



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

(21) PI 0720928-2 A2



* B R P I 0 7 2 0 9 2 8 A 2 *

(22) Data de Depósito: 20/12/2007

(43) Data da Publicação: 01/04/2014

(RPI 2256)

(51) *Int.Cl.:*

A61K 39/395

A61P 37/06

A61P 3/00

A61P 3/10

(54) Título: MÉTODO PARA TRATAR EM UM SER HUMANO, UMA DOENÇA OU CONDIÇÃO, E, USO DE UM ANTICORPO ANTI-IL-1-BETA OU FRAGMENTO DO MESMO.

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 20/12/2006 US 60/8071046, 27/03/2007 US 60/908389, 10/04/2007 US 60/911033, 10/04/2007 US 60/911033, 10/04/2007 US 60/911033, 20/12/2006 US 60/8071046, 27/03/2007 US 60/908389

(73) Titular(es): Xoma Technology Ltd.

(72) Inventor(es): Alan Solinger, David Alleva, Patrick J. Scannon, Robert J. Bauer

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

(86) Pedido Internacional: PCT US2007088411 de 20/12/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/077145de 26/06/2008

“MÉTODO PARA TRATAR EM UM SER HUMANO, UMA DOENÇA OU CONDIÇÃO, E, USO DE UM ANTICORPO ANTI-IL-1-BETA OU FRAGMENTO DO MESMO”

5 Este pedido reivindica benefício sob 35 U.S.C. § 119 do Pedido Provisório U.S. Nº 60/871.046, depositado em 20 de dezembro de 2006, 60/908.389, depositado em 27 de março de 2007 e 60/911.033, depositado em 10 de abril de 2007, as divulgações dos quais são aqui incorporadas por referência em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

10 A invenção diz respeito a métodos para o tratamento e/ou prevenção da diabetes Tipo 2, obesidade, hiperglicemia, hiperinsulinemia, diabetes Tipo 2, resistência à insulina e estados e condições de doença caracterizados pela resistência à insulina. Tais métodos podem ser usados para tratar um paciente mamífero que sofre de diabetes Tipo 2, obesidade, 15 hiperglicemia, hiperinsulinemia, diabetes Tipo 2, resistência à insulina e estados e condições de doença caracterizados pela resistência à insulina ou para prevenir a ocorrência da mesma em um paciente em risco.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

20 A presente divulgação é direcionada aos métodos para o tratamento e/ou prevenção em mamíferos da diabetes Tipo 2, obesidade, hiperglicemia, hiperinsulinemia, diabetes Tipo 1, resistência à insulina e estados e condições de doença caracterizados pela resistência à insulina. tais métodos podem ser usados para tratar um paciente mamífero (por exemplo, o ser humano) que sofre de diabetes Tipo 2, obesidade, hiperglicemia, 25 hiperinsulinemia, diabetes Tipo 1, resistência à insulina e estados e condições de doença caracterizados pela resistência à insulina ou para prevenir a ocorrência da mesma em um paciente em risco.

A diabetes melito é um distúrbio metabólico em seres humanos com uma prevalência de aproximadamente um por cento na população geral

(Foster, D. W., Harrison's Principles of Internal Medicine, Cap. 114, pp. 661-678, 10^a Ed., McGraw-Hill, Nova Iorque). A doença se manifesta por si só como uma série de anormalidades metabólicas induzidas por hormônio que eventualmente leva a complicações sérias, de longa duração e debilitantes envolvendo diversos sistemas de órgão incluindo os olhos, rins, nervos e vasos sanguíneos. Patologicamente, a doença é caracterizada pelas lesões das membranas de base, demonstráveis sob a microscopia eletrônica. A diabetes melito pode ser dividida em duas síndromes clínicas, a diabetes melito Tipo 1 e Tipo 2. Tipo 1 ou diabetes melito dependente de insulina (IDDM), também aludida como a forma de início juvenil, é uma doença autoimune crônica caracterizada pela perda extensiva de células beta nas ilhotas pancreáticas de Langerhans, que produzem a insulina. Visto que estas células são progressivamente destruídas, a quantidade de insulina secretada diminui, eventualmente levando à hiperglicemia (nível anormalmente alto de glicose no sangue) quando a quantidade de insulina secretada cai abaixo dos níveis de glicose do sangue normalmente requeridos. Embora o deflagrador exato para esta resposta imune não seja conhecido, os pacientes com IDDM têm níveis altos de anticorpos contra as proteínas expressadas nas células beta pancreáticas. Entretanto, nem todos os pacientes com níveis altos destes anticorpos desenvolvem IDDM.

Os diabéticos Tipo 1 de modo característico apresentam insulina plasmática muito baixa ou imensurável com glucagon elevado. Independente de qual a etiologia exata é, a maioria dos pacientes Tipo 1 têm anticorpos circulantes direcionados contra as suas próprias células pancreáticas incluindo anticorpos para insulina, para o citoplasma celular das ilhotas de Langerhans e para a enzima ácido glutâmico descarboxilase. Uma resposta imune especificamente direcionada contra células beta (células que produzem insulina) leva à diabetes Tipo 2. O tratamento corrente para pacientes diabéticos Tipo 1 é a injeção de insulina e também pode incluir

modificações para a dieta de modo a minimizar a hiperglicemia que resulta da falta de insulina natural, que por sua vez, é o resultado de células beta danificadas. A dieta também é modificada com respeito à administração de insulina para agir contra os efeitos hipoglicêmicos do hormônio.

5 A diabetes Tipo 2 (também aludida como diabetes melito não dependente de insulina (NIDDM), forma de início na maturidade, forma de início na idade adulta) se desenvolve quando as células musculares, gordurosas e hepáticas falham em responder normalmente à insulina. Esta insuficiência em responder (chamada de resistência à insulina) pode ser
10 devido aos números reduzidos de receptores de insulina sobre estas células ou uma disfunção dos caminhos de sinalização dentro das células ou ambos. As células beta inicialmente compensam quanto a esta resistência à insulina pelo aumento da produção de insulina. Com o tempo, estas células se tornam incapazes de produzir insulina suficiente para manter os níveis de glicose
15 normais, indicando a progressão para a diabetes Tipo 2. A diabetes Tipo 2 é causada por uma combinação de fatores de risco genéticos e adquiridos, incluindo uma dieta de gordura alta, falta de exercício e envelhecimento. Mais do que 90% da população diabética sofre de diabetes Tipo 2 e a incidência continua a crescer, tornando uma causa principal de mortalidade, morbidez e
20 gasto com cuidados de saúde por todo o mundo (Amos *et al.*, Diabetic Med. 14: 51-85, 1997).

 A diabetes Tipo 2 é uma doença complexa caracterizada pelos defeitos no metabolismo de glicose e lipídeo. Tipicamente existem perturbações em muitos parâmetros metabólicos incluindo aumentos nos
25 níveis de glicose plasmática no jejum, níveis de ácido graxo livre e níveis de triglicerídeo, assim como uma diminuição na razão de HDL/LDL. Como debatido acima, uma das causas subjacentes principais de diabetes é considerada ser um aumento na resistência à insulina em tecidos periféricos, principalmente músculo e gordura. As causas da diabetes Tipo 2 não são bem

entendidas. É considerado que tanto a resistência de tecidos alvos para a ação da insulina quanto a secreção à insulina diminuída (“insuficiência de célula β ”) ocorrem. Os tecidos responsáveis pela insulina principais para a homeostase da glicose são o fígado, em que a insulina estimula a síntese de glicogênio e inibe a gliconeogênese; músculo, em que a insulina estimula a captação de glicose e o glicogênio estimula a captação de glicose e inibe a lipólise. Assim, como uma consequência da condição diabética, existem níveis elevados de glicose no sangue, que podem levar à toxicidade celular mediada pela glicose e morbidez subsequente (nefropatia, neuropatia, retinopatia, etc.). A resistência à insulina está fortemente correlacionada com o desenvolvimento da diabetes Tipo 2.

Correntemente, existem vários métodos farmacológicos para o tratamento da diabetes Tipo 2 (Scheen *et al.*, Diabetes Care, 22(9): 1568-1577, 1999). Eles atuam por intermédio de modos diferentes de ação: 1) sulfoniluréias (por exemplo, glimepirida, glisentida, sulfoniluréia, AY31637) essencialmente estimulam a secreção de insulina; 2) biguanidas (por exemplo, metformina) atuam pela promoção da utilização de glicose, redução da produção da glicose hepática e produção de glicose intestinal diminuída; 3) inibidores de alfa-glicosidase (por exemplo, acarbose, miglitol) diminuem a digestão de carboidrato e consequentemente a absorção pelo intestino e reduzem a hiperglicemia pós prandial; 4) tiazolidinodionas (por exemplo, troglitazona, pioglitazona, rosiglitazona, glipizida, balaglitazona, rivoglitazona, netoglitazona, troglitazona, englitazona, AD 5075, T 174, YM 268, R 102380, NC 2100, NIP 223, NIP 221, MK 0767, ciglitazona, adaglitazona, CLX 0921, darglitazona, CP 92768, BM 152054) realçam a ação da insulina, promovendo assim a utilização de glicose em tecidos periféricos; 5) peptídeos equivalentes a glucagon incluindo inibidores de DPP4 (por exemplo, sitagliptina); e 6) a insulina estimula a utilização de glicose de tecido e inibe a produção da glicose hepática. Os métodos

farmacológicos mencionados acima podem ser utilizados individualmente ou em terapia de combinação. Entretanto, cada método tem as suas limitações e efeitos adversos. Com o tempo, uma grande porcentagem de pacientes diabéticos do Tipo 2 perdem a sua resposta a estes agentes.

5 O tratamento com insulina é tipicamente instituído depois que a dieta, exercícios e medicações orais tenham falhado em controlar adequadamente a glicose do sangue. As desvantagens do tratamento com insulina são a necessidade quanto a injeção de medicamento, o potencial para hipoglicemia e ganho de peso.

10 A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória secretada por vários tipos de célula diferentes incluindo monócitos e macrófagos. Quando liberado como parte de uma reação inflamatória, a IL-1 β produz uma faixa de efeitos biológicos, principalmente mediados através da indução de outros mediadores inflamatórios tais como corticotropina, fator de plaqueta 4, prostaglandina E2
15 (PGE2), IL-6 e IL-8. A IL-1 β induz os efeitos inflamatórios tanto local quanto sistêmico através da ativação do receptor IL-1 encontrado em quase todos os tipos de célula. A família da interleucina-1 (IL-1) de citocinas foi implicada em vários estados de doença. Os membros da família IL-1 incluem IL-1 α , IL-1 β e IL-1Ra. Embora relacionados pela sua capacidade para ligar aos
20 receptores de IL-1 (IL-1R1 e IL-1R2), cada uma destas citocinas é diferente, sendo expressada por um gene diferente e tendo uma sequência de aminoácido primário diferente. Além disso, as atividades fisiológicas destas citocinas podem ser distinguidas entre si. Experimentos indicando o envolvimento evidente de IL-1 β na diabetes foram publicados.

25 Maedler *et al*, J Clin Invest (2002) 110: 851-860 sugeriram que na diabetes Tipo 2 a hiperglicemia crônica pode ser nociva para as células β pancreáticas, causando secreção de insulina deteriorada e mencionaram que a IL-1 β é uma citocina proinflamatória que atua durante o processo autoimune de diabetes tipo 1 e inibe a função da célula β . Em particular, eles

testaram a hipótese de que a IL- β pode mediar os efeitos deletérios de níveis de glicose altos. O tratamento de animais diabéticos com glicose plasmática normalizada com florizina e preveniu a expressão da célula β de IL-1 β . Isto foi dito implicar em um processo inflamatório na patogênese da glicotoxicidade na diabetes tipo 2 e eles identificaram o caminho da IL-1 β /NF- κ B como um alvo para preservar a massa e função da célula β nesta condição.

Donath *et al*, J Mol med (2003) 81: 455-470 mencionaram a significância evidente de IL-1 β no caminho para a apoptose da morte de célula β das ilhotas pancreáticas, levando à deficiência da insulina e à diabetes e propuseram métodos terapêuticos anti-inflamatórios planejados para bloquear a apoptose de célula β na diabetes Tipo 1 e 2.

A WO 2004/002512 está direcionada ao uso de um antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) e/ou ditiocarbamato de pirrolidina (PDTC) para o tratamento ou profilaxia da diabetes tipo 2. Entretanto, a dosagem frequente sugerida para o uso terapêutico de polipeptídeo de IL-1Ra no tratamento da diabetes Tipo 2 (injeção a cada 24 horas) podem resultar em problemas com a aceitação pelo paciente, diminuindo deste modo a eficácia desta modalidade de tratamento e/ou limitando a sua desejabilidade. Assim, permanece uma necessidade quanto a meios eficazes para tratar a diabetes Tipo 2, particularmente aquelas que não requerem injeções diárias.

Larsen *et al*, New England Journal of Medicine (2007) 356: 1517-1526 descreve o uso de um antagonista do receptor de IL-1 recombinante (IL-1Ra, anakinra) para o tratamento da diabetes melito tipo 2. Entretanto, a dosagem de 100 mg de anakinra uma vez ao dia por 13 semanas pode resultar em problemas com a aceitação pelo paciente, diminuindo deste modo a eficácia desta modalidade de tratamento ou limitar a sua desejabilidade. Assim, permanece uma necessidade quanto a meios eficazes para tratar a diabetes Tipo 2, particularmente meios de tratamento que não requeiram injeções frequentes (por exemplo, diariamente).

A US 2005/0256197 e US 2005/0152850 são direcionadas a um método para facilitar o controle metabólico (por exemplo, glicose) em um paciente (por exemplo, paciente com diabetes), que compreende diminuir o nível de IL-1 β em fluido crevicular gengival do paciente tal que o nível de

5 TNF circulante seja diminuída, particularmente pelo uso de um agente antiinflamatório, tal como um enxágue bucal de cetorolac antiinflamatório.

A obesidade é uma doença crônica que é altamente prevalente e está associada não apenas com um estigma social, mas também com tempo de vida diminuído e numerosos problemas médicos incluindo o

10 desenvolvimento psicológico adverso, distúrbios dermatológicos tais como infecções, veias varicosas, intolerância ao exercício, diabetes melito, resistência à insulina, hipertensão, hipercolesterolemia e doença cardíaca coronária (Rissanen *et al.*, British Medical Journal, 301: 835-837, 1990). A obesidade está altamente correlacionada com a resistência à insulina e diabetes

15 em animais experimentais e seres humanos. De fato, a obesidade e a resistência à insulina, a última das quais é geralmente acompanhada pela hiperinsulinemia ou hiperglicemia ou ambas, são marcas registradas da diabetes Tipo 2. Além disso, a diabetes Tipo 2 está associada com um risco de duas a quatro vezes de doença da artéria coronária. Apesar de décadas de

20 pesquisa sobre estes sérios problemas de saúde, a etiologia da obesidade e resistência à insulina é desconhecida.

A resistência à insulina está associada com vários estados e condições de doença e está presente em aproximadamente 30 a 40% de indivíduos não diabéticos. Estes estados e condições de doença incluem, mas

25 não são limitados a, pré diabetes e síndrome metabólica (também aludido como síndrome da resistência à insulina). A pré diabetes é um estado de tolerância à glicose anormal caracterizada pela tolerância à glicose prejudicada (IGT) ou glicose no jejum prejudicada (IFG). Pacientes com pré diabetes são resistentes à insulina e estão em alto risco para progressão futura

para a diabetes Tipo 2 observável. A síndrome metabólica é um grupo associado de traços que incluem, mas não são limitados à, hiperinsulinemia, tolerância à glicose anormal, obesidade, redistribuição de gordura para o compartimento abdominal ou corpo superior, hipertensão, disfibrinólise e uma

5 dislipidemia caracterizada por triglicerídeos altos, colesterol HDL baixo e partículas de LDL densas pequenas. A resistência à insulina foi ligada a cada um dos traços, sugerindo que a síndrome metabólica e a resistência à insulina estão intimamente relacionados entre si. O diagnóstico de síndrome metabólica é um fator de risco poderoso para o desenvolvimento futuro da

10 diabetes Tipo 2, assim como aterosclerose acelerada que resulta em ataques cardíacos, acidentes vasculares cerebrais e doença vascular periférica. As citocinas inflamatórias, incluindo IL-1, mostraram mediar a inflamação dentro do tecido adiposo que parece estar envolvida na resistência à insulina de adipócitos (Trayhurn *et al.*, Br. J. Nutr. 92: 347-355, 2004; Wisse, J. Am. Soc. Nephrol. 15: 2792-2800, 2004; Fantuzzi, J. Allergy Clin. Immunol. 115: 911-919, 2005; Matsuzawa, FEBS Lett. 580: 2917-2921, 2006; Greenberg *et al.*, Eur J. Clin. Invest. 32 Suppl. 3: 24-34, 2002; Jager *et al.*, Endocrinology 148: 241-251, 2007). Os adipócitos são células que armazenam gordura e secretam adipocinas (isto é, um subconjunto de citocinas) e são um

15 componente principal do tecido adiposo. Os macrófagos, que são células inflamatórias e os principais produtores das citocinas inflamatórias, IL-1, TNF- α e IL-6, também existem dentro do tecido adiposo, especialmente adiposo inflamado associado com obesidade (Kern *et al.*, Diabetes 52: 1779-1785, 2003). TNF- α e IL-6 foram anteriormente conhecidos dessensibilizar

20 adipócitos para a estimulação de insulina (isto é, resistência à insulina).

25

Por causa dos problemas com os tratamentos correntes, novas terapias para tratar a diabetes Tipo 2 e outras indicações de doença tais como aquelas aqui divulgadas são necessárias para substituir ou complementar os métodos farmacêuticos disponíveis. A presente invenção fornece um método

para o tratamento da diabetes Tipo 2. Além disso, a presente invenção também fornece um método para tratar a obesidade, hiperglicemia, hiperinsulinemia, diabetes Tipo 2, resistência à insulina e estados e condições de doença caracterizados pela resistência à insulina. Os métodos aqui divulgados compreendem, por exemplo, administrar um anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento deste. Métodos que diretamente alvejam o ligando IL-1 β com um anticorpo, particularmente anticorpos que exibem afinidade alta, fornecem vantagens sobre outros métodos potenciais de tratamento, tais como antagonistas do receptor de IL-1 β (por exemplo, IL-1Ra, Anakinra, Kineret®). O desafio para os produtos terapêuticos com base em antagonista do receptor de IL-1 é a necessidade quanto a tais produtos terapêuticos ocuparem um número grande de receptores, que é uma tarefa formidável visto que estes receptores são amplamente expressados em todas as células exceto nas células sanguíneas vermelhas (Dinarello, Curr. Opin. Pharmacol. 4: 378-385, 2004). Na maioria das doenças mediadas por imune, tais como as doenças aqui divulgadas, a quantidade de citocina IL-1 β que é mensurável em fluidos corporais ou associada com células ativadas é relativamente baixo. Assim, um método de tratamento e/ou prevenção que diretamente alveja o ligando de IL-10 é uma estratégia superior, particularmente quando da administração de um anticorpo IL-1 β com alta afinidade.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente divulgação está direcionada aos métodos para o tratamento e/ou prevenção em mamíferos da diabetes Tipo 2, obesidade, hiperglicemia, hiperinsulinemia, produção de insulina diminuída, diabetes Tipo 1, resistência à insulina e/ou estados e condições de doença caracterizados pela resistência à insulina. tais métodos podem ser usados para tratar um paciente mamífero (por exemplo, ser humano) que sofre de ou em risco para diabetes, obesidade, hiperglicemia, hiperinsulinemia, produção de insulina diminuída, resistência à insulina e/ou estados e condições de doença

caracterizados pela resistência à insulina. Os métodos também podem ser usados para prevenir a ocorrência da diabetes Tipo 2, diabetes Tipo 1, obesidade, hiperglicemia, hiperinsulinemia, produção de insulina diminuída, resistência à insulina e estados e condições de doença caracterizados pela
5 resistência à insulina em um paciente em risco.

Em um aspecto, a invenção é um método de tratar em um ser humano, uma doença ou condição selecionadas do grupo que consiste da diabetes Tipo 2, hiperglicemia, hiperinsulinemia, obesidade, produção de insulina diminuída, diabetes Tipo 1 e resistência à insulina, o método
10 compreendendo administrar um anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento deste ao ser humano. Em uma forma de realização preferida, a doença ou condição é selecionada do grupo que consiste da diabetes Tipo 2, hiperglicemia, hiperinsulinemia, obesidade, produção de insulina diminuída e resistência à insulina. Preferivelmente, a doença ou condição é a diabetes Tipo 2, obesidade,
15 produção de insulina diminuída ou resistência à insulina. Mais preferivelmente a doença ou condição é a diabetes Tipo 2, obesidade ou resistência à insulina. Mais preferivelmente a doença ou condição é a diabetes Tipo 2. Em uma forma de realização, o método não aumenta uma doença ou condição cardiovasculares. Em certas formas de realização, o anticorpo ou
20 fragmento são usados para tratar duas ou mais das doenças ou condições anteriormente mencionadas no mesmo paciente (por exemplo, paciente humano).

Em um outro aspecto, a invenção fornece um método para tratar ou prevenir uma doença ou condição pela administração de um anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento, em que a doença ou condição é a pré-diabetes, dislipidemia, hiperlipidemia, hipertensão, síndrome metabólica ou comportamento doentio. Já em um outro aspecto, o método reduz ou previne
25 em um ser humano uma complicação ou condição associadas com a diabetes Tipo 2 selecionadas do grupo que consiste de retinopatia, insuficiência renal,

doença cardiovascular e cicatrização de ferimento, o método compreendendo administrar um anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento deste ao ser humano. Em certas formas de realização, o anticorpo ou fragmento são usados para tratar duas ou mais das doenças ou condições anteriormente mencionadas no mesmo paciente (por exemplo, paciente humano). Em uma outra forma de realização, o anticorpo ou fragmento são usados para tratar a insuficiência renal (por exemplo, doença renal) que pode resultar de uma condição outra que não a diabetes Tipo 2, Já em uma outra forma de realização, o anticorpo ou fragmento são usados para diminuir o nível de proteína reativa C (CRP) em um paciente que exibe níveis elevados de CRP.

Em um outro aspecto, a invenção fornece anticorpos IL-1 β ou fragmentos de anticorpo destes para o uso no tratamento ou prevenção de uma doença ou condição como aqui divulgada. Em um outro aspecto, a invenção fornece anticorpos IL-1 β ou fragmentos de anticorpo destes para o uso no tratamento ou prevenção de uma doença ou condições selecionadas do grupo que consiste da diabetes Tipo 2, obesidade, produção de insulina diminuída e resistência à insulina. Já em um outro aspecto, a invenção fornece anticorpos IL-1 β ou fragmentos de anticorpo destes para o uso no tratamento ou prevenção da diabetes Tipo 2.

Em um outro aspecto, a invenção fornece composições farmacêuticas que compreendem anticorpos IL-1 β ou fragmentos de anticorpo destes e opcionalmente pelo menos um excipiente farmaceuticamente aceitável para o uso no tratamento ou prevenção de uma doença ou condição como aqui divulgada. Em um outro aspecto, a invenção fornece composições farmacêuticas que compreendem anticorpos IL-1 β ou fragmentos de anticorpo destes e opcionalmente pelo menos um excipiente farmaceuticamente aceitável para o uso no tratamento ou prevenção de uma doença ou condições selecionadas do grupo que consiste da diabetes Tipo 2, obesidade, produção de insulina diminuída e resistência à insulina. Já em um outro aspecto, a

invenção fornece composições farmacêuticas que compreendem anticorpos IL-1 β ou fragmentos de anticorpo destes e opcionalmente pelo menos um excipiente farmacêuticamente aceitável para o uso no tratamento ou prevenção da diabetes Tipo 2.

5 Os anticorpos anti-IL-1 β ou fragmentos de anticorpo usados nos métodos da invenção no geral se ligam à IL-1 β com alta afinidade. Em formas de realização preferidas, o anticorpo ou fragmento de anticorpo se ligam à IL-1 β com uma constante de dissociação de cerca de 10 nM ou menos, cerca de 5 nM ou menos, cerca de 1 nM ou menos, cerca de 500 pM
10 ou menos, cerca de 250 pM ou menos, cerca de 100 pM ou menos, cerca de 50 pM ou menos ou cerca de 25 pM ou menos. Em formas de realização particularmente preferidas, o anticorpo ou fragmento de anticorpo se ligam à IL-1 β humana com uma constante de dissociação de cerca de 100 pM ou menos, cerca de 50 pM ou menos, cerca de 10 pM ou menos, cerca de 5 pM
15 ou menos, cerca de 3 pM ou menos, cerca de 1 pM ou menos, cerca de 0,75 pM ou menos, cerca de 0,5 pM ou menos, cerca de 0,3 pM ou menos, cerca de 0,2 pM ou menos ou cerca de 0,1 pM ou menos. Em formas de realização particularmente preferidas, o anticorpo ou fragmento de anticorpo se ligam à IL-1 β humana com uma constante de dissociação de cerca de 10 pM ou
20 menos.

Em um outro aspecto da invenção, o anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento de anticorpo são um anticorpo neutralizador. Em um outro aspecto, o anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento de anticorpo se liga um epítipo de IL-1 β tal que o anticorpo ligado ou fragmento substancialmente permite a ligação de
25 IL-1 β ao receptor de IL-1 I (IL-1RI). Em um outro aspecto, o anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento de anticorpo se liga a IL-1 β , mas não impede substancialmente a ligação de IL-1 β da ligação ao receptor de IL-1 I (IL-1RI). Em um outro aspecto, o anticorpo ou fragmento de anticorpo não se ligam detectavelmente a IL-1 α , IL-1R ou IL-1Ra. Já em um outro aspecto da

invenção, o anticorpo ou fragmento de anticorpo se ligam a um epítipo contido na sequência ESVDPKNYPKKKMEKRFFVFNKIE (SEQ ID NO: 1). Já em um outro aspecto da invenção, o anticorpo ou fragmento de anticorpo se ligam a um epítipo que incorpora Glu64 de IL-1 β . Já em um outro aspecto da invenção, o anticorpo ou fragmento de anticorpo se ligam aos aminoácidos de 1 a 34 do terminal N de IL-1 β . Preferivelmente, o anticorpo ou fragmento de anticorpo são engenheirados humanos, humanizados ou humanos.

Em um outro aspecto, a invenção fornece um método de tratar um ser humano que exibe sintomas de ou em risco para, desenvolver qualquer uma das doenças ou condições anteriormente mencionadas (por exemplo, diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2, hiperglicemia, hiperinsulinemia, obesidade, produção de insulina diminuída, resistência à insulina), o método compreendendo administrar um anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento deste ao ser humano em uma ou mais doses.

Em um outro aspecto da invenção, um método é fornecido para tratar em um ser humano, uma doença ou condição selecionadas do grupo que consiste da diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2, hiperglicemia, hiperinsulinemia, obesidade, produção de insulina diminuída e resistência à insulina, o método compreendendo administrar um anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento deste ao ser humano, em que a administração de uma dose inicial do anticorpo IL-1 β ou fragmento de anticorpo são seguidos pela administração de uma ou mais doses subsequentes. Em uma forma de realização, a administração de uma dose inicial do anticorpo ou fragmento de anticorpo é seguida pela administração de duas ou mais doses subsequentes. Em uma outra forma de realização, a administração de uma dose inicial do anticorpo ou fragmento de anticorpo é seguida pela administração de uma ou mais doses subsequentes e em que a dita uma ou mais doses subsequentes estão em uma quantidade que é aproximadamente a mesma ou menor do que a dose inicial. Em uma outra forma de realização, a administração de uma

dose inicial do anticorpo ou fragmento de anticorpo é seguida pela administração de uma ou mais doses subsequentes e em que pelo menos uma das doses subsequentes está em uma quantidade que é maior do que a dose inicial.

5 Em uma forma de realização, duas ou mais, três ou mais, quatro ou mais, cinco ou mais, seis ou mais, sete ou mais, oito ou mais, nove ou mais, dez ou mais ou onze ou mais doses subsequentes do anticorpo são administradas. Em uma outra forma de realização a administração da dose inicial e cada uma ou mais doses subsequentes são separadas uma da outra
10 por um intervalo de pelo menos cerca de duas semanas, pelo menos cerca de três semanas, pelo menos cerca de um mês, pelo menos cerca de dois meses, pelo menos cerca de três meses, pelo menos cerca de quatro meses, pelo menos cerca de cinco meses, pelo menos cerca de seis meses, pelo menos cerca de sete meses, pelo menos cerca de oito meses, pelo menos cerca de
15 nove meses, pelo menos cerca de dez meses, pelo menos cerca de onze meses ou pelo menos cerca de doze meses.

 Em uma outra forma de realização, o anticorpo ou fragmento são administrados em uma ou mais doses de 5 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento, 3 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento, 2 mg/kg ou
20 menos de anticorpo ou fragmento, 1 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento, 0,75 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento, 0,5 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento, 0,3 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento, 0,1 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento ou 0,03 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento. Preferivelmente, em cada uma das formas
25 de realização anteriormente mencionadas, o anticorpo ou fragmento são administrados em uma ou mais doses de pelo menos 0,01 mg/kg de anticorpo ou fragmento, pelo menos, 0,03 mg/kg de anticorpo ou fragmento, pelo menos 0,05 mg/kg de anticorpo ou fragmento ou pelo menos 0,09 mg/kg de anticorpo ou fragmento. As quantidades de dosagem acima referem-se a mg

(anticorpo ou fragmento)/kg (peso do indivíduo a ser tratado).

Em uma outra forma de realização, a dose inicial e uma ou mais doses subsequentes de anticorpo ou fragmento são cada uma de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 10 mg/kg de anticorpo, de cerca de 0,05 a cerca de 5 mg/kg de anticorpo, de cerca de 0,05 mg/kg a cerca de 3 mg/kg de anticorpo, de cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 3 mg/kg de anticorpo, de cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 1 mg/kg de anticorpo, de cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 0,5 mg/kg de anticorpo, de cerca de 0,3 mg/kg a cerca de 5 mg/kg de anticorpo, de cerca de 0,3 mg/kg a cerca de 3 mg/kg de anticorpo, de cerca de 0,3 mg/kg a cerca de 1 mg/kg de anticorpo, de cerca de 0,5 mg/kg a cerca de 5 mg/kg de anticorpo, de cerca de 0,5 mg/kg a cerca de 3 mg/kg de anticorpo, de cerca de 0,5 mg/kg a cerca de 1 mg/kg de anticorpo, de cerca de 1 mg/kg a cerca de 5 mg/kg de anticorpo ou de cerca de 1 mg/kg a cerca de 3 mg/kg de anticorpo. Em certas formas de realização, duas ou mais, três ou mais, quatro ou mais, cinco ou mais, seis ou mais, sete ou mais, oito ou mais, nove ou mais, dez ou mais ou onze ou mais doses subsequentes do anticorpo são administradas. As quantidades de dosagem acima referem-se a mg (anticorpo ou fragmento)/kg (peso do indivíduo a ser tratado). O mesmo se aplica em seguida se uma quantidade de dosagem é mencionada.

Em um outro aspecto, a invenção fornece um método de tratar em um ser humano, uma doença ou condição selecionadas do grupo que consiste da diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2, hiperglicemia, hiperinsulinemia, obesidade, produção de insulina diminuída e resistência à insulina, o método compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento deste ao ser humano como uma dose inicial de cerca de 5 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento e uma pluralidade de doses subsequentes de anticorpo ou fragmento em uma quantidade em torno da mesma ou menor do que a dose inicial, em que as doses subsequentes são separadas por um intervalo de tempo de pelo menos 2

semanas.

Em um outro aspecto, a invenção fornece um método de tratar em um ser humano, uma doença ou condição selecionadas do grupo que consiste da diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2, hiperglicemia, hiperinsulinemia, obesidade, produção de insulina diminuída e resistência à insulina, o método compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento deste ao ser humano como uma dose inicial de cerca de 3 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento e uma pluralidade de doses subsequentes de anticorpo ou fragmento em uma quantidade em torno da mesma ou menor do que a dose inicial, em que as doses subsequentes são separadas por um intervalo de tempo de pelo menos 2 semanas.

Em um outro aspecto, a invenção fornece um método de tratar em um ser humano, uma doença ou condição selecionadas do grupo que consiste da diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2, hiperglicemia, hiperinsulinemia, obesidade, produção de insulina diminuída e resistência à insulina, o método compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento deste ao ser humano como uma dose inicial de cerca de 1 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento e uma pluralidade de doses subsequentes de anticorpo ou fragmento em uma quantidade em torno da mesma ou menor do que a dose inicial, em que as doses subsequentes são separadas por um intervalo de tempo de pelo menos 2 semanas.

Em um outro aspecto, a invenção fornece um método de tratar em um ser humano, uma doença ou condição selecionadas do grupo que consiste de diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2, hiperglicemia, hiperinsulinemia, obesidade, produção de insulina diminuída e resistência à insulina, o método compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento deste ao ser humano como uma dose

inicial de cerca de 0,5 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento e uma pluralidade de doses subsequentes de anticorpo ou fragmento em uma quantidade em torno da mesma ou menor do que a dose inicial, em que as doses subsequentes são separadas por um intervalo de tempo de pelo menos 2

5 semanas.

Em um outro aspecto, a invenção fornece um método de tratar em um ser humano, uma doença ou condição selecionadas do grupo que consiste da diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2, hiperglicemia, hiperinsulinemia, obesidade, produção de insulina diminuída e resistência à insulina, o método

10 compreendendo administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento deste ao ser humano como uma dose inicial de cerca de 0,3 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento e uma pluralidade de doses subsequentes de anticorpo ou fragmento em uma quantidade em torno da mesma ou menor do que a dose inicial, em que as

15 doses subsequentes são separadas por um intervalo de tempo de pelo menos 2 semanas.

Em um outro aspecto, a invenção fornece um método de tratar em um ser humano, uma doença ou condição selecionadas do grupo que consiste da diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2, hiperglicemia, hiperinsulinemia,

20 obesidade, produção de insulina diminuída e resistência à insulina, o método compreendendo administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento deste ao ser humano como uma dose inicial de cerca de 0,1 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento e uma pluralidade de doses subsequentes de anticorpo ou fragmento em uma

25 quantidade em torno da mesma ou menor do que a dose inicial, em que as doses subsequentes são separadas por um intervalo de tempo de pelo menos 2 semanas.

Preferivelmente, nas formas de realização anteriormente mencionadas em que o anticorpo ou fragmento são administrados como uma

dose inicial e uma pluralidade de doses subsequentes, a dose de anticorpo ou fragmento é de pelo menos 0,01 mg/kg de anticorpo ou fragmento, pelo menos, 0,03 mg/kg de anticorpo ou fragmento, pelo menos 0,05 mg/kg de anticorpo ou fragmento ou pelo menos 0,09 mg/kg de anticorpo ou fragmento.

5 Já em um outro aspecto da invenção, o anticorpo ou fragmento são administrados como uma dose fixa, independente de uma dose por razão em peso do paciente. Em uma forma de realização, o anticorpo ou fragmento são administrados em uma ou mais doses fixas de 1000 mg ou menos de anticorpo ou fragmento, 750 mg ou menos de anticorpo ou fragmento, 500 mg
10 ou menos de anticorpo ou fragmento, 250 mg ou menos de anticorpo ou fragmento, 100 mg ou menos de anticorpo ou fragmento ou cerca de 25 mg ou menos de anticorpo ou fragmento. Em uma outra forma de realização, o anticorpo ou fragmento são administrados em uma ou mais doses fixas de pelo menos cerca de 1 mg de anticorpo ou fragmento, pelo menos cerca de 5
15 mg de anticorpo ou fragmento ou pelo menos cerca de 10 mg de anticorpo ou fragmento.

 Em certas formas de realização, a dose fixa é de cerca de 1 mg a cerca de 10 mg, cerca de 1 mg a cerca de 25 mg, cerca de 10 mg a cerca de 25 mg, cerca de 10 mg a cerca de 50 mg, cerca de 10 mg a cerca de 100 mg,
20 cerca de 25 mg a cerca de 50 mg, cerca de 25 mg a cerca de 100 mg, cerca de 50 mg a cerca de 100 mg, cerca de 50 mg a cerca de 150 mg, cerca de 100 mg a cerca de 150 mg, cerca de 100 mg a cerca de 200 mg, cerca de 150 mg a cerca de 250 mg, cerca de 200 mg a cerca de 250 mg, cerca de 200 mg a cerca de 300 mg, cerca de 250 mg a cerca de
25 300 mg, cerca de 250 mg a cerca de 500 mg, cerca de 300 mg a cerca de 400 mg, cerca de 400 mg a cerca de 500 mg, cerca de 400 mg a cerca de 600 mg, cerca de 500 mg a cerca de 750 mg, cerca de 600 mg a cerca de 750 mg, cerca de 700 mg a cerca de 800 mg, cerca de 750 mg a cerca de 1000 mg. Em uma forma de realização preferida, a dose fixa é selecionada do grupo que consiste

de cerca de 1 mg a cerca de 10 mg, cerca de 1 mg a cerca de 25 mg, cerca de 10 mg a cerca de 25 mg, cerca de 10 mg a cerca de 100 mg, cerca de 25 mg a cerca de 50 mg, cerca de 50 mg a cerca de 100 mg, cerca de 100 mg a cerca de 150 mg, cerca de 150 mg a cerca de 200 mg, cerca de 200 mg a cerca de 250 mg.

Em um outro aspecto, a invenção fornece um método de tratar em um ser humano, uma doença ou condição selecionadas do grupo que consiste da diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2, hiperglicemia, hiperinsulinemia, obesidade, produção de insulina diminuída e resistência à insulina, o método compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento deste ao ser humano, em que a administração de uma dose inicial do anticorpo ou fragmento de anticorpo é seguida pela administração de uma ou mais doses subsequentes e em que a concentração plasmática do dito anticorpo ou fragmento de anticorpo no ser humano é permitida diminuir abaixo de um nível de cerca de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ por um período de tempo maior do que cerca de 1 semana e menor do que cerca de 6 meses entre as administrações durante um curso de tratamento com a dita dose inicial e uma ou mais doses subsequentes. Em uma forma de realização, a concentração plasmática do dito anticorpo ou fragmento de anticorpo é permitida diminuir abaixo de um nível de cerca de 0,07 $\mu\text{g/ml}$, cerca de 0,05 $\mu\text{g/ml}$, cerca de 0,03 $\mu\text{g/ml}$ ou cerca de 0,01 $\mu\text{g/ml}$ por um período de tempo maior do que cerca de 1 semana e menor do que cerca de 5 meses, cerca de 4 meses, cerca de 3 meses, cerca de 2 meses, cerca de 1 mês, cerca de 3 semanas ou cerca de 2 semanas entre as administrações. Em uma forma de realização, estes valores plasmáticos referem-se aos valores obtidos para um indivíduo que é tratado com o anticorpo ou fragmento de acordo com a invenção. Em uma forma de realização, um tal indivíduo pode ser um paciente que sofre de uma das doenças mencionadas a seguir tais como diabetes Tipo 2.

A invenção considera que um anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento usado de acordo com os métodos aqui pode ser administrado em qualquer uma das quantidades de dose anteriormente mencionadas, números de administrações subsequentes e intervalos de dosagem entre administrações e que qualquer uma das quantidades de dose divulgadas, números de administrações subsequentes e intervalos de dosagem entre administrações podem ser combinadas entre si em regimes alternativos para modular o benefício terapêutico. Em certas formas de realização, a uma ou mais doses subsequentes estão em uma quantidade que é aproximadamente a mesma ou menor do que a primeira dose administrada. Em uma outra forma de realização, a uma ou mais doses subsequentes estão em uma quantidade que é aproximadamente maior do que a primeira dose administrada. Preferivelmente o anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento são administrados pela injeção subcutânea, intramuscular ou intravenosa. A invenção considera que cada dose de anticorpo ou fragmento pode ser administrada em um ou mais locais.

Em um outro aspecto, a invenção fornece um método de tratar ou prevenir uma doença ou condição em um ser humano usando um anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento de anticorpo, em que a doença ou condição é a diabetes Tipo 2 e em que uma dose do anticorpo ou fragmento são suficientes para se obter pelo menos um 0,5, pelo menos um 1,0, pelo menos um 1,5, pelo menos um 2,0, pelo menos um 2,5 ou pelo menos um 3,0 pontos de porcentagem de melhora na A1c da hemoglobina. Em uma forma de realização, estes valores de parâmetro referem-se a valores obtidos para um indivíduo que é tratado com o anticorpo ou fragmento de acordo com a invenção. Em uma forma de realização, um tal indivíduo pode ser um paciente que sofre de uma das doenças mencionadas a seguir tais como diabetes Tipo 2.

Em uma forma de realização preferida, a melhora na A1c da

hemoglobina é suficiente para atingir diretrizes reguladoras para a aprovação de agentes terapêuticos no tratamento da diabetes Tipo 2. Os métodos de ensaio para a determinação de A1c da hemoglobina são bem conhecidos na técnica. A invenção considera que a dose de anticorpo ou fragmento
5 suficientes para se obter a melhora na A1c da hemoglobina, pode compreender qualquer uma das quantidades de dose anteriormente mencionadas, números de administrações subsequentes e intervalos de dosagem entre as administrações, assim como qualquer combinação de números de quantidades de dose de administrações subsequentes e intervalos
10 de dosagem entre as administrações de anticorpo ou fragmento aqui descritas. Além disso, a melhora na A1c da hemoglobina pode ser em um ponto de tempo de pelo menos cerca de 1 mês, cerca de 2 meses, cerca de 3 meses, cerca de 4 meses ou cerca de 5 meses e preferivelmente cerca de 6 meses ou mais, cerca de 7 meses ou mais, cerca de 8 meses ou mais, cerca de 9 meses
15 ou mais, cerca de 10 meses ou mais, cerca de 11 meses ou mais ou cerca de 12 meses ou mais a seguir de uma administração inicial de uma ou mais doses de anticorpo ou fragmento.

Em um outro aspecto dos métodos anteriormente mencionados para tratar ou prevenir a diabetes Tipo 2, o método é suficiente para se obter
20 pelo menos uma das seguintes modificações: redução no nível de açúcar no sangue no jejum, diminuição na resistência à insulina, redução da hiperinsulinemia, melhora na tolerância à glicose, redução no peptídeo reativo C (CRP), produção de insulina aumentada e redução de hiperglicemia, redução na necessidade quanto a medicação da diabetes, redução em BMT,
25 mudança na AUC de peptídeo C da glicose/insulina, redução no nível de glicose da urina, redução em reagentes da fase aguda, diminuição nos lipídeos séricos com melhora no perfil de lipídeo com respeito ao risco cardiovascular. Os métodos de ensaio para determinar qualquer uma das modificações acima são bem conhecidos na técnica. Além disso, a invenção considera que a

obtenção de uma das modificações anteriormente mencionadas pode ser em um ponto de tempo de pelo menos cerca de 1 mês, cerca de 2 meses, cerca de 3 meses, cerca de 4 meses ou cerca de 5 meses e preferivelmente pelo menos cerca de 6 meses ou mais, cerca de 7 meses ou mais, cerca de 8 meses ou mais, cerca de 9 meses ou mais, cerca de 10 meses ou mais, cerca de 11 meses ou mais ou cerca de 12 meses ou mais a seguir de uma administração inicial de uma ou mais doses de anticorpo ou fragmento.

Em um outro aspecto da invenção, o método aqui fornecido reduz ou previne uma complicação ou condição associada com a diabetes Tipo 2 selecionadas do grupo que consiste de retinopatia, insuficiência renal, doença cardiovascular e cicatrização de ferimento, o método compreendendo administrar um anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento deste ao ser humano. Em uma forma de realização, a complicação ou condição é a doença cardiovascular e em que a dita doença cardiovascular é a aterosclerose ou doença vascular periférica. Em uma outra forma de realização, a complicação ou condição é a cicatrização de ferimento e em que a dita condição de cicatrização de ferimento é a úlcera diabética. Em um outro aspecto, o método previne ou retarda a doença renal de estágio diabético ou neuropatia diabética. Em uma forma de realização, o anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento é administrado em combinação com pelo menos um outro tratamento medicamente aceito para a doença, condição ou complicação. Em uma outra forma de realização, o pelo menos um outro tratamento medicamente aceito para a doença, condição ou complicação é reduzido ou descontinuado, enquanto que o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento é mantida em um regime de dosagem constante. Em uma outra forma de realização, o pelo menos um outro tratamento medicamente aceito para a doença, condição ou complicação é reduzido ou descontinuado e o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento é reduzido. Em uma outra forma de realização, o pelo menos um outro tratamento medicamente aceito para a

doença, condição ou complicação é reduzido ou descontinuado e o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento é aumentado. Já em uma outra forma de realização, o pelo menos um outro tratamento medicamente aceito para a doença, condição ou complicação é mantido e o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento é reduzido ou descontinuado. Já em uma outra forma de realização, o pelo menos um outro tratamento medicamente aceito para a doença, condição ou complicação e o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento são reduzidos ou descontinuados.

Em um outro aspecto da invenção, um método de reduzir a quantidade de proteína reativa C em um paciente é fornecida, o método compreendendo administrar um anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento deste ao paciente. Em uma forma de realização, o anticorpo ou fragmento de anticorpo são administrados em uma ou mais doses de 1 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento, 0,75 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento, 0,5 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento, 0,3 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento, 0,1 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento ou 0,03 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento. Preferivelmente, o anticorpo ou fragmento são administrados em uma ou mais doses de pelo menos 0,01 mg/kg de anticorpo ou fragmento, pelo menos, 0,03 mg/kg de anticorpo ou fragmento, pelo menos 0,05 mg/kg de anticorpo ou fragmento ou pelo menos 0,09 mg/kg de anticorpo ou fragmento. Em uma outra forma de realização, o anticorpo ou fragmento são administrados como uma ou mais doses fixas, independente de uma dose por razão em peso do paciente, de 500 mg ou menos de anticorpo ou fragmento, 250 mg ou menos de anticorpo ou fragmento, 100 mg ou menos de anticorpo ou fragmento ou cerca de 25 mg ou menos de anticorpo ou fragmento. Preferivelmente, o anticorpo ou fragmento são administrados em uma ou mais doses fixas de pelo menos cerca de 1 mg de anticorpo ou fragmento, pelo menos cerca de 5 mg de anticorpo ou fragmento ou pelo menos cerca de 10 mg de anticorpo ou fragmento. Em uma outra forma de

realização, o anticorpo ou fragmento de anticorpo se ligam a IL-1 β com uma constante de dissociação de cerca de 500 pM ou menos, 250 pM ou menos, cerca de 100 pM ou menos, cerca de 50 pM ou menos ou cerca de 25 pM ou menos, cerca de 10 pM ou menos, cerca de 5 pM ou menos, cerca de 3 pM ou menos, cerca de 1 pM ou menos, cerca de 0,75 pM ou menos, cerca de 0,5 pM ou menos, cerca de 0,3 pM ou menos, cerca de 0,2 pM ou menos ou cerca de 0,1 pM ou menos. Em uma outra forma de realização, a administração de uma dose inicial é seguida pela administração de uma ou mais doses subsequentes, separadas uma da outra por um intervalo de pelo menos cerca de duas semanas, pelo menos cerca de três semanas, pelo menos cerca de um mês, pelo menos cerca de dois meses, pelo menos cerca de três meses, pelo menos cerca de quatro meses, pelo menos cerca de cinco meses, pelo menos cerca de seis meses, pelo menos cerca de sete meses, pelo menos cerca de oito meses, pelo menos cerca de nove meses, pelo menos cerca de dez meses, pelo menos cerca de onze meses ou pelo menos cerca de doze meses. Em uma outra forma de realização, o dito método de reduzir a quantidade de proteína reativa C em um paciente é fornecido, em que o paciente está sofrendo de uma doença renal (por exemplo, doença renal crônica, insuficiência renal). Em uma outra forma de realização, está sofrendo de diabetes Tipo 2, diabetes Tipo 1, obesidade, hiperglicemia, hiperinsulinemia, produção de insulina diminuída, resistência à insulina e/ou estados e condições de doença caracterizados pela resistência à insulina. Em uma outra forma de realização, está sofrendo de uma doença ou condição de pré-diabetes, dislipidemia, hiperlipidemia, hipertensão, síndrome metabólica ou comportamento doentio. As quantidades de dosagem acima referem-se a mg (anticorpo ou fragmento)/kg (peso do indivíduo a ser tratado). A administração dos anticorpos ou fragmentos com as constantes de dissociação anteriormente mencionadas pode ser realizada de acordo com qualquer uma das quantidades de dose e intervalos de dosagem anteriormente mencionados (quando da

administração de duas ou mais doses).

Em um outro aspecto, os métodos aqui fornecidos estão em conjunção com pelo menos um método de tratamento adicional, o dito método de tratamento adicional compreendendo administrar pelo menos uma
5 composição farmacêutica que compreende um agente ativo outro que não um anticorpo IL-1 β ou fragmento. Já em um outro aspecto, os métodos previnem ou retardam a necessidade quanto a pelo menos um método de tratamento adicional, o dito método de tratamento adicional compreendendo administrar pelo menos uma composição farmacêutica que compreende um agente ativo
10 outro que não um anticorpo IL-1 β ou fragmento. Ainda em um outro aspecto, os métodos reduzem a quantidade, frequência ou duração de pelo menos um método de tratamento adicional, o dito método de tratamento adicional compreendendo administrar pelo menos uma composição farmacêutica que compreende um agente ativo outro que não um anticorpo IL-1 β ou fragmento.
15 Em uma forma de realização, a pelo menos uma composição farmacêutica que compreende um agente ativo outro que não um anticorpo IL-1 β ou fragmento é selecionada do grupo que consiste de uma sulfoniluréia, uma meglitinida, uma biguanida, um inibidor da alfa-glicosidase, uma tiazolidinodiona, um peptídeo equivalente a glucagon e insulina. Em uma outra forma de
20 realização, o agente ativo é uma sulfoniluréia. Em uma outra forma de realização, o agente ativo é uma meglitinida. Em uma outra forma de realização, o agente ativo é uma biguanida. Em uma outra forma de realização, o agente ativo é um inibidor da alfa-glicosidase. Em uma outra forma de realização, o agente ativo é uma tiazolidinodiona. Em uma outra
25 forma de realização, o agente ativo é um peptídeo equivalente a glucagon. Em uma outra forma de realização, o agente ativo é insulina. Em uma outra forma de realização, a pelo menos uma composição farmacêutica que compreende um agente ativo, compreende dois agente ativos. Em uma forma de realização, os dois agentes ativos são uma sulfoniluréia e uma biguanida. Em

uma outra forma de realização, os dois agentes ativos são uma tiazolidinodiona e uma biguanida. Já em uma outra forma de realização, o tratamento com o pelo menos um agente ativo é mantido. Em uma outra forma de realização, o tratamento com o pelo menos um agente ativo é
5 reduzido ou descontinuado, enquanto que o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento é mantido em um regime de dosagem constante. Em uma outra forma de realização, o tratamento com o pelo menos um agente ativo é reduzido ou descontinuado e o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento é reduzido. Em uma outra forma de realização, o tratamento com o
10 pelo menos um agente ativo é reduzido ou descontinuado e o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento é aumentado. Já em uma outra forma de realização, o tratamento com o pelo menos um agente ativo é mantido e o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento é reduzido ou descontinuado. Já em uma outra forma de realização, o tratamento com o pelo
15 menos um agente ativo e o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento é reduzido ou descontinuado.

Em um outro aspecto, a invenção fornece um método de tratar em um ser humano, uma doença ou condição selecionadas do grupo que consiste da diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2, hiperglicemia, hiperinsulinemia,
20 obesidade, produção de insulina diminuída e resistência à insulina, o método compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento deste ao ser humano, em que a administração de uma dose inicial do anticorpo ou fragmento de anticorpo é seguida pela administração de uma ou mais doses subsequentes e em que a
25 concentração plasmática do dito anticorpo ou fragmento de anticorpo no ser humano é mantida em um nível de pelo menos cerca de 0,03 $\mu\text{g/ml}$, pelo menos cerca de 0,05 $\mu\text{g/ml}$, pelo menos cerca de 0,08 $\mu\text{g/ml}$, pelo menos cerca de 0,1 $\mu\text{g/ml}$, pelo menos cerca de 0,15 $\mu\text{g/ml}$, pelo menos cerca de 0,2 $\mu\text{g/ml}$, pelo menos cerca de 0,25 $\mu\text{g/ml}$, pelo menos cerca de 0,3 $\mu\text{g/ml}$, pelo

menos cerca de 0,4 µg/ml, pelo menos cerca de 0,5 µg/ml, pelo menos cerca de 0,6 µg/ml, pelo menos cerca de 0,8 µg/ml, pelo menos cerca de 1 µg/ml, pelo menos cerca de 1,5 µg/ml, pelo menos cerca de 2 µg/ml, pelo menos cerca de 3 µg/ml, pelo menos cerca de 4 µg/ml ou pelo menos cerca de 5 µg/ml durante um curso de tratamento com a dita dose inicial e uma ou mais doses subsequentes. Em uma forma de realização, estes valores plasmáticos referem-se a valores obtidos para um indivíduo que é tratado com o anticorpo ou fragmento de acordo com a invenção. Em uma forma de realização, um tal indivíduo pode ser um paciente que sofre de uma das doenças mencionadas a seguir tal como diabetes Tipo 2.

Em um outro aspecto, a invenção fornece um método de tratar em um ser humano, uma doença ou condição selecionadas do grupo que consiste da diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2, hiperglicemia, hiperinsulinemia, obesidade, produção de insulina diminuída e resistência à insulina, o método compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento deste ao ser humano, em que a administração do anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento deste ao ser humano resulta em uma diminuição na produção de um ou mais produtos de gene selecionados do grupo que consiste de leptina, resistina, visfatina, RANTES, IL-6, MCP-I, PAI-1, proteína estimuladora de acilação, SAA3, Pentraxina-3, fator de inibição de migração de macrófago, IL-1RA, IL-12, IL-8 e TNF- α . Em uma forma de realização, a administração do anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento deste ao ser humano resulta em uma diminuição na produção de um ou mais produtos de gene selecionadas do grupo que consiste de leptina, resistina e visfatina. Em uma outra forma de realização, a administração do anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento deste ao ser humano resulta em uma diminuição na produção de um ou mais produtos de gene selecionados do grupo que consiste de MCP-1, RANTES, IL-6, TNF- α e Pentraxina-3. Já em uma outra forma de realização, a dita diminuição na produção de um ou mais

produtos de gene é de tecido adiposo. Já em uma outra forma de realização, a dita diminuição é detectada no sangue do ser humano.

Em um outro aspecto, a invenção fornece um método de tratar em um ser humano, uma doença ou condição selecionadas do grupo que
5 consiste da diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2, hiperglicemia, hiperinsulinemia, obesidade, produção de insulina diminuída e resistência à insulina, o método compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento deste ao ser humano, em que a
administração do anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento deste ao ser humano
10 resulta em um aumento na produção de adiponectina. Em uma forma de realização, o dito aumento na produção de adiponectina é de tecido adiposo. Em uma outra forma de realização, o dito aumento é detectado no sangue do ser humano.

Em um outro aspecto, a invenção fornece um método de tratar
15 em um ser humano, uma doença ou condição selecionadas do grupo que consiste da diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2, hiperglicemia, hiperinsulinemia, obesidade, produção de insulina diminuída e resistência à insulina, o método compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento deste ao ser humano, em que o anticorpo
20 ou fragmento deste tem um IC₅₀ mais baixo do que um antagonista do receptor de IL-1 β em um ensaio de inibição de IL-1 β no sangue integral humano que mede produção induzida pela IL-1 β de IL-8. Em uma forma de realização, o anticorpo ou fragmento tem um IC₅₀ que é menor do que cerca de 90%, 80%, 70%, 60%, 50% da IC₅₀ de um antagonista do receptor de IL-
25 1 β em um ensaio de inibição de IL-1 β no sangue integral humano que mede a Produção induzida por IL-1 β de IL-8. Em uma outra forma de realização, o anticorpo ou fragmento tem um IC₅₀ que é menor do que cerca de 40%, 30%, 20%, 10% da IC₅₀ de um Antagonista do receptor de IL-1 β em um ensaio de inibição de IL-1 β no sangue integral humano que mede a produção induzida

por IL-1 β de IL-8. Em uma forma de realização preferida, o anticorpo ou fragmento tem um IC₅₀ que é menor do que cerca de 8%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% da IC₅₀ de um antagonista do receptor de IL-1 β em um ensaio de inibição de IL1 β em sangue integral humano que mede a Produção induzida por IL-1 β de IL-8. Em uma forma de realização, o antagonista do receptor de IL-1 β é anaquinra (isto é, Kineret®).

Em um outro aspecto, a invenção fornece um método de tratar em um ser humano, uma doença ou condição selecionadas do grupo que consiste da diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2, hiperglicemia, hiperinsulinemia, obesidade, produção de insulina diminuída e resistência à insulina, o método compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento deste ao ser humano, em que o anticorpo ou fragmento deste fornece a inibição *in vivo* da liberação estimulada por IL-1 β de IL-6 em camundongos comparada a um anticorpo de controle usando um ensaio que é descrito por Economides *et al.*, Nature Med., 9: 47-52 (2003) que é incorporada por referência. Em uma forma de realização o anticorpo ou fragmento fornece a inibição *in vivo* da liberação estimulada por IL-1 β de IL-6 em camundongos de pelo menos cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50% comparados com o anticorpo de controle. Em uma outra forma de realização, o anticorpo ou fragmento fornece a inibição *in vivo* da liberação estimulada por IL-18 de IL-6 em camundongos de pelo menos cerca de 60%, 70%, 80%, 90%, 95% comparados com o anticorpo de controle. Em uma forma de realização, o anticorpo de controle é um anticorpo de controle de isótipo.

Em um outro aspecto, a invenção fornece um método de tratar em um ser humano, uma doença ou condição selecionadas do grupo que consiste da diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2, hiperglicemia, hiperinsulinemia, obesidade, produção de insulina diminuída e resistência à insulina, o método compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento deste ao ser humano, em que o anticorpo

ou fragmento deste inibe a produção de citocina induzida pelo *Staphylococcus epidermidis* no sangue integral humano comparado com um controle onde nenhum anticorpo é usado. Em uma forma de realização o anticorpo ou fragmento fornece um nível maior de inibição da produção de citocina induzida pelo *Staphylococcus epidermidis* no sangue integral humano em pelo menos cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50% comparados com o controle. Em uma outra forma de realização, o anticorpo ou fragmento fornece um nível maior de inibição da produção de citocina induzida pelo *Staphylococcus epidermidis* no sangue integral humano em pelo menos cerca de 60%, 70%, 80%, 90%, 95% comparados com o controle. Em uma forma de realização, as citocinas inibidas são IL-1 β , IL-1 α , M-6, IL-8, IL-1Ra, TNF α ou IFN γ .

Em um outro aspecto, a invenção divulga o uso de um anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento deste que como um IC₅₀ mais baixo do que um antagonista do receptor de IL-1 β em um ensaio de inibição de IL-1 β em sangue integral humano que mede a produção induzida pela IL-1 β de IL-8, na fabricação de uma composição para o uso no tratamento da diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2, hiperglicemia, hiperinsulinemia, obesidade, produção de insulina diminuída e resistência à insulina. Em uma forma de realização, o antagonista do receptor IL-1 β é anaquinra (isto é, Kineret[®])

Em um outro aspecto da invenção, o uso dos anticorpos IL-1 β ou fragmentos de ligação é considerado na fabricação de um medicamento para tratar ou prevenir uma doença ou condição como aqui divulgada. Em qualquer um dos usos, o medicamento pode ser coordenado com tratamento usando um segundo agente ativo. Em uma outra forma de realização da invenção, o uso de uma combinação sinérgica de um anticorpo da invenção para a preparação de um medicamento para tratar um paciente que exibe sintomas em risco para desenvolver uma doença ou condição como aqui divulgada, em que o medicamento é coordenado com tratamento usando um segundo agente ativo é considerado. Ainda em uma outra forma de realização

relacionada, a composição é fornecida em que o segundo agente ativo é um outro anticorpo, um fator de crescimento, uma citocina ou insulina. As formas de realização de qualquer um dos usos anteriormente mencionados são considerados em que a quantidade do anticorpo de ligação de IL-1 β ou
5 fragmento no medicamento está em uma dose eficaz para reduzir a dosagem do segundo agente ativo requerido para se obter um efeito terapêutico.

Já em um outro aspecto da invenção, um artigo de fabricação é fornecido, compreendendo um recipiente, uma composição dentro do recipiente compreendendo um anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento deste e um
10 inserto de embalagem contendo instruções para administrar o anticorpo ou fragmento a um ser humano em necessidade de tratamento de acordo com os métodos da invenção anteriormente mencionados. Em uma forma de realização, o recipiente compreende ainda um carregador, excipiente ou diluente farmacologicamente adequados. Em uma forma de realização
15 relacionada, a composição dentro do recipiente compreende ainda um segundo agente ativo. Ainda em uma outra forma de realização relacionada, a composição é fornecida em que o segundo agente ativo é um outro anticorpo, um fator de crescimento, uma citocina ou insulina.

Os kits também são considerados pela presente invenção. Em
20 uma forma de realização, um kit compreende uma quantidade terapêutica ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento, embalada em um recipiente, tal como um frasco ou garrafa e compreendendo ainda um rótulo ligado a ou embalado com o recipiente, o rótulo descrevendo os conteúdos do recipiente e fornecendo indicações e/ou instruções com respeito
25 ao uso dos conteúdos do recipiente para o tratamento ou prevenção de uma doença ou condição de acordo com os métodos da invenção anteriormente mencionados. Em uma forma de realização, o recipiente compreende ainda um carregador, excipiente ou diluente farmacologicamente adequados. Em uma forma de realização relacionada, o recipiente contém ainda um segundo

agente ativo. Ainda em uma outra forma de realização relacionada, o segundo agente ativo compreende um outro anticorpo, um fator de crescimento, uma citocina ou insulina.

Em uma forma de realização, o artigo de fabricação, kit ou medicamento é para o tratamento ou prevenção de uma doença ou condição em um ser humano, a dita doença ou condição selecionadas do grupo que consiste da diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2, hiperglicemia, hiperinsulinemia, obesidade, produção de insulina diminuída e resistência à insulina. Em uma forma de realização preferida, a doença ou condição são selecionadas do grupo que consiste da diabetes Tipo 2, obesidade e resistência à insulina. Em uma outra forma de realização, as instruções de um inserto de embalagem de um artigo de fabricação ou rótulo de um kit compreende instruções para a administração do anticorpo ou fragmento de acordo com qualquer uma das quantidades de dose, números de administrações subsequentes e intervalos de dosagem entre administrações anteriormente mencionados, assim como qualquer combinação de quantidades de números de dose de administrações e intervalos de dosagem subsequentes entre as administrações aqui descritas. Já em uma outra forma de realização, o recipiente do kit ou artigo de fabricação é uma seringa pré enchida.

Deve ser entendido que onde o presente relatório descritivo menciona métodos de tratamento fazendo uso dos anticorpos ou fragmentos destes com certas propriedades (tais como valores K_d ou valores de IC_{50}), isto também significa incorporar o uso de tais anticorpos ou fragmentos destes na fabricação de um medicamento para o uso nestes métodos. Além disso, a invenção também abrange anticorpos ou fragmentos destes tendo estas propriedades assim como composições farmacêuticas que compreendem estes anticorpos ou fragmentos destes para o uso nos métodos de tratamento debatidos em seguida.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DOS DESENHOS

A Fig. 1 é um gráfico que mostra os resultados de um experimento de inibição de IL-1 β *in vitro* para o anticorpo designado AB7 e para Kineret[®] envolvendo a produção induzida por IL-1 de IL-8.

5 A Fig. 2 é um gráfico que mostra os resultados de um experimento de inibição de IL-1 β *in vivo* para os anticorpos designados AB5 e AB7 envolvendo a liberação estimulada por IL-1 de IL-6.

A Fig. 2B é um gráfico que mostra os resultados de um experimento de inibição de IL-1 β *in vivo* para os anticorpos designados AB7 envolvendo a liberação estimulada por IL-1 de IL-6 e comparando a inibição de IL-1 β humana (painel A) versus camundongo (painel B).

A Fig. 3 é um gráfico que mostra concentrações séricas a seguir da administração de 0,1, 1 ou 10 mg/kg de um anticorpo anti-IL-1 β em ratos.

15 A Fig. 4 é um gráfico que mostra as concentrações séricas a seguir da administração de 0,3 ou 3 mg/kg de um anticorpo anti-IL-1 β em macacos Cinomolgos.

A Fig. 5 é um gráfico que modela os perfis de concentração plasmática de um anticorpo anti-IL-1 β em macacos Cinomolgos a seguir de cinco doses mensais de 0,1, 0,3, 1 ou 3 mg/kg.

20 A Fig. 6 é uma tabela que mostra a redução da produção de citocina induzida pelo *Staphiloccus epidermidis* no sangue integral humano pelo tratamento com um anticorpo anti-IL-1 β .

A Fig. 7 é um gráfico que mostra as farmacocinéticas de AB7 em seres humanos a seguir da administração de uma dose de 0,01 mg/kg de anticorpo.

A Fig. 8 é um gráfico que mostra o efeito na redução dos níveis de CRP em seres humanos a seguir da administração de uma dose de 0,01 mg/kg de AB7.

A Fig. 9 é um gráfico que mostra o efeito sobre a redução dos níveis de CRP em seres humanos a seguir da administração de uma dose de 0,03 mg/kg de AB7.

5 A Fig. 10 é um gráfico que mostra níveis de CRP em controles de placebo dos grupos de dose de 0,01 e 0,03 mg/kg.

A Fig. 11 é um gráfico que modela o efeito sobre os níveis de CRP em seres humanos a seguir da administração de várias doses de um anticorpo com propriedades similares ao AB7 em intervalos de 28 dias.

10 A Fig. 12 é um gráfico que mostra o efeito de AB7 em um modelo de camundongo de obesidade induzida pela dieta da diabetes Tipo 2.

DESCRIÇÃO DETALHADA

15 A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória secretada por vários tipos de célula diferentes incluindo monócitos e macrófagos. Quando liberada como parte de uma reação inflamatória, a IL-1 β produz uma faixa de efeitos biológicos, principalmente mediados através da indução de outros mediadores inflamatórios tais como corticotrofina, fator de plaqueta 4, prostaglandina E2 (PGE2), IL-6 e IL-8. IL-1 β induz efeitos inflamatórios tanto locais quanto sistêmicos através da ativação do receptor de IL-1 encontrado em quase todos os tipos de célula.

20 A família da interleucina-1 (IL-1) de citocinas foi implicada em diversos estados de doença tais como artrite reumatóide (RA), osteoartrite, doença de Crohn, colite ulcerativa (UC), choque séptico, doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD), asma, doença do enxerto versus hospedeiro, aterosclerose, leucemia de célula T do adulto, mieloma múltiplo, esclerose múltipla, acidente vascular cerebral e doença de Alzheimer. Os membros da
25 família de IL-1 incluem IL-1 α , IL-1 β e IL-1Ra. Embora relacionada pela sua capacidade para ligar aos receptores de IL-1 (IL-1R1, IL-1R2), cada uma destas citocinas é expressada por um gene diferente e tem uma sequência de aminoácido primária diferente. Além disso, as atividades fisiológicas destas

citocinas podem ser distinguidas uma da outra.

Os compostos que rompem a sinalização do receptor de IL-1 foram investigados como agentes terapêuticos para tratar doenças mediadas pela IL-1, tais como por exemplo algumas das doenças anteriormente mencionadas. Estes compostos incluem IL-1Ra recombinante (Amgen Inc., Thousand Oaks, CA), peptídeo “armadilha” do receptor de IL-1 (Regeneron Inc., Tarrytown, NY), assim como anticorpos IL-1 β derivados de animal e anticorpos IL-1 β recombinantes e fragmentos destes.

Como mencionado acima, o polipeptídeo antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) foi sugerido para o uso no tratamento da diabetes Tipo 2 (WO 2004/002512), mas permanece uma necessidade quanto a meios eficazes para tratar a diabetes Tipo 2, particularmente aquelas que não requeiram injeções diárias, repetidas. Um desafio adicional para os produtos terapêuticos com base no antagonista do receptor de IL-1 é a necessidade quanto a tais produtos terapêuticos ocupar um grande número de receptores, que é uma tarefa formidável visto que estes receptores são amplamente expressados em todas as células exceto as células vermelhas do sangue (Dinarello, Curr. Opin. Pharmacol. 4: 378-385, 2004). Na maioria das doenças imuno-mediadas, tais como as doenças aqui divulgadas, a quantidade de citocina IL-1 β que é mensurável em fluidos corporais ou associada com as células ativadas é relativamente baixa. Assim, um método de tratamento e/ou prevenção que diretamente alveje o ligando de IL-1 β é uma estratégia superior, particularmente quando da administração de um anticorpo IL-1 β com alta afinidade.

A presente invenção fornece métodos e artigos relacionados de fabricação para o tratamento e/ou prevenção em mamíferos da diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2, obesidade, hiperglicemia, hiperinsulinemia, produção de insulina diminuída, resistência à insulina e/ou estados e condições de doença caracterizados pela resistência à insulina, usando um anticorpo ou fragmento

deste específico para IL-1 β .

Como mostrado no Exemplo 1 abaixo, nós surpreendentemente descobrimos que um tal anticorpo (por exemplo, com alta afinidade) pode ser um inibidor muito mais potente do caminho de IL-1 do que é IL-Ra (por exemplo, Kinere[®]) e como mostrado no Exemplo 9 abaixo fornece uma oportunidade para se obter um efeito terapêutico em uma dose mais baixa e/ou com administração menos frequente do que necessário para outros medicamentos, tais como IL-1Ra recombinante.

Tais métodos como aqui descritos com um anticorpo IL-1 β ou fragmento podem incluir o tratamento de um paciente que sofre de diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2, obesidade, hiperglicemia, hiperinsulinemia, produção de insulina diminuída, hipoinsulinemia, resistência à insulina e/ou estados e condições de doença caracterizados pela resistência à insulina. Os métodos também podem incluir prevenir a ocorrência da diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2, obesidade, hiperglicemia, hiperinsulinemia, produção de insulina diminuída, resistência à insulina e estados e condições de doença caracterizados pela resistência à insulina ou para prevenir ocorrência da mesma em um paciente em risco. Como aqui usado, hiperinsulinemia refere-se à hiperinsulinemia relativa devido à resistência à insulina.

Anticorpos, Anticorpos Humanizado e Anticorpos Engenheirados Humanos

Os anticorpos de ligação de IL-1 (por exemplo, IL-1 β) da presente invenção pode ser fornecido como anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais (mAbs), anticorpos recombinantes, anticorpos quiméricos, anticorpos enxertados com CDR, anticorpos totalmente humanos, anticorpos de cadeia única, e/ou anticorpos biespecíficos, assim como fragmentos, incluindo variantes e derivados destes, fornecidos pelas técnicas conhecidas, incluindo, mas não limitado à clivagem enzimática, síntese de peptídeo ou técnicas recombinantes.

Os anticorpos no geral compreendem dois polipeptídeos de cadeia pesada e dois polipeptídeos de cadeia leve, entretanto anticorpos de domínio único tendo uma cadeia pesada e uma cadeia leve e anticorpos de cadeia pesada destituídos de cadeias leves também são considerados. existem
5 cinco tipos de cadeias pesadas, chamadas alfa, delta, épsilon, gama e mu, com base na sequência de aminoácido do domínio constante de cadeia pesada. Estes tipos diferentes de cadeia pesadas dão origem a cinco classes de anticorpos, IgA (incluindo IgA₁ e IgA₂), IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente, incluindo quatro subclasses de IgG, a saber IgG₁, IgG₂, IgG₃
10 e IgG₄. Existem também dois tipos de cadeias leves, chamadas de capa (κ) ou lambda (λ) com base na sequência de aminoácido dos domínios constantes. Um anticorpo de tamanho natural inclui um domínio constante e um domínio variável. A região constante não precisa estar presente em um fragmento de ligação de antígeno de um anticorpo. Os fragmentos de ligação de antígeno de
15 um anticorpo aqui divulgado pode incluir fragmentos de anticorpo Fab, Fab', F(ab')₂ e F(v). Como debatido em mais detalhes abaixo, os fragmentos de ligação de IL-1 β abrangem fragmentos de anticorpo e polipeptídeos de ligação de antígeno que ligarão IL-1 β .

Cada uma das sequências de cadeia pesada e cadeia leve de um
20 anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno deste, inclui uma região variável com três regiões determinadoras de complementaridade (CDRs) assim como regiões de matriz que não de CDR (FRs). Os termos “cadeia pesada” e “cadeia leve,” como aqui usados, significam a região variável de cadeia pesada e a região variável de cadeia leve, respectivamente, a menos
25 que de outro modo mencionado. As CDRs de cadeia pesada são aqui aludidas como CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3. As CDRs de cadeia leve são aqui aludidas como CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3. As regiões variáveis e as CDRs em uma sequência de anticorpo podem ser identificadas (i) de acordo com as regras gerais que foram desenvolvidas na técnica ou (ii) alinhando-se as

sequências contra uma base de dados de regiões variáveis conhecidas. Os métodos para identificar estas regiões são descritas em Kontermann e Dubel, eds., *Antibody Engineering*, Springer, Nova Iorque, NY, 2001 e Dinarello *et al.*, *Current Protocols in Immunology*, John Wiley and Sons Inc., Hoboken, NJ, 2000. As bases de dados de sequências de anticorpo são descritas e podem ser acessadas através da base de dados “The Kabatman” em www.bioinf.org.uk/labs (mantida por A. C. Martin no Department of Biochemistry & Molecular Biology University College London, Londres, Inglaterra) e VBASE2 na www.vbase2.org, como descrito em Retter *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 33 (Emissão da base de dados): D671-D674 (2005). O sítio da web da base de dados “Kabatman” também inclui regras gerais de manuseio para identificar CDRs. O termo “CDR,” como aqui usado, é como definido em Kabat *et al.*, *Sequences of Immunological Interest*, 5^a ed., U.S. Department of Health and Human Services, 1991, a menos que de outro modo indicado.

Os anticorpos policlonais são preferivelmente incitados em animais pelas injeções subcutâneas (sc) ou intraperitoneais (ip) múltiplas do antígeno relevante e um adjuvante. Uma resposta de anticorpo melhorada pode ser obtida conjugando-se o antígeno relevante a uma proteína que é imunogênica nas espécies a serem imunizadas, por exemplo, hemocianina do lapa buraco de fechadura, albumina sérica, tiroglobulina bovina ou inibidor de tripsina da soja usando um agente bifuncional ou derivante, por exemplo, éster de maleimidobenzoil sulfossuccinimida (conjugação através dos resíduos de cisteína), N-hidroxissuccinimida (através de resíduos de lisina), glutaraldeído, aldeído succínico ou outros agentes conhecidos na técnica.

Os animais são imunizados contra o antígeno, conjugados imunogênicos ou derivados pela combinação, por exemplo, de 100 µg ou 5 µg da proteína ou conjugado (para coelhos ou camundongos, respectivamente) com 3 volumes de adjuvante completo de Freund e injetando a solução

intradermicamente em sítios múltiplos. Um mês mais tarde, os animais são reforçados com 1/5 (fração (1/10)) da quantidade original de peptídeo ou conjugado em adjuvante completo de Freund pela injeção subcutânea em sítios múltiplos. Nos dias 7 a 14 após a injeção de reforço, os animais são sangrados e o soro é ensaiado quanto ao título de anticorpo. Os animais são reforçados até o platô do título. Preferivelmente, o animal é reforçado com o conjugado do mesmo antígeno, mas conjugado a uma proteína diferente e/ou através de um reagente de reticulação diferente. Os conjugados também podem ser fabricados em cultura de célula recombinante como fusões de proteína. Também, agentes de agregação tais como alume são adequadamente usados para realçar a resposta imune.

O anticorpo monoclonal refere-se a um anticorpo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos. Os anticorpos monoclonais são no geral altamente específicos e podem ser direcionados contra um sítio antigênico único, ao contrário das preparações de anticorpo convencionais (policlonais) que tipicamente incluem anticorpos diferentes direcionados contra determinantes diferentes (epítomos). Além da sua especificidade, os anticorpos monoclonais são vantajosos em que eles são sintetizados pela cultura homogênea, não contaminada por outras imunoglobulinas com especificidades e características diferentes.

Os anticorpos monoclonais a serem usados de acordo com a presente invenção podem ser fabricados pelo método de hibridoma primeiro descrito por Kohler *et al.*, (Nature, 256: 495-7, 1975) ou podem ser fabricados pelos métodos de DNA recombinantes (ver, por exemplo, a Patente U.S. Nº 4.816.567). Os anticorpos monoclonais também podem ser isolados a partir de bibliotecas de anticorpo de fago usando as técnicas descritas, por exemplo, em Clackson *et al.*, (Nature 352: 624-628, 1991) e Marks *et al.*, (J. Mol. Biol. 222: 581-597, 1991).

No método de hibridoma, um camundongo ou outro animal

hospedeiro apropriado, tal como um hamster ou macaco, é imunizado como aqui descrito para evocar linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que especificamente ligar-se-ão à proteína usada para a imunização. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*.

- 5 Os linfócitos depois são fundidos com células de mieloma usando um agente de fusão adequado, tal como polietileno glicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)).

10 As células de hibridoma assim preparadas são semeadas e cultivadas em um meio de cultura adequado que preferivelmente contém uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou sobrevivência das células de mieloma não fundido, precursor. Por exemplo, se as células de mieloma precursoras carecem da enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas tipicamente
15 incluirão hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT), substâncias estas que impedem o crescimento de células deficientes em HGPRT.

As células de mieloma preferidas são aquelas que fundem eficientemente, sustentam a produção de anticorpo de alto nível estável pelas células que produzem anticorpo selecionadas e são sensíveis a um meio. As
20 linhagens de célula de mieloma humano e linhagens de célula de heteromieloma de camundongo-ser humano também foram descritas para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1987)). As
25 linhagens de mieloma de murino exemplares incluem aquelas derivadas de tumores de camundongos MOP-21 e M.G.-11 disponível da Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif USA e células SP-2 ou X63-Ag8-653 disponíveis da American Type Culture Collection, Rockville, Md. USA.

O meio de cultura em que as células de hibridoma estão

crescendo é ensaiada quanto a produção de anticorpos monoclonais direcionados contra o antígeno. Preferivelmente, a especificidade de ligação de anticorpos monoclonais produzidos pelas células de hibridoma é determinada pela imunoprecipitação ou por um ensaio de ligação *in vitro*, tal como radioimunoensaio (RIA) ou ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA). A afinidade de ligação do anticorpo monoclonal, por exemplo, pode ser determinado pela análise de Scatchard (Munson *et al.*, Anal. Biochem., 107: 220 (1980)).

Depois que as células de hibridoma são identificadas que produzem anticorpos da especificidade, afinidade e/ou atividade desejadas, os clones podem ser subclonados pelos procedimentos de diluição limitante e cultivados pelos métodos padrão (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). Os meios de cultura adequados para este propósito incluem, por exemplo, meio DMEM ou RPM-1640. Além disso, as células de hibridoma podem ser cultivadas *in vivo* como tumores de ascite em um animal. Os anticorpos monoclonais secretados pelos subclones são adequadamente separados do meio de cultura, o fluido ou soro de ascite pelos procedimentos de purificação de imunoglobulina convencionais tais como, por exemplo, proteína A-Sefarose, cromatografia de hidroxilapatita, eletroforese em gel, diálise ou cromatografia de afinidade.

É ainda considerado que os anticorpos da invenção podem ser usados como fragmentos de ligação de antígeno menores do anticorpo bem conhecidos na técnica e aqui descritos.

A presente invenção abrange anticorpos de ligação de IL-1 (por exemplo, IL-1 β) que incluem duas cadeias pesadas de tamanho natural e duas cadeias leves de tamanho natural. Alternativamente, os anticorpos de ligação de IL-1 β podem ser construções tais como anticorpos de cadeia única ou “mini” anticorpos que retêm a atividade de ligação a IL-1 β . Tais construções podem ser preparadas pelos métodos conhecidos na técnica tais

como, por exemplo, a clonagem mediada pela PCR e montagem de anticorpos de cadeia única para a expressão na *E. coli* (como descritos em Antibody Engineering, The practical approach series, J. McCafferty, H. R. Hoogenboom e D. J. Chiswell, editores, Oxford University Press, 1996).

- 5 Neste tipo de construção, as porções variáveis das cadeias pesadas e leves de uma molécula de anticorpo são amplificadas pela PCR a partir do cDNA. Os amplicons resultantes são depois montados, por exemplo, em uma segunda etapa de PCR, através de um DNA ligador que codifica um ligador de proteína flexível composto dos aminoácidos Gly e Ser. Este ligador permite
- 10 que as porções de cadeia pesada e leve variáveis se dobrem em um tal modo que a bolsa de ligação de antígeno é regenerada e o antígeno é ligado com afinidades frequentemente comparáveis com a molécula de imunoglobulina dimérica de tamanho natural precursora.

- A IL-1 (por exemplo, anticorpos de ligação de IL-1 β e
- 15 fragmentos da presente invenção abrangem variantes, fragmentos e sequências dos anticorpos exemplares aqui divulgados. As variantes incluem peptídeos e polipeptídeos que compreendem uma ou mais substituições, deleções e/ou adições de sequência de aminoácido que têm a mesma ou substancialmente a mesma afinidade e especificidade de ligação de epítipo
- 20 como um ou mais dos anticorpos, fragmentos e sequências exemplares aqui divulgados. Assim, as variantes incluem peptídeos e polipeptídeos que compreendem uma ou mais substituições, deleções e/ou adições de sequência de aminoácido aos anticorpos, fragmentos e sequências exemplares aqui divulgadas onde tais substituições, deleções e/ou adições não causem
- 25 mudanças substanciais na afinidade e especificidade de ligação de epítipo. Por exemplo, uma variante de um anticorpo ou fragmento podem resultar de uma ou mais mudanças para um anticorpo ou fragmento, onde o anticorpo ou fragmento mudados tem a mesma ou substancialmente a mesma afinidade e especificidade de ligação de epítipo como a sequência de partida. As

variantes podem ser de ocorrência natural, tais como variantes alélicas ou de junção ou podem ser artificialmente construídas. As variantes podem ser preparadas a partir de moléculas de ácido nucleico correspondentes que codificam as ditas variantes. As variantes dos presentes anticorpos e
5 fragmentos de ligação de IL-1 β podem ter mudanças nas sequências de aminoácido de cadeia leve e/ou pesada que sejam de ocorrência natural ou são introduzidas pelo engenheiramento *in vitro* de sequências nativas usando as técnicas de DNA recombinante. As variantes que ocorrem naturalmente incluem variantes “somáticas” que são geradas *in vivo* nas sequências de
10 nucleotídeo da linha germinativa correspondente durante a geração de uma resposta de anticorpo a um antígeno estranho.

As variantes de anticorpos de ligação de IL-1 (por exemplo, IL-1 β) e fragmentos de ligação também podem ser preparados pelas técnicas de mutagênese. Por exemplo, as mudanças de aminoácido podem ser
15 introduzidas aleatoriamente por toda uma região codificadora de anticorpo e as variantes resultantes podem ser triadas quanto a afinidade de ligação para IL-1 β ou para uma outra propriedade. Alternativamente, as mudanças de aminoácido podem ser introduzidas em regiões selecionadas de um anticorpo IL-1 β , tais como nas CDRs de cadeia leve e/ou pesada e/ou nas regiões de
20 matriz e os anticorpos resultantes podem ser triados quanto a ligação ao MAP ou alguma outra atividade. As mudanças de aminoácido abrangem uma ou mais substituições de aminoácido em uma CDR, variando de uma única diferença de aminoácido até a introdução de permutas múltiplas de aminoácidos dentro de uma dada CDR, tal como CDR3. Em um outro
25 método, a contribuição de cada resíduo dentro de uma CDR para a ligação de IL-1 β pode ser avaliada pela substituição de pelo menos um resíduo dentro da CDR com alanina. Lewis *et al.* (1995), Mol. Immunol. 32: 1065-72. Os resíduos que não são ideais para a ligação à IL-1 β podem ser depois mudados de modo a determinar uma sequência mais ideal. Também abrangidos são as

variantes geradas pela inserção de aminoácidos para aumentar o tamanho de uma CDR, tal como CDR3. Por exemplo, a maioria das sequências de CDR3 de cadeia leve têm nove aminoácidos no comprimento. As sequências de cadeia leve em um anticorpo que são mais curtas do que nove resíduos podem
5 ser otimizadas para a ligação à IL-1 β pela inserção de aminoácidos apropriados para aumentar o comprimento da CDR.

Variantes também podem ser preparadas pelo “embaralhamento de cadeia” de cadeias leves ou pesadas. Marks *et al.* (1992), *Biotechnology* 10: 779-83. Uma cadeia leve única (ou pesada) pode ser
10 combinada com uma biblioteca tendo um repertório de cadeias pesadas (ou leves) e a população resultante é triada quanto a uma atividade desejada, tal como a ligação à IL-1 β . Isto permite a triagem de uma amostra maior de cadeias pesadas (ou leves) diferentes em combinação com uma única cadeia leve (ou pesada) do que é possível com bibliotecas que compreendem
15 repertórios tanto de cadeia pesada quanto leve.

Os anticorpos de ligação de IL-1 (por exemplo, IL-1 β) e fragmentos da presente invenção abrangem derivados dos anticorpos, fragmentos e sequências exemplares aqui divulgados. Os derivados incluem polipeptídeos ou peptídeos ou variantes, fragmentos ou derivados destes, que
20 foram quimicamente modificados. Os exemplos incluem a ligação covalente de um ou mais polímeros, tais como polímeros solúveis em água, carboidratos ligados em N ou ligados em O, açúcares, fosfatos e/ou outras tais moléculas. Os derivados são modificados de uma maneira que é diferente do peptídeo ou polipeptídeos que ocorrem naturalmente ou de partida, no tipo ou localização
25 das moléculas ligadas. Derivados incluem ainda a deleção de um ou mais grupos químicos que estão naturalmente presentes no peptídeo ou polipeptídeo.

Os anticorpos de ligação de IL-1 β e fragmentos da presente invenção podem ser biespecíficos. Os anticorpos ou fragmentos biespecíficos

podem ser de diversas configurações. Por exemplo, os anticorpos biespecíficos podem ser parecidos com anticorpos simples (ou fragmentos de anticorpo) mas têm dois sítios de ligação de antígeno diferentes (regiões variáveis). Os anticorpos biespecíficos podem ser produzidos pelas técnicas químicas (Kranz *et al.* (1981), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 5807), por técnicas de “polidoma” (Pat. U.S. Nº 4.474.893) ou pelas técnicas de DNA recombinantes. Os anticorpos biespecíficos da presente invenção podem ter especificidades de ligação para pelo menos dois epítomos diferentes, pelo menos um dos quais é um epítipo de IL-1 β . Os anticorpos de ligação de IL-1 β e fragmentos também podem ser heteroanticorpos. Heteroanticorpos são dois ou mais anticorpos ou fragmentos de anticorpo de ligação (Fab) ligados juntos, cada anticorpo ou fragmento tendo uma especificidade diferente.

As técnicas para criar versões de DNA recombinante das regiões de ligação de antígeno das moléculas de anticorpo que desviam a geração de anticorpos monoclonais são considerados para os presentes anticorpos de ligação de IL-1 (por exemplo, IL-1 β) e fragmentos. O DNA é clonado em um sistema de expressão bacteriana. Um exemplo de uma tal técnica adequada para a prática desta invenção usa um sistema de vetor de bacteriófago lambda tendo uma sequência líder que faz com que a proteína Fab expressada migre para o espaço periplásmico (entre a membrana de célula bacteriana e a parede celular) ou seja secretada. Pode-se rapidamente gerar e triar números maiores de fragmentos Fab funcionais no lugar daqueles que ligam IL-1 β . Tais agentes de ligação de IL-1 β (fragmentos Fab com especificidade para um polipeptídeo IL-1 β) são especificamente abrangidos dentro dos anticorpos de ligação de IL-1 β e fragmentos da presente invenção.

Os presentes anticorpos de ligação de IL-1 (por exemplo, IL-1 β) e fragmentos podem ser anticorpos humanizados ou engenheirados humanos. Como aqui usado, um anticorpo humanizado ou fragmento de ligação de antígeno deste, é um polipeptídeo recombinante que compreende

uma porção de um sítio de ligação de antígeno de um anticorpo não humano e uma porção da matriz e/ou regiões constantes de um anticorpo humano. Um anticorpo engenheirado humano ou fragmento de anticorpo são um anticorpo não humano (por exemplo, de camundongo) que foi engenheirado pela
5 modificação (por exemplo, deleção, inserção ou substituição) de aminoácidos nas posições específicas de modo a reduzir ou eliminar qualquer imunogenicidade detectável do anticorpo modificado em um ser humano.

Os anticorpos humanizados incluem anticorpos quiméricos e anticorpos enxertados com CDR. Os anticorpos quiméricos são anticorpos
10 que incluem uma região variável de anticorpo não humano ligado a uma região constante humana. Assim, em anticorpos quiméricos, a região variável é na maioria das vezes não humana e a região constante é humana. Os anticorpos quiméricos e os métodos para fabricá-los são descritos em Morrison, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6841-6855 (1984),
15 Boulianne, *et al.*, Nature, 312: 643-646 (1984) e Publicação do Pedido PCT WO 86/01533. Embora, eles possam ser menos imunogênicos do que um anticorpo monoclonal de camundongo, as administrações de anticorpos quiméricos têm sido associadas com respostas de anticorpo anti-camundongo humano (HAMA) para a porção não humana dos anticorpos. Os anticorpos
20 quiméricos também podem ser produzidos pela união dos genes a partir de uma molécula de anticorpo de camundongo de especificidade de ligação de antígeno apropriada junto com genes de uma molécula de anticorpo humana de atividade biológica apropriada, tal como a capacidade para ativar complemento humano e mediar ADCC. Morrison *et al.* (1984), Proc. Natl.
25 Acad. Sci., 81: 6851; Neuberger *et al.* (1984), Nature, 312: 604. Um exemplo é a substituição de uma região Fc com aquela de um isótipo diferente.

Os anticorpos enxertados na CDR são anticorpos que incluem as CDRs de um anticorpo “doador” não humano ligado à região de matriz de um anticorpo “receptor” humano. No geral, os anticorpos enxertados na CDR

incluem mais sequências de anticorpo humano do que anticorpos quiméricos porque eles incluem tanto as sequências da região constante quanto as sequências da região variável (matriz) de anticorpos humanos. Assim, por exemplo, um anticorpo humanizado enxertado na CDR da invenção pode

5 compreende uma cadeia pesada que compreenda uma sequência de aminoácido contígua (por exemplo, cerca de 5 ou mais, 10 ou mais ou ainda 15 ou mais resíduos de aminoácido contíguos) da região de matriz de um anticorpo humano (por exemplo, FR-1, FR-2 ou FR-3 de um anticorpo humano) ou, opcionalmente, a maior parte ou toda da região de matriz inteira

10 de um anticorpo humano. Os anticorpos enxertados na CDR e métodos para fabricá-los são descritos em, Jones *et al.*, Nature, 321: 522-525 (1986), Riechmann *et al.*, Nature, 332: 323-327 (1988) e Verhoeyen *et al.*, Science, 239: 1534-1536 (1988)). Os métodos que podem ser usados para produzir anticorpos humanizados também são descritos nas Patentes U.S. 4.816.567,

15 5.721.367, 5.837.243 e 6.180.377. Os anticorpos enxertados na CDR são considerados menos prováveis do que os anticorpos quiméricos para induzir uma reação imune contra porções de anticorpo não humanas. Entretanto, foi relatado que as sequências de matriz dos anticorpos doadores são requeridas quanto a afinidade e/ou especificidade de ligação do anticorpo doador,

20 presumivelmente porque estas sequências de matriz afetam a dobra da porção de ligação de antígeno do anticorpo doador. Portanto, quando as sequências de CDR doadoras, não humanas são enxertadas nas sequências de matriz humanas não alteradas, os anticorpos enxertados na CDR resultantes pode

25 doador não humano original. Ver, por exemplo, Riechmann *et al.*, Nature, 332: 323-327 (1988) e Verhoeyen *et al.*, Science, 239: 1534-1536 (1988).

Anticorpos engenheirados humanos incluem por exemplo anticorpos “embutidos” e anticorpos preparadas usando a tecnologia HUMAN ENGINEERING (Patente U.S. 5.869.619). A tecnologia HUMAN

ENGINEERING[®] está comercialmente disponível e envolve alterar um anticorpo ou fragmento de anticorpo não humanos, tais como um anticorpo ou fragmento de anticorpo de camundongo ou quimérico, fazendo-se mudanças específicas para a sequência de aminoácido do anticorpo de modo a produzir um anticorpo modificado com imunogenicidade reduzida em um ser humano que não obstante retém as propriedades de ligação desejáveis dos anticorpos não humanos originais. No geral, a técnica envolve classificar resíduos de aminoácido de um anticorpo não humano (por exemplo, de camundongo) como resíduos com “risco baixo”, “risco moderado” ou “risco alto”. A classificação é realizada usando um cálculo de risco/recompensa global que avalia os benefícios prognosticados de fazer substituição particular (por exemplo, para imunogenicidade em seres humanos) contra o risco de que a substituição afetará as propriedades de dobra e/ou ligação de antígeno do anticorpo resultante. Assim, uma posição de risco baixo é uma para a qual uma substituição é prognosticada ser benéfica porque a mesma é prognosticada reduzir a imunogenicidade sem afetar significativamente as propriedades de ligação de antígeno. Uma posição de risco moderado é uma para a qual uma substituição é prognosticada reduzir a imunogenicidade, mas é mais provável afetar a dobra e/ou ligação de antígeno da proteína. As posições de alto risco contêm resíduos mas prováveis de estarem envolvidos na dobra ou ligação de antígeno apropriadas. No geral, as posições de risco baixo em um anticorpo não humano são substituídos com resíduos humanos, as posições de alto risco são raramente substituídas e as substituições de humanização em posições de risco moderado são feitas algumas vezes, embora não indiscriminadamente. As posições com prolinas na sequência da região variável de anticorpo não humano são usualmente classificadas como posições pelo menos de risco moderado.

O resíduo de aminoácido humano particular a ser substituído em uma dada posição de risco baixo ou moderado de uma sequência de

anticorpo não humano (por exemplo, de camundongo) pode ser selecionado alinhando-se uma sequência de aminoácido das regiões variáveis do anticorpo não humano com a região correspondente de uma sequência de anticorpo humana específica ou de consenso. Os resíduos de aminoácido nas risco de
5 baixo ou moderada na sequência não humana podem ser substituídos no lugar dos resíduos correspondentes na sequência de anticorpo humana de acordo com o alinhamento. As técnicas para fabricar as proteínas engenheiradas humanas são descritas em maiores detalhes em Studnicka *et al.*, Protein Engineering, 7: 805-814 (1994), Patentes U.S. 5.766.886, 5.770.196,
10 5.821.123 e 5.869.619 e Publicação de Pedido PCT WO 93/11794.

Os anticorpos “embutidos” são anticorpos não humanos ou humanizados (por exemplo, anticorpos quiméricos ou enxertados na CDR) que foram engenheirados para substituir certos resíduos de aminoácido expostos a solvente de modo a reduzir ainda mais a sua imunogenicidade ou
15 realçar a sua função. Visto que os resíduos de superfície de um anticorpo quimérico são supostos serem menos prováveis de afetar a dobra do anticorpo apropriada e mais provável de evocar uma reação imune, o embutimento de um anticorpo quimérico pode incluir, por exemplo, identificar resíduos expostos a solvente na região de matriz não humana de um anticorpo
20 quimérico e substituindo pelo menos um deles com os resíduos de superfície correspondentes de uma região de matriz humana. O embutimento pode ser realizado por quaisquer técnicas de engenheiramento adequadas, incluindo o uso da tecnologia HUMAN ENGINEERING® descrita acima.

Em um método diferente, uma recuperação da atividade de
25 ligação pode ser obtida pela “desumanização” de um anticorpo enxertado na CDR. A desumanização pode incluir restaurar resíduos das regiões de matriz do anticorpo doador para o anticorpo enxertado na CDR, restaurando deste modo a dobra apropriada. Similar a “desumanização” pode ser obtida pela (i) inclusão de porções da região de matriz “doadora” no anticorpo “receptor” ou

(ii) enxertando porções da região de matriz do anticorpo “doador” no anticorpo receptor (junto com as CDRs doadoras enxertadas).

Para um debate adicional de anticorpos, anticorpos humanizado, engenheirados humanos e métodos para a sua preparação, ver Kontermann e Dube], eds., *Antibody Engineering*, Springer, Nova Iorque, NY, 2001.

Os anticorpo humanizados ou engenheirados humanos exemplares incluem anticorpos IgG, IgM, IgE, IgA e IgD. Os presentes anticorpos podem ser de qualquer classe (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD, etc.) ou isótipo e podem compreender uma cadeia leve κ ou λ . Por exemplo, um anticorpo humano pode compreender uma cadeia pesada de IgG ou fragmento definido, tal como pelo menos um dos isótipos, IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. Como um outro exemplo, os presentes anticorpos ou fragmentos podem compreender uma cadeia pesada IgG1 e uma cadeia leve IgG1.

Os presentes anticorpos e fragmentos podem ser anticorpos humanos, tais como anticorpos que ligam polipeptídeos IL-1 β e são codificados pelas sequências de ácido nucleico que são variantes somáticas que ocorrem naturalmente da sequência de ácido nucleico da imunoglobulina da linha germinativa humana e fragmentos, variantes sintéticas, derivados e fusões destas. Tais anticorpos podem ser produzidos por qualquer método conhecido na técnica, tal como através do uso de mamíferos transgênicos (tais como camundongos transgênicos) em que o repertório da imunoglobulina nativa foi substituído com genes V humanos no cromossoma do mamífero. Tais mamíferos parecem carregar a recombinação VDJ e a hipermutação somática dos genes de anticorpo da linha germinativa humana em uma maneira normal, produzindo assim anticorpos de alta afinidade com sequências completamente humanas.

Os anticorpos humanos para alvejar proteína também podem ser produzidos usando animais transgênicos que não têm nenhuma produção

de imunoglobulina endógena e são engenheirados para conter locais de imunoglobulina humana. Por exemplo, a WO 98/24893 divulga animais transgênicos tendo um local Ig humano em que os animais não produzem imunoglobulinas endógenas funcionais devido à inativação de locais de cadeia pesada e leve endógenos. A WO 91/00906 também divulga hospedeiros mamíferos não primatas transgênicos capazes de montar uma resposta imune para um imunógeno, em que os anticorpos têm regiões constantes e/ou variáveis de primata e em que os locais que codificam imunoglobulina endógena são substituídos ou inativados. A WO 96/30498 e a Patente US Nº 6.091.001 divulgam o uso do Sistema Cre/Lox para modificar o local da imunoglobulina em um mamífero, tal como para substituir toda ou uma porção da região constante ou variável para formar uma molécula de anticorpo modificada. A WO 94/02602 divulga hospedeiros mamíferos não humano tendo locais de Ig endógenos inativados e locais de Ig humano funcionais. A Patente U.S. Nº 5.939.598 divulga métodos de fabricar camundongos transgênicos em que os camundongos carecem de cadeias pesadas endógenas e expressam um local de imunoglobulina exógeno que compreende uma ou mais regiões constantes xenogênicas. Ver também, as Patentes U.S. Nºs 6.114.598, 6.657.103 e 6.833.268.

Usando um animal transgênico descrito acima, uma resposta imune pode ser produzida para uma molécula antigênica selecionada e as células que produzem anticorpo podem ser removidas do animal e usadas para produzir hibridomas que secretam anticorpos monoclonais humanos. Os protocolos de imunização, adjuvantes e outros são conhecidos na técnica e são usados na imunização, por exemplo, de um camundongo transgênico como descrito na WO 96/33735. Esta publicação divulga anticorpos monoclonais contra uma variedade de moléculas antigênicas incluindo IL-6, IL-8, TNF α , CD4 humana, L selectina, gp39 e toxina do tétano. Os anticorpos monoclonais podem ser testadas quanto a capacidade para inibir ou

neutralizar a atividade biológica ou efeito fisiológico da proteína correspondente. A WO 96/33735 divulga que os anticorpos monoclonais contra IL-8, derivadas de células imunes de camundongos transgênicos imunizados com IL-8, bloquearam as funções induzidas por IL-8 de neutrófilos. Os anticorpos monoclonais humanos com especificidade para o antígeno usado para imunizar animais transgênicos também são divulgados na WO 96/34096 e pedido de patente U.S. nº 20030194404; e pedido de patente U.S. nº 20030031667.

Animais transgênicos adicionais úteis para fabricar anticorpos monoclonais incluem o HuMAb-MOUSE® da Medarex, descritos na Pat. U.S. Nº 5.770.429 e Fishwild, *et al.* (Nat. Biotechnol. 14: 845-851, 1996), que contém sequências de gene de genes de anticorpo humano não rearranjados que codificam as cadeias pesada e leve de anticorpos humanos. A imunização de um HuMAb-MOUSE® possibilita a produção de anticorpos monoclonais totalmente humanos para a proteína alvo.

Também, Ishida *et al.* (Cloning Stem Cells. 4: 91-102, 2002) descreve o Camundongo TransChromo (TCMOUSE®) que compreende segmentos de tamanho megabase de DNA humano e que incorpora os locais de imunoglobulina humana inteira (hIg). O TCMOUSE® tem um repertório totalmente diverso de hIgs, incluindo todas as subclasses de IgGs (IgG1-G4). A imunização do TCMOUSE® com vários antígenos humanos produz respostas de anticorpo que compreendem anticorpos humanos.

Ver também Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362: 255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, Year in Immunol., 7: 33 (1993); e Pat. U.S. Nº 5.591.669, Patente U.S. Nº 5.589.369, Patente U.S. Nº 5.545.807; e Publicação de Patente U.S. Nº 20020199213. Publicação de Patente U.S. Nº 20030092125 descreve métodos para polarizar a resposta imune de um animal para o epítipo desejado. Anticorpos humanos também podem ser gerados pelas células B ativadas *in*

vitro (ver as Pats. U.S. Nºs 5.567.610 e 5.229.275).

Anticorpos humanos também podem ser gerados através da triagem de bibliotecas de demonstração de anticorpo *in vitro*. Ver Hoogenboom *et al.* (1991), J. Mol. Biol. 227: 381; e Marks *et al.* (1991), J. Mol. Biol. 222: 581. Várias bibliotecas de demonstração de fago contendo anticorpo foram descritas e podem ser facilmente preparadas. As bibliotecas podem conter uma diversidade de sequências de anticorpo humanas, tais como fragmentos de Fab, Fv e scFv humanos, que podem ser triados contra um alvo apropriado. As bibliotecas de demonstração de fago pode compreender peptídeos ou proteínas outras que não anticorpos que podem ser triados para identificar agentes de ligação seletiva de IL-1 β .

O desenvolvimento de tecnologias para fabricar repertórios de genes de anticorpo humano recombinantes e a demonstração dos fragmentos de anticorpo codificados na superfície de bacteriófago filamentoso, tem fornecido um meio para fabricar anticorpos humanos diretamente. Os anticorpos produzidos pela tecnologia de fago são produzidos como fragmentos de ligação de antígeno - usualmente fragmentos Fv ou Fab - em bactérias e assim carecem de funções efetoras. As funções efetoras podem ser introduzidas por uma de duas estratégias: Os fragmentos podem ser engenheirados em anticorpos completos para a expressão em células de mamífero ou em fragmentos de anticorpo biespecíficos com um segundo sítio de ligação capaz de deflagrar uma função efetora.

A invenção considera um método para produzir anticorpo específico de alvo ou porção de ligação de antígeno deste que compreende as etapas de sintetizar uma biblioteca de anticorpos humanos em fago, triar a biblioteca com a proteína alvo ou uma porção desta, isolar o fago que se liga ao alvo e obter o anticorpo do fago. Por via de exemplo, um método para preparar a biblioteca de anticorpos para o uso nas técnicas de demonstração de fago compreende as etapas de imunizar um animal não humano que

compreende locais da imunoglobulina humana com antígeno alvo ou uma porção antigênica deste para criar uma resposta imune, extrair as células que produzem anticorpo a partir do animal imunizado; isolar o RNA das células extraídas, transcrever de modo reverso o RNA para produzir cDNA, amplificar o cDNA usando um iniciador e inserir o cDNA em um vetor de demonstração de fago tal que os anticorpos são expressados no fago. Os anticorpos específicos de alvo recombinantes da invenção podem ser obtidos deste modo.

Os processos de demonstração de fago imitam a seleção imune através da demonstração de repertórios de anticorpo sobre a superfície de bacteriófagos filamentosos e seleção subsequente de fago pela sua ligação a um antígeno de escolha. Uma tal técnicas é descrita na WO 99/10494, que descreve a isolamento de anticorpos de alta afinidade e agonísticos funcionais para os receptores MPL e msk usando um tal método. Os anticorpos da invenção podem ser isolados pela triagem de uma biblioteca de anticorpo combinatória recombinante, preferivelmente uma biblioteca de demonstração de fago scFv, preparada usando cDNAs V_L e V_H humanos preparados a partir de mRNA derivado de linfócitos humanos. As metodologias para preparar e triar tais bibliotecas são conhecidas na técnica. Ver por exemplo, a Patente U.S. Nº 5.969.108. Existem kits comercialmente disponíveis para gerar bibliotecas de demonstração de fago (por exemplo, o Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, catálogo nº 27-9400-01; e o kit de demonstração de fago SurfZAP[®] da Stratagene, catálogo nº 240612). Também existem outros métodos e reagentes que podem ser usados na geração e triagem de bibliotecas de demonstração de anticorpo (ver, por exemplo, Ladner *et al.* Pat. U.S. Nº 5.223.409; Kang *et al.* Publicação PCT Nº WO 92/18619; Dower *et al.* Publicação PCT Nº WO 91/17271; Winter *et al.* Publicação PCT Nº WO 92/20791; Markland *et al.* Publicação PCT Nº WO 92/15679; Breitling *et al.* Publicação PCT Nº WO 93/01288; McCafferty *et al.* Publicação PCT Nº WO

92/01047; Garrard *et al.* Publicação PCT N^o WO 92/09690; Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9: 1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3: 81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246: 1275-1281; McCafferty *et al.*, *Nature* (1990) 348: 552-554; Griffiths *et al.* (1993) *EILIBO* 5 J 12: 725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 226: 889-896; Clackson *et al.* (1991) *Nature* 352: 624-628; Gram *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3576-3580; Garrad *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9: 1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc Acid Res* 19: 4133-4137; e Barbas *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7978-7982.

10 Em uma forma de realização, para isolar anticorpos humanos específicos para o antígeno alvo com as características desejadas, uma biblioteca de V_H e V_L humana é triada para selecionar quanto aos fragmentos de anticorpo tendo a especificidade desejada. As bibliotecas de anticorpo usadas neste método são preferivelmente bibliotecas de scFv preparadas e triadas como aqui descrito e na técnica (McCafferty *et al.*, Publicação PCT N^o 15 WO 92/01047, McCafferty *et al.*, (*Nature* 348: 552-554, 1990); e Griffiths *et al.*, (*EMBO J* 12: 725-734, 1993). As bibliotecas de anticorpo de scFv preferivelmente são triadas usando proteína alvo como o antígeno.

20 Alternativamente, o fragmento Fd (V_H-C_H1) e a cadeia leve (V_L-C_L) de anticorpos são separadamente clonados pela PCR e aleatoriamente recombinaados em bibliotecas de demonstração de fago combinatórias, que podem ser depois selecionadas quanto a ligação a um antígeno particular. Os fragmentos Fab são expressados na superfície de fago, isto é, fisicamente ligados aos genes que os codificam. Assim, a seleção de Fab pela ligação de 25 antígeno co-seleciona quanto as sequências que codificam Fab, que podem ser amplificadas subsequentemente. Através de diversas rodadas de ligação de antígeno e re-amplificação, um procedimento chamado de *panning*, Fab específico para o antígeno é enriquecido e finalmente isolado.

Em 1994, um método para a humanização de anticorpos,

chamado de “seleção orientada”, foi descrito. A seleção orientada utiliza a energia das técnicas de demonstração de fago para a humanização de anticorpo monoclonal de camundongo (Ver, Jespers, L. S., *et al.*, Bio/Technology 12, 899-903 (1994)). Para isto, o fragmento Fd do anticorpo monoclonal de camundongo pode ser demonstrado em combinação com uma biblioteca de cadeia leve humana e a biblioteca de Fab híbrida resultante pode ser depois selecionada com antígeno. O fragmento Fd de camundongo fornece deste modo um padrão para guiar a seleção. Subsequentemente, as cadeias leves humanas selecionadas são combinadas com uma biblioteca de fragmento de Fd humano. A seleção da biblioteca resultante produz Fab totalmente humano.

Uma variedade de procedimentos foi descrita para derivar anticorpos humanos de bibliotecas de demonstração de fago (Ver, por exemplo, Hoogenboom *et al.*, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol, 222: 581-597 (1991); Pats. U.S. N^{os} 5.565.332 e 5.573.905; Clackson, T. e Wells, J. A., TIBTECH 12, 173-184 (1994)). Em particular, a seleção e evolução *in vitro* de anticorpos derivados de bibliotecas de demonstração de fago tem se tornado uma ferramenta poderosa (Ver Burton, D. R. e Barbas III, C. F., Adv. Immunol. 57, 191-280 (1994); Winter, G., *et al.*, Annu. Rev. Immunol. 12, 433-455 (1994); publicação de patente U.S. n^o 20020004215 e WO 92101047; publicação de patente U.S. n^o 20030190317; e Patentes U.S. N^{os} 6.054.287 e 5.877.293.

Watkins, “Screening of Phage-Expressed Antibody Libraries by Capture Lift,” Methods in Molecular Biology, Antibody Phage Display: Methods and Protocols 178: 187-193 (2002) e publicação de patente U.S. n^o 20030044772, publicado em 6 de março de 2003, descreve métodos para a triagem de bibliotecas de anticorpo expressadas em fago ou outras moléculas de ligação pelo levantamento de captura, um método que envolve a imobilização das moléculas de ligação candidatas em um suporte sólido.

Os fragmentos Fv são demonstrados na superfície de fago, pela associação de uma cadeia expressada como uma fusão de proteína de fago (por exemplo, com M13 gene III) com a cadeia complementar expressada como um fragmento solúvel. É considerado que o fago pode ser

5 um fago filamentosos tal como um dos fagos classe I: fd, M13, f1, If1, Ike, ZJ/Z, Ff e um dos fagos de classe II Xf, Pf1 e Pf3. O fago pode ser M13 ou fd ou um derivado deste.

Uma vez que os segmentos V_L e V_H humanos iniciais são selecionados, experimentos de “mistura e emparelhamento”, em que pares

10 diferentes dos segmentos V_L e V_H inicialmente selecionados são triados quanto a ligação de alvo, são realizados para selecionar combinações de par V_L/V_H preferidas. Adicionalmente, para melhorar ainda mais a qualidade do anticorpo, os segmentos V_L e V_H do(s) par(es) V_L/V_H preferido(s) podem ser aleatoriamente mutados, preferivelmente dentro de qualquer uma das regiões

15 CDR1, CDR2 ou CDR3 de V_H e/ou V_L , em um processo análogo ao processo de mutação somática *in vivo* responsável pela maturação de afinidade de anticorpos durante uma resposta imune natural. Esta maturação de afinidade *in vitro* pode ser realizada pela amplificação de regiões V_L e V_H usando iniciadores de PCR complementares às CDR1, CDR2 e CDR3 de V_H ou

20 CDR1, CDR2 e CDR3 de V_L , respectivamente, iniciadores estes que foram “reforçados” com uma mistura randômica das quatro bases de nucleotídeo em certas posições tal que os produtos de PCR resultantes codifiquem os segmentos de V_L e V_H em que as mutações randômicas foram introduzidas nas regiões CDR3 de V_H e/ou V_L . Estes segmentos V_L e V_H aleatoriamente

25 mutados podem ser novamente triados quanto a ligação ao antígeno alvo.

A seguir da triagem e isolamento de um anticorpo alvo específico de uma biblioteca de demonstração de imunoglobulina recombinante, o ácido nucleico que codifica o anticorpo selecionado pode ser recuperado do pacote de demonstração (por exemplo, a partir do genoma de fago) e subclonado em

outros vetores de expressão pelas técnicas de DNA recombinante padrão. Se desejado, o ácido nucleico pode ser ainda manipulado para criar outras formas de anticorpo da invenção, como descrito abaixo. Para expressar um anticorpo humano recombinante isolado pela triagem de uma biblioteca combinatória, o DNA que codifica o anticorpo é clonado em um vetor de expressão recombinante e introduzido em uma célula hospedeira de mamífero, como aqui descrito.

É considerado que o método de demonstração de fago pode ser realizado em uma cepa mutadora de bactérias ou célula hospedeira. Uma cepa mutadora é uma célula hospedeira que tem um defeito genético que faz com que o DNA replicado dentro dele seja mutado com respeito ao seu DNA precursor. As cepas mutadoras exemplares são NR9046mutD5 e NR9046 mut Ti.

Também é considerado que o método de demonstração de fago pode ser realizado usando um fago auxiliar. Isto é um fago que é usado para infectar células contendo um genoma de fago defeituoso e que funcione para complementar o defeito. O genoma de fago defeituoso pode ser um fagomídeo ou um fago com alguma função que codifica as sequências de gene removidas. Os exemplos de auxiliares de fago são M13K07, M13K07 gene III nº 3; e fago que demonstra ou que codifica uma molécula de ligação fundida a uma proteína de capsídeo.

Os anticorpos são também gerados por intermédio de métodos de triagem de demonstração de fago usando o método combinatório duplo hierárquico como divulgado na WO 92/01047 em que uma colônia individual contendo um clone de cadeia H ou L é usada para infectar uma biblioteca completa de clones que codificam a outra cadeia (L ou H) e o membro de ligação específica das duas cadeias é selecionado de acordo com as técnicas de demonstração de fago tais como aquelas descritas nesta. Estas técnicas também são divulgadas em Marks *et al*, (Bio/Technology, 10: 779-783,

1992).

Os métodos para a demonstração de peptídeos na superfície de células de levedura e microbianas também foram usadas para identificar anticorpos específicos de antígeno. Ver, por exemplo, a Patente U.S. Nº 6.699.658. As bibliotecas de anticorpo podem ser ligadas às proteínas de levedura, tais como aglutinina, imitando eficazmente a demonstração de superfície de célula de anticorpos pelas células B no sistema imune.

Além dos métodos de demonstração de fago, os anticorpos podem ser isolados usando métodos de demonstração de mRNA ribossômico e métodos de demonstração de célula microbiana. A seleção de polipeptídeo usando a demonstração de ribossoma é descrita em Hanes *et al.*, (Proc. Natl Acad Sci USA, 94: 4937-4942, 1997) e Pat. U.S. Nºs 5.643.768 e 5.658.754 concedidas à Kawasaki. A demonstração de ribossoma também é útil para a análise mutacional em escala grande rápida de anticorpos. O método de mutagênese seletiva também fornece um método de produzir anticorpos com atividades melhoradas que podem ser selecionadas usando técnicas de demonstração ribossômicas.

Os anticorpos de ligação de IL-1 (por exemplo, IL-1 β) e fragmentos podem compreender uma ou mais porções que não se ligam a IL-1 β mas ao invés são responsáveis por outras funções, tais como meia-vida em circulação, efeito citotóxico direto, rotulação detectável ou ativação da cascata de complemento endógeno do receptor ou citotoxicidade celular endógena. Os anticorpos ou fragmentos podem compreender toda ou uma porção da região constante e pode ser de qualquer isótipo, incluindo IgA (por exemplo, IgA1 ou IgA2), IgD, IgE, IgG (por exemplo IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4) ou IgM. Além ou ao invés de compreender uma região constante, compostos de ligação de antígeno da invenção podem incluir um rótulo de epítipo, um epítipo de receptor de recuperação, uma porção de rótulo para propósitos de diagnóstico ou purificação ou uma porção citotóxica tal como

um radionuclídeo ou toxina.

A região constante (quando presente) dos presentes anticorpos e fragmentos pode ser do tipo $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$, μ , $\beta 2$ ou δ ou ϵ , preferivelmente do tipo γ , mais preferivelmente do tipo γ , ao passo que a parte constante de
5 uma cadeia leve humana pode ser do tipo κ ou λ (que inclui os subtipos λ_1 , λ_2 e λ_3) mas é preferivelmente do tipo κ .

As variantes também incluem anticorpos ou fragmentos que compreendem uma região Fc modificada, em que a região Fc modificada compreende pelo menos uma modificação de aminoácido em relação a uma
10 região Fc do tipo selvagem. A região Fc variante pode ser planejada, em relação a uma molécula comparável que compreende a região Fc do tipo selvagem, de modo a ligar receptores Fc com uma afinidade maior ou menor.

Por exemplo, os anticorpos de ligação IL-1 β e fragmentos presentes podem compreender uma região Fc modificada. A região Fc refere-
15 se aos polipeptídeos que ocorrem naturalmente ou sintéticos homólogos ao domínio de terminal C de IgG que é produzido na digestão com papaína de IgG. A Fc de IgG tem um peso molecular de aproximadamente 50 kD. Nos presentes anticorpos e fragmentos, uma região Fc inteira pode ser usada ou apenas uma porção que realça a meia vida. Além disso, muitas modificações
20 na sequência de aminoácido são aceitáveis, visto que atividade nativa não é em todos os casos necessária ou desejada.

A região Fc pode ser mutada, se desejado, para inibir a sua capacidade para fixar complemento e ligar o receptor de Fc com alta afinidade. Para a Fc de IgG de murino, a substituição de resíduos Ala no lugar
25 de Glu 318, Lys 320 e Lys 322 torna a proteína incapaz de direcionar ADCC. A substituição de Glu no lugar de Leu 235 inibe a capacidade da proteína para ligar o receptor de Fc com alta afinidade. Várias mutações para a IgG humana também são conhecidas (ver, por exemplo, Morrison *et al.*, 1994, The Immunologist 2: 119 124 e Brekke *et al.*, 1994, The Immunologist 2: 125).

Em algumas formas de realização, os presentes anticorpos ou fragmentos são fornecidos com uma região Fc modificada onde uma região Fc que ocorre naturalmente é modificada para aumentar a meia vida do anticorpo ou fragmento em um ambiente biológico, por exemplo, a meia vida sérica ou uma meia vida medida por um ensaio *in vitro*. Métodos para alterar a forma original de uma região Fc de uma IgG também são descritos na Patente U.S. Nº 6.998.253.

Em certas formas de realização, pode ser desejável modificar o anticorpo ou fragmento de modo a aumentar a meia vida sérica, por exemplo, adicionando moléculas tais como PEG ou outros polímeros solúveis em água, incluindo polímeros de polissacarídeo, aos fragmentos de anticorpo para aumentar a meia vida. Isto também pode ser obtido, por exemplo, pela incorporação de um epítipo de ligação de receptor de recuperação no fragmento de anticorpo (por exemplo, pela mutação da região apropriada no fragmento de anticorpo ou pela incorporação do epítipo em um rótulo de peptídeo que é depois fundido ao fragmento de anticorpo no final ou no meio, por exemplo, pela síntese de DNA ou peptídeo) (ver, a Publicação Internacional Nº WO96/32478). Epítipo de ligação de receptor de recuperação refere-se a um epítipo da região Fc de uma molécula de IgG (por exemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ ou IgG₄) que é responsável pelo aumento da meia vida sérica *in vivo* da molécula de IgG.

Um epítipo de ligação de receptor de recuperação pode incluir uma região em que qualquer um ou mais resíduos de aminoácido de uma ou duas alças de um domínio Fc são transferidos para uma posição análoga do fragmento de anticorpo. Ainda mais preferivelmente, três ou mais resíduos de uma ou duas alças do domínio Fc são transferidas. Ainda mais preferido, o epítipo é tirado do domínio CH₂ da região Fc (por exemplo, de uma IgG) e transferido para a região CH₁, CH₃ ou V_H ou mais do que uma tal região, do anticorpo. Alternativamente, o epítipo é tirado do domínio CH₂ da região Fc

e transferido para a região C_L ou região V_L ou ambas, do fragmento de anticorpo. Ver também os pedidos internacionais WO 97/34631 e WO 96/32478 que descrevem variantes de Fc e a sua interação com o receptor de recuperação.

- 5 A mutação de resíduos dentro dos sítios de ligação de receptor Fc pode resultar na função efetora alterada, tal como a atividade de ADCC ou CDC alterada ou meia vida alterada. As mutações potenciais incluem inserção, deleção ou substituição de um ou mais resíduos, incluindo a substituição com alanina, uma substituição conservativa, uma substituição não
- 10 conservativa ou substituição com um resíduo de aminoácido correspondente na mesma posição de uma subclasse IgG diferente (por exemplo substituindo um resíduo de IgG1 com um resíduo de IgG2 correspondente naquela posição). Por exemplo foi reportado que mutando a serina na posição de aminoácido 241 em IgG4 para prolina (encontrada naquela posição em IgG1 e
- 15 IgG2) levou à produção de um anticorpo homogêneo, assim como meia vida sérica prolongada e melhorando a distribuição de tecido comparada com a IgG4 quimérica original. (Angal *et al*, Mol Immunol. 30: 105-8, 1993).

- Os fragmentos de anticorpo são porções de um anticorpo intacto de tamanho natural, tal como uma ligação de antígeno ou região
- 20 variável do anticorpo intacto. Os exemplos de fragmentos de anticorpo incluem fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ e Fv; diacorpos; anticorpos lineares; moléculas de anticorpo de cadeia única (por exemplo, scFv); fragmentos de anticorpo multiespecíficos tais como anticorpos biespecíficos, triespecíficos e multiespecíficos (por exemplo, diacorpos, triacorpos, tetracorpos);
- 25 minicorpos; anticorpos recombinantes queladores; tricorpos ou bicorpos; intracorpos; nanocorpos; imunofarmacêuticos modulares pequenos (SMIP), adnectinas, proteínas de fusão de imunoglobulina de domínio de ligação; anticorpos camelizados; anticorpos contendo Vex; e quaisquer outros polipeptídeos formados de fragmentos de anticorpo.

A presente invenção inclui fragmentos de ligação de anticorpo de IL-1 β que compreendem qualquer uma das sequências de cadeia pesada ou leve precedentes e que ligam IL-1 β . O termo fragmentos como aqui usado refere-se a quaisquer 3 ou mais aminoácidos contíguos (por exemplo, 4 ou
 5 mais, 5 ou mais 6 ou mais, 8 ou mais ou ainda 10 ou mais aminoácidos contíguos) do anticorpo e abrange fragmentos de Fab, Fab', F(ab')₂ e F(v) ou a região variável de cadeia leve ou pesadas individual ou porção desta. Os fragmentos de ligação IL-1 β incluem, por exemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv e scFv. Estes fragmentos carecem do fragmento Fc de um anticorpo intacto,
 10 depuram mais rapidamente da circulação e podem ter menos ligação de tecido não específica do que um anticorpo intacto. Ver Wahl *et al.* (1983), J. Nucl. Med., 24: 316-25. Estes fragmentos podem ser produzidos a partir de anticorpos intactos usando métodos bem conhecidos, por exemplo pela clivagem proteolítica com enzimas tais como papaína (para produzir
 15 fragmentos Fab) ou pepsina (para produzir fragmentos F(ab')₂).

Os ensaios *in vivo* e com base em célula são bem descritos na técnica para o uso na determinação da ligação de IL-1 β ao receptor de IL-1 Tipo I (IL-1R1), incluindo ensaios que determinam na presença de moléculas (tais como anticorpos, antagonistas ou outros inibidores) que ligam a IL-1 β ou
 20 IL-1R1. (ver por exemplo Evans *et al.*, (1995), J. Biol. Chem. 270: 11477-11483; Vigers *et al.*, (2000), J. Biol. Chem. 275: 36927-36933; Yanofsky *et al.*, (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7381-7386; Fredericks *et al.*, (2004), Proteína Eng. Des. Sel. 17: 95-106; Slack *et al.*, (1993), J. Biol. Chem. 268: 2513-2524; Smith *et al.*, (2003), Immunity 18: 87-96; Vigers *et al.*, (1997), Nature 386: 190-194; Ruggiero *et al.*, (1997), J. Immunol. 158: 3881-3887; Guo *et al.*, (1995), J. Biol. Chem. 270: 27562-27568; Svenson *et al.*, (1995), Eur. J. Immunol. 25: 2842-2850; Arend *et al.*, (1994), J. Immunol. 153: 4766-4774). O receptor de IL-1 Tipo I recombinante, incluindo o
 25 receptor de IL-1 humana Tipo 1, para tais ensaios é facilmente disponível a

partir de uma variedade de fontes comerciais (ver por exemplo R&D Systems, SIGMA). O receptor IL-1 Tipo I também pode ser expressado a partir de uma construção ou vetor de expressão introduzidos em uma célula hospedeira apropriada usando biologia molecular padrão e técnicas de transfecção conhecidas na técnica. O receptor de IL-1 Tipo I expressado pode ser depois isolado e purificado para o uso em ensaios de ligação ou alternativamente usados diretamente em uma forma associada a célula.

Por exemplo, a ligação de IL-1 β ao receptor de IL-1 Tipo I pode ser determinada pela imobilização de um anticorpo de ligação de IL-1 β , contatando IL-1 β com o anticorpo imobilizado e determinando se a IL-1 β foi ligada ao anticorpo e contatar uma forma solúvel de IL-1R1 com o complexo de IL-1 β /anticorpo ligado e determinar se a IL-1R1 solúvel foi ligada ao complexo. O protocolo também pode incluir contatar o IL-1R1 solúvel com o anticorpo imobilizado antes do contato com IL-1 β , para confirmar que a IL-1R1 solúvel não se liga ao anticorpo imobilizado. Este protocolo pode ser realizado usando um instrumento Biacore[®] para a análise cinética de interações de ligação. Um tal protocolo também pode ser utilizado para determinar se um anticorpo ou outra molécula permite ou bloqueia a ligação de IL-1 β ao receptor de IL-1 Tipo I.

Para outros ensaios de ligação de IL-1 β /IL-1R1, a permissão ou bloqueio da ligação de IL-1 β ao receptor de IL-1 Tipo I podem ser determinados pela comparação da ligação de IL-1 β com IL-1R1 na presença ou ausência de anticorpos IL-1 β ou fragmentos de ligação de IL-1 β destes. O bloqueio é identificado na leitura do ensaio como uma redução designada de IL-1 β ao receptor de IL-1 Tipo I na presença de anticorpos anti-IL-1 β ou fragmentos de ligação de IL-1 β destes, quando comparado com uma amostra de controle que contenha o tampão ou diluente correspondentes mas não um anticorpo IL-1 β ou fragmento de ligação de IL-1 β deste. A leitura do ensaio pode ser qualitativamente visualizada como indicando a presença ou ausência

de bloqueio ou pode ser quantitativamente visualizada como indicando um por cento ou vezes de redução na ligação devido à presença do anticorpo ou fragmento.

Alternativa ou adicionalmente, quando um anticorpo de
5 ligação de IL-1 β ou fragmento de ligação de IL-1 β substancialmente bloqueia a ligação de IL-1 β ao IL-1RI, a ligação de IL-1 β ao IL-1R1 é reduzido em pelo menos 10 vezes, alternativamente pelo menos cerca de 20 vezes, alternativamente pelo menos cerca de 50 vezes, alternativamente pelo menos cerca de 100 vezes, alternativamente pelo menos cerca de 1000 vezes,
10 alternativamente pelo menos cerca de 10000 vezes ou mais, comparado com a ligação das mesmas concentrações de IL-1 β e IL-1R1 na ausência do anticorpo ou fragmento. Como um outro exemplo, quando um anticorpo de ligação de IL-1 β ou fragmento de ligação de IL-1 β substancialmente permite a ligação de IL-1 β ao IL-1R1, a ligação de IL-1 β ao IL-1R1 é de pelo menos
15 cerca de 90%, alternativamente pelo menos cerca de 95%, alternativamente pelo menos cerca de 99%, alternativamente pelo menos cerca de 99,9%, alternativamente pelo menos cerca de 99,99%, alternativamente pelo menos cerca de 99,999%, alternativamente pelo menos cerca de 99,9999%, de modo alternativamente substancial idêntica à ligação das mesmas concentrações de
20 IL-1 β e IL-1R1 na ausência do anticorpo ou fragmento.

A presente invenção pode em certas formas de realização abranger anticorpos de ligação de IL-1 β ou fragmentos de ligação de IL-1 β que liga ao mesmo epítipo ou substancialmente ao mesmo epítipo como um ou mais dos anticorpos exemplares aqui descritos. Alternativa ou
25 adicionalmente, os anticorpos de ligação IL-1 β ou fragmentos de ligação IL-1 β competem com a ligação de um anticorpo tendo sequências de região variável de AB7, descritas no pedido US número 111472813 (sequências mostradas abaixo). Alternativa ou adicionalmente, a presente invenção abrange anticorpos de ligação IL-1 β e fragmentos que se ligam a um epítipo

contido na sequência de aminoácido ESVDPKNYPKKKMEKRFFVNKIF (SEQ ID NO: 1), um epítipo ao qual os anticorpos designados AB5 e AB7 (pedido US número 111472813) se ligam. Como aqui considerado, pode-se facilmente determinar se um anticorpo de ligação de IL-1 β ou fragmento se
5 ligam ao mesmo epítipo ou substancialmente ao mesmo epítipo como um ou mais dos anticorpos exemplares, tais como por exemplo o anticorpo designado AB7, usando qualquer um de diversos métodos conhecidos na técnica.

Por exemplo, os resíduos de aminoácido chave (epítipo)
10 ligados por um anticorpo de ligação de IL-1 β ou fragmento pode ser determinado usando um arranjo de peptídeo, tal como por exemplo, um arranjo de peptídeo PepSpot[®] (JPT Peptide Technologies, Berlin, Alemanha), em que uma varredura de peptídeos de doze aminoácidos, que abrangem a sequência de aminoácido de IL-1 β inteiro, cada peptídeo sobrepondo-se em
15 11 aminoácidos ao anterior, são sintetizados diretamente em uma membrana. A membrana que carrega os peptídeos é depois sondada com o anticorpo para o qual a informação de ligação de epítipo é procurada, por exemplo em uma concentração de 2 μ g/ml, por 2 horas na temperatura ambiente. A ligação de anticorpo aos peptídeos ligados à membrana pode ser detectada usando um
20 anticorpo anti-humano de cabra (ou camundongo, quando apropriado) conjugados a HRP secundário, seguido pela quimioluminescência realçada (ECL). A(s) mancha(s) de peptídeos correspondentes aos resíduos de aminoácido particulares ou sequências da proteína IL-1 β madura e que alcançam positivo quanto a ligação de anticorpo, são indicativos do epítipo
25 ligado pelo anticorpo particular.

Alternativamente ou além disso, os experimentos de competição de anticorpo podem ser realizados e tais ensaios são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, para determinar se um anticorpo ou fragmento se liga a um epítipo contido em uma sequência de peptídeo que

compreende os aminoácidos ESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIE (SEQ ID NO: 1), que corresponde aos resíduos 83 a 105 da proteína de IL-1 β madura, um anticorpo de especificidade desconhecida pode ser comparado com qualquer um dos exemplares de anticorpos (por exemplo, AB7) da presente
5 invenção que são conhecidos por ligar um epítipo contido dentro desta sequência. Os ensaios de competição de ligação podem ser realizados, por exemplo, usando um instrumento Biacore para a análise cinética de interações de ligação ou pelo ELISA. Em um tal ensaio, o anticorpo de especificidade de epítipo desconhecida é avaliada quanto a sua capacidade para competir
10 quanto a ligação contra o anticorpo comparador conhecido (por exemplo, AB7). A competição quanto a ligação a um epítipo particular é determinada por uma redução na ligação ao epítipo IL-1 β de pelo menos cerca de 50% ou pelo menos cerca de 70% ou pelo menos cerca de 80% ou pelo menos cerca de 90% ou pelo menos cerca de 95% ou pelo menos cerca de 99% ou cerca de
15 100% quanto ao anticorpo comparador conhecido (por exemplo, AB7) e é indicativo de ligação substancialmente ao mesmo epítipo.

Em vista da identificação nesta divulgação de regiões de ligação de IL-1 β em anticorpos exemplares e/ou epítopos reconhecidos pelos anticorpos divulgados, é considerado que os anticorpos adicionais com
20 características de ligação e utilidade terapêutica ou de diagnóstico similares podem ser gerados que se comparam às formas de realização desta divulgação.

Fragmentos de ligação de antígeno de um anticorpo incluem fragmentos que retêm a capacidade para ligar especificamente a um antígeno, no geral pela retenção da porção de ligação de antígeno do anticorpo. É bem
25 estabelecido que a função de ligação de antígeno de um anticorpo pode ser realizada pelos fragmentos de um anticorpo de tamanho natural. Os exemplos das porções de ligação de antígeno incluem (i) um fragmento Fab, que é um fragmento monovalente que consiste dos domínios VL, VH, CL e CH1; (ii)

um fragmento $F(ab')^2$, que é um fragmento bivalente que compreende dois fragmentos Fab ligados por uma ponte de dissulfeto na região de dobradiça; (iii) um fragmento Fd que é os domínios VH e CH1; (iv) um fragmento Fv que é os domínios VL e VH de um ramo único de um anticorpo, (v) um
5 fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) Nature 341: 544-546), que é um domínio VH; e (vi) um região determinadora de complementaridade isolada (CDR). Os anticorpos de cadeia única também são abrangidos dentro do termo de porção de ligação de antígeno de um anticorpo. Os anticorpos de ligação de IL-1 β e fragmentos da presente invenção também abrangem domínios de
10 ligação derivados de CDR monovalentes ou multivalentes ou monoméricos ou multiméricos (por exemplo tetraméricos), com ou sem um esqueleto (por exemplo, esqueleto de proteína ou carboidrato).

Os presentes anticorpos de ligação de IL-1 β ou fragmentos podem ser parte de uma molécula de imunoadesão maior, formada pela
15 associação covalente ou não covalente do anticorpo ou porção de anticorpo com uma ou mais outras proteínas ou peptídeos. Os exemplos de tais moléculas de imunoadesão incluem o uso do núcleo de estreptavidina para fabricar uma molécula de scFv tetramérica (Kipriyanov, S. M., *et al.* (1995) Human Antibody and Hybridomas 6: 93-101) e o uso de um resíduo de
20 cisteína, um peptídeo marcador e um rótulo de poliistidina de terminal C para fabricar moléculas de scFv bivalentes e biotiniladas (Kipriyanov, S. M., *et al.* (1994) Mol. Immunol. 31: 1047-1058). Os anticorpos e fragmentos que compreendem moléculas de imunoadesão podem ser obtidos usando técnicas de DNA recombinante padrão, como aqui descritas. As porções de ligação de
25 antígeno preferidas são domínios completos ou pares de domínios completos.

Os anticorpos de ligação de IL-1 β e fragmentos da presente invenção também abrangem fragmentos de anticorpo de domínio (dAb) (Ward *et al.*, Nature 341: 544-546, 1989) que consistem de um domínio VH. Os anticorpos de ligação de IL-1 β e fragmentos da presente invenção também

abrangem diacorpos, que são anticorpos bivalentes em que os domínios V_H e V_L são expressados em uma cadeia de polipeptídeo única, mas usando um ligador que é muito curto para permitir o emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia, forçando por meio deste os domínios a formarem par com os domínios complementares de uma outra cadeia e criando dois sítios de ligação de antígeno (ver por exemplo, a EP 404.097; WO 93111161; Holliger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448, 1993 e Poljak *et al.*, Structure 2: 1121-1123, 1994). Os diacorpos podem ser biespecíficos ou monoespecíficos.

Os anticorpos de ligação de IL-1 β e fragmentos da presente invenção também abrangem fragmentos de anticorpo de cadeia única (scFv) que se ligam a IL-1 β . Um scFv compreende uma região variável de cadeia pesada (V_H) de anticorpo operavelmente ligado a uma região variável de cadeia leve (V_L) de anticorpo em que a região variável de cadeia pesada e a região variável de cadeia leve, juntas ou individualmente, formam um sítio de ligação que liga IL-1 β . Um scFv pode compreender uma região V_H na extremidade de terminal amino e uma região V_L na extremidade de terminal carbóxi. Alternativamente, scFv pode compreender uma região V_L na extremidade de terminal amino e uma região V_H na extremidade de terminal carbóxi. Além disso, embora os dois domínios do fragmento Fv, V_L e V_H , sejam codificados por genes separados, elas podem ser unidas, usando métodos recombinantes, por um ligador sintético que as possibilitem ser fabricada como uma única cadeia de proteína em que as regiões V_L e V_H formem par para formar moléculas monovalentes (conhecidas como Fv de cadeia única (scFv); ver por exemplo, Bird *et al.* (1988) Science 242: 423-426; e Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883).

Um scFv pode opcionalmente compreender ainda um ligador de polipeptídeo entre a região variável de cadeia pesada e a região variável de cadeia leve. Tais ligadores de polipeptídeo no geral compreendem entre 1 e

50 aminoácidos, alternativamente entre 3 e 12 aminoácidos, alternativamente 2 aminoácidos. Um exemplo de um peptídeo ligador para ligar cadeias pesadas e leves em um scFv compreende a sequência de 5 aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 2). Outros exemplos compreendem uma ou
5 mais repetições em tandem desta sequência (por exemplo, um polipeptídeo que compreende duas a quatro repetições de Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 2) para criar ligadores.

Os anticorpos de ligação de IL-1 β e fragmentos da presente invenção também abrangem anticorpos de cadeia pesada (HCAb). As
10 exceções para a estrutura H₂L₂ de anticorpos convencionais ocorrem em alguns isótipos das imunoglobulinas encontrados em camelídeos (camelos, dromedários e lhamas; Hamers-Casterman *et al.*, 1993 Nature 363: 446; Nguyen *et al.*, 1998 J. Mol. Biol. 275: 413), tubarões wobbegong (Nuttall *et al.*, Mol Immunol. 38: 313-26, 2001), tubarões lambaru (Greenberg *et al.*,
15 Nature 374: 168-73, 1995; Roux *et al.*, 1998 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95: 11804) e no peixe-rato pintado (Nguyen, *et al.*, “Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation,” 2002 Immunogenetics 54(1): 39-47). Estes anticorpos podem aparentemente formar regiões de ligação de antígeno usando apenas regiões variáveis de cadeia pesada, em que estes
20 anticorpos funcionais são dímeros apenas de cadeias pesadas (aludidos como “anticorpos de cadeia pesada” ou “HCAbs”). Consequentemente, algumas formas de realização dos presentes anticorpos de ligação de IL-1 β e fragmentos podem ser anticorpos de cadeia pesada que especificamente se liga a IL-1 β . Por exemplo, anticorpos de cadeia pesada que são uma classe de
25 IgG e destituídos de cadeias leves são produzidos pelos animais do gênero *Camelidae* que inclui camelos, dromedários e lhamas (Hamers-Casterman *et al.*, Nature 363: 446-448 (1993)). HCAbs têm um peso molecular de cerca de 95 kDa ao invés do peso molecular de cerca de 160 kDa dos anticorpos de IgG convencionais. Os seus domínios de ligação consistem apenas dos

domínios variáveis de cadeia pesada, frequentemente aludidos como V_{HH} para distinguí-los do V_H convencional. Muildermans *et al.*, J. Mol. Recognit. 12: 131-140 (1999). O domínio variável dos anticorpos de cadeia pesada é algumas vezes aludido como um nanocorpo (Cortez-Retamozo *et al.*, Cancer Research 64: 2853-57, 2004). Uma biblioteca de nanocorpo pode ser gerada a partir de um dromedário imunizado como descrito em Conrath *et al.*, (Antimicrob Agents Chemother 45: 2807-12, 2001) ou usando métodos recombinantes.

Visto que o primeiro domínio constante (C_{H1}) está ausente (removido durante o processamento do mRNA devido à perda de um sinal de consenso de união), o domínio variável (V_{HH}) é imediatamente seguido pela região de dobradiça, os domínios C_{H2} e C_{H3} (Nguyen *et al.*, Mot. Immunol. 36: 515-524 (1999); Woolven *et al.*, Immunogenetics 50: 98-101 (1999)). A V_{HH} de camélídeo V_{HH} segundo notícias recombina-se com as regiões constantes IgG2 e IgG3 que contêm dobradiça, os domínios CH2 e CH3 e carecem de um domínio CH1 (Hamers-Casterman *et al.*, supra). Por exemplo, a IgG1 de lhama é um isótipo de anticorpo convencional (H_2L_2) em que V_H recombina com uma região constante que contêm dobradiça, os domínios CH1, CH2 e CH3, ao passo que as IgG2 e IgG3 de lhama são isótipos apenas de cadeia pesada que carecem dos domínios CH1 e que não contém nenhuma cadeia leve.

Embora os HCAs sejam destituídos de cadeias leves, eles têm um repertório de ligação de antígeno. O mecanismo de geração genética de HCAs é revisado em Nguyen *et al.* Adv. Immunol 79: 261-296 (2001) e Nguyen *et al.*, Immunogenetics 54: 39-47 (2002). Os tubarões, incluindo o tubarão lambaru, demonstram domínios V monoméricos únicos contendo receptor de antígeno similares. Irving *et al.*, J. Immunol. Methods 248: 31-45 (2001); Roux *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 11804 (1998).

V_{HHS} compreendem fragmentos de ligação de antígeno intactos

pequenos (por exemplo, fragmentos que são de cerca de 15 kDa, 118 a 136
resíduos). Os domínios V_{HH} camelídeos foram descoberto ligar ao antígeno
com alta afinidade (Desmyter *et al.*, J. Biol. Chem. 276: 26285-90, 2001),
com as afinidades de V_{HI} tipicamente na faixa nanomolar e comparáveis com
5 aquelas dos fragmentos Fab e scFv. V_{HHS} são altamente solúveis e mais
estáveis do que os derivados correspondentes dos fragmentos scFv e Fab. Os
fragmentos V_H foram relativamente difíceis de produzir na forma solúvel, mas
melhora em solubilidade e ligação específica pode ser obtida quando os
resíduos de matriz são alterados para serem mais iguais a V_{HH} (Ver, por
10 exemplo, Reichman *et al*, J Immunol Methods 1999, 231: 25-38). Os V_{HHS}
carregam substituições de aminoácido que os tornam mais hidrofílicos e
impedem a interação prolongada com BiP (proteína de ligação de cadeia
pesada da imunoglobulina), que normalmente se liga à cadeia H no Retículo
Endoplático (ER) durante a dobra e montagem, até que a mesma seja
15 deslocada pela cadeia L. Por causa da hidrofilicidade aumentada da V_{HHS} , a
secreção do ER é melhorada.

V_{HHS} funcionais podem ser obtidas pela clivagem proteolítica
de HCAb de um camelídeo imunizado, pela clonagem direta de genes V_{HH} de
células B de um camelídeo imunizado que resulta em V_{HHS} recombinantes ou
20 de bibliotecas ingênuas ou sintéticas. V_{HHS} com a especificidade de antígeno
desejada também podem ser obtidas através da metodologia de demonstração
de fago. Usar V_{HHS} na demonstração de fago é muito mais simples e mais
eficiente comparado com Fabs ou scFvs, visto que apenas um domínio
necessita ser clonado e expressado para se obter um fragmento de ligação de
25 antígeno funcional. Muildermans, Biotechnol. 74: 277-302 (2001); Ghahroudi
et al, FEBS Lett. 414: 521-526 (1997); e van der Linden *et al*, J. Biotechnol.
80: 261-270 (2000). Métodos para gerar anticorpos tendo cadeia pesadas de
camelídeo também são descritos na Publicação de Patente U.S. N^{os}
20050136049 e 20050037421.

Os métodos de demonstração de ribossoma podem ser usados para identificar e isolar moléculas de scFv e/ou V_{HH} tendo a atividade e afinidade de ligação desejadas. Irving *et al.*, J. Immunol. Methods 248: 31-45 (2001). A demonstração de ribossoma e seleção tem o potencial para gerar e

5 demonstrar bibliotecas grandes (10^{14}).

Outras formas de realização fornecem moléculas iguais a V_{HH} geradas através do processo de camelização, pela modificação de V_{HS} não *Camelidae*, tais como V_{HHS} humanas, para melhorar a sua solubilidade e prevenir a ligação não específica. Isto é obtido pela substituição dos resíduos

10 no lado V_{LS} de V_{HS} com resíduos iguais a V_{HH} , por meio deste imitando os fragmentos V_{HH} mais solúveis. Os fragmentos V_H camelizado, particularmente aqueles com base na matriz humana, são esperados exibir uma resposta imune enormemente reduzida quando administrada *in vivo* a um paciente e, conseqüentemente, são esperados ter vantagens significantes para aplicações

15 terapêuticas. Davies *et al.*, FEBS Lett. 339: 285-290 (1994); Davies *et al.*, Protein Eng. 9: 531-537 (1996); Tanha *et al.*, J. Biol. Chem. 276: 24774-24780 (2001); e Riechmann *et al.*, Immunol. Methods 231: 25-38 (1999).

Uma ampla variedade de sistemas de expressão são disponíveis para a produção de fragmentos de IL-1 β incluindo fragmentos

20 Fab, scFv e V_{HHS} . Por exemplo, sistemas de expressão de origem tanto procariótica quanto eucariótica podem ser usados para a produção em larga escala de fragmentos de anticorpo e proteínas de fusão de anticorpo. Particularmente vantajosos são os sistemas de expressão que permitem a secreção de quantidades grandes de fragmentos de anticorpo no meio de

25 cultura.

A produção de Fab-scFv biespecíficos (“bicorpo”) e Fab-(scFv)(2) triespecíficos (“tricorpo”) é descrita em Schoonjans *et al.* (J Immunol. 165: 7050-57, 2000) e Willems *et al.* (J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 786: 161-76, 2003). Para bicorpos ou tricorpos,

uma molécula scFv é fundida a uma ou ambas das cadeias VL-CL (L) e VH-CH₁ (Fd), por exemplo, para produzir um tricorpo dois scFvs são fundidos ao terminal C de Fab enquanto em um bicorpo um scFv é fundido ao terminal C de Fab. Um “minicorpo” que consiste de scFv fundido ao CH3 por intermédio de um ligador de peptídeo (sem dobradiça) ou por intermédio de uma dobradiça IgG foi descrito em Olafsen, *et al.*, Protein Eng Des Sel. Abril de 2004; 17(4): 315-23.

Intracorporos são anticorpos de cadeia única que demonstram a expressão intracelular e podem manipular a função da proteína intracelular (Biocca, *et al.*, EMBO J. 9: 101-108, 1990; Colby *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 101: 17616-21, 2004). Intracorporos, que compreendem sequências de sinal de célula que retêm a construção de anticorpo em regiões intracelulares, podem ser produzidos como descrito em Mhashilkar *et al.* (EMBO J 14: 1542-51, 1995) e Wheeler *et al.* (FASEB J. 17: 1733-5. 2003). Transcorporos são anticorpos permeáveis à célula em que um domínio de transdução de proteína (PTD) é fundido com anticorpos de fragmento variável de cadeia única (scFv) Heng *et al.*, (Med Hypotheses. 64: 1105-8, 2005).

Os anticorpos de ligação de IL-1 β e fragmentos da presente invenção também abrangem anticorpos que são SMIPs ou domínio de ligação de proteínas de fusão de imunoglobulina específico para alvejar proteína. Estas construções são polipeptídeos de cadeia única que compreendem domínios de ligação de antígeno fundidos aos domínios de imunoglobulina necessários para realizar as funções efetoras de anticorpo. Ver por exemplo, WO03/041600, Publicação de Patente U.S. 20030133939 e Publicação de Patente US 20030118592.

Os anticorpos de ligação de IL-1 β e fragmentos da presente invenção também abrangem imunoadesinas. Uma ou mais CDRs podem ser incorporadas em uma molécula covalente ou não covalentemente para torná-la uma imunoadesina. Uma imunoadesina pode incorporar as CDR(s) como

parte de uma cadeia de polipeptídeo maior, pode ligar covalentemente a(s) CDR(s) a uma outra cadeia de polipeptídeo ou pode incorporar a(s) CDR(s) de modo não covalente. As CDRs aqui divulgadas permitem que a imunoadesina se ligue especificamente à IL-1 β .

5 Os anticorpos de ligação IL-1 β e fragmentos da presente invenção também abrangem imitações de anticorpo que compreendem uma ou mais porções de ligação de IL-1 β construídas em um esqueleto orgânico ou molecular (tal como um esqueleto de proteína ou carboidrato). As proteínas tendo estruturas tridimensionais relativamente definidas,
10 habitualmente aludidas como esqueletos de proteína, podem ser usadas como reagentes para o planejamento de imitações de anticorpo. Estes esqueletos tipicamente contêm uma ou mais regiões que são passíveis à variação de sequência específica ou randômica e tal randomização de sequência é frequentemente realizada para produzir bibliotecas de proteínas a partir das
15 quais produtos desejados podem ser selecionados. Por exemplo, uma imitação de anticorpo pode compreender um polipeptídeo de ligação não quimérico tendo um domínio igual à imunoglobulina contendo esqueleto tendo duas ou mais alças expostas ao solvente contendo uma CDR diferente de um anticorpo precursor inserido em cada um das alças e que exhibe atividade de ligação
20 seletiva contra uma ligação de ligando pelo anticorpo precursor. Esqueletos de proteína que não imunoglobulina foram propostos para a obtenção de proteínas com novas propriedades de ligação. (Tramontano *et al*, J. Mol. Recognit. 7: 9, 1994; McConnell e Hoess, J. Mol. Biol. 250: 460, 1995). Outras proteínas foram testadas como matrizes e foram usadas para
25 demonstrar resíduos randomizados nas superfícies helicoidais alfa (Nord *et al*, Nat. Biotechnol. 15: 772, 1997; Nord *et al*., Protein Eng. 8: 601, 1995), nas alças entre as hélices alfa nos feixes de hélice alfa (Ku e Schultz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6552, 1995) e alças constrangidas pelas pontes de dissulfeto, tais como aquelas dos inibidores de protease pequenos (Markland

et al., Biochemistry 35: 8045, 1996; Markland *et al.*, Biochemistry 35: 8058, 1996; Rottgen e Collins, Gene 164: 243, 1995; Wang *et al.*, J. Biol. Chem. 270: 12250, 1995). Os métodos para utilizar esqueletos para as imitações de anticorpo são divulgados na Patente US 5.770.380 e Publicações de Patente
5 US 2004/0171116, 2004/0266993 e 2005/0038229.

Os anticorpos IL-1 β ou fragmentos de anticorpo preferidos para o uso de acordo com a invenção no geral ligam-se à IL-1 β humana com alta afinidade (por exemplo, como determinado com BIACORE), tal como por exemplo com uma constante de dissociação de ligação no equilíbrio (K_0)
10 para IL-1 β de cerca de 10 nM ou menos, cerca de 5 nM ou menos, cerca de 1 nM ou menos, cerca de 500 pM ou menos ou mais preferivelmente cerca de 250 pM ou menos, cerca de 100 pM ou menos, cerca de 50 pM ou menos, cerca de 25 pM ou menos, cerca de 10 pM ou menos, cerca de 5 pM ou menos, cerca de 3 pM ou menos, cerca de 1 pM ou menos, cerca de 0,75 pM
15 ou menos, cerca de 0,5 pM ou menos ou cerca de 0,3 pM ou menos.

Anticorpos ou fragmentos da presente invenção, por exemplo, podem ligar-se à IL-1 β com um IC₅₀ de cerca de 10 nM ou menos, cerca de 5 nM ou menos, cerca de 2 nM ou menos, cerca de 1 nM ou menos, cerca de 0,75 nM ou menos, cerca de 0,5 nM ou menos, cerca de 0,4 nM ou menos,
20 cerca de 0,3 nM ou menos ou ainda cerca de 0,2 nM ou menos, como determinado pelo ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA). Preferivelmente, o anticorpo ou fragmento de anticorpo da presente invenção não reage cruzado com nenhum alvo outro que não IL-1. Por exemplo, os presentes anticorpos e fragmentos podem ligar-se à IL-1 β , mas não se liga
25 detectavelmente à IL-1 α ou têm pelo menos cerca de 100 vezes (por exemplo, pelo menos cerca de 150 vezes, pelo menos cerca de 200 vezes ou ainda pelo menos cerca de 250 vezes) maior seletividade na sua ligação de IL-1 β em relação à sua ligação de IL-1 α . Anticorpos ou fragmentos usados de acordo com a invenção, em certas formas de realização, podem inibir a expressão

induzida por IL-1 β de IL-6 sérico em um animal em pelo menos 50% (por exemplo, pelo menos 60%, pelo menos 70% ou ainda pelo menos 80%) quando comparado ao nível de IL-6 sérico em um animal estimulado com IL-1 β que não foi administrado com um anticorpo ou fragmento da invenção. Os anticorpos podem ligar IL-1 β mas permitem ou substancialmente permitem a ligação do ligando de IL-1 β ligado ao receptor de IL-1 Tipo I (IL-1 RI). Ao contrário de muitos anticorpos de ligação de IL-1 β conhecidos que bloqueiam ou substancialmente interferem com a ligação de IL-1 β à IL-1RI, os anticorpos designados AB5 e AB7 (Pedido US número 111472813) seletivamente se ligam ao ligando de IL-1 β , mas permitem a ligação do ligando de IL-1 β ligado à IL-1RI. Por exemplo, o anticorpo designado AB7 se liga a um epítipo IL-1 β mas ainda permite a ligação de IL-1 β para ligar à IL-1RI. Em certas formas de realização, o anticorpo pode diminuir a afinidade de interação de IL-1 β ligado para ligar à IL-1RI. Consequentemente, a invenção fornece, em um aspecto relacionado, o uso de um anticorpo de ligação de IL-1 β ou fragmento de anticorpo de ligação de IL-1 β que tem pelo menos uma das características anteriormente mencionadas. Qualquer um dos anticorpos, fragmentos de anticorpo ou polipeptídeos precedentes da invenção podem ser humanizados ou engenheirados humanos, como aqui descrito.

Uma variedade de anticorpos de IL-1 (por exemplo, IL-1 β) e fragmentos conhecidos na técnica podem ser usados de acordo com os métodos aqui fornecidos, incluindo por exemplo anticorpos descritos ou derivados usando métodos descritos nas seguintes patentes e pedidos de patente: US 4.935.343, US 2003/0026806, US 2003/0124617, WO 2006/081139, WO 03/034984, WO 95/01997, WO 02/16436, WO 03/010282, WO 03/073982, WO 2004/072116, WO 2004/067568, EP 0 267 611 B 1, EP 0 364 778 B1 e Pedido US número 11/472813. Como um exemplo não limitante, os anticorpos AB5 e AB7 (Pedido US número 11/472813, WO2007/002261) podem ser usados de acordo com a invenção. As

sequências da região variável de AB5 e AB7 são como segue:

AB5

CADEIA LEVE

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLSWYQQKPDGTVKLLIYYTSKLHS

5 GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCLQ GKMLPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 3)

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

CADEIA PESADA

10 QVTLKESGPGILKPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVGVWIRQPSGKGLEWLAHIWWD
GDESYNPSLKTQLTISKDTSRNQVFLKITSVDTVDTATYFCARNRYDPPWFVDW
QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 4)

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

15 **AB7**

CADEIA LEVE

DIQMTQSTSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLSWYQQKPGKAVKLLIYYTSKLHS

GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQQEDFATYFCLQ GKMLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 5)

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

CADEIA PESADA

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVGVWIRQPSGKGLEWLAHIWW

25 DGDESYNPSLKSRLTISKDTSKNQVSLKITSVTAADTAVYFCARNRYDPPWFVDW
GGTLVTVSS (SEQ ID NO: 6)

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

Os anticorpos e fragmentos de anticorpo aqui descritos podem ser preparados por qualquer método adequado. Os métodos adequados para

preparar tais anticorpos e fragmentos de anticorpo são conhecidos na técnica. Outros métodos para preparar os anticorpos e fragmentos de anticorpo são como aqui descritos como parte da invenção. O anticorpo, fragmento de anticorpo ou polipeptídeo da invenção, como aqui descritos, podem ser

5 isolados ou purificados em qualquer grau. Como aqui usado, um composto isolado é um composto que foi removido do seu ambiente natural. Um composto purificado é um composto que foi aumentado em pureza, tal que o composto existe em uma forma que é mais pura do que existe (i) no seu ambiente natural ou (ii) quando inicialmente sintetizado e/ou amplificado sob

10 condições de laboratório, em que a “pureza” é um termo relativo e não necessariamente significa “pureza absoluta.”

Composições farmacêuticas

Os anticorpos de ligação de IL-1 (por exemplo, IL-1 β) e fragmentos de anticorpo para o uso de acordo com a presente invenção podem

15 ser formulados em composições, especialmente composições farmacêuticas, para o uso nos métodos aqui. Tais composições compreendem uma quantidade terapêutica ou profilaticamente eficaz de um anticorpo de ligação de IL-1 β ou fragmento de anticorpo da invenção em mistura com um carregador adequado, por exemplo, um agente farmaceuticamente aceitável.

20 Tipicamente, os anticorpos de ligação de IL-1 β e fragmentos de anticorpo da invenção são suficientemente purificados para a administração a um animal antes da formulação em uma composição farmacêutica.

Os agentes farmaceuticamente aceitáveis incluem agentes carregadores, excipientes, diluentes, antioxidantes, conservantes, corantes,

25 flavorizantes e diluentes, agentes emulsificantes, agentes de suspensão, solventes, enchedores, agentes de volume, tampões, veículos de liberação, agentes de tonicidade, co-solventes, agentes de umectação, agentes complexantes, agentes tamponantes, antimicrobianos e tensoativos.

Solução salina tamponada neutra ou solução salina mista com

albumina são carregadores apropriados exemplares. As composições farmacêuticas podem incluir antioxidantes tais como ácido ascórbico; polipeptídeos de peso molecular baixo; proteínas, tais como albumina sérica, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, arginina ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos incluindo glicose, manose ou dextrinas; agentes queladores tais como EDTA; álcoois de açúcar tais como manitol ou sorbitol; contraíons que forma sal tais como sódio; e/ou tensoativos não iônicos tais como Tween, pluronics ou polietileno glicol (PEG). Também por via de exemplo, os agentes realçadores de tonicidade adequados incluem haletos de metal alcalino (preferivelmente cloreto de sódio ou potássio), manitol, sorbitol e outros. Os conservantes adequados incluem cloreto de benzalcônio, timerosal, álcool fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorexidina, ácido sórbico e outros. Peróxido de hidrogênio também pode ser usado como conservante. Os co-solventes adequados incluem glicerina, propileno glicol e PEG. Os agentes complexantes adequados incluem cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina ou hidróxi-propil-beta-ciclodextrina. Os tensoativos adequados ou agentes de umectação incluem ésteres de sorbitano, polissorbatos tais como polissorbato 80, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal e outros. Os tampões podem ser tampões convencionais tais como acetato, borato, citrato, fosfato, bicarbonato ou Tris-HCl. O tampão de acetato pode ser em torno do pH 4 a 5,5 e o tampão de Tris pode ser em torno do pH 7 a 8,5. Os agentes farmacêuticos adicionais são apresentados em Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edição, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990.

A composição pode estar na forma líquida ou em uma forma liofilizada ou secada por congelamento e podem incluir um ou mais lioprotetores, excipientes, tensoativos, aditivos estruturais de peso molecular alto e/ou agentes de volume (ver por exemplo as Patentes US 6.685.940,

6.566.329 e 6.372.716). Em uma forma de realização, um lioprotetor é incluído, que é um açúcar não redutor tal como sacarose, lactose ou trealose. A quantidade de lioprotetor no geral incluído é tal que, na reconstituição, a formulação resultante será isotônica, embora formulações hipertônicas ou

5 levemente hipotônica também possam ser adequadas. Além disso, a quantidade de lioprotetor deve ser suficiente para prevenir uma quantidade inaceitável de degradação e/ou agregação da proteína na liofilização. As concentrações de lioprotetor exemplares para açúcares (por exemplo, sacarose, lactose, trealose) na formulação pré-liofilizada são de cerca de 10

10 mM a cerca de 400 mM. Em uma outra forma de realização, um tensoativo é incluído, tal como por exemplo, tensoativos não iônicos e tensoativos iônicos tais como polissorbatos (por exemplo polissorbato 20, polissorbato 80); poloxâmeros (por exemplo poloxâmero 188); éteres fenílicos de poli(etileno glicol) (por exemplo Triton); dodecil sulfato de sódio (SDS); lauril sulfato de

15 sódio; octil glicosídeo sódico; lauril-, miristil-, linoleil- ou estearil-sulfobetaina; lauril-, miristil-, linoleil- ou estearil-sarcosina; linoleil-, miristil- ou cetil-betaína; lauroamidopropil-, cocamidopropil-, linoleamidopropil-, miristamidopropil-, palmidopropil- ou isostearamidopropil-betaína (por exemplo lauroamidopropil); miristamidopropil-, palmidopropil- ou

20 isostearamidopropil-dimetilamina; metil cocoil- taurato de sódio ou metil ofeil-aurato de dissódio; e a série MONAQUAT[®] (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.), polietil glicol, polipropil glicol e copolímeros de etileno e propileno glicol (por exemplo Pluronic, PF68 etc). As quantidades exemplares de tensoativo que pode estar presente na formulação pré-

25 liofilizada são de cerca de 0,001 a 0,5%. Aditivos estruturais de peso molecular alto (por exemplo enchedores, aglutinantes) podem incluir por exemplo, acácia, albumina, ácido algínico, fosfato de cálcio (dibásico), celulose, carboximetilcelulose, carboximetilcelulose sódica, hidroxietilcelulose, hidroxipropilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, celulose

microcristalina, dextrano, dextrina, dextratos, sacarose, tilose, amido pré gelatinizado, sulfato de cálcio, amilose, glicina, bentonita, maltose, sorbitol, etilcelulose, hidrogeno fosfato de dissódio, fosfato de dissódio, pirossulfito de dissódio, álcool polivinílico, gelatina, glicose, goma guar, glicose líquida, açúcar compressível, alumino silicato de magnésio, maltodextrina, óxido de polietileno, polimetacrilatos, povidona, alginato de sódio, tragacanto, celulose microcristalina, amido e zeína. As concentrações exemplares de aditivos estruturais de peso molecular alto são de 0,1% a 10% em peso. Em outras formas de realização, um agente de volume (por exemplo, manitol, glicina) pode ser incluído.

As composições podem ser adequadas para a administração parenteral. As composições exemplares são adequadas para injeção ou infusão em um animal por qualquer via disponível para o técnico habilitado, tal como as vias intraarticular, subcutânea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intralesional, intrarretal, transdérmica, oral e inalada. Uma formulação parenteral tipicamente será uma solução estéril, isenta de pirogênio, isotônica, opcionalmente contendo conservantes farmaceuticamente aceitáveis.

Os exemplos de solventes não aquosos são propileno glicol, polietileno glicol, óleos vegetais tais como óleo de oliva e ésteres orgânicos injetáveis tais como oleato de etila. Os carregadores aquosos incluem água, soluções alcoólicas/aquosas, emulsões ou suspensões, incluindo solução salina e meio tamponado. Os veículos parenterais incluem solução de cloreto de sódio, dextrose de Ringer, dextrose e cloreto de sódio, Ringer's lactado ou óleos fixos. Os veículos intravenosos incluem reabastecedores de fluido e nutriente, reabastecedores de eletrólito, tais como aqueles com base em dextrose de Ringer e outros. Conservantes e outros aditivos também podem estar presentes, tais como, por exemplo, anti-microbianos, anti-oxidantes,

agentes queladores, gases inertes e outros. Ver no geral, Remington's Pharmaceutical Science, 16^a Ed., Mack Eds., 1980, que é aqui incorporada por referência.

As composições farmacêuticas aqui descritas podem ser

5 formuladas para a liberação controlada ou prolongada de uma maneira que forneça concentração local de liberação prolongada (por exemplo, bolo, efeito depósito) e/ou estabilidade ou meia vida aumentadas do produto em um ambiente local particular. A invenção considera que em certas formas de realização tais composições podem incluir uma quantidade significamente

10 maior de anticorpo ou fragmento no depósito inicial, enquanto que a quantidade eficaz de anticorpo ou fragmento realmente liberado e disponível em qualquer ponto de tempo esteja de acordo com a divulgação aqui em uma quantidade muito mais baixa do que o depósito inicial. As composições podem incluir a formulação de anticorpos de ligação de IL-1 β , fragmentos de

15 anticorpo, ácido nucleicos ou vetores da invenção com preparações particuladas de compostos poliméricos tais como ácido polilático, ácido poliglicólico, etc., assim como agentes tais como uma matriz biodegradável, microesferas injetáveis, partículas microcapsulares, microcápsulas, pérolas de partículas bioerodíveis, lipossomas e dispositivos de liberação implantáveis

20 que forneçam a liberação controlada ou prolongada do agente ativo que depois pode ser liberado como uma injeção depósito. As técnicas para formular tais meios de liberação prolongada ou controlada são conhecidos e uma variedade de polímeros foram desenvolvidos e usados para a liberação controlada e liberação de medicamentos. Tais polímeros são tipicamente

25 biodegradáveis e biocompatíveis. Hidrogéis poliméricos, incluindo aqueles formados pela complexação de polímero enantiomérico ou segmentos de polipeptídeo e hidrogéis com propriedades sensíveis à temperatura ou pH, podem ser desejáveis para fornecer efeito de depósito de medicamento por causa das condições brandas e aquosas envolvidas no aprisionamento dos

agentes de proteína bioativos (por exemplo, anticorpos). Ver, por exemplo, a descrição de micropartículas poliméricas porosas de liberação controlada para a liberação de composições farmacêuticas na Publicação de Pedido PCT WO 93/15722.

5 Os materiais adequados para este propósito incluem polilactídeos (ver, por exemplo, a Patente U.S. 3.773.919), polímeros de poli- (ácidos α -hidroxicarboxílicos), tais como o ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (EP 133.988A), copolímeros do ácido L-glutâmico e gama L-glutamato de etila (Sidman *et al.*, *Biopolymers*, 22: 547-556 (1983)), poli (metacrilato de 2-
10 hidroxietila) (Langer *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, 15: 167-277 (1981) e Langer, *Chem. Tech.*, 12: 98-105 (1982)), vinil acetato de etileno ou ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Outros polímeros biodegradáveis incluem poli(lactonas), poli(acetais), poli(ortoésteres) e poli(ortocarbonatos). As composições de liberação prolongada também podem incluir lipossomas, que
15 podem ser preparadas por qualquer um de diversos métodos conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Eppstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688-92 (1985)). O próprio carregador ou seus produtos de degradação, devem ser não tóxicos no tecido alvo e não devem agravar ainda mais a condição. Isto pode ser determinado pela triagem de rotina em modelos de
20 animal do distúrbio alvo ou, se tais modelos são indisponíveis, em animais normais.

A microencapsulação de proteínas recombinantes para a liberação prolongada foi realizada com êxito com hormônio do crescimento humano (rhGH), interferon- (rhIFN--), interleucina-2 e MN rgp120. Johnson
25 *et al.*, *Nat. Med.*, 2: 795-799 (1996); Yasuda, *Biomed. Ther.*, 27: 1221-1223 (1993); Hora *et al.*, *Bio/Technology*, 8: 755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polilactide Poliglicolide Microsphere Systems," em *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Method*, Powell e Newman, eds, (Plenum Press: Nova Iorque, 1995), pp. 439-

462; WO 97/03692, WO 96140072, WO 96/07399; e Pat. U.S. Nº 5.654.010. As formulações de liberação prolongada destas proteínas foram desenvolvidas usando o polímero do ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA) devido à sua biocompatibilidade e ampla faixa de propriedades biodegradáveis. Os produtos de degradação de PLGA, os ácidos láctico e glicólico podem ser depurados rapidamente dentro do corpo humano. Além disso, a degradabilidade deste polímero pode ser dependente do seu peso e composição moleculares. Lewis, "Controlled release of active bioagents from lactidelglicolide polymer," em: M. Chasm e R. Langer (Eds.), *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems* (Marcel Dekker: Nova Iorque, 1990), pp. 1-41. Os exemplos adicionais de composições de liberação prolongada incluem, por exemplo, a EP 58.481A, Pat. U.S. Nº 3.887.699, EP 158.277A, Patente Canadense Nº 1176565, U. Sidman *et al.*, *Biopolymers* 22, 547 [1983], R. Langer *et al.*, *Chem. Tech.* 12, 98 [1982], Sinha *et al.*, *J. Control. Release* 90, 261 [2003], Zhu *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 18, 24 [2000] e Dai *et al.*, *Colloids Surf B Biointerfaces* 41, 117 [2005].

Os polímeros bioadesivos também são considerados para o uso nas ou com as composições da presente invenção. Os bioadesivos são materiais sintéticos e que ocorrem naturalmente capazes de aderir aos substratos biológicos por períodos de tempo prolongados. Por exemplo, Carbopol e policarbofil são ambos derivados reticulados sintéticos do poli(ácido acrílico). Os sistemas de liberação de bioadesivo com base nas substâncias que ocorrem naturalmente incluem por exemplo o ácido hialurônico, também conhecido como hialuronan. O ácido hialurônico é um mucopolissacarídeo que ocorre naturalmente que consiste de resíduos de D-glucurônico e N-acetil-D-glicosamina. O ácido hialurônico é encontrado na matriz do tecido extracelular de vertebrados, incluindo nos tecidos conectivos, assim como no fluido sinovial e no humor vítreo e aquoso do olho. Os derivados esterificados do ácido hialurônico foram usados para produzir

microesferas para o uso na liberação que são biocompatíveis e biodegradáveis (ver por exemplo, Cortivo *et al.*, *Biomaterials* (1991) 12: 727-730; Publicação Européia Nº 517.565; Publicação Internacional Nº WO 96129998; Thum *et al.*, *J. Controlled Rel.* (1994) 29: 133-141). As composições contendo ácido hialurônico exemplares da presente invenção compreendem um polímero de éster do ácido hialurônico em uma quantidade de aproximadamente 0,1% a cerca de 40% (p/p) de um anticorpo de ligação de IL-1 β ou fragmento ao polímero do ácido hialurônico.

As matrizes poliméricas tanto biodegradáveis quanto não biodegradáveis podem ser usadas para liberar composições de acordo com a invenção e tais matrizes poliméricas podem compreender polímeros naturais ou sintéticos. As matrizes biodegradáveis são preferidas. O período de tempo no qual a liberação ocorre está fundamentado na seleção do polímero. Tipicamente, a liberação em um período que varia dentre umas poucas horas e três a doze meses é mais desejável. Os polímeros sintéticos exemplares que podem ser usados para formar o sistema de liberação biodegradável incluem: polímeros de ácido láctico e ácido glicólico, poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, polialquileno glicóis, óxidos de polialquileno, tereftalatos de polialquileno, álcoois polivinílicos, éteres polivinílicos, ésteres polivinílicos, haletos de polivinila, polivinilpirrolidona, poliglicolídeos, polissiloxanos, polialdeídos, poliuretanos e co-polímeros destes, poli(ácido butírico), poli(ácido valérico), alquil celulose, hidroxialquil celulosas, éteres de celulose, ésteres de celulose, nitro celulosas, polímeros de ésteres acrílico e metacrílico, metil celulose, etil celulose, hidroxipropil celulose, hidroxipropil metil celulose, hidroxibutil metil celulose, acetato de celulose, propionato de celulose, acetato butirato de celulose, acetato ftalato de celulose, carboxietil celulose, triacetato de celulose, sal sódico de sulfato de celulose, poli(metacrilato de metila), poli(metacrilato de etila), poli(metacrilato de butila), poli(metacrilato de isobutila), poli(metacrilato de hexila),

poli(metacrilato de isodecila), poli(metacrilato de laurila), poli(metacrilato de fenila), poli(acrilato de metila), poli(acrilato de isopropila), poli(acrilato de isobutila), poli(acrilato de octadecila), polietileno, polipropileno, poli(etileno glicol), poli(óxido de etileno), poli(tereftalato de etileno), poli(álcoois

5 vinílicos), acetato de polivinila, cloreto de polivinila, poliestireno e polivinilpirrolidona. Os polímeros naturais exemplares incluem alginato e outros polissacarídeos incluindo dextrano e celulose, colágeno, derivados químicos destes (substituições, adições de grupos químicos, por exemplo, alquila, alquilenos, hidroxilações, oxidações e outras modificações

10 rotineiramente feitas por aqueles habilitados na técnica), albumina e outras proteínas hidrofílicas, zeína e outras prolaminas e proteínas hidrofóbicas, copolímeros e misturas destes. No geral, estes materiais degradam pela hidrólise enzimática ou exposição à água *in vivo*, pela erosão de superfície ou volumétrica. O polímero opcionalmente está na forma de um hidrogel (ver por

15 exemplo a WO 04/009664, WO 05/087201, Sawhney, *et al.*, *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587), que pode absorver até cerca de 90% do seu peso em água e além disso, opcionalmente é reticulado com íons multivalentes ou outros polímeros.

Os sistemas de liberação também incluem sistemas não

20 poliméricos que são lipídeos incluindo esteróis tais como colesterol, ésteres de colesterol e ácidos graxos ou gorduras neutras tais como mono- di- e triglicerídeos; sistemas de liberação de hidrogel; sistemas silásticos; sistemas com base em peptídeo; revestimentos de cera; tabletes comprimidos usando aglutinantes e excipientes convencionais; implantes parcialmente fundidos; e

25 outros. Os exemplos específicos incluem, mas não são limitados a: (a) sistemas erosionais em que o produto está contido em uma forma dentro de uma matriz tal como aquela descrita nas Pats. U.S. N^{os} 4.452.775, 4.675.189 e 5.736.152 e (b) sistemas difusionais em que um produto permeia em uma taxa controlada a partir de um polímero tal como descrito nas Pats. U.S. N^{os}

3.854.480, 5.133.974 e 5.407.686. Lipossomas contendo o produto podem ser preparados pelos métodos conhecidos, tais como por exemplo (DE 3.218.121; Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688-3692 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030-4034 (1980); EP 52.322; EP 5 36.676; EP 88.046; EP 143.949; EP 142.641; Pedido de Patente Japonesa 83-118008; Pats. U.S. N^{os} 4.485.045 e 4.544.545; e EP 102.324).

Uma composição farmacêutica que compreende um anticorpo de ligação de IL-1 β ou fragmento pode ser formulada para inalação, tal como por exemplo, como um pó seco. As soluções de inalação também podem ser 10 formuladas em um propelente liquefeito para a liberação por aerossol. Já em uma outra formulação, as soluções podem ser nebulizadas. A composição farmacêutica adicional para a administração pulmonar inclui, aquelas descritas, por exemplo, na Publicação de Pedido PCT WO 94/20069, que divulga a liberação pulmonar de proteínas quimicamente modificadas. Para a 15 liberação pulmonar, o tamanho da partícula deve ser adequada para a liberação ao pulmão distal. Por exemplo, o tamanho de partícula pode ser de 1 μ m a 5 μ m; entretanto, partículas maiores podem ser usadas, por exemplo, se cada partícula for razoavelmente porosa.

Certas formulações contendo anticorpos de ligação de IL-1 β 20 ou fragmentos de anticorpo podem ser administrados oralmente. As formulações administradas desta maneira pode ser formulada com ou sem aqueles carregadores habitualmente usados na combinação de formas de dosagem sólida tais como tabletes e cápsulas. Por exemplo, uma cápsula pode ser planejada para liberar a porção ativa da formulação no ponto no trato 25 gastrointestinal quando a biodisponibilidade é maximizada e a pré-sistêmica é minimizada. Os agentes adicionais podem ser incluídos para facilitar a absorção de um agente de ligação seletiva. Diluentes, flavorizantes, ceras de baixo ponto de fusão, óleos vegetais, lubrificantes, agentes de suspensão, agentes desintegradores de tablete e aglutinantes também podem ser

utilizados.

Uma outra preparação pode envolver uma quantidade eficaz de um anticorpo de ligação de IL-1 β ou fragmento em uma mistura com excipientes não tóxicos que são adequados para a fabricação de tabletes. Pela
5 dissolução dos tabletes em água estéril ou um outro veículo apropriado, soluções podem ser preparadas na forma de dose unitária. Os excipientes adequados incluem, mas não são limitados a, diluentes inertes, tais como carbonato de cálcio, carbonato ou bicarbonato de sódio, lactose ou fosfato de cálcio; ou agentes de ligação, tais como amido, gelatina ou acácia; ou agentes
10 de lubrificação tais como estearato de magnésio, ácido esteárico ou talco.

As formulações farmacêuticas adequadas e/ou preferidas podem ser determinadas em vista da presente divulgação e conhecimento geral da tecnologia da formulação, dependendo da via pretendida de administração, formato de liberação e dosagem desejada. Independente da
15 maneira de administração, uma dose eficaz pode ser calculada de acordo com o peso corporal do paciente, área de superfície ou tamanho do órgão. Outro refinamento dos cálculos para determinar a dosagem apropriada para tratamento envolvendo cada uma das formulações aqui descritas são rotineiramente feitos na técnica e estão dentro do âmbito das tarefas
20 rotineiramente realizadas na técnica. As dosagens apropriadas podem ser averiguadas através do uso de dados de resposta de dose apropriados.

As formulações adicionais estarão evidentes considerando-se a presente divulgação, incluindo formulações envolvendo anticorpos de ligação de IL-1 β e fragmentos em combinação com um ou mais outros agentes
25 terapêuticos. Por exemplo, em algumas formulações, um anticorpo de ligação de IL-1 β , fragmento de anticorpo, ácido nucleico ou vetor da invenção são formulados com um segundo inibidor de um caminho de sinalização de IL-1. Os inibidores secundários representativos incluem, mas não são limitados a, anticorpos, fragmentos de anticorpo, peptídeos, polipeptídeos, compostos,

ácidos nucleicos, vetores e composições farmacêuticas, tais como, por exemplo, aquelas descritas na US 6899878, US 2003022869, US 20060094663, US 20050186615, US 20030166069, WO/04022718, WO/05084696, WO/05019259. Por exemplo, uma composição pode

5 compreender um anticorpo de ligação de IL-1 β , fragmento de anticorpo, ácido nucleico ou vetor da invenção em combinação com um anticorpo de ligação de IL-1 β , fragmento ou um ácido nucleico ou vetor que codifica um tal anticorpo ou fragmento.

As composições farmacêuticas podem compreender anticorpos

10 de ligação de IL-1 β ou fragmentos em combinação com outros agentes ativos. Tais combinações são aquelas úteis para o seu propósito intencionado. As combinações que são parte desta invenção podem ser anticorpos de IL-1 β e fragmentos, tais como por exemplo aqueles aqui descritos e pelo menos um agente adicional selecionado das listas abaixo. Os agentes ativos apresentados

15 abaixo são para propósitos ilustrativos e não intencionados a serem limitantes. A combinação também pode incluir mais do que um agente adicional, por exemplo, dois ou três agentes adicionais se a combinação for tal que a composição formada possa desempenhar a sua função pretendida.

A invenção considera ainda que as composições farmacêuticas

20 que compreendem um ou mais outros agentes ativos podem ser administradas separadamente dos anticorpos de ligação de IL-1 β ou fragmentos e tais administrações separadas podem ser realizadas no mesmo ponto ou pontos diferentes no tempo, tal como por exemplo no mesmo ou em dias diferentes. A administração dos outros agentes ativos podem estar de acordo com as

25 práticas médicas padrão conhecidas na técnica ou a administração pode ser modificada (por exemplo, intervalos mais longos, dosagens menores, início demorado) quando usado em conjunção com a administração de anticorpos de ligação de IL-1 β ou fragmentos, tais como aqui divulgados.

Os agente ativos ou combinações com os presentes anticorpos

ou fragmentos incluem um medicamento antiinflamatório não esteroideal (NSAID) tal como aspirina, ibuprofeno e outros derivados do ácido propiônico (alminoprofeno, benoxaprofeno, ácido buclórico, carprofeno, fenbufeno, fenoprofeno, fluprofeno, flurbiprofeno, indoprofeno, cetoprofeno, 5 mioprofeno, naproxeno, oxaprozin, piroprofeno, pranoprofeno, suprofeno, ácido tiaprofênico e tioxaprofeno), derivados do ácido acético (indometacina, acemetacina, alclofenaco, clidanaco, diclofenaco, fenclofenaco, ácido fenclórico, fentiazac, fuirofenaco, ibufenaco, isoxepac, oxpinac, sulindac, tiopinac, tolmetina, zidometacina e zomepirac), derivados do ácido fenâmico 10 (ácido flufenâmico, ácido meclofenâmico, ácido mefenâmico, ácido niflúmico e ácido tolfenâmico), derivados do ácido bifenilcarboxílico (diflunisal e flufenisal), oxicams (isoxicam, piroxicam, sudoxicam e tenoxicam), salicilatos (ácido acetil salicílico, sulfasalazina) e as pirazolonas (apazona, bezpiperilon, feprazona, mofebutazona, oxifenbutazona, fenilbutazona). Outras 15 combinações incluem inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2). Outros agentes ativos para a combinação incluem esteróides tais como prednisolona, prednisona, metilprednisolona, betametasona, dexametasona ou hidrocortisona. Uma combinação pode ser especialmente vantajosa, desde que um ou mais efeitos colaterais do esteróide possam ser reduzidos ou mesmo 20 eliminados pela diminuição da dose de esteróide requerida quando do tratamento dos pacientes em combinação com os presentes anticorpos e fragmentos.

Alternativamente ou além disso, o tratamento terapêutico com pelo menos um ou mais agentes ativos adicionais pode ser usado que pode 25 atuar por intermédio de modos diferentes de ação: 1) sulfoniluréias (por exemplo, clorpropamida, tolazamida, acetoexamida, tolbutamida, gliburida, glimepirida, glipizida) e/ou meglitinidas (por exemplo, repaglinida, nateglinida) que essencialmente estimulam a secreção da insulina; 2) biguanidas (por exemplo, metformina) atuam pela promoção da utilização de

glicose, redução da produção de glicose hepática e diminuição da produção da glicose intestinal; 3) inibidor das alfa-glicosidases (por exemplo, acarbose, miglitol) diminuem a digestão de carboidrato e conseqüentemente a absorção a partir do intestino e reduzem a hiperglicemia pós prandial; 4)

5 tiazolidinodionas (por exemplo, troglitazona, pioglitazona, rosiglitazona, glipizida, balaglitazona, rivoglitazona, netoglitazona, troglitazona, englitazona, AD 5075, T 174, YM 268, R 102380, NC 2100, NIP 223, NIP 221, MK 0767, ciglitazona, adaglitazona, CLX 0921, darglitazona, CP 92768, BM 152054) que realçam a ação da insulina, promovendo assim a utilização

10 da glicose em tecidos periféricos; 5) peptídeos equivalentes a glucagon incluindo inibidores de DPP4 (por exemplo, sitagliptina); e 6) insulina, que estimula a utilização da glicose de tecido e inibe a produção da glicose hepática. O peptídeo-1 equivalente a glucagon (GLP-1), análogos resistentes a DPP-IV (miméticos de incretina), inibidores de DPP-IV, insulina, análogos de

15 insulina, agonistas de PPAR gama, agonistas de PPAR de ação dupla, agonistas ou análogos de GLP-1, inibidores de PTP1B, inibidores de SGLT, secretagogos de insulina, agonistas de RXR, inibidores da glicogênio sintase cinase-3, sensibilizadores de insulina, imuno moduladores, agonistas do receptor beta-3 adrenérgico, agonistas Pan-PPAR, inibidores de 11beta-HSDI,

20 análogos de amilina, biguanidas, inibidores da alfa-glicosidase, meglitinidas, tiazolidino-dionas, sulfoniluréias e outros também podem ser usados como o(s) outro(s) agente(s) ativo(s) (ver por exemplo Nathan, 2006, N. Engl. J. Med. 355: 2477-2480; Kahn *et al.*, 2006, N. Engl. J. Med. 355: 2427-2443). Já em uma outra forma de realização, o agente ativo pode ser um inibidor da

25 HMG Co-A redutase (por exemplo, estatinas).

É ainda considerado que um anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento administrados a um paciente de acordo com a invenção podem ser administrados em combinação com tratamento com pelo menos um agente ativo adicional, tal como por exemplo qualquer um dos agentes ativos

anteriormente mencionados. Em uma forma de realização, o tratamento com o pelo menos um agente ativo é mantido. Em uma outra forma de realização, o tratamento com o pelo menos um agente ativo é reduzido ou descontinuado (por exemplo, quando o paciente está estável), enquanto que o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento é mantido em um regime de dosagem constante. Em uma outra forma de realização, o tratamento com o pelo menos um agente ativo é reduzido ou descontinuado (por exemplo, quando o paciente está estável) e o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento é reduzido (por exemplo, dose mais baixa, dosagem menos frequente, regime de tratamento mais curto). Em uma outra forma de realização, o tratamento com o pelo menos um agente ativo é reduzido ou descontinuado (por exemplo, quando o paciente está estável) e o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento é aumentado (por exemplo, dose mais alta, dosagem mais frequente, regime de tratamento mais longo). Já em uma outra forma de realização, o tratamento com o pelo menos um agente ativo é mantido e o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento é reduzido ou descontinuado (por exemplo, dose mais baixa, dosagem menos frequente, regime de tratamento mais curto). Já em uma outra forma de realização, o tratamento com o pelo menos um agente ativo e o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento são reduzidos ou descontinuados (por exemplo, dose mais baixa, dosagem menos frequente, regime de tratamento mais curto).

As composições farmacêuticas usadas na invenção podem incluir uma quantidade terapeuticamente eficaz ou uma quantidade profilaticamente eficaz dos anticorpos de ligação de IL-1 β ou fragmentos. Uma quantidade terapeuticamente eficaz refere-se a uma quantidade eficaz, em dosagens e por períodos de tempo necessários, para se obter o resultado terapêutico desejado. Uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo ou porção de anticorpo pode variar de acordo com fatores tais como o estado

de doença, idade, sexo e peso do indivíduo e a capacidade do anticorpo ou porção de anticorpo para evocar uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz também é uma em que quaisquer efeitos tóxicos ou nocivos do anticorpo ou porção de anticorpo são excedidos pelos efeitos terapeuticamente benéficos. Uma quantidade profilaticamente eficaz refere-se a uma quantidade eficaz, em dosagens e por períodos de tempo necessários, para se obter o resultado profilático desejado.

Uma quantidade terapêutica ou profilaticamente eficaz de uma composição farmacêutica que compreende um anticorpo de ligação de IL-1 β ou fragmento dependerá, por exemplo, dos objetivos terapêuticos tais como a indicação para a qual a composição está sendo usada, da via de administração e da condição do paciente. As composições farmacêuticas são administradas em uma quantidade terapêutica ou profilaticamente eficaz para tratar uma condição relacionada com a IL-1. Uma “quantidade terapêutica ou profilaticamente eficaz” de um anticorpo de ligação de IL-1 β ou fragmento, da invenção é aquela quantidade que pode tratar ou prevenir um ou mais sintomas de uma doença relacionada com a IL-1 em um paciente, como aqui divulgada.

Métodos de Uso

Os anticorpos anti-IL-1 β em uma quantidade eficaz podem ser usados na presente invenção para o tratamento e/ou prevenção da diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2, obesidade, hiperglicemia, hiperinsulinemia, resistência à insulina e estados e condições de doença caracterizados pela resistência à insulina. tais métodos podem ser usados para tratar um paciente mamífero (por exemplo, o ser humano) que sofre de diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2, obesidade, hiperglicemia, hiperinsulinemia, resistência à insulina e estados e condições de doença caracterizados pela resistência à insulina ou para prevenir a ocorrência da mesma em um paciente em risco.

Os termos “prevenção”, “previne”, “prevenir”, “supressão”,

“suprime”, “suprimir”, “inibir” e “inibição” como aqui usados referem-se a um curso de ação (tal como administrar um composto ou composição farmacêutica) iniciado de uma maneira (por exemplo, antes do início de um sintoma clínico de um estado ou condição de doença) de modo a prevenir, 5 suprimir ou reduzir, temporária ou permanentemente, o início de uma manifestação clínica do estado ou condição de doença. Tal prevenção, supressão ou redução não necessita ser absoluta para ser útil.

Os termos “tratamento”, “tratar” e “tratando” como aqui usado refere-se a um curso de ação (tal como a administração de um composto ou 10 composição farmacêutica) iniciado depois do início de um sintoma clínico de um estado ou condição de doença de modo a eliminar, reduzir, suprimir ou melhorar, temporária ou permanentemente, uma manifestação clínica ou progressão do estado ou condição de doença. Tal tratamento não necessita ser absoluto para ser útil.

15 O termo “em necessidade de tratamento” como aqui usado refere-se a um julgamento feito por um profissional de saúde que um paciente requer ou beneficiar-se-á do tratamento. Este julgamento é feito com base em uma variedade de fatores que estão no domínio de uma perícia do profissional de saúde, mas que inclui o conhecimento de que o paciente está doente ou 20 estará doente, como o resultado de uma condição que é tratável por um método ou composto da divulgação.

O termo “em necessidade de prevenção” como aqui usado refere-se a um julgamento feito por um profissional de saúde que um paciente requer ou beneficiar-se-á da prevenção. Este julgamento é feito com base em 25 uma variedade de fatores que estão no domínio de uma habilidade do profissional de saúde, mas que inclui o conhecimento de que o paciente estará doente ou poderá se tornar doente, como o resultado de uma condição que é prevenível por um método ou composto da divulgação.

O termo “quantidade terapeuticamente eficaz” como aqui

usado refere-se a uma quantidade de um composto (por exemplo, anticorpo), sozinho ou como uma parte de uma composição farmacêutica, que é capaz de ter qualquer efeito detectável, positivo sobre qualquer sintoma, aspecto ou características de um estado ou condição de doença quando administrada a um paciente (por exemplo, como uma ou mais doses). tal efeito não necessita ser absoluto para ser benéfico.

O termo “resistência à insulina” como aqui usado refere-se a uma condição onde uma quantidade normal de insulina é incapaz de produzir uma resposta fisiológica ou molecular normal. Em alguns casos, uma quantidade hiper-fisiológica de insulina, endogenamente produzida ou exogenamente adicionada, é capaz de superar a resistência à insulina no todo ou em parte e produzir uma resposta biológica.

Os anticorpos anti-IL-1 β ou fragmentos podem ser administrados a um ser humano em uma quantidade eficaz para o tratamento e/ou prevenção da diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2, obesidade, hiperglicemia, hiperinsulinemia, resistência à insulina e/ou estados e condições de doença caracterizados pela resistência à insulina. Outras doenças ou condições consideradas para o tratamento com anticorpos anti-IL-1 β ou fragmentos de acordo com a presente invenção incluem pré-diabetes, dislipidemia, hiperlipidemia, hipertensão, síndrome metabólica e comportamento doentio. A invenção considera ainda métodos de usar tais anticorpos ou fragmentos para diminuir a incidência ou severidade ou estabilizar, complicações ou condições associadas com a diabetes Tipo 2, tais como por exemplo, retinopatia, insuficiência renal, doença cardiovascular (por exemplo, aterosclerose, doença vascular periférica) e cicatrização de ferimento (por exemplo, úlcera diabética).

Além disso, a invenção considera ainda o uso de anticorpos de IL-1 β e fragmentos como aqui descritos para reduzir o nível de proteína reativa C (CRP) em um paciente. CRP é uma proteína de fase aguda que é

predominantemente produzida pelos hepatócitos sob a influência de citocinas tais como IL-1, IL-6 e fator de necrose de tumor (TNF). Com base na versão eletrônica de 2007 do livro texto de medicina interna UpToDate®, a despeito de uma carência de especificidade para a causa de inflamação (por exemplo, infecção, doença renal crônica, doença auto-inflamatória, câncer), os dados de mais do que 30 estudos epidemiológicos têm mostrado uma associação significativa entre as concentrações séricas ou plasmáticas elevadas de CRP e a prevalência da aterosclerose subjacente, do risco de eventos cardiovasculares recorrentes entre pacientes com a doença estabelecida e a incidência do primeiro evento cardiovascular entre indivíduos em risco para a aterosclerose. Além disso, a interação da doença renal primária, a insuficiência renal resultante com o seu estresse oxidativo e modificações de proteína pós-sintéticas, a diálise com os contaminantes associados e o efeito da membrana de diálise sobre as proteínas séricas e as infecções associadas com a entrada no local de acesso repetidas e as infecções sistêmicas subsequentes leva estes pacientes a uma carga excessiva de estímulos inflamatórios. Visto que os níveis de depuração da creatinina sérica caem com a piora da função renal existe uma elevação proporcional de mediadores inflamatórios séricos (por exemplo, citocinas TNF, IL-6, IL-1) assim como evidência da tentativa do corpo para combater esta situação com a produção aumentada, mas ineficiente, de IL-1 RA e IL-10, mediadores anti-inflamatórios. Este estado inflamatório em pacientes de insuficiência renal crônica leva à instabilidade de placa aterosclerótica devido à deflagração direta da apoptose de células do músculo liso vascular. A consequência da elevação de citocina leva a uma das duas mortalidades principais nestes pacientes - um aumento acentuável em mortes cardiovasculares a partir de infartos do miocárdio e acidentes vasculares cerebrais. Uma ilustração direta deste risco aumentado é observado com a avaliação dos níveis de CRP do paciente; quando dividido em quartis de valores CRP, o grupo com os valores

CRP mais altos tem uma taxa de mortalidade em 12 meses de aproximadamente 35%. Assim, a presente invenção divulga o uso de um anticorpo de IL-1 β ou fragmento como aqui fornecido para reduzir os níveis de CRP em tais pacientes (por exemplo, pacientes que sofrem de doença renal). A redução nos níveis de CRP em um paciente como aqui descrito é um meio adequado para se obter uma diminuição proporcional correspondente na morbidez e mortalidade cardiovascular.

Em uma forma de realização, o anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento é administrado a um paciente com pelo menos uma das doenças, condições ou complicações anteriormente mencionadas e o paciente também recebe pelo menos um outro tratamento medicinalmente aceito (por exemplo, medicação, medicamento, produto terapêutico, agente ativo) para a doença, condição ou complicação. Em uma outra forma de realização, o pelo menos um outro tratamento medicinalmente aceito para a doença, condição ou complicação é reduzido ou descontinuado (por exemplo, quando o paciente está estável), enquanto que o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento é mantido em um regime de dosagem constante. Em uma outra forma de realização, o pelo menos um outro tratamento medicinalmente aceito para a doença, condição ou complicação é reduzido ou descontinuado (por exemplo, quando o paciente está estável) e o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento é reduzido (por exemplo, dose mais baixa, dosagem menos frequente, regime de tratamento mais curto). Em uma outra forma de realização, o pelo menos um outro tratamento medicinalmente aceito para a doença, condição ou complicação é reduzido ou descontinuado (por exemplo, quando o paciente está estável) e o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento é aumentado (por exemplo, dose mais alta, dosagem mais frequente, regime de tratamento mais longo). Já em uma outra forma de realização, o pelo menos um outro tratamento medicinalmente aceito para a doença, condição ou complicação é mantido e o tratamento com o anticorpo

anti-IL-1 β ou fragmento é reduzido ou descontinuado (por exemplo, dose mais baixa, dosagem menos frequente, regime de tratamento mais curto). Já em uma outra forma de realização, o pelo menos um outro tratamento medicinalmente aceito para a doença, condição ou complicação e o

5 tratamento com o anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento são reduzidos ou descontinuados (por exemplo, dose mais baixa, dosagem menos frequente, regime de tratamento mais curto).

Em métodos preferidos de tratar ou prevenir as doenças ou condições anteriormente mencionadas (por exemplo, diabetes Tipo 1, diabetes

10 Tipo 2, hiperglicemia, hiperinsulinemia, obesidade, resistência à insulina) o anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento deste é administrado ao paciente humano de acordo com os números de doses, quantidades por dose e/ou intervalos entre dosagem anteriormente mencionados. Alternativamente, o anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento pode ser administrado como uma ou mais doses

15 iniciais das quantidades anteriormente mencionadas que são mais baixas do que uma ou mais quantidades de dose subsequentes. Fornecendo-se a(s) dose(s) inicial(is) em uma quantidade mais baixa, a eficácia e/ou tolerabilidade do tratamento podem ser realçadas. Por exemplo, em uma forma de realização não limitante da invenção, uma ou mais doses iniciais

20 (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5) de uma quantidade de anticorpo ou fragmento < 1 mg/kg (por exemplo, < 0,9 mg/kg, < 0,8 mg/kg, < 0,7 mg/kg, 50,6 mg/kg, < 0,5 mg/kg, < 0,4 mg/kg, < 0,3 mg/kg, < 0,2 mg/kg, < 0,1 mg/kg, < 0,05 mg/kg, < 0,03 mg/kg, < 0,01 mg/kg) podem ser administradas, seguidas por uma ou mais doses subsequentes em uma quantidade maior do que a(s)

25 dose(s) inicial(is) (por exemplo, > 0,01 mg/kg, > 0,03 mg/kg, > 0,1 mg/kg, > 0,3 mg/kg, > 0,5 mg/kg, > 0,6 mg/kg, > 0,7 mg/kg, > 0,8 mg/kg, > 0,9 mg/kg, > 1,0 mg/kg, > 1,5 mg/kg, > 2 mg/kg, > 2,5 mg/kg, > 3 mg/kg, > 3,5 mg/kg, > 4 mg/kg, > 4,5 mg/kg, > 5 mg/kg). A invenção considera que cada dose de anticorpo ou fragmento pode ser administrada em um ou mais locais.

Os métodos de tratar ou prevenir uma doença ou condição de acordo com a presente invenção podem usar um programa pré-determinado ou de “rotina” para a administração do anticorpo ou fragmento. Como aqui usado um programa de rotina refere-se a um período designado pré determinado de tempo entre as administrações de dose. O programa de rotina pode abranger períodos de tempo que são idênticos ou que diferem no comprimento, contanto que o programa seja pré determinado. Qualquer combinação particular seria abrangida pelo programa de rotina contanto que o mesmo fosse determinado adiante do tempo em que o programa apropriado envolve a administração em um certo dia.

A invenção considera ainda que os anticorpos 1L-1 β ou fragmentos usados de acordo com os métodos aqui fornecidos, podem ser administrados em conjunção com métodos de tratamento e composições farmacêuticas mais tradicionais (por exemplo, agentes ativos). Tais composições, podem incluir por exemplo, inibidores de DPP-IV, insulina, análogos de insulina, agonistas de PPAR gama, agonistas de PPAR de ação dupla, agonistas ou análogos de GLP-1, inibidores de PTP1B, inibidores de SGLT, secretagogos de insulina, agonistas de RXR, inibidores da glicogênio sintase cinase-3, sensibilizadores de insulina, imuno moduladores, agonistas do receptor de beta-3 adrenérgico, agonistas de Pan-PPAR, inibidores de 11beta-HSD1, análogos de amilina, biguanidas, inibidores de alfa-glicosidase, meglitinidas, tiazolidinodionas, sulfoniluréias e outros (ver por exemplo Nathan, 2006, N. Engl. J. Med. 355: 2477-2480; Kahn *et al.*, 2006, N. Engl. J. Med. 355: 2427-2443). Em certas formas de realização, os anticorpos e fragmentos usados de acordo com a invenção podem prevenir ou retardar a necessidade quanto a métodos de tratamento ou composições farmacêuticas adicionais. Em outras formas de realização, os anticorpos ou fragmentos podem reduzir a quantidade, frequência ou duração do método de tratamento ou composições farmacêuticas adicionais.

Alternativamente, os métodos de tratar ou prevenir uma doença ou condição de acordo com a presente invenção podem usar um programa para a administração do anticorpo ou fragmento que está fundamentado na presença de sintomas de doença e/ou mudanças em qualquer uma das avaliações aqui (por exemplo, HbA1c, níveis de açúcar do sangue no jejum, OGTT, AUC de peptídeo C de glicose/insulina, uso de medicação da diabetes, sensibilidade à insulina, níveis de citocina sérica, níveis de CRP, medições da qualidade de vida, melhora de BMI) como um meio para determinar quando administrar uma ou mais doses subsequentes. Similarmente, este método pode ser usado como um meio para determinar se uma dose subsequente deve ser aumentada ou diminuída, com base no efeito de uma dose anterior.

O diagnóstico de tais doenças ou condições em pacientes ou alternativamente o risco para desenvolver tais doenças ou condições pode ser de acordo com as práticas médicas padrão conhecidas na técnica. A seguir da administração de um anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento, avaliações clínicas para um tratamento ou efeito preventivo sobre as doenças e condições anteriormente mencionadas são bem conhecidas na técnica e podem ser usadas como um meio para monitorar a eficácia dos métodos da invenção.

Por exemplo, a resposta ao tratamento da diabetes Tipo 2 pode ser avaliada com base em um ponto final de eficácia primário de melhora na A1c da hemoglobina HbA1c, ver por exemplo Reynolds *et al.*, BMJ, 333(7568): 586-589, 2006). As melhoras na HbA1c que são indicativas da eficácia terapêutica podem variar dependendo das medições de referência iniciais em um paciente, com uma diminuição maior frequentemente correspondente a uma referência inicial mais alta e uma diminuição menor frequentemente correspondente a uma referência inicial mais baixa. Em um aspecto da invenção, o método deve resultar em uma diminuição de HbA1c de pelo menos cerca de 0,5% (por exemplo, de pelo menos cerca de 0,5%,

pelo menos cerca de 1%, pelo menos cerca de 1,5%, pelo menos cerca de 2%, pelo menos cerca de 2,5%, pelo menos cerca de 3%, pelo menos cerca de 3,5%, pelo menos cerca de 4% ou mais) comparado com os níveis de pré-dose.

5 Um ou mais dos seguintes pontos finais secundários também podem ser determinados de modo a avaliar a eficácia do tratamento, tais como por exemplo os níveis de açúcar do sangue no jejum (por exemplo, glicose) (por exemplo, diminuição para < 130, < 125, < 120, < 115, < 110, < 105, < 100; alternativamente diminuição de > 20%, > 30%, > 40%, > 50%, > 60%, > 70%, > 80%, > 90%, > 95% comparado com os níveis de pré-dose), teste de tolerância à glicose oral em 120 minutos (OGTT) (por exemplo, < 200, < 190, < 180, < 170, < 160, < 150, < 140), AUC de peptídeo C de glicose/insulina (por exemplo, > 25%, > 50%, > 60%, > 70%, > 80%, > 90%, > 100% de aumento do pré-tratamento), redução na medicação da diabetes (por exemplo, 15 insulina, agente hipoglicêmico oral), melhora na sensibilidade à insulina, níveis de citocina sérica (por exemplo, normalização), níveis de CRP (por exemplo diminuição de > 0,2, > 0,4, > 0,6, > 0,8, > 1,0, > 1,4, > 1,8, > 2,2, > 2,6, > 3,0 mg/L; alternativamente uma diminuição de > 20%, > 30%, > 40%, > 50%, > 60%, > 70%, > 80%, > 90%, > 95% do pré-tratamento), medições 20 de qualidade de vida, melhora de BMI (redução de 1%, 3%, 5%), farmacocinéticas e outros (Saudek, *et al.*, JAMA, 295: 1688-97, 2006; Pfutzner *et al.*, Diabetes Technol Ther. 8: 28-36, 2006; Norberg, *et al.*, J Intern Med. 260: 263-71, 2006).

25 Similarmente, a avaliação de eficácia para outras doenças ou condições pode usar um ou mais dos pontos finais anteriormente mencionados e/ou outros conhecidos na técnica. Por exemplo, o efeito sobre a hiperglicemia pode ser avaliado medindo-se os níveis de açúcar do sangue no jejum (isto é, glicose), o efeito sobre a hiperinsulinemia pode ser avaliado medindo-se os níveis de insulina e/ou níveis de peptídeo C, o efeito sobre a

obesidade pode ser avaliado medindo-se o peso e/ou EMI e o efeito sobre a resistência à insulina pode ser avaliado pelo OGTT.

Alternativamente ou além disso, os pacientes tratados de acordo com a invenção podem experienciar uma diminuição no nível de triglicerídeo no sangue do paciente de pelo menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% ou mais do nível no pré-tratamento. Alternativamente ou além disso, pacientes tratados de acordo com a invenção podem experienciar uma diminuição no nível de ácidos graxos livres de pelo menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60% ou mais do nível no pré-tratamento.

EXEMPLOS

Os seguintes exemplos são intencionados meramente para ilustrar ainda mais a prática da presente invenção, mas não deve ser de nenhum modo interpretado como limitante do seu escopo. As divulgações de todas as patentes e literaturas científicas citadas dentro são por meio deste expressamente incorporada em sua totalidade por referência.

Exemplo 1

Inibição de IL-1 β usando um anticorpo IL-1 β de alta afinidade em um ensaio com base em célula in vitro, com a produção induzida por IL-1 de IL-8 como uma leitura

O efeito inibidor do anticorpo específico de IL-1 β foi comparado com um inibidor não de anticorpo do caminho de IL-1, Kineret[®] (anakinra), que é um antagonista do receptor de IL-1 recombinante. Sangue periférico fresco, heparinizado foi coletado de doadores saudáveis. 180 μ l de sangue integral foram plaqueados em uma placa de 96 reservatórios e incubados com várias concentrações do anticorpo AB7 (Pedido US número 11/472813, WO 2007/002261) e 100 pM de rhIL-1 β . Para as amostras tratadas com Kineret[®], Kineret[®] e rhIL-1 β foram combinados 1:1 antes de misturar com o sangue. As amostras foram incubadas por 6 horas a 37°C com

5% de CO₂. As células de sangue integral foram depois lisadas com 50 µl de Triton X-100 a 12,5%. A concentração de interleucina-8 (IL-8) em lisados depurados foi ensaiada pelo ELISA (Quantikine human IL-8 ELISA kit, R&D Systems) de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações de IL-8 nas amostras tratadas com AB7 e Kineret[®] foram comparadas com uma amostra de controle tratada com controle anti-KLH. Os resultados são representados na Fig. 1 e resumidos na Tabela 6. A IC₅₀ é a concentração de anticorpo requerida para inibir 50% de IL-8 liberada pelo estímulo de IL-1β.

Tabela 1

	IC ₅₀ (pM)
AB7	1,9 pM
Kineret [®]	53,4 pM

Estes resultados demonstram a potência *in vitro* de AB7, como medida pela inibição da liberação estimulada pela IL-1β de IL-8. Estes resultados que mostram maior potência comparados com Kineret[®] indicam que o anticorpo terá eficácia inibidora de IL-1β *in vivo*.

Exemplo 2

Inibição *in vivo* da atividade biológica de IL-1β humana usando anticorpos específicos de IL-1β, como medida pelo impacto na liberação estimulada por IL-1β de IL-6

Para confirmar a eficácia *in vivo* de AB7, a sua capacidade para bloquear a atividade biológica de IL-1β humana foi testada em camundongos. Detalhes do ensaio são descritos em Economides *et al.*, Nature Med., 9: 47-52 (2003). Em resumo, camundongos C57/B16 machos (Jackson Laboratory Bar Harbor, Maine) foram injetados intraperitonealmente com doses tituladas de AB7, um outro anticorpo IL-1β, AB5 ou um anticorpo de controle. Vinte e quatro horas depois da injeção de anticorpo, os camundongos foram injetados subcutaneamente com IL-1β humana recombinante (rhIL-1β) (da PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ) em uma dose de 1 µg/kg. Duas horas após a injeção de rhIL-1β (tempo de resposta de IL-6 de

pico), os camundongos foram sacrificados e o sangue foi coletado e processado para soro. Os níveis de IL-6 séricos foram ensaiados pelo ELISA (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ) de acordo com o protocolo do fabricante. A inibição percentual foi calculada a partir da razão de IL-6 detectada no soro do animal experimental para a IL-6 detectada no soro do animal de controle (multiplicado por 100).

Os resultados são apresentados na Figura 2. A capacidade para inibir a atividade *in vivo* de IL-1 β foi avaliada como uma função dos níveis de IL-6 estimulados por IL-1 β no soro. Como ilustrado pela Figura 2, os anticorpos AB7 e AB5 foram eficazes para inibir a atividade *in vivo* de IL-1 β humana. Estes resultados também mostram que uma única injeção de AB7 ou AB5 pode bloquear a ação sistêmica para a estimulação de IL-1 β e que tais anticorpos são úteis para a inibição da atividade de IL-1 β *in vivo*.

Um experimento similar foi realizado para demonstrar ainda mais a capacidade de AB7 para neutralizar a IL-1 β de camundongo *in vivo*, para sustentar o uso deste anticorpo em modelos de camundongo da doença. Foi determinado que AB7 tem uma afinidade para a IL-1 β humana que é ~10.000 vezes maior do que a afinidade para a IL-1 β de camundongo e uma potência *in vitro* no ensaio D10.G4.1 que é ~1.000 vezes maior do que aquela para a IL-1 β de camundongo. No modelo de camundongo C57BL16 com leitura de IL-6, os camundongos foram injetados com AB7 (3 ou 300 μ g) ou controle de veículo de PBS i.p. 24 horas antes de uma injeção s.c. de IL-1 β humana (Figure 2B, painel A) ou camundongo (Figure 2B, painel B) (20 ng). O sangue foi drenado 2 horas mais tarde e as amostras séricas foram analisadas quanto aos níveis de IL-6 por intermédio de ELISA. Estes dados mostram a supressão máxima de níveis de IL-6 (~ 75%) induzida pela IL-1 β humana a 3 μ g (painel A), ao passo que a supressão submáxima de níveis de IL-6 (~50%) induzida pela IL-1 β de camundongo foi demonstrada com 300 μ g (painel B). Estes resultados são compatíveis com a observação da

afinidade muito maior e potência *in vitro* do anticorpo AB7 para a IL-1 β humana, quando comparada à IL-1 β de camundongo. Além disso, os dados indicam que este anticorpo pode ser usado para modelos de doença *in vivo* de camundongo com uma dose mais alta apropriada do que seria necessária para o tratamento de pacientes humanos, onde o anticorpo tem afinidade e potência muito superior. No caso de outros anticorpos de IL-1 β , tais como por exemplo os anticorpos aqui divulgados e/ou citados, que não exibem uma tal propriedade de afinidade significativamente mais alta e potência *in vitro* para IL-1 β humana quando comparada com a IL-1 β de camundongo, doses mais altas similares em modelos de camundongo podem não ser necessárias.

Exemplo 3

Farmacocinéticas de um anticorpo anti-IL-1 β após a administração de uma única dose intravenosa ou subcutânea aos ratos

Para examinar o perfil farmacocinético, um anticorpo IL-1 β designado AB7 foi administrado aos ratos machos adultos como um bolo intravenoso (IV) na veia da cauda em doses de 0,1, 1,0 ou 10 mg/kg (Grupos 1, 2 e 3 respectivamente) ou uma dose subcutânea (SC) entre as omoplatas a 1,0 mg/kg (Grupo 4). As amostras de sangue foram coletadas por intermédio de cânula na veia jugular ou no sino retro-orbital nas vezes especificadas por até 91 dias depois da dosagem. As amostras de sangue foram centrifugadas para se obter soro. As amostras foram analisadas quanto a concentração de anticorpo anti-IL-1 β usando um ensaio de ELISA com base na fosfatase alcalina como segue.

IL-1 β (Preprotech) foi diluída a 0,5 μ g/ml em PBS e 50 μ l desta solução foram adicionados aos reservatórios de placas microtituladoras Nunc-Immuno Maxisorp (VWR) e incubados durante a noite de 2 a 8°C. A solução de antígeno foi removida e 200 μ l de tampão de bloqueio [1% de albumina sérica bovina (BSA) em 1X PBS contendo 0,05% de Tween 20] foram adicionados a todos os reservatórios e incubados por 1 hora na

temperatura ambiente. Depois de bloquear, os reservatórios foram lavados três vezes com tampão de lavagem (1X PBS, contendo 0,05% de Tween 20). Os padrões, amostras e controles foram diluídos em diluente de amostra (25% de Soro de Rato em 1X PBS contendo 1% de BSA e 0,05% de Tween 20).

5 Soluções padrão de anticorpo anti-IL-1 β foram preparadas como diluições em série de duas vezes de 2000 a 0,24 ng/ml. Cada réplica e diluição dos padrões, amostras e controles (50 μ l) foram transferidas para as placas microtituladoras bloqueadas e incubadas por 1 hora a 37°C. Depois da incubação, os reservatórios foram lavados 3 vezes com tampão de lavagem. Anticorpo IgG

10 (H+L) anti-humano de cabra conjugados com fosfatase alcalina (Southern Biotech Associates Inc, Birmingham, AL) foi diluído 1/1000 em diluente conjugado (1% de BSA em 1X PBS contendo 0,05% de Tween 20). Cinquenta μ l do conjugado diluído foi adicionado a todos os reservatórios exceto para os reservatórios BRANCOS, que receberam apenas 50 μ l de

15 diluente conjugado. As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C e depois todos os reservatórios foram lavados 3 vezes com tampão de lavagem e 3 vezes com água deionizada. O substrato de p-nitrofenilfosfato (1 mg/ml em 10% de tampão de dietanolamina, pH 9,8) foi adicionado a todos os reservatórios e o desenvolvimento de cor foi deixado processar por 1 hora na

20 temperatura ambiente, depois que 50 μ l de NaOH 1 N foi adicionado para interromper a reação. A absorbância a 405 nm foi determinada usando uma Leitora de Placa SPECTRAmax M2 (Molecular Devices, Menlo Park, CA) e uma curva padrão foi depois plotada como A₄₀₅ versus ng/mL de padrão de anticorpo. Uma análise de regressão foi realizada e as concentrações foram

25 determinadas para as amostras e controles pela interpolação a partir da curva padrão. O limite de quantificação foi 40 ng/ml.

Como mostrado na Figura 3, as concentrações séricas declinaram bi-exponencialmente entre os grupos de dose IV. Uma análise em compartimentos foi realizada nos dados de animal individual e os parâmetros

farmacocinéticos resultantes foram calculados em média para cada grupo de dose excluindo aqueles animais em que uma resposta de RAHA foi gerada. Os níveis séricos de anticorpo anti-IL-1 β declinaram com uma meia vida de fase alfa média de $0,189 \pm 0,094$ a $0,429 \pm 0,043$ dias (4,54 a 10,3 horas) e
5 uma meia vida de fase beta de $9,68 \pm 0,70$ a $14,5 \pm 1,7$ dias. Entre os ratos que recebem uma dose subcutânea de 1 mg/kg de os níveis séricos aumentaram a um pico de $4,26 \pm 0,065$ $\mu\text{g/ml}$ em 2 a 3 dias e declinaram com uma meia vida de $2,59 \pm 0,25$.

Exemplo 4

10 Farmacocinéticas de um anticorpo anti-IL-1 β a seguir da administração de uma única dose intravenosa a macacos cinomolgos

Macacos cinomolgos machos e fêmeas adultos receberam o anticorpo anti-IL-1 β designados AB7 como uma única injeção de bolo intravenosa (IV) nas doses de 0,3, 3,0 ou 30 mg/kg. As amostras de sangue
15 foram coletadas de animais antes da dose, 5 minutos, 4 e 8 horas após a dose no Dia 1 e Dias 2, 4, 8, 11, 15, 22, 29, 43 e 56. As amostras foram analisadas quanto a concentração de anticorpo anti-IL-1 β usando um ensaio de ELISA com base na fosfatase alcalina como segue.

A solução de IL-1 β foi diluída a 0,5 $\mu\text{g/ml}$ em PBS e 50 μl
20 desta solução foram adicionados aos reservatórios de placas microtituladoras Nunc-Immuno Maxisorp (VWR) e incubadas durante a noite de 2 a 8°C. A solução de antígeno foi removida e 200 μl de tampão de bloqueio [1% de albumina sérica bovina (BSA) em 1X PBS contendo 0,05% de Tween 20] foram adicionados a todos reservatórios e depois incubados por 1 a 4 horas na
25 temperatura ambiente. Depois do bloqueio, os reservatórios de cada placa foram lavados três vezes com tampão de lavagem (1X PBS, contendo 0,05% de Tween 20). Os padrões, amostras e controles foram diluídos em diluente de amostra (2% de Soro de Cinomolgo Normal (NCS) em 1X PBS contendo 1% de BSA e 0,05% de Tween 20). As soluções padrão anti-IL-1 β foram

preparadas como diluições de duas vezes em série de 8000 ng/ml. Cada réplica e a diluição dos padrões, amostras e controles (50 µl) foram transferidos para as placas de microtitulação bloqueadas e incubadas por 1 hora a 37°C. Depois da incubação primária, os reservatórios foram lavados 3
5 vezes com tampão de lavagem e 50 µl de rhIL-1beta biotinilada foi adicionado a todos os reservatórios. As placas foram depois incubadas por 1 hora a 37°C. Os reservatórios foram lavados 3 vezes com tampão de lavagem e uma incubação terciária com cinquenta µl de estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina diluída foram adicionados a todos os reservatórios exceto
10 para os reservatórios BRANCOS, que receberam apenas 50 µl de diluente. As placas foram incubadas por 30 minutos a 37°C e depois todos os reservatórios foram lavados 3 vezes com tampão de lavagem e 3 vezes com água deionizada. O substrato de p-nitrofenilfosfato (1 mg/ml em 10% de tampão de dietanolamina, pH 9,8) foi adicionado a todos os reservatórios. O
15 desenvolvimento de cor foi deixado processar no escuro por 1 hora na temperatura ambiente, depois que 50 µl de NaOH 1 N foram adicionados para interromper a reação. A absorbância a 405 nm foi determinada para todos os reservatórios usando uma Leitora de Placa SPECTRAmax M2 (Molecular Devices, Menlo Park, CA). Uma curva padrão foi depois plotada como A_{405}
20 versus ng/ml de padrão anti-IL-1 β . Uma análise de regressão de 4 parâmetros foi realizada e as concentrações foram determinadas para as amostras e controles pela interpolação a partir da curva padrão. O limite de quantificação foi de 40 ng/ml.

Para os grupos de dose única de 0,3 e 3 mg/kg, os níveis de
25 anticorpo anti-IL-1 β séricos declinaram com uma meia vida da fase alfa média de $9,40 \pm 2,00$ horas, seguido por uma meia vida de fase beta de $13,3 \pm 1,0$ dias (Figura 5). Em macacos cinomolgos que receberam uma única injeção IV de 30 mg/kg, os níveis séricos de anticorpo declinaram mais rapidamente, com a meia vida de fase alfa de $10,9 \pm 3,2$ horas, seguido por

uma meia vida de fase beta de $7,54 \pm 1,79$ dias. A modelagem dos perfis de concentração plasmática-tempo das doses de 0,1, 0,3, 1 e 10 mg/kg administrado em cinco intervalos mensais também foi realizada e é mostrada na Figura 5.

5 Exemplo 5

Efeito de anticorpos anti-IL-1 β em um sistema de ensaio de célula da ilhota humana

Como um modelo *in vitro*, as células da ilhota humana são isoladas e depois tratadas com níveis de glicose altos para imitar o ambiente diabético Tipo 2. Os anticorpos anti-IL-1 β podem ser usados no sistema de célula da ilhota para examinar o efeito sobre a função de célula beta (liberação de insulina em resposta à glicose), proliferação de célula beta e apoptose.

As ilhotas são isoladas das pancreases de doadores de órgão humano múltiplo sem nenhuma história de diabetes ou doença metabólica como descritas (Linetsky *et al.*, Diabetes 46: 1120-1123, 1997; Oberholzer *et al.*, Transplantation 69: 1115-1123, 2000; Ricordi *et al.*, Diabetes 37: 413-420, 1988, Maedler *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 8138-8143, 2004; WO 2004/0002512). As ilhotas são depois cultivadas em placas revestidas com a matriz extracelular derivadas de células endoteliais corneais bovinas (Novamed Ltd, Jerusalém), permitindo que as células se ligassem às placas e preservando a sua integridade funcional. As ilhotas são cultivadas em meio CMRL 1066 contendo 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (GIBCO, Gaithersburg, MD). Para estimular a secreção de insulina, o meio de cultura é substituído com meio de cultura suplementado ainda com 5 μ l ou 33 mM de glicose, com ou sem a adição de ácido graxo.

Para medir a liberação de insulina em resposta à glicose, células da ilhota são lavadas e pré-incubadas por 30 minutos em tampão de

bicarbonato de Krebs-Ringer (KRB) contendo 3,3 mM de glicose e 0,5% de BSA. KRB é depois substituído por KRB 3,3 mM de glicose por 1 hora, que é depois seguido por mais 1 hora em KRB 16,7 mM de glicose. As células da ilhota são extraídas com HCl 0,18 M em 70% de etanol para a determinação do teor de insulina usando um kit RIA de insulina humana (CIS Biointernational, Gif-sur-Yvette, França). A apoptose de célula beta pode ser medida por uma variedade de métodos. Por exemplo, as células são duplamente tingidas pelas técnicas de rotulação de extremidade cortada dUTP mediada pela desoxinucleotidil transferase de terminal padrão (TUNEL) e também para insulina. Em paralelo, a apoptose também é confirmada pela detecção da ativação de caspase 3 ou expressão de Fas como descrito (ver por exemplo, WO 2004/002512; Maedler *et al.*, 2004, *ibid.*)

Exemplo 6

Efeito de anticorpos anti-IL-1 β em um sistema de ensaio de célula de pseudo ilhota de rato

Alternativamente ou além do modelo de célula da ilhota humana, as células de pseudo ilhota de rato podem ser usadas como um modelo *in vitro* para avaliar os efeitos de anticorpos anti-IL-1 β . Por exemplo, as pseudo ilhotas podem ser preparadas e testadas como descrito na US 20060094714. Os pâncreas de quatro ratos Sprague Dawley são divididos em pedaços pequenos, enxaguados três vezes com tampão de Hanks-Hepes e digeridos com collagenase (Liberase, 0,25 mg/ml, Roche Diagnostic Corp., Indianápolis, Ind., USA) a 37°C em um agitador com banho de água por 10 minutos. O tecido dos pâncreas digeridos é depois enxaguado três vezes com 50 ml de tampão de Hanks-Hepes para remover a collagenase e a pelota de tecido é depois filtrada através de um filtro de 250 microns. O filtrado é misturado com 16 ml de Ficoll a 27% (Sigma, St. Louis, Mo., USA) p/v em tampão de Hanks-Hepes e depois centrifugado em um gradiente de Ficoll (23%, 20,5% e 11%, respectivamente; 8 ml de cada concentração) a 1.600

rpm por 10 minutos na temperatura ambiente. As ilhotas pancreáticas são concentradas na interfase entre 11% e 20,5% e entre 20,5% e 23% dependendo do tamanho das ilhotas. As ilhotas são coletadas das duas interfases, enxaguadas duas vezes com tampão de Hanks-Hepes isento de cálcio e depois colocadas em suspensão em 5 ml de tampão de Hanks-Hepes isento de anticorpo contendo 1 mM de EDTA e incubadas por 8 minutos na temperatura ambiente. Tripsina e DNase I são adicionados à suspensão de ilhota para uma concentração final de 25 µg/ml e 2 µg/ml, respectivamente e a suspensão é incubada com agitação a 30°C por 10 minutos. A digestão com tripsina é interrompida pela adição de 40 ml de RPMI 1640 (GIBCO Life Technologies, Invitrogen, Carlsbad, Calif.) com 10% de FBS. As células de ilhota digeridas com tripsina são depois filtradas através de um filtro de náilon de 63 microns (PGC Scientific, Frederick, Md.) para remover grupos de célula grande. As células de ilhota dispersas são depois lavadas, contadas e semeadas em placas de 96 reservatórios de “fundo em V” (2.500 células por reservatório). A suspensão de célula de ilhota dispersa é depois centrifugada a 1.000 rpm por 5 minutos. O tampão de Hanks-Hepes é removido e substituído com 200 µl de meio RPMI 1640 contendo 10% de FBS, 1% de Penicilina-Estreptomicina e 2 mM de L-glutamina. Em seguida, as placas de 96 reservatórios são centrifugadas a 1.000 rpm por 5 minutos para coletar as células de ilhota dispersas concentradas no fundo em V da placa formando pseudo ilhotas. Estas pseudo ilhotas são depois cultivadas durante a noite em um incubador de cultura de célula a 37°C com 5% de CO₂ e depois usadas para os ensaios.

25 Exemplo 7

Efeito de um anticorpo de IL-1β sobre a sensibilidade à insulina em um modelo de animal

A eficácia *in vivo* de um anticorpo IL-1β como um agente sensibilizador para a insulina pode ser medida como a atividade do anticorpo

que diminui a insulina e glicose em um modelo dietético de resistência à insulina. Ratos Sprague-Dawley machos são colocados em uma dieta de gordura alta, carboidrato alto, contendo 60% de frutose, 10% de banha de porco e 0,06% de magnésio em 6 semanas de idade. Dois dias depois de
5 começar a dieta, os ratos são randomizados em grupos diferentes com base nos níveis de dose de anticorpo (variando de 0,1 a 5 mg/kg de peso corporal), via de administração (vias subcutânea, intravenosa ou intraperitoneal) e frequência de administração (diária a bi-semanalmente). Os grupos de controle recebem apenas tampão (veículo) ou um anticorpo irrelevante. As
10 ingestões de alimento e fluido são medidos a cada dia e um protocolo de alimentação aos pares é utilizado para garantir a ingestão de alimento entre os 3 grupos. Depois de 5 semanas, os níveis séricos de glicose, insulina e triglicerídeos são obtidos no estado de semi-jejum (na noite anterior à drenagem do sangue, os animais são administrados com uma quantidade
15 restrita de alimento) e o sangue é drenado na manhã seguinte. O protocolo é continuado por um adicional de 9 semanas tempo no qual o teste de tolerância à glicose (OGTT) é realizado em animais conscientes no estado de semi-jejum pela amostragem do sangue quanto as medições de glicose e insulina depois da administração oral de uma carga de glicose (100 mg/100 gramas de
20 peso corporal). Os níveis séricos de glicose e triglicerídeos são medidos pelos métodos espectrofotométricos e os níveis de insulina são medidos pelo radioimunoensaio (Linco, St. Louis, MO).

Exemplo 8

Anticorpos IL-1 β para tratamento em um modelo animal de *Psammomys*
25 *obesus* DE T2D

A eficácia terapêutica de um anticorpo IL-1 β para prevenir o declínio da massa de célula β observada em pacientes com diabetes Tipo 2 é avaliada no gerbo *Psammomys obesus*, que mostra resistência à insulina e desenvolve a diabetes ligada à obesidade induzida pela dieta, inicialmente

associada com a hiperinsulinemia e gradualmente progredindo para a hiperglicemia grave, acompanhada por um aumento transitório na atividade proliferativa de célula beta e por um aumento prolongado na taxa de morte de célula beta, com o rompimento da arquitetura da ilhota (Donath *et al.*,
 5 Diabetes 48: 738-744, 1999). Para determinar o efeito do anticorpo IL-1 β na apoptose de célula beta induzida pela hiperglicemia e proliferação prejudicada nas ilhotas pancreáticas de *Psammomys obesus* durante o desenvolvimento da diabete, o anticorpo é administrado aos animais propensos à diabete (mudados para uma dieta de alta energia) em níveis de dose múltiplos variando de 0,1 a
 10 5 mg/kg de peso corporal pelas vias subcutâneas, intravenosas ou intraperitoneais, com as administrações de anticorpo repetidas em intervalos variando de diária a semanalmente. Os grupos de controle de animais são mantidos em uma dieta de baixa energia ou mudada para uma dieta de alta energia e tratados com tampão (veículo) apenas ou um anticorpo irrelevante.
 15 Subgrupos de animais são sacrificados nos dias 4, 7, 14, 21 e 28, depois do que o sangue é coletado e usado para determinar a glicose plasmática, insulina e triglicerídeos. O pâncreas também é removido, com uma porção congelada a -70 C para determinação posterior do teor de insulina e a porção remanescente fixada em 10% de formalina tamponada com fosfato, embutido em parafina e
 20 seccionado para análise de Fas, IL-1 β e expressão de insulina e proliferação e apoptose de célula beta. Tais análises permitirão a determinação da prevenção ou retardo no início da diabete, proteção da apoptose de célula beta induzida por hiperglicemia, proliferação prejudicada e massa diminuída de célula β e normalização do teor de insulina pancreática.

25 **Exemplo 9**

Uso de um anticorpo IL-1 β no tratamento de T2D em seres humanos

Os anticorpos de IL-1 β ou fragmentos aqui descritos podem ser administrados a um paciente humano de acordo com a invenção para o tratamento terapêutico e/ou prevenção da diabete Tipo 2. Especificamente, em

um exemplo, um anticorpo IL- β tendo as propriedades anteriormente mencionadas (AB7, descritas acima) é usado para o tratamento terapêutico de pacientes que demonstram sinais e sintomas da diabetes Tipo 2. Mais especificamente, a segurança e eficácia de um anticorpo IL-1 β para a diabetes Tipo 2 são demonstradas em um ou mais estudos clínicos humanos, incluindo por exemplo um teste do seguinte planejamento.

Um estudo clínico humano controlado duplo cego de placebo é realizado em pacientes com diabetes Tipo 2. Os pacientes que atingem os critérios de inclusão para este estudo de acordo com os critérios de diagnóstico da American Diabetes Association (ADA) para T2D:

- Concentração de glicose do sangue no jejum ≥ 126 mg/dL ($\geq 7,0$ mmol/L) (deve ser medido dentro de 28 dias antes do Dia 0)

OU

- Sintomas de hiperglicemia (por exemplo, sede, poliúria, perda de peso, embaçamento visual) e um valor de glicose plasmática casual/randômica de ≥ 200 mg/dL ($\geq 11,1$ mmol/L) (deve ser medida dentro de 28 dias antes do Dia 0),

e com um HbA1c $> 7,5\%$ e $\leq 12\%$ (DCCT padrão), são alistados no estudo sequencialmente por grupo de estudo e dentro de cada grupo são randomicamente designados para receber o anticorpo IL-1B ou placebo. Para minimizar o risco para os pacientes, a segurança e tolerabilidade são revisadas em cada nível de dose antes de escalar para o nível de dose seguinte. Os grupos de tratamento e os números de pacientes para o estudo são mostrados na tabela seguinte:

Grupo	Via	Anticorpo		Placebo
		# Pacientes	Dose	# Pacientes
1	IV ou SC	5	0,01 mg/kg	1
2	IV ou SC	5	0,03 mg/kg	1
3	IV ou SC	5	0,1 mg/kg	1
	IV ou SC	5	0,3 mg/kg	1
s	IV ou SC	5	1,0 mg/kg	1
6	IV ou SC	5	3,0 mg/kg	1

No Dia 1 do estudo, o anticorpo ou placebo é administrado

subcutaneamente ou por intermédio de uma infusão intravenosa em taxa constante de 30 minutos. As avaliações de segurança, incluindo o registro de eventos adversos, exames físicos, sinais vitais, testes de laboratório clínico (por exemplo, química do sangue, hematologia, urinálise), níveis de citocina plasmática e eletrocardiogramas (ECGs) são conduzidos usando as práticas médicas padrão conhecidas na técnica. As amostras de sangue são coletadas na administração de pré-dose e nos períodos de tempo múltiplos (por exemplo, dias) após a administração para avaliar HbA1c, perfil de lipídeo incluindo ácidos graxos livres, colesterol HDL e LDL, níveis de anticorpo de IL-1 β (farmacocinéticas), respostas de anticorpo anti-IL-1 β , níveis de citocina (por exemplo, IL-1 β , IL-6, TNF α), CRP, sódio, potássio, creatinina, AST, ALT e hematograma. Os ensaios também podem ser realizados para outras citocinas e linfocinas, tais como por exemplo, aquelas aqui descritas. As amostras de sangue adicionais podem ser coletadas em dias posteriores do que inicialmente planejados naqueles casos quando níveis do anticorpo de IL-1 β administrado não caíram abaixo do limite de detecção. As avaliações de estudo são conduzidas em vezes de pós-tratamento especificadas.

O monitoramento clínico do tratamento para a diabetes Tipo 2 é realizada com base em um ponto final de eficácia primária de melhora na A1c da hemoglobina (HbA1c, ver por exemplo Reynolds *et al.*, BUT, 333(7568): 586-589, 2006), A melhora no nível de HbA1c é indicativo de eficácia terapêutica do tratamento anti-IL-1 β e no geral devem resultar em uma diminuição de pelo menos cerca de 0,5% ou mais. Um ou mais dos seguintes pontos finais secundários são também determinados para avaliar a eficácia do tratamento para a diabetes Tipo 2, tal como por exemplo os níveis de açúcar do sangue no jejum (por exemplo, glicose) (por exemplo, ≤ 130 , ≤ 120), teste de tolerância à glicose oral em 120 minutos (OGTT), AUC de peptídeo C glicose/insulina (por exemplo, $> 50\%$, $> 60\%$ de aumento), redução na medicação da diabetes (por exemplo, insulina, agente hipoglicêmico oral),

melhora na sensibilidade à insulina, níveis de citocina sérica (por exemplo, normalização), níveis de CRP, medições da qualidade de vida, melhora de BMI (1%, 3%, 5% de redução), farmacocinéticas e outros (Saudek, *et al.*, JAMA, 295: 1688-97, 2006; Pfutzner *et al.*, Diabetes Technol Ther. 8: 28-36, 2006; Norberg, *et al.*, J Intern Med. 260: 263-71, 2006). As análises do perfil de lipídeo adicionais de amostras inclui os seguintes testes realizados de acordo com os métodos padrão aceitos conhecidos na técnica.

Teste	Método
Eletroforese de Lipoproteína	Eletroforese em gel
Apolipoproteína sérica A-I (apoA-I)	Nefelometria
Apolipoproteína A-II (apo A-II)	Nefelometria
Apolipoproteína sérica B-48 (apo B-48)	ELISA
Apolipoproteína sérica B-100 (apo B-100)	Nefelometria
Apolipoproteína sérica Cs (apo Cs)	Imunoturbidimetria para Apo CII e ApoCIII
Apolipoproteína sérica E (apo E)	Nefelometria
Apolipoproteína sérica J (apo J)	ELISA
Amiloide sérico A	Nefelometria
Ácido graxos livres plasmáticos (FFA)	Colorimetria
Glicerol plasmático	Colorimetria
LCAT sérico	ELISA
Proteína de transferência de éster colesterílico sérico (CETP)	ELISA
Lipase hepática sérica (HL)	Fluorometria
Paraoxonase sérica I (PON1)	UV/colorimetria

Análise Farmacocinética

Amostras são obtidas para a análise farmacocinética nos dias 0, 1, 2, 3, 4, 7, 9 $\pm$ 1, 11 $\pm$ 1, 14 $\pm$ 1, 21 $\pm$ 2, 28 $\pm$ 2, 42 $\pm$ 3 e 56 $\pm$ 3. A análise preliminar das farmacocinéticas de AB7 em pacientes com diabetes Tipo 2 que recebem uma única dose IV de 0,01 mg/kg mostrou perfis de concentração sérica - tempo com uma meia vida terminal de 22 dias, depuração de 2,9 ml/dia/kg e volume de distribuição do compartimento central de 50 ml/kg, muito similar ao volume sérico (Figura 7).

Glicose do Sangue e Análise de HbA1c

As amostras são obtidas e a glicose do sangue medida nos dias 0, 7, 14 $\pm$ 1, 21 $\pm$ 2, 28 $\pm$ 2, 42 $\pm$ 3 e 56 $\pm$ 3, assim como no dia da triagem. A avaliação destas amostras quanto a uma diminuição nos níveis de glicose do sangue é mostrada abaixo para as amostras dos dois primeiros grupos de dose

(linha de dados superior para cada paciente). As amostras são obtidas e HbA1c medido nos dias 0, 28 ± 2 , 42 ± 3 e 56 ± 3 , assim como no dia da triagem. A avaliação destas amostras para uma diminuição nos níveis de HbA1c é mostrado abaixo para as amostras dos dois primeiros grupos de dose

5 (linha de dados inferior para cada paciente).

Grupo na dose de 0,01 mg/kg

Paciente	Triagem	Dia 0 Labs	Dia 7 Labs	Dia 14 Labs	Dia 21 Labs	Dia 28 Labs	Dia 42 Labs	Dia 56 Labs
5	200,00	247,00	212,00	179,00	213,00	242,00	235,00	200,00
	8,40	8,60				8,50	7,10	9,30
1	211,00	232,00	235,00	236,00	199,00	221,00	252,00	204,00
	9,30	9,60				9,50	9,10	9,80
2	229,00	131,00	160,00	191,00	193,00	224,00	204,00	207,00
	9,00	8,80				8,40	8,60	9,00
11	290,00	283,00	300,00	177,00	308,00	278,00	292,00	302,00
	11,80	11,60				11,40	11,20	11,80
3	175,00	158,00	175,00	154,00	154,00	162,00	183,00	170,00
	8,20	8,20				7,70	7,80	8,10
4	238,00	255,00	270,00	275,00	289,00	278,00	255,00	245,00
	8,50	9,40				10,50	10,60	10,40

Grupo na dose de 0,03 mg/kg

Paciente	Triagem	Dia 10 Labs	Dia 7 Labs	Dia 14 Labs	Dia 21 Labs	Dia 28 Labs	Dia 42 Labs	Dia 56 Labs
6	222,00	164,00	148,00	166,00	162,00	145,00	207,00	
	8,40	8,40				8,20	8,40	
7	208,00	109,00	101,00	120,00	81,00	108,00	113,00	
	8,00	7,50				6,70	6,40	
8	364,00	287,00	289,00	260,00	237,00			
	12,40	12,00						
9	204,00	128,00	124,00	117,00	112,00	113,00		
	7,90	7,50				7,10		
12	275,00	235,00	250,00	126,00	168,00			
	9,90	10,30						
10	332,00	398,00	243,00	187,00	220,00			
	11,50	11,50						

Estes dados indicam os limites inferiores de uma dose de anticorpo IL-1 β como aqui fornecido, úteis para se obter um efeito terapêutico (por exemplo, diminuição nos níveis de glicose e/ou HbA1c) em um paciente a seguir de uma administração única de anticorpo.

Análise de Proteína Reativa C

A proteína reativa C (CRP), que é liberada pelo fígado em resposta a vários deflagradores do estresse, incluindo IL-6, produzido em resposta à IL-1, também foi medida no soro nos mesmos pontos de tempo como as amostras PK. Um modelo PKIPD foi desenvolvido que incorporou um modelo de dois compartimentos para o nível de anticorpo sérico e uma resposta de anticorpo indireta dependente da concentração sobre a taxa de produção de CRP, com uma taxa linear de eliminação de CRP. Depois de uma única dose IV de 0,01 mg/kg de anticorpo em pacientes com diabetes Tipo 2, CRP declinou dentro de 7 a 10 dias para $66 \pm 22\%$ em relação aos 100% na pré-dose, com base nos ajustes de modelo (Figura 8). Depois de uma única dose IV de 0,03 mg/kg de anticorpo em pacientes com diabetes Tipo 2, CRP declinou dentro de 7 a 10 dias para $40 \pm 12\%$ em relação aos 100% da pré-dose (Figura 9). Os dados para os controles de placebo são mostrados na Figura 10. Com base nestes dados e nas projeções de modelo, os níveis de CRP mantidos previsto a seguir de injeções mensais de anticorpo são aproximados para serem de 40% a 0,03 mg/kg, 16,5% a 0,1 mg/kg, 6,2% a 0,3 mg/kg, 1,9% a 1 mg/kg e 0,66% a 3 mg/kg por mês (Figura 11). Estes dados indicam que um anticorpo IL-1 β como aqui fornecido pode ser administrado tão não frequentemente quanto um mês ou mais longo para se obter um efeito terapêutico (por exemplo, diminuição nos níveis de CRP) em um paciente a seguir de uma única administração de anticorpo.

Com base nos resultados obtidos a partir dos primeiros estudos clínicos, testes clínicos adicionais são realizados. Tais testes podem incluir uma ou mais das dosagens acima, assim como ou alternativamente uma ou mais outras dosagens de anticorpo IL-1 β , período de tratamento e/ou observação mais longos e números maiores de pacientes por grupo (pelo menos cerca de 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000), de acordo com a invenção. Além disso, estes e outros estudos também podem ser usados para

determinar o período de tempo requerido para atingir um benefício terapêutico desejado com base na mudança de um parâmetro específico (por exemplo, diminuição no açúcar do sangue, diminuição em HbA1c, diminuição em CRP), assim como a duração do benefício terapêutico desejado com base na mudança de um parâmetro específico (por exemplo, diminuição no açúcar do sangue, diminuição em HbA1c, diminuição em CRP), antes que dosagens adicionais sejam administradas.

Exemplo 10

Efeito do anticorpo de IL-1 β sobre a função de adipócito e resistência à insulina

Um ensaio in vitro usando adipócitos cultivados pode ser usado para demonstrar uma redução (por exemplo, bloqueio) da resistência à insulina induzida pelo IL-1 β pelo uso dos anticorpos anti-IL-1 β . A linhagem de célula pré-adipócito 3T3-L1 obtida da ATCC (# CL-173) é cultivada em 7% de CO₂ e 37°C em DMEM, 25 mM de glicose e 10% de soro de bezerro e induzida para diferenciar em adipócitos. Em resumo, 2 dias depois da confluência, o meio é trocado para DMEM, 25 mM de glicose e 10% de FCS suplementado com isobutilmetilxantina (0,25 mM), dexametasona (0,25 μ M), insulina (5 μ g/ml) e pioglitazona (10 μ M). O meio é removido depois de 2 dias e substituído com DMEM, 25 mM de glicose e 10% de FCS suplementado com insulina (5 μ g/ml) e pioglitazona (10 μ M) por 2 dias. Depois as células são alimentadas a cada 2 dias com DMEM, 25 mM de glicose e 10% de FCS. Os adipócitos 3T3-L1 são usados 8 a 15 dias depois do começo do protocolo de diferenciação.

Os pré adipócitos humanos (Biopredic International, Rennes, França) são cultivados em 5% de CO₂ e 37°C em DMEM F12 de Ham contendo 15 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina, 5% de FCS, 1% de solução antimicótica, ECGS/H-2, hEGF-5 e HC-500 do meio de crescimento de pré adipócito de pacote de suplemento (Promocell, Heidelberg, Alemanha).

A diferenciação em adipócitos é induzida depois da confluência pela troca do meio pelo DMEM F12 de Ham 15 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina e 3% de FCS suplementado com biotina (33 μ M), insulina (100 nM), pantotenato (17 μ M), isobutilmetilxantina (0,2 mM), dexametasona (1 μ M), e rosiglitazona (10 μ M). O meio é removido depois de 3 dias e substituído com F12 de Ham contendo 15 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina e 10% de FCS suplementado com biotina (33 μ M), insulina (100 nM), pantotenato (17 μ M) e dexametasona (1 μ M). Depois as células são alimentadas a cada 2 dias com o mesmo meio. Adipócitos humanos são usados 15 dias depois do começo do protocolo de diferenciação. Os pré adipócitos humanos também podem ser obtidos de fontes alternativas, tais como por exemplo linhagens de célula XA15A1 e XM18B1 (Lonza, Allendale, NJ).

O papel de IL-1 β na indução da resistência à insulina (diminuição da sensibilidade à insulina) em adipócitos cultivados é mostrado pela incubação de adipócitos com IL-1 β (por exemplo, 20 ng/ml, 48 horas) e depois incubando com diferentes concentrações de insulina (por exemplo, 0,5 nM, 100 nM; 20 min), seguido pela medição do transporte de glicose depois da adição de 2-[3 H]desoxiglicose. A resistência à insulina é determinada como uma redução na captação de glicose e o efeito de um anticorpo anti-IL-1 β na redução (por exemplo, bloqueio) da resistência à insulina é facilmente medida neste sistema de cultura de célula de adipócito.

O papel da IL-1 β na estimulação direta da produção de adipocinas e citocinas pelos adipócitos (por exemplo, leptina, resistina, visfatina, IL-6, MCP-1 (CCL2), RANTES, PM-1, Proteína estimuladora de acilação, SAA3, Pentraxina-3, fator de inibição de migração de macrófago, IL-1RA, IL-12, IL-8, IL-6, TNF- α) é determinada pelo cultivo de adipócitos na ausência ou presença de concentrações diferentes de IL-1 β por dimensões diferentes de tempo como descrito acima e medindo níveis de adipócitos e citocinas no meio condicionado de cultura, usualmente por intermédio de

ELISA ou outros métodos habitualmente usados. Além disso, os efeitos de tratar culturas de adipócitos estimulados por IL-1 β com um anticorpo anti-IL-1 β neutralizador na indução de adipocina e/ou secreção de citocina relacionada com a resistência à insulina são medidos. Similarmente, os efeitos de tratar com um anticorpo anti-IL-1 β na supressão da adipocina que sensibiliza insulina, adiponectina, são medidos. Para indicar se o tratamento com anticorpo anti-IL-1 β neutraliza os efeitos de IL-1 endogenamente produzido derivado de células imunes/inflamatórias (por exemplo, macrófagos) durante a inflamação de tecido adiposo, números diferentes de macrófagos humanos (derivados de monócito ou várias linhagens de célula monocítica) são cultivadas com as culturas de adipócito descritas acima na ausência ou presença de anticorpo anti-IL-1 β e a modulação de adipocinas e citocinas são medidas. Além disso, os efeitos moduladores sobre a secreção de adipocina e citocina depois do tratamento *in vivo* de um paciente com um anticorpo anti-IL-1 β são medidos na circulação (por exemplo, soro, plasma), como um meio para demonstrar eficácia.

Exemplo 11

Inibição da produção de citocina no sangue integral humano por um anticorpo IL-1 β

Medir as citocinas no sangue durante uma doença ou o tratamento de uma doença pode ser útil para determinar a severidade da doença ou resposta a uma terapia. Usualmente, os níveis de citocina são medidos no soro, mas este método não mede necessariamente as citocinas totais. Muitas citocinas podem estar dentro das células (intracelulares). Além disso, a capacidade de uma célula para produzir uma citocina pode ser informação mais útil do que o nível de citocina em circulação.

Um método de estimular sangue integral foi usado para determinar a produção de citocina e o efeito de tratar com um anticorpo anti-IL-1 β . O sangue foi drenado de pacientes nos tubos heparinizados estéreis e

depois 250 µl do sangue integral foi adicionado a cada criotubo estéril Corning de topo laranja de 4 ml ajustado como segue:

Séries de Controle

5 Todos os tubos foram pré-enchidos com 550 µl de RPMI. Ao tubo 1 (controle), 200 µl de RPMI foram adicionados e aos tubos 2 a 10, 100 µl de RPMI adicionais foram adicionados. A cada um dos tubos 2 a 10, 100 µl de diluições de um anticorpo anti-IL-1β (AB7) foi adicionado.

Série de Teste

10 Uma série similar de diluições de anticorpo foi ajustada como detalhado acima.

 Todos os tubos foram bem misturados usando um turbilhão de 10 segundos. Os tubos da série de controle A1 a 10 depois receberam 100 µl adicionais de RPMI, foram turbilhonados 10 segundos, a tampa de rosca firmemente fixada e os tubos colocados no incubador. Aos tubos da série de 15 Teste B1 a 10, 100 µl de *Staphilococcus epidermidis* mortos por calor (concentração final de 1:1000 de estoque resultando em uma razão de bactéria:célula sanguínea branca de 10:1) foram adicionados, os tubos foram depois turbilhonados por 10 segundos, tampados e colocados em incubador a 37°C. Depois de 24 horas de incubação, as culturas foram todas lisadas com 20 Triton X (0,5% final) para liberar os conteúdos celulares e os lisados foram congelados. Depois da lise das culturas de sangue integral, os tubos submetidos a ciclos de congelamento descongelamento e os níveis de citocina são medidos pelos ensaios de ELISA de citocina padrão para TNFα humano, IL-6, IFNγ, IL-8, IL-1α, IL-1Ra e IL-1β (R&D Systems, Minneapolis, MN).

25 As citocinas medidas nos tubos da série de controle, que contêm apenas meio de cultura estéril e anticorpo (onde indicado), reflete o nível espontâneo de estimulação. Em pacientes saudáveis, níveis muito baixos das várias citocinas são encontrados quando medidos depois de 24 horas de incubação. Em pacientes com doenças não tratadas, os níveis podem ser mais

altos. A série de Teste de tubos adicionalmente contiveram uma quantidade definida de *Staphylococcus epidermidis* mortos por calor, que estimula a produção de várias citocinas. Se o tratamento com o anticorpo anti-IL-1 β é eficaz, isto será refletido pela redução da produção de citocina.

- 5 Como mostrado na Figura 6, o anticorpo anti-IL-1 β de alta afinidade AB7 foi muito eficaz em inibir a produção de IL-1 β no sangue humano. Em uma média de três amostras humanas, o anticorpo inibiu a produção de IL-1 β induzida pelo *Staphylococcus epidermidis* em 50% a 0,1 pM e em 75% a 3 pM. Em 100 pM, a inibição foi de 100%. Interferon gama
- 10 (IFN γ) foi induzido pelo *Staphylococcus epidermidis* e AB7 reduziu IFN γ induzido pelo *Staphylococcus epidermidis* em 75% a 100 pM.

Exemplo 12

Efeito do anticorpo anti-IL-1 β sobre a diabetes no camundongo Diabético Não Obeso (NOD)

- 15 Para demonstrar a eficácia de um anticorpo anti-IL-1 β em um modelo de diabetes de camundongo, camundongos fêmeas NOD de 3 a 4 semanas de idade (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) são obtidos e alojados em um viveiro sob condições isentas de patógeno. Várias doses de anticorpo anti-IL-1 β (por exemplo, 3 a 600 μ g) são diluídas em um veículo
- 20 adequado (por exemplo, PBS) e administrado em camundongos de partida NOD fêmeas pré diabéticos não mais tarde do que 6 semanas de idade, usando vias diferentes (por exemplo, intraperitoneal, subcutânea, intravenosamente) em intervalos definidos (por exemplo, semanal, bissemanal, mensalmente). A glicose do sangue é monitorada usando um
- 25 glicômetro (Encore Glucometer; Bayer, Elkhart, IN) em intervalos semanais, começando em 10 semanas de idade. Os camundongos com níveis de glicose do sangue de 200 mg/dl em duas ocasiões consecutivas são considerados diabéticos (o início da diabetes é usualmente observada em torno de 15 a 20 semanas de idade e a incidência usualmente alcança um máximo em torno dos

90% em 30 semanas de idade). Os dados são calculados como a porcentagem de animais que permanecem livres da diabetes durante o curso do experimento. As diferenças entre as curvas são testadas usando o teste de classificação log, que compara as distribuições durante o período de observação inteiro.

5 Em um outro modelo de camundongo NOD, a eficácia do anticorpo anti-IL-1 β é demonstrada em um modelo de doença acelerada pela ciclofosfamida (CY) (Reddy *et al.*, Histochem J. 33: 317-327, 2001; Cailleau *et al.*, Diabetes 46: 937-940, 1997; Reddy *et al.*, Histochem J., 34: 1-12, 2002; Harada *et al.*, Diabetologia 27: 604-606, 1984; Nicoletti, *et al.*, Eur J
10 Immunol 24: 1843-7, 1994). camundongos NOD Não diabéticos de 4 a 8 semanas de idade machos (ou fêmeas) são obtidos (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) e alojados em um viveiro sob condições isentas de patógeno. Os camundongos são injetados com uma única dose de CY (Sigma) a 200 mg/Kg e são tratados em vários intervalos acelerados devido à natureza acelerada do
15 modelo (por exemplo, uma vez por semana, duas vezes por semana) por duas a três semanas com ou sem várias doses de anticorpos anti-IL-1 β (por exemplo, 3 μ g, 30 μ g, 150 μ g, 600 μ g) ou controle de isótipo diluídos em um veículo adequado (por exemplo, PBS) usando vias diferentes de administração (por exemplo, intraperitoneal, subcutânea, intravenosamente).
20 Os níveis de glicose da urina (glicosuria) são monitorados três vezes por semana e os níveis de glicose do sangue são monitorados uma vez por semana usando um glicômetro começando no dia antes da injeção de CY. Os níveis de glicose da urina > 20 mmol/L em duas ocasiões consecutivas são considerados diabéticos e a redução dos níveis de glicose da urina por um
25 anticorpo anti-IL-1 β é uma medida de eficácia.

Em um outro modelo, a eficácia de um anticorpo anti-IL-1 β é avaliada em um modelo da recorrência da diabetes de transplante de ilhotas pancreáticas (não rejeição do transplante) (Mellgren *et al.*, Diabetologia 29: 670-2, 1986; Sandberg, *et al.*, Clin Exp Immunol 108: 314-7, 1997).

Camundongos NOD não diabéticos de 4 a 8 semanas de idade fêmeas são obtidos (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) e alojados em um viveiro sob condições isentas de patógeno. As ilhotas pancreáticas são preparadas a partir de camundongos NOD de 5 a 6 semanas de idade não diabéticos machos e fêmeas antes da infiltração leucocítica observada e transplantadas sob a cápsula renal de camundongos NOD diabéticos espontâneos fêmeas (15 a 20 semana de idade) (400 a 450 ilhotas/camundongo). A normoglicemia transitória ocorre logo depois do transplante e a hiperglicemia usualmente reaparece aproximadamente 6 dias depois do transplante. Os camundongos são tratados com ou sem várias doses de anti-IL-1 β (por exemplo, 3 μ g, 30 μ g, 150 μ g, 600 μ g) ou anticorpos de controle de isótipo diluídos em um veículo adequado (por exemplo, PBS) usando vias diferentes de administração (por exemplo, intraperitoneal, subcutânea, intravenosamente). Os níveis de glicose do sangue são monitorados antes e depois do transplante uma vez ou duas vezes por semana usando um glicômetro e os camundongos com níveis > 200 mg/dl em duas ocasiões consecutivas são considerados diabéticos e a redução dos níveis de glicose do sangue por um anticorpo anti-IL-1 β são uma medida de eficácia.

Exemplo 13

Tratamento do modelo de diabetes induzida por estreptozotocina em dose baixa em camundongos C57BLIK.

Para demonstrar a eficácia de um anticorpo anti-IL-1 β em um modelo de hiperglicemia e diabetes insulite induzidas pela estreptozotocina (STZ) em dose baixa múltipla (Sandberg, *et al.*, Biochem Biophys Res Commun 202: 543-548, 1994; Reddy, *et al.*, Ann N Y Acad Sci 1079: 109-113, 2006), camundongos C57BL/K de 4 a 8 semanas de idade são obtidos (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) e alojados em um viveiro sob condições isentas de patógeno. Os camundongos recebem cinco injeções diárias de STZ (40 mg/kg) neste modelo acelerado e são submetidos ao

tratamento acelerado (de partida um dia antes da injeção de STZ) em vários intervalos (por exemplo, uma vez, duas vezes ou três vezes por semana) por uma a três semanas com ou sem várias doses de anticorpo anti-IL-1 β (por exemplo, 3 μ g, 30 μ g, 150 μ g, 600 μ g) ou anticorpo de controle de isótipo diluído em um veículo adequado (por exemplo, PBS) usando vias diferentes de administração (por exemplo, intraperitoneal, subcutânea, intravenosamente). Os níveis de glicose do sangue são monitorados uma vez por semana usando um glicômetro começando um dia antes da injeção de STZ. Os níveis de glicose do sangue > 200 mg/dl em duas ocasiões consecutivas são considerados diabéticos e a redução dos níveis de glicose do sangue por um anticorpo anti-IL-1 β são uma medida de eficácia.

Exemplo 14

Tratamento no Modelo de Obesidade Induzida por Dieta de Diabetes Tipo 2

A eficácia de um anticorpo anti-IL-1 β foi testada no modelo de obesidade induzida por dieta (DIO) da diabetes Tipo 2. Neste modelo, os camundongos alimentados com uma dieta com alto teor de gordura tornam-se obesos em um período de várias semanas e eles exibem tolerância à glicose prejudicada e secreção de insulina prejudicada quando inoculados com uma injeção de bolo de glicose. camundongos C57BL/6 machos, 6 semanas de idade, foram alimentados com dieta normal (ND, Teklad, 5 kcal% de gordura) ou dieta de gordura alta, sacarose alta da Surwit (HFD, Research Diets #D12331, 58 kcal% de gordura). A dosagem de anticorpo foi iniciada um dia antes. O anticorpo anti-IL-1 β de teste (AB7) e anticorpo IgG2 humano de controle de isótipo foram administrados pela injeção intraperitoneal (i.p.). Os anticorpos foram dosados duas vezes por semana por 4 semanas. O peso corporal também foi registrado duas vezes por semana. Depois de 4 semanas, os camundongos foram submetidos a um teste de tolerância à glicose (GTT). No GTT, os camundongos são jejuados durante a noite e depois injetados i.p. com 1 g/kg de glicose. A glicose do sangue é medida a partir de cortes na

cauda em 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos depois da injeção, usando um glicômetro FreeStile. A Figura 12 mostra que os camundongos alimentados com uma dieta de gordura alta por 4 semanas tiveram tolerância à glicose prejudicada comparada com camundongos na dieta normal (Figura 1). A administração de um anticorpo de IL-1 β de teste protegeu os camundongos HFD da tolerância à glicose prejudicada. Em 60 minutos durante o GTT, o desempenho dos camundongos dosados com 1 mg/kg de anticorpo IL-1 β foi significativamente melhor do que os camundongos que receberam anticorpo IgG2 de controle (*, $p < 0,05$). Notavelmente, os resultados positivos neste modelo de camundongo foram observados mesmo que o anticorpo AB7 tivesse uma afinidade muito mais baixa (~10.000 vezes) e potência *in vitro* para a IL-1 β de camundongo, quando comparada com a IL-1 β humana, como descrito no Exemplo 2 acima.

Todas as referências, incluindo publicações, pedidos de patente e patentes, aqui citadas são por meio deste incorporadas por referência no mesmo grau como se cada referência fosse individual e especificamente indicada ser incorporada por referência e fosse aqui apresentada em sua totalidade.

O uso dos termos “um” e “uma” e “o” e “a” e referentes similares no contexto de descrever a invenção (especialmente no contexto das reivindicações que seguem) devem ser interpretados abranger tanto o singular quanto o plural, a menos que de outro modo aqui indicado ou claramente contradito pelo contexto. Os termos “compreendendo,” “tendo,” “incluindo,” e “contendo” devem ser interpretados como termos ilimitados (isto é, significando “incluindo, mas não limitado a”), a menos que de outro modo mencionado. Sempre que um termo ilimitado é usado para descrever uma característica ou elemento da invenção, é especificamente considerado que um termo limitado possa ser usado no lugar do termo ilimitado sem divergir do espírito e escopo da invenção. A recitação de faixas de valores aqui são

meramente intencionadas a servir como um método resumido de se referir individualmente a cada valor separado que caia dentro da faixa, a menos que de outro modo aqui indicado e cada valor separado é incorporado no relatório descritivo como se o mesmo fosse individualmente aqui relatado. Todos os
5 métodos aqui descritos podem ser realizados em qualquer ordem adequada a menos que de outro modo aqui indicado ou de outro modo claramente contradito pelo contexto. O uso de qualquer e todas as linguagens de exemplo ou exemplares (por exemplo, “tal como”) aqui fornecidas, são intencionadas meramente a ilustrar melhor a invenção e não propõe uma limitação no
10 escopo da invenção a menos que de outro modo reivindicado. Nenhuma linguagem no relatório descritivo deve ser interpretado como indicando qualquer elemento não reivindicado como essencial para a prática da invenção.

As formas de realização preferidas desta invenção são aqui
15 descritas, incluindo o melhor modo conhecidos pelos inventores que realizam a invenção. Variações destas formas de realização preferidas podem se tornar evidentes para aqueles que trabalham na técnica na leitura da descrição precedente. Os inventores esperam que os técnicos habilitados utilizem tais variações como apropriado e os inventores pretendem que a invenção seja
20 praticada de outro modo como aqui especificamente descrito. Consequentemente, esta invenção inclui todas as modificações e equivalentes do assunto objeto relatado nas reivindicações anexas a esta como permitido pela lei aplicável. Além disso, qualquer combinação dos elementos descritos acima em todas de suas variações possíveis é abrangida pela invenção a
25 menos que de outro modo aqui indicado ou de outro modo claramente contradito pelo contexto.

LISTAGEM DA SEQUÊNCIA

<110> XOMA Technology Ltd.
 <120> "MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS RELACIONADAS A IL-1-BETA"
 <130> 117791-100
 <140> PCT/US07/88411
 <141> 2007-12-20
 <150> US 60/871,046
 <151> 2006-12-20
 <150> US 60/908,389
 <151> 2007-03-27
 <150> US 60/911,033
 <151> 2007-04-10
 <160> 6
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Epítipo IL-1-BETA
 <400> 1
 Glu Ser Val Asp Pro Lys Asn Tyr Pro Lys Lys Lys Met Glu Lys Arg
 1 5 10 15
 Phe Val Phe Asn Lys Ile Glu
 20
 <210> 2
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> Peptídeo ligador
 <400> 2
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 3
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> AB5-LC
 <400> 3
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln Gly Lys Met Leu Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 4
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> AB5-HC
 <400> 4

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

<210> 5
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> AB7-LC
 <400> 5

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

<210> 6
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial
 <220>
 <223> AB7-HC
 <400> 6

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

REIVINDICAÇÕES

1. Método para tratar em um ser humano, uma doença ou condição selecionadas do grupo que consiste da diabetes Tipo 2, resistência à insulina, produção de insulina diminuída, hiperglicemia, hiperinsulinemia, diabetes Tipo 2 e obesidade, caracterizado pelo fato de que compreende administrar um anticorpo anti-IL- β ou fragmento do mesmo ao ser humano.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a doença ou condição são selecionadas do grupo que consiste da diabetes Tipo 2, resistência à insulina, produção de insulina diminuída, hiperglicemia, hiperinsulinemia e obesidade.

3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a doença ou condição é selecionada do grupo que consiste da diabetes Tipo 2, resistência à insulina e obesidade.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a doença ou condição é a diabetes Tipo 2.

5. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a doença ou condição é a hiperglicemia.

6. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a doença ou condição é a hiperinsulinemia.

7. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a doença ou condição é a obesidade.

8. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a doença ou condição é a resistência à insulina.

9. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a doença ou condição é a diabetes Tipo 2.

10. Método de acordo com as reivindicações de 1 a 9, caracterizado pelo fato de que a administração de uma dose inicial do anticorpo ou fragmento de anticorpo são seguidos pela administração de uma ou mais doses subsequentes.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a administração de uma dose inicial do anticorpo ou fragmento de anticorpo são seguida pela administração de duas ou mais doses subsequentes.

5 12. Método de acordo com as reivindicações de 1 a 9, caracterizado pelo fato de que a administração de uma dose inicial do anticorpo ou fragmento de anticorpo são seguida pela administração de uma ou mais doses subsequentes, e

em que a dita uma ou mais doses subsequentes estão em uma
10 quantidade que é aproximadamente a mesma ou menor do que a dose inicial.

13. Método de acordo com as reivindicações de 1 a 9, caracterizado pelo fato de que a administração de uma dose inicial do anticorpo ou fragmento de anticorpo são seguida pela administração de uma ou mais doses subsequentes, e em que pelo menos uma das doses
15 subsequentes está em uma quantidade que é mais do que a dose inicial.

14. Método de acordo com as reivindicações de 1 a 13, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de anticorpo se liga à IL-1 β humana com uma constante de dissociação de cerca de 250 pM ou menos.

20 15. Método de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de anticorpo se liga à IL-1 β humana com uma constante de dissociação de cerca de 10 pM ou menos.

16. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de anticorpo se liga à IL-1 β
25 humana com uma constante de dissociação de cerca de 1 pM ou menos.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de anticorpo se liga à IL-1 β humana com uma constante de dissociação de cerca de 0.5 pM ou menos.

18. Método de acordo com as reivindicações 10 a 17,

caracterizado pelo fato de que a dose inicial e cada uma ou mais doses subsequentes são separadas uma da outra por um intervalo de pelo menos cerca de 2 semanas.

5 19. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que a dose inicial e cada uma ou mais doses subsequentes são separadas uma da outra por um intervalo de pelo menos cerca de 1 mês.

20. Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a dose inicial e cada uma ou mais doses subsequentes são separadas uma da outra por um intervalo de pelo menos cerca de 3 meses.

10 21. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a dose inicial e cada uma ou mais doses subsequentes são separadas uma da outra por um intervalo de pelo menos cerca de 6 meses.

15 22. Método de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que a dose inicial e cada uma ou mais doses subsequentes são separadas uma da outra por um intervalo de pelo menos cerca de 12 meses.

23. Método de acordo com as reivindicações de 1 a 22, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de anticorpo são administrado em uma ou mais doses de 3 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento.

20 24. Método de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de anticorpo são administrados em uma ou mais doses de 1 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento.

25 25. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de anticorpo são administrados em uma ou mais doses de 0.5 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento.

26. Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de anticorpo são administrados em uma ou mais doses de 0,1 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento.

27. Método de acordo com a reivindicação 26, caracterizado

pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de anticorpo são administrados em uma ou mais doses de 0,03 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento.

28. Método de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de anticorpo são administrados em
5 uma ou mais doses de 0,01 mg/kg ou menos de anticorpo ou fragmento.

29. Método de acordo com as reivindicações 23 a 28, caracterizado pelo fato de que a uma ou mais doses são pelo menos 0,01 mg/kg de anticorpo ou fragmento.

30. Método de acordo com as reivindicações de 1 a 29, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento de
10 anticorpo é um anticorpo neutralizador.

31. Método de acordo com as reivindicações de 1 a 29, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento de anticorpo se liga um epítopo de IL-1 β tal que o anticorpo ou fragmento
15 ligados substancialmente permite a ligação de IL-1 β ao receptor 1 de IL-1 (IL-1R1).

32. Método de acordo com as reivindicações de 1 a 29, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de anticorpo não se liga detectavelmente a IL-1 α , IL-1R ou IL-IRa.

33. Método de acordo com as reivindicações de 1 a 29, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de anticorpo se liga um epítopo contido na sequência ESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIE.
20

34. Método de acordo com as reivindicações de 1 a 29, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de anticorpo se liga a
25 um epítopo que incorpora Glu64 de IL-1 β .

35. Método de acordo com as reivindicações de 1 a 29, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de anticorpo se liga aos aminoácidos de 1 a 34 do terminal N de IL-1 β .

36. Método de acordo com as reivindicações de 1 a 35,

caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de anticorpo são humanos, engenheirado ou humanizado.

37. Método de acordo com as reivindicações de 1 a 35, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de anticorpo são humanos.

38. Método de acordo com as reivindicações de 1 a 37, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento são administrados pela injeção subcutânea, intravenosa ou intramuscular.

39. Método de acordo com as reivindicações de 1 a 22, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento são administrados como uma dose fixa, independente de uma dose por razão em peso do paciente.

40. Método de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento são administrados em uma ou mais doses de 500 mg ou menos de anticorpo ou fragmento.

41. Método de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento são administrados em uma ou mais doses de 250 mg ou menos de anticorpo ou fragmento.

42. Método de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento são administrados em uma ou mais doses de 100 mg ou menos de anticorpo ou fragmento.

43. Método de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento são administrados em uma ou mais doses de 25 mg ou menos de anticorpo ou fragmento.

44. Método de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento são administrados em uma ou mais doses de pelo menos 1 mg de anticorpo ou fragmento.

45. Método de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento são administrados em uma ou mais

doses de cerca de 10 mg a cerca de 100 mg de anticorpo ou fragmento.

46. Método de acordo com as reivindicações de 9 a 45, caracterizado pelo fato de que uma dose do anticorpo ou fragmento são suficientes para se obter pelo menos 0,5 ponto de porcentagem de melhora na hemoglobina A1c.

47. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que a dose do anticorpo ou fragmento são suficientes para se obter pelo menos um 1 ponto de porcentagem de melhora na hemoglobina A1c.

48. Método de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que a dose do anticorpo ou fragmento são suficientes para se obter pelo menos 2 pontos de porcentagem de melhora na hemoglobina A1c.

49. Método de acordo com a reivindicação 48, caracterizado pelo fato de que a dose do anticorpo ou fragmento são suficientes para se obter pelo menos 3 pontos de porcentagem de melhora na hemoglobina A1c.

50. Método de acordo com as reivindicações de 9 a 49, caracterizado pelo fato de que dito método é suficiente para se obter pelo menos uma das seguintes modificações: redução no nível de açúcar no sangue no jejum, diminuição na resistência à insulina, redução da hiperinsulinemia, melhora na tolerância à glicose, redução no peptídeo reativo (CRP), redução de hiperglicemia, redução na necessidade quanto a medicação da diabete, redução em BMI, mudança na AUC de peptídeo C de glicose/insulina, redução nos reagentes de fase aguda, diminuição nos lipídeos séricos com melhora no perfil de lipídeo.

51. Método de acordo com as reivindicações de 9 a 45, caracterizado pelo fato de que reduz ou previne uma complicação ou condição associadas com a diabete Tipo 2 selecionadas do grupo que consiste de retinopatia, insuficiência renal, doença cardiovascular e cicatrização de ferimento, o método compreendendo administrar um anticorpo anti-IL-1 β ou

fragmento do mesmo ao ser humano.

52. Método de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que a complicação ou condição é a doença cardiovascular e em que a dita doença cardiovascular é a aterosclerose ou doença vascular periférica.

53. Método de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que a complicação ou condição é a cicatrização de ferimento e em que a dita condição de cicatrização de ferimento é a úlcera diabética.

54. Método de acordo com as reivindicações de 1 a 53, caracterizado pelo fato de que o dito método está em conjunção com pelo menos um método de tratamento adicional, o dito método de tratamento adicional compreendendo administrar pelo menos uma composição farmacêutica que compreende um agente ativo outro que não um anticorpo IL-1 β ou fragmento.

55. Método de acordo com as reivindicações de 1 a 53, caracterizado pelo fato de que o dito método previne ou retarda a necessidade quanto a pelo menos um método de tratamento adicional, o dito método de tratamento adicional compreendendo administrar pelo menos uma composição farmacêutica que compreende um agente ativo outro que não um anticorpo IL-1 β ou fragmento.

56. Método de acordo com as reivindicações de 1 a 53, caracterizado pelo fato de que o dito método reduz a quantidade, frequência ou duração de pelo menos um método de tratamento adicional, o dito método de tratamento adicional compreendendo administrar pelo menos uma composição farmacêutica que compreende um agente ativo outro que não um anticorpo IL-1 β ou fragmento.

57. Método de acordo com as reivindicações de 54 a 56, caracterizado pelo fato de que a dita pelo menos uma composição farmacêutica que compreende um agente ativo outro que não um anticorpo de

IL-1 β ou fragmento é selecionada do grupo que consiste de uma sulfoniluréia, uma meglitinida, uma biguanida, um inibidor da alfa-glicosidase, uma tiazolidinodiona, um peptídeo equivalente a glucagon e insulina.

5 58. Método de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que o dito agente ativo é uma sulfoniluréia.

59. Método de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que o dito agente ativo é uma meglitinida.

60. Método de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que o dito agente ativo é uma biguanida.

10 61. Método de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que o dito agente ativo é um inibidor da alfa-glicosidase.

62. Método de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que o dito agente ativo é uma tiazolidinodiona.

15 63. Método de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que o dito agente ativo é um peptídeo equivalente a glucagon.

64. Método de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que o dito agente ativo é a insulina.

20 65. Método de acordo com as reivindicações de 1 a 53, caracterizado pelo fato de que a administração de uma dose inicial do anticorpo ou fragmento de anticorpo é seguida pela administração de uma ou mais doses subsequentes, e

25 em que a concentração plasmática do dito anticorpo ou fragmento de anticorpo no ser humano é mantida em um nível de pelo menos cerca de 0,03 $\mu\text{g/ml}$ durante um curso de tratamento com a dita dose inicial e uma ou mais doses subsequentes.

66. Método de acordo com a reivindicação 65, caracterizado pelo fato de que a concentração plasmática do dito anticorpo ou fragmento de anticorpo é mantida em um nível de pelo menos cerca de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ durante o curso de tratamento.

67. Método de acordo com a reivindicação 66, caracterizado pelo fato de que a concentração plasmática do dito anticorpo ou fragmento de anticorpo é mantida em um nível de pelo menos cerca de 0,3 µg/ml durante o curso de tratamento.

5 68. Método de acordo com as reivindicações de 1 a 67, caracterizado pelo fato de que a administração do anticorpo anti-IL-1β ou fragmento do mesmo ao ser humano resulta em uma diminuição na produção de um ou mais produtos de gene selecionados do grupo que consiste de leptina, resistina, visfatina, RANTES, IL-6, MCP-1, PAI-1, proteína
10 estimuladora de acilação, SAA3, Pentraxina-3, fator de inibição de migração de macrófago, IL-1RA, IL-12, IL-8 e TNF-α.

 69. Método de acordo com a reivindicação 68, caracterizado pelo fato de que a administração do anticorpo anti-IL-1β ou fragmento do mesmo ao ser humano resulta em uma diminuição na produção de um ou mais
15 produtos de gene selecionados do grupo que consiste de leptina, resistina e visfatina.

 70. Método de acordo com a reivindicação 68, caracterizado pelo fato de que a administração do anticorpo anti-IL-1β ou fragmento do mesmo ao ser humano resulta em uma diminuição na produção de um ou mais
20 produtos de gene selecionados do grupo que consiste de MCP-1, RANTES, IL-6, TNF-α, e Pentraxina-3.

 71. Método de acordo com a reivindicação 68, caracterizado pelo fato de que a dita diminuição na produção de um ou mais produtos de gene é de tecido adiposo.

25 72. Método de acordo com as reivindicações de 1 a 67, caracterizado pelo fato de que a administração do anticorpo anti-IL-1β ou fragmento do mesmo ao ser humano resulta em um aumento na produção de adiponectina.

 73. Método de acordo com a reivindicação 72, caracterizado

pelo fato de que o dito aumento na produção de adiponectina é de tecido adiposo.

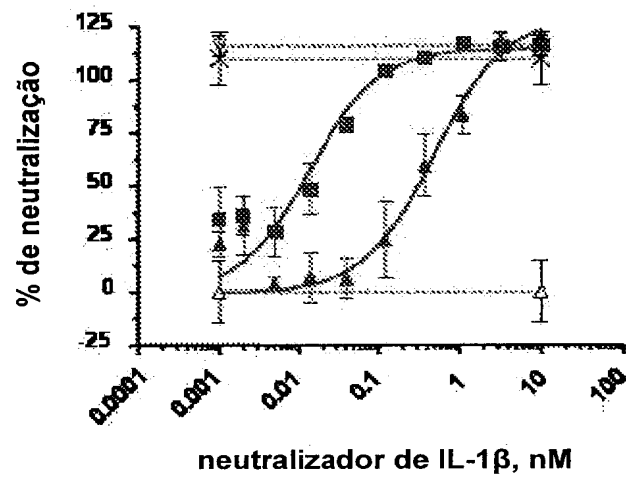
74. Método de acordo com as reivindicações 68 e 72, caracterizado pelo fato de que a dita diminuição ou aumento são detectados
5 no sangue do ser humano.

75. Método de acordo com as reivindicações 1 a 74, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento do mesmo tem um IC_{50} mais baixo do que um antagonista do receptor de IL-1 β em um ensaio de inibição de IL- β no sangue integral do ser humano que mede a produção
10 induzida por IL-10 de IL-8.

76. Uso de um anticorpo anti-IL-1 β ou fragmento do mesmo que tem um IC_{50} mais baixo do que um antagonista do receptor de IL-1 β , caracterizado pelo fato de ser em um ensaio de inibição de IL- β no sangue integral do ser humano que mede a produção induzida por IL-1 β de IL-8, na
15 fabricação de uma composição para o uso no tratamento da diabetes Tipo 2, hiperglicemia, hiperinsulinemia, obesidade, produção de insulina diminuída e resistência à insulina.

77. Método de acordo com a reivindicação 75 ou o uso de acordo com a reivindicação 76, caracterizados pelo fato de que o antagonista
20 do receptor de IL-1 β é anakinra.

Figura 1



■ Ab7

▲ Kineret®

---X--- Ab7 sozinho, 10nM

---▽--- Kineret sozinho, 10nM

---△--- KLH8-G2 10nM

Figura 2

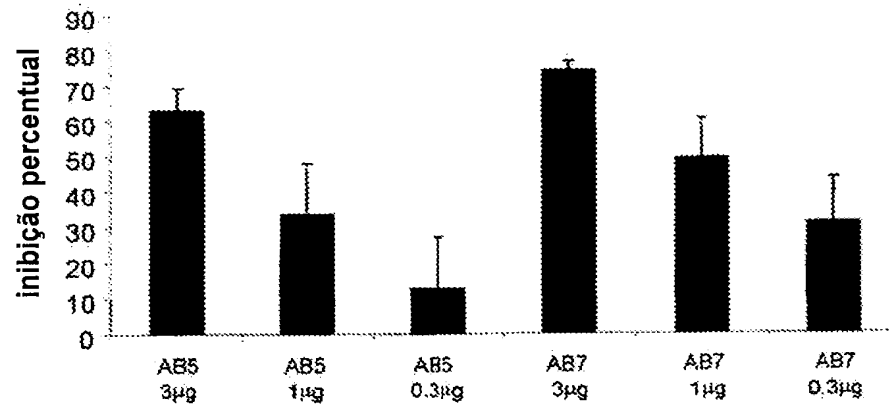


Figura 2B

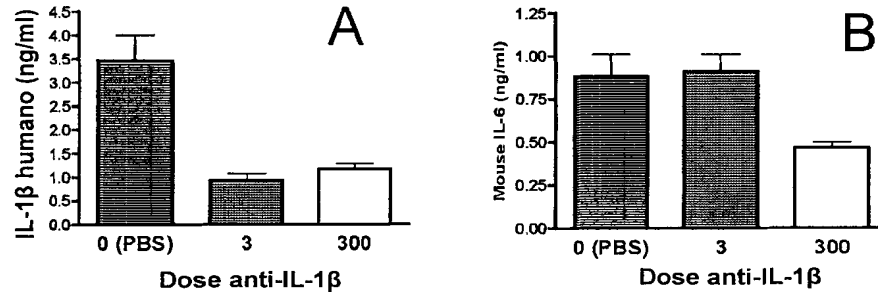


Figura 3

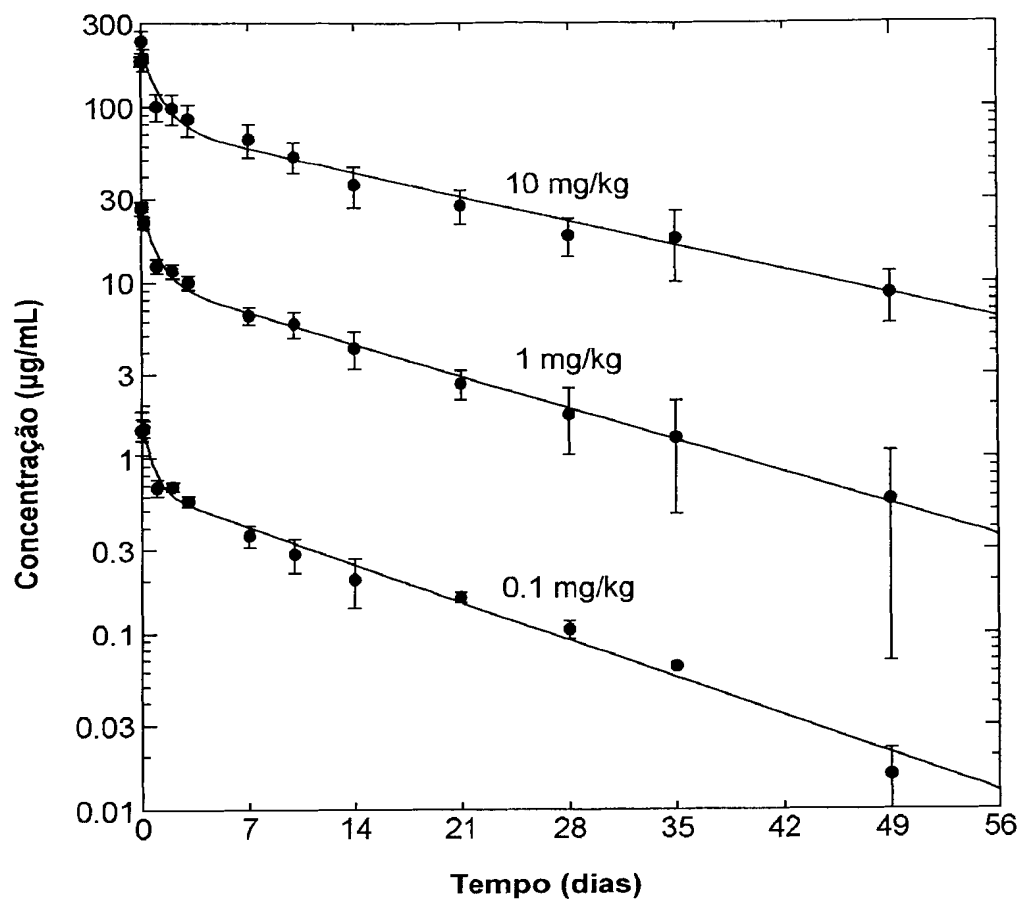


Figura 4

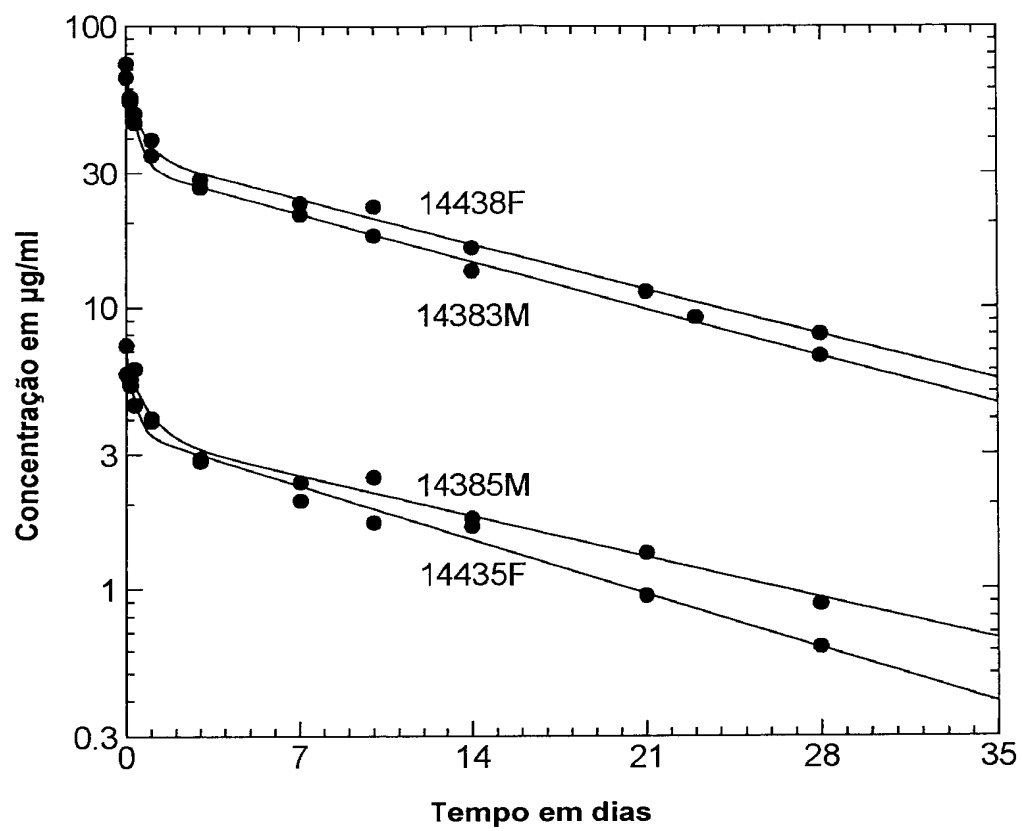


Figura 5

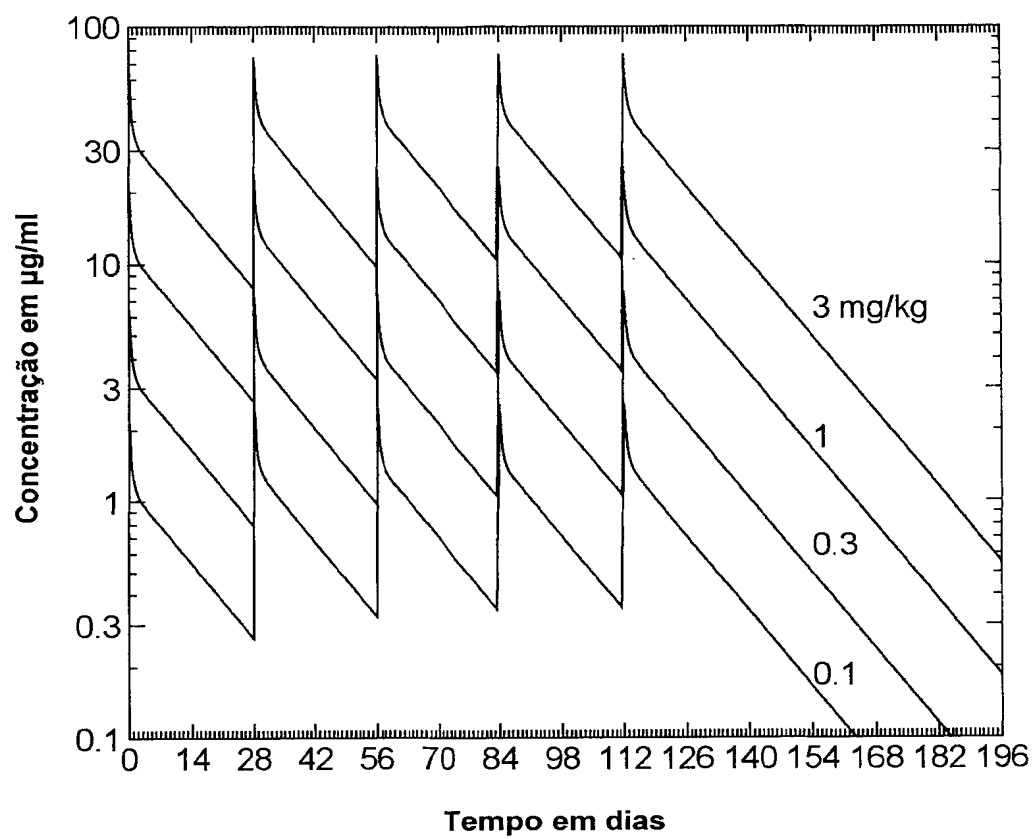


Figura 6

[illegible]

Figura 7

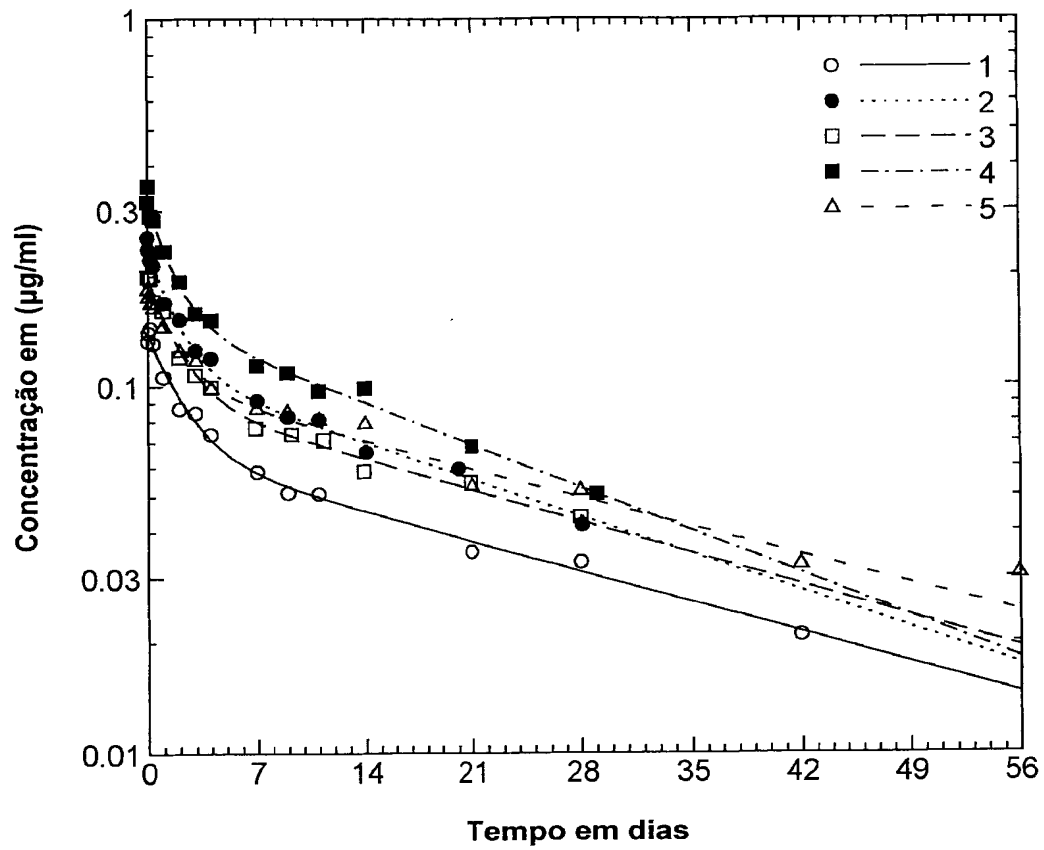


Figura 8

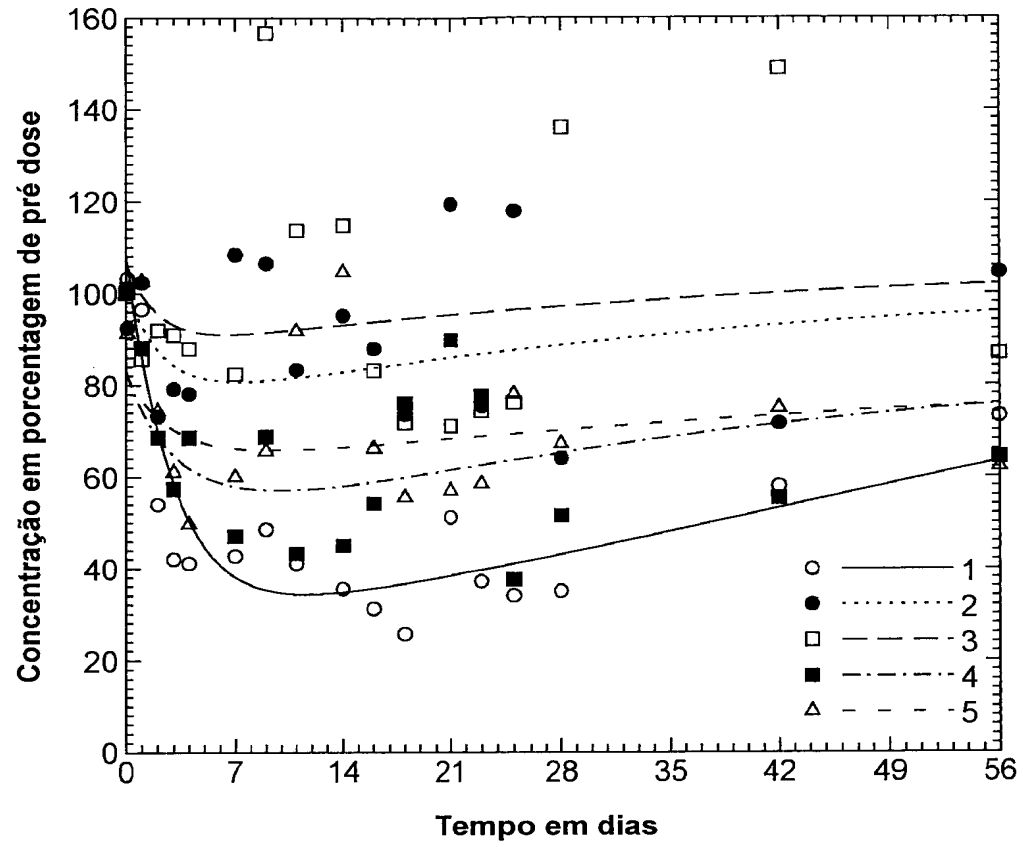


Figura 9

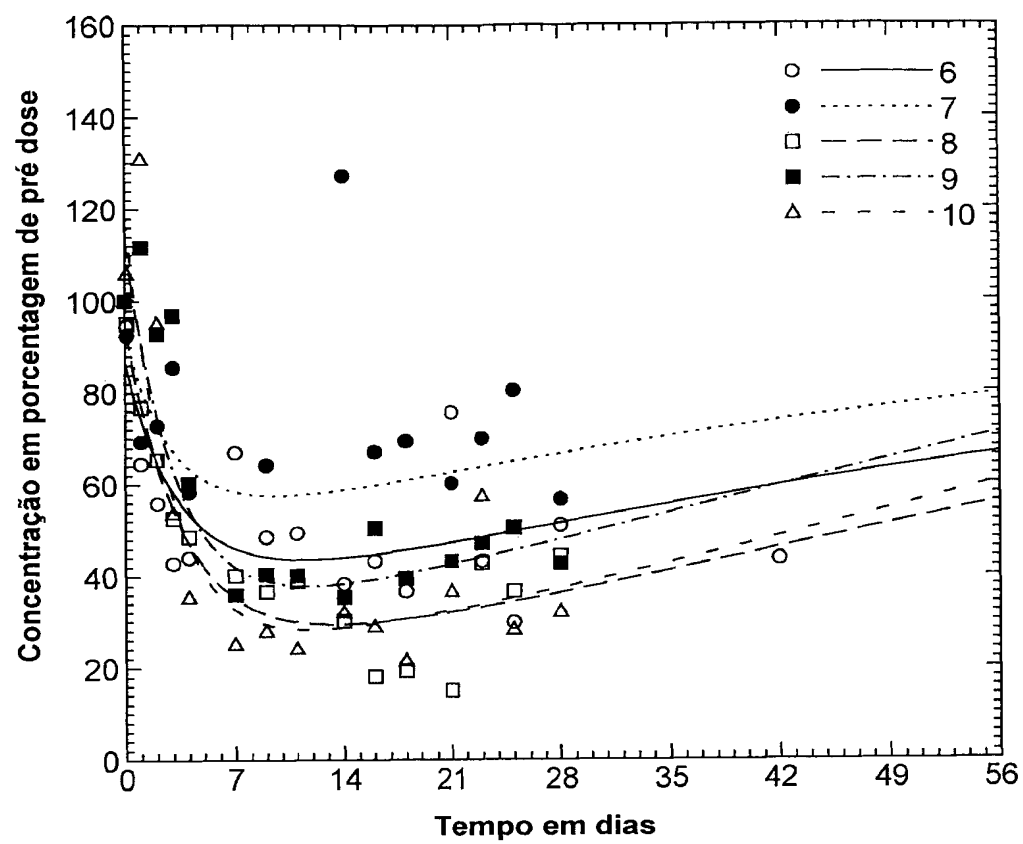


Figura 10

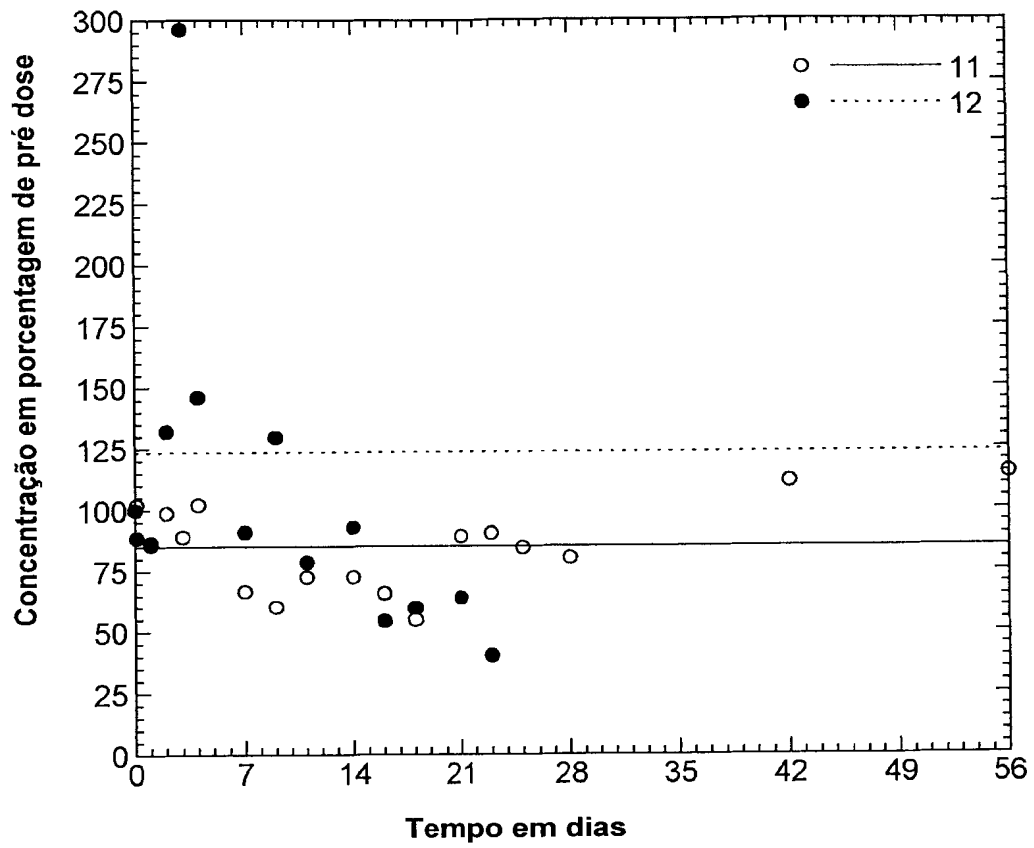


Figura 11

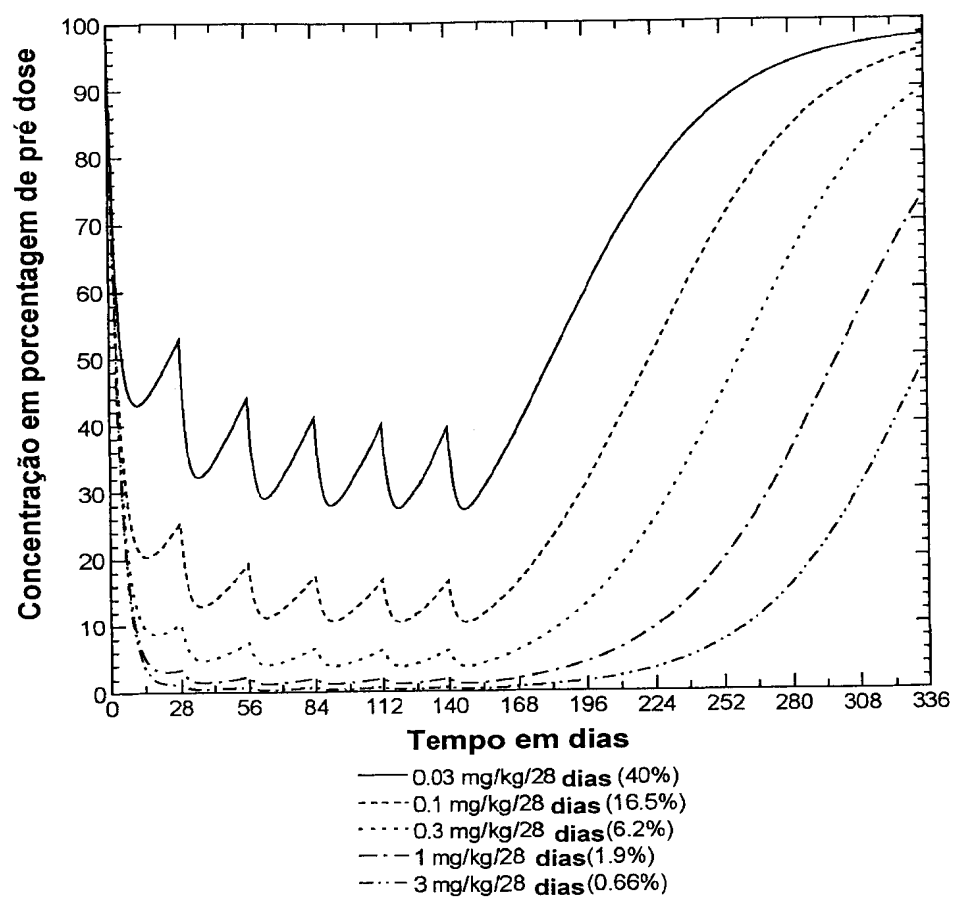
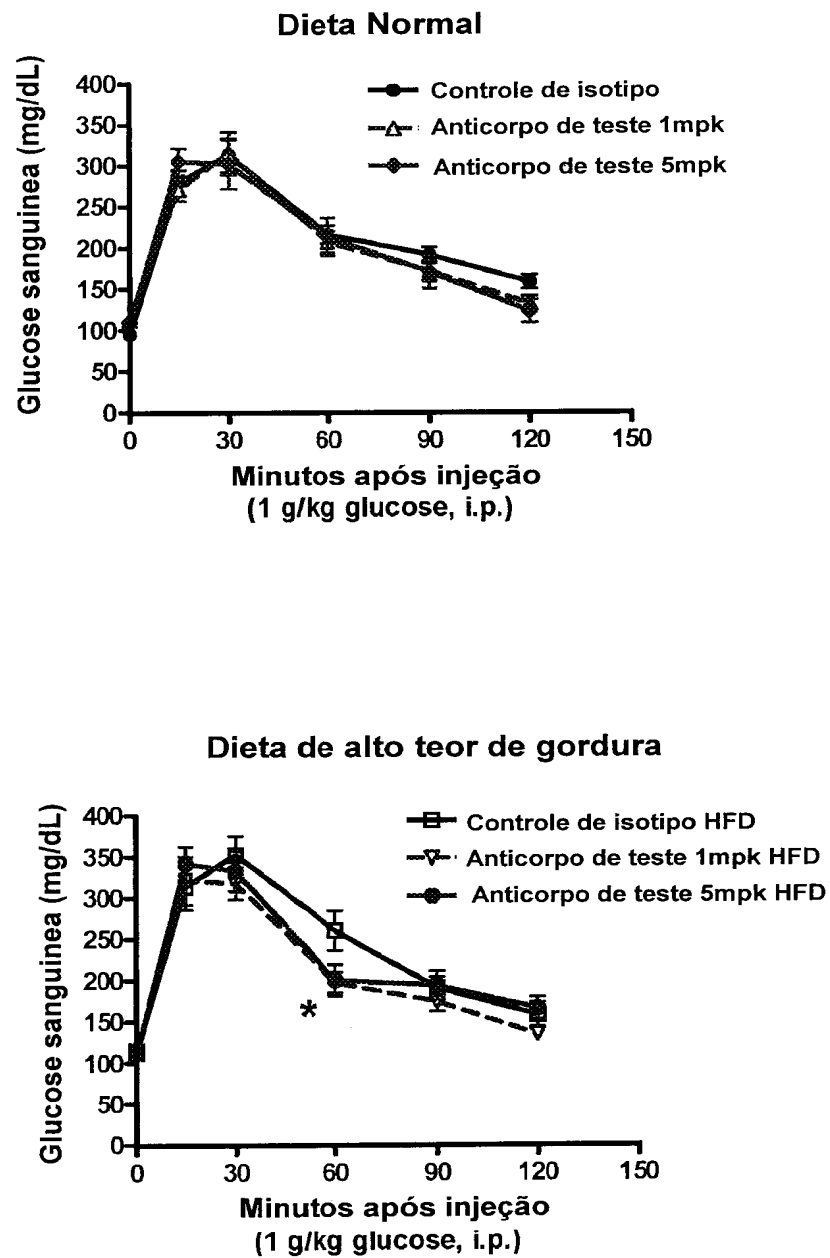


Figura 12



RESUMO

“MÉTODO PARA TRATAR EM UM SER HUMANO, UMA DOENÇA OU CONDIÇÃO, E, USO DE UM ANTICORPO ANTI-IL-1-BETA OU FRAGMENTO DO MESMO”

- 5 São divulgados métodos para o tratamento e/ou prevenção da diabetes Tipo 2, resistência à insulina e estados e condições de doença caracterizadas pela resistência à insulina, obesidade, hiperglicemia, hiperinsulinemia e diabetes Tipo 2, que compreende administrar a um paciente uma quantidade eficaz de anticorpo anti-IL-1 ou fragmento do mesmo.