exemplo, a inibição *in vivo* da atividade de IL-1 beta humana por DLX2323 é demonstrada. IL-1 beta humana pode ligar-se e ativar o receptor de IL-1 de camundongo assim induzindo uma resposta inflamatória no camundongo *in vivo*. A inflamação conduz a níveis elevados de citocinas no soro incluindo IL-6 de camundongo (mIL-6). IL-1 beta humana recombinante (Peprotech, no. cat. 200-01B) foi administrada subcutaneamente a uma dose de 1,5 mcg/kg do peso do corpo em camundongos BALB/c machos de 8 semanas de idade (Charles River, Alemanha). Após duas horas, os níveis de mIL-6 foram significativamente elevados no soro. Para testar a capacidade de neutralização de DLX2323 *in vivo*, ela foi intraperitonealmente (i.p.) injetada duas horas antes do doseamento de IL-1 beta. Um grupo de camundongos foi injetado com uma dose de 5 mg/kg de DLX2323, o segundo grupo foi injetado com uma dose de 15 mg/kg de DLX2323. Os grupos de controle negativos foram tratados com PBS i.p. ou scFvs de especificidade irrelevante. Um quinto grupo de camundongos foi

intravenosamente injetado com 10 mg/kg de canacinumab (Novartis, Ilaris®) como um controle positivo. Duas horas depois, amostras de sangue de aplicação de rhIL-1 beta foram colhidas e os níveis séricos de mL-6 foram medidos usando o kit de ELISA DuoSet de IL-6 de Camundongo de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems, no. cat. DY406). Para os grupos de camundongos tratados com DLX2323 e canacinumab apenas, quantidades muito baixas de mL-6 ou até mesmo nenhuma mL-6 puderam ser detectadas (0,0-2 pg/ml de mL-6; figura 4). Camundongos que recebem PBS ou scFv de controle mostraram níveis significativamente elevados de IL-6 de 50 a 170 pg/ml. DLX2323 estava neutralizando IL-1 beta humano muito eficientemente em um cenário *in vivo*, até mesmo a uma dose de 5 mg/kg.

Exemplo 9 - Bibliotecas de CDR

[00405] Para melhor caracterizar a associação de DLX2323 com IL-1 beta humana, foram projetadas mutações de aminoácido e de forma sítio-específica inseridas nas regiões de CDR de DLX2323. As posições de CDR foram escolhidas para mutagênese com base em sua exposição de superfície, interação antecipada com IL-1 beta humana como deduzido dos modelos de homologia ou comparações de sequência com IgGs de coelho de base. Na cadeia leve, o motivo DNW em CDR-L1 (SEQ ID N°: 14), os resíduos de aminoácido R e T em CDR-L2 (SEQ ID N°: 15), a treonina em CDR-L3 como também o motivo GGVS foram selecionados (SEQ ID N°: 16) para o projeto de variantes de DLX2323. Na cadeia pesada, o motivo SA foi escolhido em CDR-H1 (SEQ ID N°: 11), na CDR-H2 o motivo YD e a tirosina seguinte (SEQ ID N°: 12). Em CDR-H3, todas as posições foram selecionadas para substituição (SEQ ID N°: 13) com exceção do ácido glutâmico N-terminal (E). Todas as ditas posições estão indicadas com um X nas SEQ ID N°s. 11-16, respectivamente. Mutagênese loco-dirigida, sequenciação de clones e montagem de biblioteca são realizadas por

GeneArt (Life Technologies™, Regensburg, Alemanha).

[00406] Os mutantes de scFv resultantes são expressos em formato de 96 poços em culturas de 1 ml em BL21 de *E. coli* (DE3) (Novagen, EUA, no. cat. 69450-3). Durante a expressão neste sistema, a maioria das proteínas de scFv forma corpos de inclusão insolúveis dentro da célula mas uma quantidade considerável de proteína pode ser recuperada das frações solúveis após lises celulares, que foi observado ser suficiente para a análise pelo ELISA de rhIL-1 beta (vide exemplo 2 para detalhes). As células foram lisadas em tampão de lise (1 mM de EDTA, 0,1 mg/ml de lisozima, PBS pH 7,2) em um formato de 96 poços por congelamento e subsequente descongelamento. Extratos brutos derivados foram clareados através de centrifugação. Os sobrenadantes foram acrescentados aos poços de uma microplaca de titulação revestida com 50 ng/ml de rhIL-1 beta (Peprotech) por poço. Após lavar, scFvs ligados são detectados por ProteinL-HRP e ligação à rhIL-1 beta quantificada por Substrato BM Blue POD (Roche Applied Science).

[00407] Tabela 3 lista as mutações de sítio simples que claramente permitem a ligação de rhIL-1 beta definida por um sinal de ELISA pelo menos duas vezes a mais que no controle negativo, mas não menos que 0,1 unidade óptica.

TABELA 3

Posição do resíduo	substituições de aminoácido
CDR-L1_D32	A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
CDR-L1_N33	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, S, T, V, W, Y
CDR-L1_W40	E, F, G, M, N, Q, S, Y
CDR-L2_R58	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, W, Y
CDR-L2_T69	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, Y
CDR-L3_T109	A, C, I, N, S, V
CDR-L3_G111	A, P, S

Posição do resíduo	substituições de aminoácido
CDR-L3_G112	A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
CDR-L3_V135	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, Y
CDR-L3_S136	A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, Y
CDR-H1_S33	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, Y
CDR-H1_A39	C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y
CDR-H2_Y59	A, C, G, M
CDR-H2_D60	N, P
CDR-H2_Y69	A, D, E, G, F, H, I, K, L, M, N, P, S, T, W
CDR-H3_R110	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, S, T, V, W, Y
CDR-H3_A111	C, D, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
CDR-H3_I112	A, C, F, H, L, M, N, Q, S, T, V, Y
CDR-H3_F113	I
CDR-H3_S114	A, C, E, G, T, V
CDR-H3_G115	A, M, N,
CDR-H3_D135	A, E, H, N, S, T
CDR-H3_F136	A, C, G, H, I, L, M, N, Q, S, T, V, W, Y
CDR-H3_V137	A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, Y
CDR-H3_L138	A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y

[00408] Estes dados de ligação têm valor prognósticos também com relação à neutralização da função biológica de rhIL-1 beta como verificado pela expressão de cinco mutantes de sítio simples exemplar no formato de grande escala, purificado para homogeneidade, e submetido à análise baseada em célula junto com proteína de DLX2323 igualmente purificada.

[00409] DLX2323_CDR-H1_A39N (SEQ ID No. 45 com X = N),
DLX2323_CDR-H3_A111N (SEQ ID NO: 50 com X = N),
DLX2323_CDR-H3_F136N (SEQ ID No. 56 com X = N),

DLX2323_CDR-H3_V137D (SEQ ID NO: 57 com X = D), e DLX2323_CDR-H3_L138D (SEQ ID NO: 58 com X = D) e scFv parental correspondente, DLX2323, foram expressos em células BL21(DE3) de *E. coli* (Novagen) a uma escala de 2 litros. Seguindo a lise celular por sonicação, os corpos de inclusão foram enriquecidos através de centrifugação, lavados, solubilizados com proteína em tampão de guanidina (6 M de guanidina/HCl, 100 mM de Tris, 1 mM de EDTA, pH 8,5), redobrados em tampão de ureia (4 M de ureia, 50 mM de glicina, 2 mM de cistina, 2 mM de cisteína, pH 10), concentrados em 50 mM de glicina, 50 mM de NaCl, pH 10, e purificados a homogeneidade através de cromatografia por exclusão de tamanho. Frações de pico monoméricas deste procedimento foram concentradas a um conteúdo de proteína final de cerca de 0,5 - 5 mg/ml, passadas em uma unidade de filtro estéril, e como tal submetidas a análises com base em célula como descrito no Exemplo 3. Tabela 4 mostra a potência de neutralização IC₅₀ de cada um dos mutantes como determinado em duas corridas independentes.

TABELA 4

ID do Clone	IC ₅₀
DLX2323	2-4 pM
DLX2323_CDR-H1_A39N	10 pM
DLX2323_CDR-H3_A111N	2-4 pM
DLX2323_CDR-H3_F136N	2-4 pM
DLX2323_CDR-H3_V137D	5 pM
DLX2323_CDR-H3_L138D	10 pM

[00410] Em uma boa conformidade geral com os resultados de ELISA precedentes, um valor de IC₅₀ na faixa pM baixa foi observado para todos os cinco mutantes de sítio simples selecionados. Cada membro do subconjunto mutante selecionado teve uma capacidade de neutralização para rhIL-1 beta comparável à do scFv parental DLX2323.

Consequentemente, a ligação de DLX2323 e suas variantes à rhIL-1 beta mostra que um grau significativo de variabilidade de sequência é permitido enquanto concomitantemente preservando as características funcionais fundamentais.

Exemplo 10 - Geração de variantes combinatórias

[00411] Com base no acima, os mutantes de DLX2323 combinatórios foram projetados combinando 3 a 9 das alterações de CDR de sítio simples previamente investigadas. As alterações de resíduos individuais foram selecionadas com base em (i) resultados de ligação de ELISA fortes comparáveis ou melhores que os do anticorpo parental DLX2323 (ii) combinações de alterações de sítio simples de expansão distante que simultaneamente afetariam as regiões de CDR múltiplas e (iii) uma modulação cumulativa de CDR-H3, sozinha. Os mutantes projetados foram expressos em formato de grande escala e foram purificados como descrito acima para os mutantes simples, antes de a capacidade de neutralização ser avaliada no ensaio de fibroblasto humano do Exemplo 3. Alterações de aminoácidos individuais por sequência e os dados de IC₅₀ das proteínas de scFv correspondentes estão detalhados na Tabela No.: 5. Todas estas proteínas de scFv isoladas tiveram atividade de neutralização para rhIL1-beta *in vitro*. Os cinco melhores candidatos exibiram valores de IC₅₀ na faixa picomolar baixa e, desse modo, são altamente comparáveis ao scFv parental DLX2323.

TABELA 5

scFv	Alterações de aminoácido (anotação de AHo)	IC ₅₀
DLX2464	VL: parental VH: A111Q, F136M, V137A, L138G	4 pM
DLX2465	VL: parental VH: A111N, F136M, V137D	4 pM
DLX2466	VL: D32G, N33K, W40Y, T109A	300 pM

scFv	Alterações de aminoácido (anotação de AHo)	IC ₅₀
	VH: A39D, A111N, F136M, V137A, L138G	
DLX2467	VL: D32H, T69N, V135S VH: S33R, A111M	25 pM
DLX2468	VL: D32G, W40Y, T109A, V135T VH: A39S, A111N, F136M	15 pM
DLX2475	VL: N33K, R58Q, S136H VH: A39Y, V137K	200 pM
DLX2476	VL: D32S, N33S VH: A111D, L138G	100 pM
DLX2480	VL: V135I, S136N VH: S33D, A111Q	5 pM

[00412] Variantes que carregam mais de 6 substituições de aminoácidos na CDR e flanqueando as regiões de estrutura de cadeia leve variável e/ou pesada variável foram projetadas. No total, 10 candidatos combinatórios (quatro sequências mutantes de VL e seis de VH) foram gerados, expressos, e funcionalmente analisados para ligação de rhIL1-beta (ELISA) e neutralização (ensaio de fibroblasto humano) *in vitro* como descrito no Exemplo 3. Tabela 6 resume as respectivas mutações de ponto como também a potência de neutralização conforme medida em dois experimentos independentes de cada clone.

TABELA 6

ScFv	Alterações de aminoácido (anotação de AHo)	IC ₅₀
DLX2543	VL: I20T, D32S, N33S, R58K, A87T, T109A VH: parental	3-4 pM
DLX2529	VL: Q24R, D32G, T69N, D99E, V135I, S136N VH: parental	1-2 pM
DLX2547	VL: E1D, I20T, D32S, N33S, W40Y, V135I, S136N, T146E, V147I, L148K, G149R	30 pM

	VH: parental	
DLX2528	VL: I20T, D32G, S42A, R58Q, T69N, A87T, E88D, T109A, G112A, V135T, S136T, VH: parental	8 pM
DLX2585	VL: parental VH: A25V, A39Y, A42S, R82K, V137D, L138Y	1-2 pM
DLX2545	VL: parental VH: V55I, V89L, Y105F, A111N, F136M, L144T	7 pM
DLX2531	VL: parental VH: L12N, S33N, A39S, T84N, V103T, V137A	0,6 - 1 pM
DLX2586	VL: parental VH: A25V, A39Y, A42S, V55I, R82K, Y105F, A111Q, F136M, V137D, L138G	2 pM
DLX2530	VL: parental VH: L12N, S33D, Y69F, T84N, V89L, V103T, A111N, F136M, V137A, L144T	1-2 pM
DLX2548	VL: parental VH: A25V, A39Y, A42S, V55I, R82K, V89L, Y105F, A111Q, F136M, V137D, L138G, L144T	1-2 pM

[00413] Todas as 10 proteínas de scFv foram constatadas neutralizar efetivamente rhIL1-beta no ensaio de fibroblasto humano *in vitro* com valores de IC₅₀ na faixa molar alta à faixa picomolar baixa. Clones DLX2531, DLX2548, DLX2585, DLX2530, DLX2529, e DLX2586 reprodutivamente renderam valores de IC₅₀ mais baixos que a scFv parental DLX2323.

[00414] Por fim, as sequências VL e VH acima eram de cadeias embaralhadas. Ligação à rhIL1-beta foi confirmada para lisados clareados de células origami de BL21 de *E. coli* transformadas com 19 mutantes de cadeias VL e VH embaralhadas. Tabela 7 resume as substituições.

TABELA 7

ScFv	Fusão de VL-VH	Substituições de aminoácido
DLX2676	DLX2528_2530	VL: I20T, D32G, S42A, R58Q, T69N, A87T, E88D, T109A, G112A, V135T, S136T VH: L12N, S33D, Y69F, T84N, V89L, V103T, A111N, F136M, V137A, L144T
DLX2677	DLX2528_2531	VL: I20T, D32G, S42A, R58Q, T69N, A87T, E88D, T109A, G112A, V135T, S136T VH: L12N, S33N, A39S, T84N, V103T, V137A
DLX2678	DLX2528_2548	VL: I20T, D32G, S42A, R58Q, T69N, A87T, E88D, T109A, G112A, V135T, S136T VH: A25V, A39Y, A42S, V55I, R82K, V89L, Y105F, A111Q, F136M, V137D, L138G, L144T
DLX2679	DLX2528_2585	VL: I20T, D32G, S42A, R58Q, T69N, A87T, E88D, T109A, G112A, V135T, S136T VH: A25V, A39Y, A42S, R82K, V137D, L138Y
DLX2680	DLX2529_2530	VL: Q24R, D32G, T69N, D99E, V135I, S136N VH: L12N, S33D, Y69F, T84N, V89L, V103T, A111N, F136M, V137A, L144T
DLX2681	DLX2529_2531	VL: Q24R, D32G, T69N, D99E, V135I, S136N VH: L12N, S33N, A39S, T84N, V103T, V137A
DLX2682	DLX2529_2548	VL: Q24R, D32G, T69N, D99E, V135I, S136N VH: A25V, A39Y, A42S, V55I, R82K, V89L, Y105F, A111Q, F136M, V137D, L138G, L144T
DLX2683	DLX2529_2585	VL: Q24R, D32G, T69N, D99E, V135I, S136N VH: A25V, A39Y, A42S, R82K, V137D, L138Y,
DLX2684	DLX2543_2530	VL: I20T, D32S, N33S, R58K, A87T, T109A VH: L12N, S33D, Y69F, T84N, V89L, V103T, A111N, F136M, V137A, L144T
DLX2685	DLX2543_2531	VL: I20T, D32S, N33S, R58K, A87T, T109A, VH: L12N, S33N, A39S, T84N, V103T, V137A,
DLX2686	DLX2543_2548	VL: I20T, D32S, N33S, R58K, A87T, T109A VH: A25V, A39Y, A42S, V55I, R82K, V89L, Y105F, A111Q, F136M, V137D, L138G, L144T
DLX2687	DLX2543_	VL: I20T, D32S, N33S, R58K, A87T, T109A

ScFv	Fusão de VL-VH	Substituições de aminoácido
	2585	VH: A25V, A39Y, A42S, R82K, V137D, L138Y
DLX2689	DLX2544_2531	VL: E1D, I20T, D32S, N33S, W40Y, R58K, A87T, E88D, D99E, T109A, V135I, S136N, L145V, T146E, V147I, L148K, G149R VH: L12N, S33N, A39S, T84N, V103T, V137A
DLX2690	DLX2544_2548	VL: E1D, I20T, D32S, N33S, W40Y, R58K, A87T, E88D, D99E, T109A, V135I, S136N, L145V, T146E, V147I, L148K, G149R VH: A25V, A39Y, A42S, V55I, R82K, V89L, Y105F, A111Q, F136M, V137D, L138G, L144T
DLX2691	DLX2544_2585	VL: E1D, I20T, D32S, N33S, W40Y, R58K, A87T, E88D, D99E, T109A, V135I, S136N, L145V, T146E, V147I, L148K, G149R VH: A25V, A39Y, A42S, R82K, V137D, L138Y
DLX2692	DLX2547_2530	VL: E1D, I20T, D32S, N33S, W40Y, V135I, S136N, T146E, V147I, L148K, G149R VH: L12N, S33D, Y69F, T84N, V89L, V103T, A111N, F136M, V137A, L144T
DLX2693	DLX2547_2531	VL: E1D, I20T, D32S, N33S, W40Y, V135I, S136N, T146E, V147I, L148K, G149R VH: L12N, S33N, A39S, T84N, V103T, V137A
DLX2694	DLX2547_2548	VL: E1D, I20T, D32S, N33S, W40Y, V135I, S136N, T146E, V147I, L148K, G149R VH: A25V, A39Y, A42S, V55I, R82K, V89L, Y105F, A111Q, F136M, V137D, L138G, L144T
DLX2695	DLX2547_2585	VL: E1D, I20T, D32S, N33S, W40Y, V135I, S136N, T146E, V147I, L148K, G149R VH: A25V, A39Y, A42S, R82K, V137D, L138Y

[00415] Ligação foi considerada específica se um sinal de ELISA de $\geq 0,1$ unidade óptica fosse obtido que era pelo menos duas vezes mais alto que o controle negativo. Os resultados estão mostrados na Figura 6. Por exemplo, DLX2690 e DLX2691 passaram ligeiramente pelo filtro

de expansão, mas são testados positivos. Os mutantes de cadeias VL e VH embaralhadas coletivos restantes ligam-se à rhIL1-beta com sinais de ELISA absolutos comparáveis ou até mais altos que DLX2323.

[00416] Os valores de IC_{50} de DLX2681 e DLX2693 foram determinados no ensaio de fibroblasto humano como descrito acima. DLX2681 foi constatada neutralizar rhIL1-beta com um valor de IC_{50} de 0,6 pM e o valor de IC_{50} de DLX2693 foi determinado ser 12,5 pM.

[00417] Embora sejam mostradas e descritas as modalidades presentemente preferidas da invenção, será entendido que a invenção não é este limitada mas pode ser do contrário de forma variada incorporada e praticado dentro do escopo das reivindicações a seguir. Uma vez que numerosas modificações e modalidades alternativas da presente invenção serão facilmente evidentes àqueles versados na técnica, esta descrição é para ser interpretada como ilustrativa apenas e é para o propósito de ensinar aqueles versados na técnica o melhor modo para levar a cabo a presente invenção. Consequentemente, todas as modificações adequadas e equivalentes podem ser considerados enquadrar-se no escopo das reivindicações a seguir.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo contra IL-1 beta, caracterizado pelo fato de que compreende:

as sequências de CDR de cadeia pesada variável (VH) CDR-H1, CDR-H2 ou CDR-H3 como expostas em SEQ ID NOs: 1, 2 e 3; e

as sequências de CDR de cadeia leve variável (VL) CDR-L1, CDR-L2 ou CDR-L3 como expostas em SEQ ID NOs: 4, 5, e 6, respectivamente.

2. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é um fragmento de anticorpo monovalente, preferencialmente um fragmento Fab, Fab', scFv ou Fv.

3. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é uma imunoglobulina completa ou um fragmento de anticorpo bivalente, preferivelmente um F(ab')₂.

4. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que compreende:

- a. uma sequência VH compreendendo SEQ ID NO: 7; e/ou
- b. uma sequência VL compreendendo SEQ ID NO: 8.

5. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que compreende a sequência ligante de SEQ ID NO: 9.

6. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que apresenta uma sequência compreendendo SEQ ID NO: 10.

7. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que é reativo cruzado com IL-1 beta de macaco cinomolgo, IL-1 beta de macaco rhesus e/ou IL-1 beta de rato.

8. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que é química ou

biologicamente modificado.

9. Sequência isolada de ácido nucleico, caracterizada pela sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 17, e sequências de nucleotídeos degeneradas da mesma.

10. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende a sequência de ácido nucleico, como definido na reivindicação 9.

11. Composição cosmética, de diagnóstico ou farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8, a sequência de ácido nucleico, como definida na reivindicação 9, ou o vetor, como definido na reivindicação 10; e adicionalmente um veículo, diluente ou excipiente adequados.

12. Anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, sequência de ácido nucleico, de acordo com a reivindicação 9, ou vetor, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que é:

(i) para uso no tratamento de uma doença mediada por IL-1 beta selecionada a partir de retinopatia diabética proliferativa, artrite gotosa, síndrome de Schnitzler, artrite idiopática juvenil sistêmica, artrite reumatoide, artrite gotosa aguda, artrite gotosa crônica, urticária, vasculite, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, espondilite ancilosante, osteomielite multifocal recorrente, policondrite recidivante, síndrome periódica associada à ciropirina (CAPS), doença de Behçet, febre mediterrânea familiar, doença pulmonar obstrutiva crônica, polimialgia reumática, mutações de NALP3, pioderma gangrenosa, urticária idiopática crônica, osteoartrite, degeneração macular relacionada à idade úmida, síndrome de olho seco, psoríase pustular, síndrome de sinovite-acne-pustulose-hiperostose-osteíte, síndrome da ativação de macrófagos, síndrome de febre periódica adenite faringite úlcera aftosa, doença de Still de princípio adulto, deficiência da mevalonato cinase,

aterosclerose, síndrome periódica associada ao receptor de TNF (TRAPS), acne vulgar e/ou acne inversa;

(ii) para uso em diagnósticos; e/ou

(iii) para propósitos de detecção.

13. Método para produzir o anticorpo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

(A)

(i) cultivar uma célula hospedeira, de modo que o anticorpo é expresso;

(ii) recuperar; e

(iii) purificar o anticorpo; ou

(B)

(i) fornecer um sistema livre de célula,

(ii) fornecer um molde de produto de ácido nucleico,

(iii) permitir a transcrição e a tradução do dito molde de produto de ácido nucleico;

(iv) recuperar; e

(v) opcionalmente purificar o anticorpo.

14. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende o anticorpo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8, junto com uma combinação empacotada de reagentes e instruções para o uso.

15. Uso do anticorpo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8, da sequência de ácido nucleico, com definida na reivindicação 9, ou do vetor, como definido na reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que é como cosmético.

FIG. 1

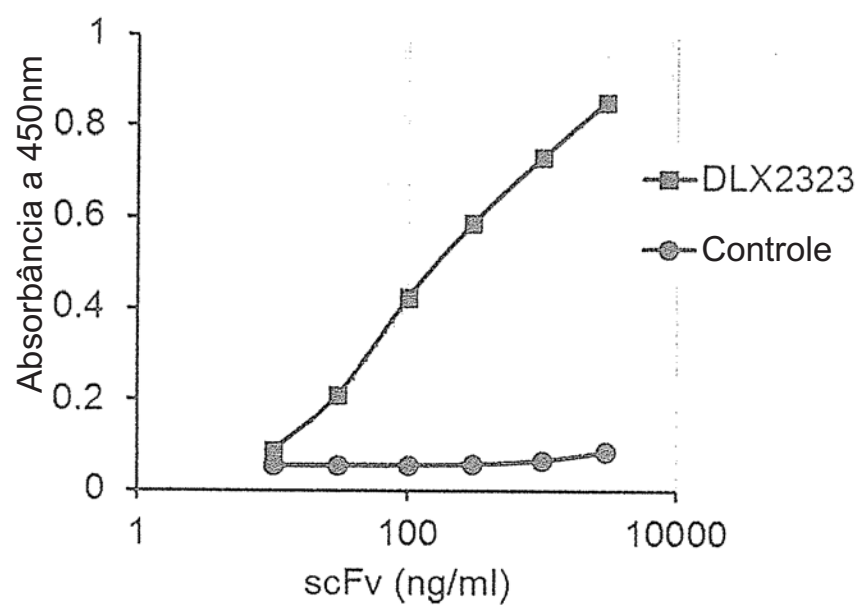


FIG. 2

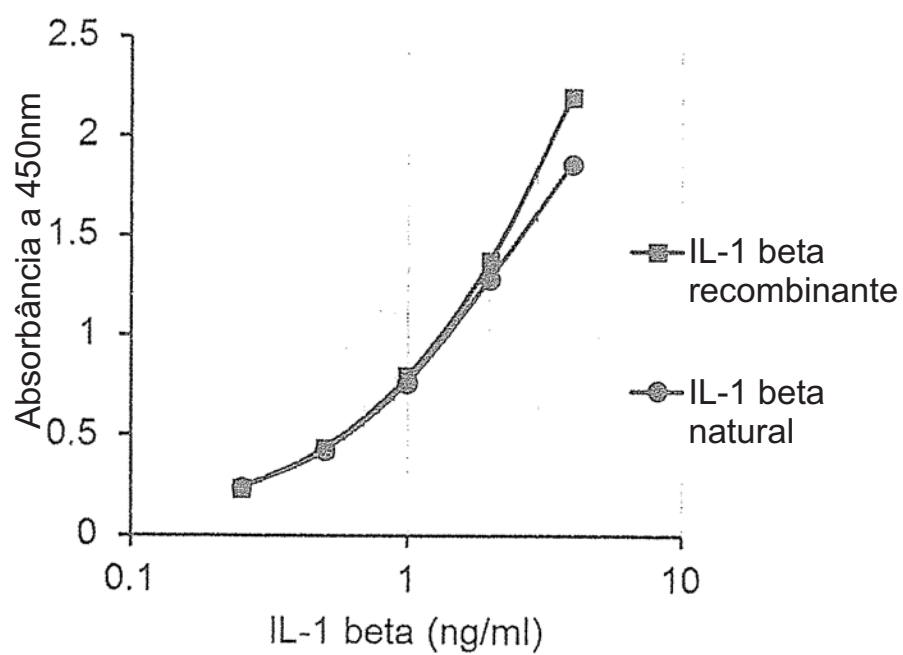
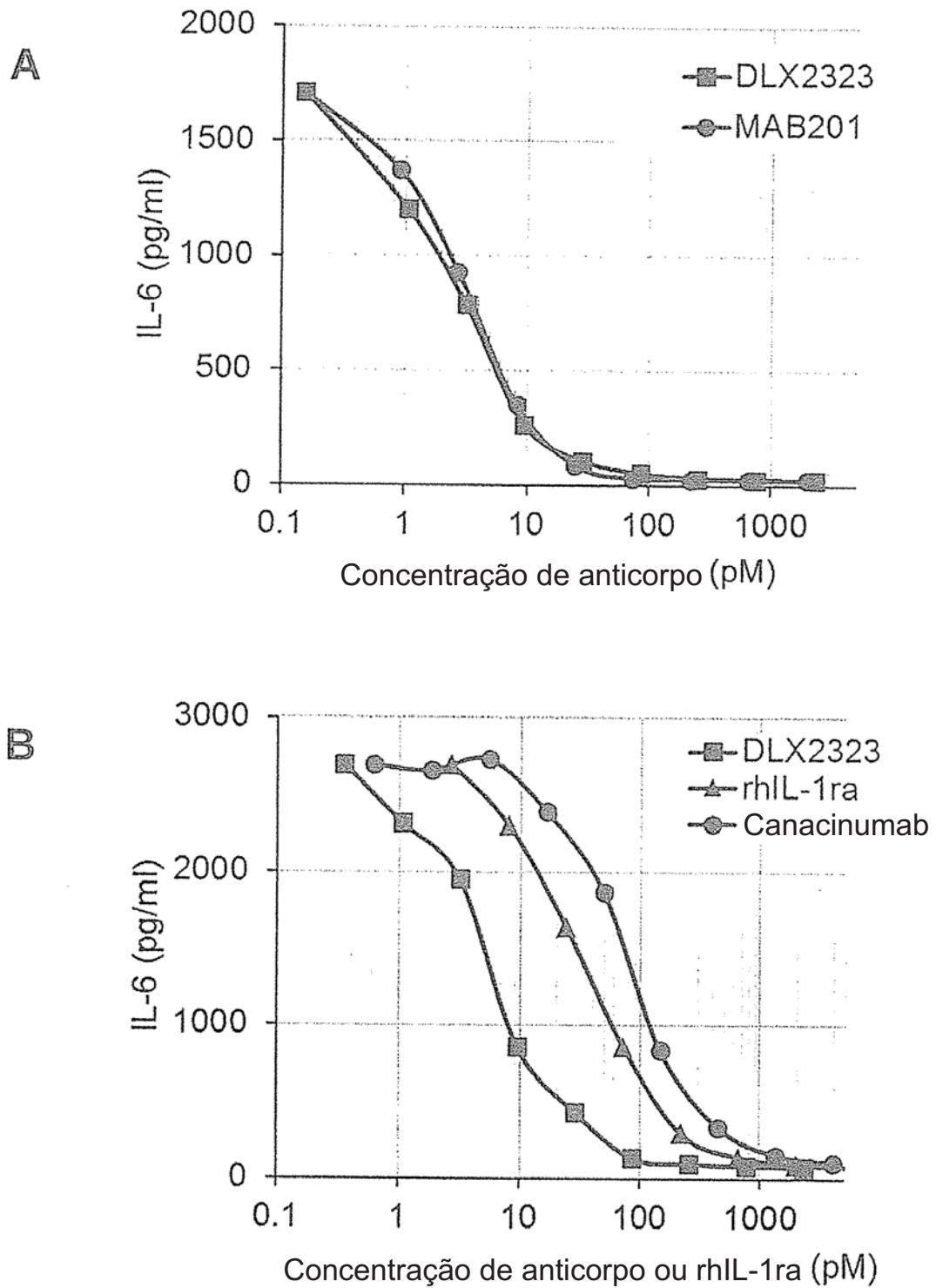


FIG. 3



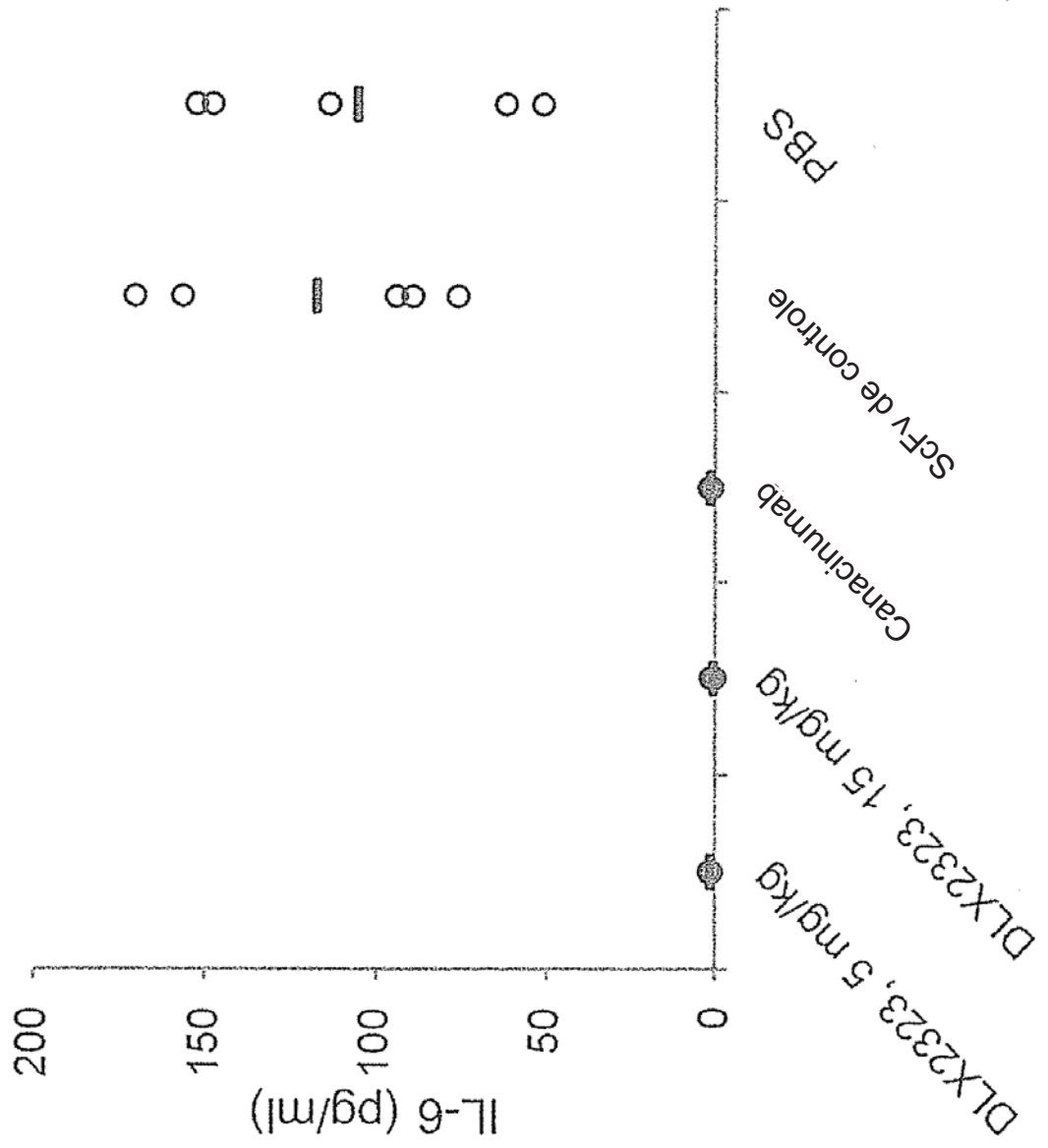


FIG. 4

FIG. 5

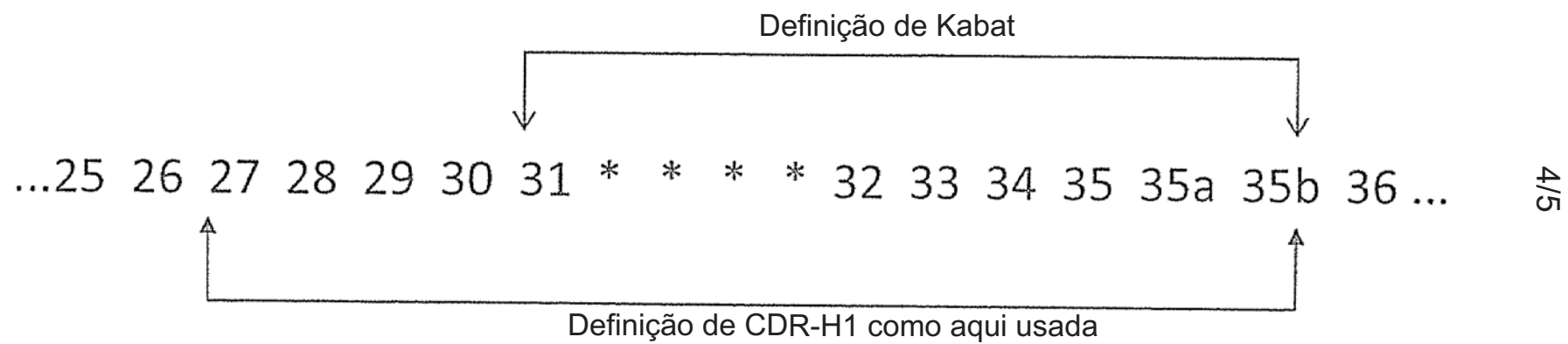


FIG. 6

