

(11) Número de Publicação: **PT 2285409 T**

(51) Classificação Internacional:
C07K 16/24 (2016.01) **A61K 39/395** (2016.01)
C12N 5/16 (2016.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2009.06.01	(73) Titular(es): XBIOTECH, INC 1055 WEST HASTINGS STREET, SUITE 300 VANCOUVER, BRITISH COLUMBIA V6E 2E9 CA
(30) Prioridade(s): 2008.05.30 US 57586 P 2008.12.10 US 121391 P 2009.05.14 US 178350 P	(72) Inventor(es): JOHN SIMARD US
(43) Data de publicação do pedido: 2011.02.23	(74) Mandatário: MARIA TERESA DELGADO AVENIDA DA LIBERDADE, Nº 69, 3º D 1250-140 LISBOA PT
(45) Data e BPI da concessão: 2016.04.20 132/2016	

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS DE INTERLEUCINA-1 ALFA E MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO**

(57) Resumo:

O ANTICORPO MONOCLONAL (MAB) TOTALMENTE HUMANO COMPREENDE (I) UMA REGIÃO VARIÁVEL DE LIGAÇÃO A ANTIGÊNIO, QUE APRESENTA UMA AFINIDADE DE LIGAÇÃO MUITO GRANDE RELATIVAMENTE A IL-1 β ; E (II) UMA REGIÃO CONSTANTE, QUE É EFICAZ NA ATIVAÇÃO DO SISTEMA DO COMPLEMENTO TANTO APESAR DE LIGAÇÃO AO C1Q COMO DE LIGAÇÃO A DIFERENTES RECEPTORES FC.

RESUMO**"ANTICORPOS DE INTERLEUCINA-1 ALFA E MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO"**

O anticorpo monoclonal (mAb) totalmente humano compreende (1) uma região variável de ligação a antigénio, que apresenta uma afinidade de ligação muito grande relativamente a IL-1 α e (ii) uma região constante, que é eficaz na ativação do sistema do complemento tanto apesar de ligação ao C1q como de ligação a diferentes recetores Fc.

DESCRIÇÃO

"ANTICORPOS DE INTERLEUCINA-1 ALFA E MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO"

ÁREA DA INVENÇÃO

A invenção é em geral relativa às áreas da imunologia, da inflamação, do cancro, dos distúrbios vasculares e da medicina. Mais em particular, a invenção é relativa a anticorpos (Abs), que ligam especificamente a interleucina-1 α (IL-1 α), e a métodos para utilizar esses Abs no tratamento, na prevenção ou na deteção de uma patologia associada a uma expressão aberrante da IL-1 α .

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A IL-1 α é uma citocina pró-inflamatória, que desempenha um papel numa série de atividades diferentes, inclusive inflamação, respostas imunitárias, metástases tumorais e hematopoese. Os autoanticorpos IgG contra a IL-1 α ocorrem naturalmente na população geral humana e pensa-se serem benéficos em doenças como a aterosclerose.

Miossec (*Ann. Rheum. Dis.* (2002) 61: 577-579) descreve a utilização de anticorpos anti-IL-1 α como um tratamento natural para a artrite reumatoide.

Jefferis (*Expert Opin. Biol. Ther.* (2007) 7(9): 1401-1413) debate a escolha do isotipo rMAb e a sua importância na determinação das atividades biológicas que são desencadeadas *in vivo*. Salfield também debate a importância da seleção de isotipos aquando da conceção de anticorpos

para aplicações terapêuticas. (*Nature Biotechnology* (2007) 25(12): 1369-1372).

RESUMO

A invenção tem por base o desenvolvimento de anticorpos (Abs) monoclonais totalmente humanos (mAbs), compreendendo (i) uma região variável de ligação a antigénio, que apresenta uma afinidade de ligação muito grande com a IL-1 α humana e (ii) uma região constante que é eficaz na ativação do sistema do complemento tanto apesar de ligação a C1q como de ligação a diferentes recetores Fc. O mAb específico de IL-1 α descrito no presente documento foi elaborado ao substituir a região constante de um mAb IgG4 humano, tendo uma região variável específica da IL-1 α humana, pela região constante de um mAb IgG1 humano.

Em conformidade com isso, a invenção compreende um mAb IgG1 humano purificado, que se liga especificamente à IL-1 α humana, em que o mAb compreende uma cadeia pesada ligada por covalência a uma cadeia leve. A cadeia pesada pode compreender a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 9 e a cadeia leve pode compreender a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:11.

O âmbito da invenção também compreende um conjunto de ácidos nucleicos isolados, compreendendo um primeiro ácido nucleico que codifica a cadeia pesada de um mAb IgG1 humano, que se liga especificamente à IL-1 α , e um segundo ácido nucleico que codifica a cadeia leve do mAb IgG1 humano, que se liga especificamente à IL-1 α humana. O primeiro ácido nucleico pode codificar a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 9 e o segundo ácido nucleico pode codificar a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:11. O primeiro ácido nucleico pode compreender a sequência de nucleótidos da SEQ ID NO: 10 e o segundo ácido nucleico

pode compreender a sequência de nucleótidos da SEQ ID NO:12.

Noutro aspeto, a invenção compreende um vetor de expressão contendo um ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 11.

Outra característica da invenção é uma célula hospedeira isolada (por exemplo, uma célula de mamífero como a célula CHO), compreendendo um conjunto de ácidos nucleicos isolados, contendo um primeiro ácido nucleico que codifica a cadeia pesada de um mAb IgG1 humano, que se liga especificamente à IL-1 α , e um segundo ácido nucleico que codifica a cadeia leve do mAb IgG1 humano, que se liga especificamente à IL-1 α humana. A cadeia pesada pode compreender a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 9 e a cadeia leve pode compreender a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:11.

A revelação descreve ainda um método para matar uma célula que expressa a IL-1 α humana. Este método pode compreender a etapa de fazer contactar a célula com um mAb IgG1 humano purificado, que se liga especificamente à IL-1 α humana.

Também se descreve um método para inibir a migração de uma célula humana através de uma matriz de membrana basal. Este método pode compreender a etapa de adição de um mAb purificado, que se liga especificamente à IL-1 α humana, a uma mistura contendo a matriz de membrana basal e a célula humana.

Também se descreve um método para inibir um aumento induzido pela IL-1 α da expressão do ICAM-1 e/ou da E-selectina na superfície de uma célula endotelial humana. Este método pode compreender a etapa de adição de um mAb

purificado, que se liga especificamente à IL-1 α humana, a uma mistura contendo a célula endotelial e IL-1 α .

A revelação descreve ainda um método para rastrear a inflamação num sujeito humano, previamente sujeito às etapas: obtenção, do sujeito, de uma primeira amostra de células mononucleares de sangue periférico numa primeira altura; fazer contactar a primeira amostra com um mAb purificado, que se liga especificamente à IL-1 α humana; e determinação da percentagem de células na primeira amostra, que ligam o Ab monoclonal. Este método pode compreender as etapas: (a) obtenção, do sujeito, de uma segunda amostra de células mononucleares de sangue periférico numa segunda altura; (b) fazer contactar a segunda amostra com o mAb purificado, que se liga especificamente à IL-1 α humana; (c) determinação da percentagem de células na segunda amostra que ligam o Ab monoclonal; e (d) comparação da percentagem de células na primeira amostra que ligam o mAb com a percentagem de células na segunda amostra que ligam o Ab monoclonal.

Nos métodos anteriores, o mAb purificado é um mAb IgG1 humano, compreendendo uma cadeia pesada ligada por covalência a uma cadeia leve, por exemplo, em que a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 9 e a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:11.

Outro método descrito compreende as etapas: (a) enriquecimento de uma amostra biológica, obtida de um sujeito humano, utilizando um filtro para separar as moléculas de acordo com o peso molecular numa primeira fração, incluindo IgG intacta complexada com IL-1 α e uma segunda fração incluindo moléculas inferiores a 100 Kda; e

(b) quantificação da quantidade de IL-1 α na primeira fração.

Ainda outro método descrito compreende as etapas: (a) enriquecimento de uma amostra de plasma obtida de um sujeito humano, utilizando um filtro que separa as moléculas de acordo com o peso molecular numa primeira fração compreendendo IgG intacta complexada com IL-1 α , e uma segunda fração compreendendo moléculas inferiores a 100 Kda; (b) adição da primeira fração a um substrato, compreendendo Abs IgG anti-humano imobilizado, sob condições que permitem que a IgG na primeira fração se ligue especificamente ao Abs IgG anti-humano, imobilizado no substrato; (c) lavagem do substrato para remover material na primeira fração, que não se liga especificamente ao Abs IgG anti-humano imobilizado; (d) fazer contactar o substrato lavado na Etapa (c) com um Ab que liga especificamente a IL-1 α humana, sob condições que permitem ao Ab, que liga especificamente a IL-1 α humana, ligar especificamente qualquer ligação IL-1 α humana ao substrato; (e) lavagem do substrato para remover qualquer Ab que se liga especificamente à IL-1 α humana que não esteja ligada ao substrato; e (f) quantificação da quantidade de Ab que liga especificamente a ligação restante da IL-1 α humana ao substrato após a Etapa (e).

Se nada for expresso em contrário, todos os termos técnicos utilizados no presente documento têm o significado comumente entendido pelo especialista comum da técnica a que pertence a presente invenção. As definições comumente entendidas de termos biológicos podem ser encontradas em Rieger et al., *Glossary of Genetics: Classical and Molecular*, 5.^a edition, Springer-Verlag: New York, 1991; e Lewin, *Genes V*, Oxford University Press: New York, 1994.

O termo "(se) liga especificamente", como empregue no presente documento quando se refere a um polipéptido (inclusive Abs) ou recetor, refere-se a uma reação de ligação que determina a presença da proteína ou do polipéptido ou recetor numa população heterogénea de proteínas e outros elementos biológicos. Por conseguinte, sob condições estabelecidas (por exemplo, condições de imunoensaio no caso de um Ab), o ligando especificado ou Ab liga-se ao seu "alvo" particular e não se liga numa quantidade significativa a outras proteínas presentes na amostra ou a outras proteínas com as quais o ligando ou Ab pode entrar em contacto num organismo. Em geral, uma primeira molécula que "liga especificamente" uma segunda molécula tem uma constante de afinidade de equilíbrio superior a cerca de 10^5 (por exemplo, 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} e 10^{12} ou mais) litros/mol para essa segunda molécula.

Ao referir uma molécula proteica como um Ab, "purificada" significa separada dos componentes que acompanham naturalmente essas moléculas. Tipicamente um Ab ou uma proteína está purificado/a quando está pelo menos cerca de 10% (por exemplo, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99,9% e 100%), em peso isento/a das proteínas não Ab ou de outras moléculas orgânicas naturalmente ocorrentes, às quais está naturalmente associado/a. É possível medir a pureza por qualquer método apropriado, como, por exemplo, cromatografia de coluna, eletroforese em gel de poliacrilamida ou análise por HPLC. Uma proteína quimicamente sinterizada ou outra proteína recombinante produzida num tipo celular diferente do tipo de célula onde ocorre naturalmente está "purificada".

Embora se possa empregar métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos descritos no presente documento na prática

ou no testar da presente invenção, encontram-se abaixo descritos métodos e materiais apropriados. Em caso de conflito, a presente descrição, inclusive as definições, servirão de controlo. Além disso, execuções particulares abaixo discutidas destinam-se meramente a ser ilustrativas e não limitativas.

DESCRIÇÃO DETALHADA

A invenção compreende composições e métodos relativos a mAbs totalmente humanos, que compreendem (i) uma região variável de ligação a antigénio, que apresenta uma afinidade de ligação muito grande relativamente à IL-1 α e (ii) uma região constante que é eficaz na ativação do sistema do complemento tanto apesar de ligação ao C1q como de ligação a vários recetores Fc diferentes. A cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:9 e a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:11. As execuções preferidas abaixo descritas ilustram a adaptação destas composições e destes métodos. Em todo o caso, a partir da descrição destas execuções, é possível elaborar e/ou pôr em prática outros aspetos da invenção com base na descrição abaixo fornecida.

No presente documento encontram-se descritos métodos que compreendem técnicas de imunologia e de biologia molecular convencionais. Os métodos imunológicos (por exemplo, ensaios para deteção e localização de complexos de antigénio-Ab, imunoprecipitação, *immunoblotting*, e semelhantes) são geralmente conhecidos do estado da técnica e encontram-se descritos em tratados de metodologia, como *Current Protocols in Immunology*, Coligan et al., ed., John Wiley & Sons, New York. As técnicas de biologia molecular encontram-se descritas em detalhe em tratados, tais como *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.^a ed., vol. 1-3,

Sambrook et al., ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001; e *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., ed., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York. Os métodos para anticorpos (Ab) encontram-se descritos em *Handbook of Therapeutic Abs*, Dubel, S., ed., Wiley-VCH, 2007. As técnicas de cultura de células são geralmente conhecidas do estado da técnica e encontram-se descritas em detalhe em tratados de metodologia, como *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 4.^a edição, por R Ian Freshney, Wiley-Liss, Hoboken, N.J., 2000; e *General Techniques of Cell Culture*, por Maureen A Harrison e Ian F Rae, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1994. Métodos de purificação proteica são debatidos em *Guide to Protein Purification: Methods in Enzymology*, Vol. 182, Deutscher M P, ed., Academic Press, San Diego, Calif., 1990.

Num aspeto, a invenção compreende um mAb totalmente humano, que compreende (i) uma região variável de ligação a antigénio, que apresenta uma afinidade de ligação muito grande com a IL-1 α humana e (ii) uma região constante, que é eficaz na ativação do sistema do complemento tanto apesar de ligação a C1q como de ligação a vários recetores Fc diferentes. A cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:9 e a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:11. O Ab humano é preferencialmente um IgG1. O K_a do Ab é de preferência de pelo menos $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ ou mais (por exemplo, superior a $9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $8 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $7 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $6 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ ou $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$).

Dado que os linfócitos B, que expressam Ig específica da IL-1 α humana, ocorrem naturalmente no ser humano, um método atualmente preferido de criar mAbs consiste em primeiro

isolar um linfócito B desse tipo de um sujeito e depois imortaliza-lo de modo a poder ser continuamente replicado em cultura. Os sujeitos que não têm grandes quantidades de linfócitos B naturalmente ocorrentes, que expressam Ig específica da IL-1 α humana, podem ser imunizados com um ou mais antigénios de IL-1 α humana, para aumentar o número desses linfócitos B. Prepara-se os mAbs humanos através da imortalização de uma célula que segrega Ab humano (por exemplo, uma célula plasmática humana). Ver, por exemplo, a patente US 4,634,664.

Num método exemplificativo, um ou mais (por exemplo, 5, 10, 25, 50, 100, 1000 ou mais) sujeitos humanos (por exemplo, sujeitos a quem não foi previamente ministrada uma vacina IL-1 α humana) são examinados relativamente à presença desse Ab específico de IL-1 α humana no seu sangue. Os sujeitos que expressam o Ab pretendido podem ser depois utilizados como doadores de linfócitos B. Num método possível, obtém-se sangue periférico de um dador humano que tem linfócitos B, que expressam o Ab específico de IL-1 α humana. Esses linfócitos B são depois isolados da amostra de sangue, por exemplo, através de triagem de células (por exemplo, *fluorescence activated cell sorting*, "FACS"; ou *magnetic bead cell sorting*) de modo a selecionar os linfócitos B que expressam a Ig específica de IL-1 α humana. Estas células podem ser depois imortalizadas por meio de transformação viral (por exemplo, utilizando EBV) ou através de fusão noutra célula imortalizada, como o mieloma humano de acordo com técnicas conhecidas. Os linfócitos B nesta população que expressam Ig específica de IL-1 α humana podem ser depois isolados por métodos de diluição limitativa (por exemplo, células em poços de uma placa de microtítulo que são positivas para Ig específica de IL-1 α humana são selecionadas e subcultivadas, e repete-se o processo até se conseguir isolar uma linha clonal pretendida). Ver, por

exemplo, Goding, *Monoclonal Abs: Principles and Practice*, pág. 59-103, Academic Press, 1986. Prefere-se as linhas celulares clonais que expressam Ig tendo afinidades de ligação pelo menos nanomolares ou picomolares relativamente à IL-1 α humana. Os mAbs segregados por estas linhas celulares clonais podem ser purificados a partir do meio de cultura ou de um fluido corporal (por exemplo, ascites) por meio de procedimentos de purificação de Ig convencionais, tais como fracções de sal, exclusão molecular, separação por permuta iónica, e cromatografia de afinidade.

Embora os linfócitos B imortalizados possam ser empregues em culturas *in vitro* para produzir diretamente mAbs, nalguns casos poderá ser desejável utilizar sistemas de expressão heterólogos para produzir mAbs. Ver, por exemplo, os métodos descritos no pedido de patente US número 11/754,899. Por exemplo, os genes que codificam um mAb específico da IL-1 α humana podem ser clonados e introduzidos num vetor de expressão (por exemplo, um vetor de expressão à base de plasmídeo) com vista à expressão numa célula hospedeira heteróloga (por exemplo, células CHO, células COS, células de mieloma, e células de *E. coli*). Uma vez que as Igs compreendem cadeias pesadas (H) e leves (L) numa configuração H₂L₂, os genes que codificam cada uma delas podem ser isolados e expressos em separado em diferentes vetores.

Embora geralmente menos preferidos, é possível utilizar na invenção os mAbs quiméricos (por exemplo, mAbs "humanizados"), que são moléculas de ligação a antigénio tendo diferentes porções derivadas de diferentes espécies animais (por exemplo, região variável de uma Ig murina fundida na região constante de uma Ig humana). É possível preparar estes Abs quiméricos por métodos conhecidos do estado da técnica. E.G., Morrison et al., *Proc. Nat'l.*

Acad. Sci. USA, 81:6851, 1984; Neuberger et al., *Nature*, 312:604, 1984; Takeda et al., *Nature*, 314:452, 1984. De modo semelhante, é possível humanizar Abs por métodos conhecidos do estado da técnica. Por exemplo, os Abs monoclonais com uma especificidade de ligação pretendida podem ser humanizados a nível comercial ou como descrito na patente US 5,693,762; 5,530,101; ou 5,585,089.

Os mAbs descritos no presente documento podem ser amadurecidos em termos de afinidade para aumentar ou então alterar a respetiva especificidade de ligação por métodos conhecidos, tais como *VH* e *VL domain shuffling* (Marks et al. *Bio/Technology* 10:779-783, 1992), mutagénese aleatória de regiões hipervariáveis (HVRs = *hypervariable regions*) e/ou *framework residues* (Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813, 1994; Schier et al. *Gene* 169:147-155, 1995; Yelton et al. *J. Immunol.* 155:1994-2004, 1995; Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-9, 1995; e Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896, 1992. As variantes de sequências de aminoácidos de um Ab podem ser preparadas através da introdução de modificações apropriadas na sequência de nucleótidos que codifica o Ab. Além disso, é possível alterar as modificações às sequências de aminoácidos que codificam os mAbs (por exemplo, sem alterar a sequência de aminoácidos do mAb) para aumentar a produção do mAb em determinados sistemas de expressão (por exemplo, eliminação de intrões e/ou otimização de códon para um determinado sistema de expressão). Os mAbs descritos no presente documento também podem ser modificados pela conjugação noutra proteína (por exemplo, outro mAb) ou molécula não proteica. Por exemplo, um mAb pode ser conjugado num polímero hidrossolúvel, como polietilenoglicol ou um nanotubo de carbono (ver, por exemplo, Kam et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-

11605, 2005). Ver o pedido de patente US número 11/754,899 (publicação n.º US2008/0050310).

Preferencialmente, para garantir que títulos elevados de mAb específico de IL-1 α humana possam ser ministrados a um sujeito com um mínimo de efeitos secundários, as composições de mAb da invenção apresentam uma pureza de pelo menos 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99,9 por cento em peso ou mais (excluindo quaisquer excipientes). As composições de mAb da invenção poderão compreender apenas um único tipo de mAb (ou seja, um produzido a partir de uma única linha de linfócitos B clonais) ou poderão compreender uma mistura de dois ou mais (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais) tipos diferentes de mAbs. Além de mAbs de IL-1 α humana, as composições de Ab da invenção também poderão compreender outros mAbs que ligam especificamente antigénios diferentes da IL-1 α humana.

De modo a modificar ou aumentar a sua função, os mAbs de IL-1 α humana podem ser conjugados com outra molécula, como uma citocina ou um marcador detetável. Um mAb específico de IL-1 α humana pode ser conjugado com uma ou mais citocinas, no intuito de matar com uma maior eficácia as células que expressam a IL-1 α . As citocinas com vista a serem utilizadas na invenção poderão ser qualquer agente citotóxico (por exemplo, uma molécula capaz de matar uma célula após o contacto com esta) que possa ser conjugado com um mAb específico de IL-1 α humana. Os exemplos de citotoxinas compreendem, sem limitação, radionuclídeos (por exemplo, ³⁵S, ¹⁴C, ³²P, ¹²⁵I, ¹³¹I, ⁹⁰Y, ⁸⁹Zr, ²⁰¹Tl, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ⁵⁷Cu, ²¹³Bi e ²¹¹At), radionuclídeos conjugados e agentes quimioterapêuticos. Outros exemplos de citocinas compreendem, sem ficarem a estes limitados, antimetabólitos

(por exemplo, 5-fluorouracilo (5-FU), metotrexato (MTX), fludarabina, etc.), agentes antimicrotubulares (por exemplo, vincristina, vinblastina, colquicina, taxanos (tais como paclitaxel e docetaxel), etc.), agentes alquilantes (por exemplo, ciclofosfamida, melfalano, biscloroetilnitrosureia (BCNU), etc.), agentes de platina (por exemplo, cisplatina (também designados por cDDP), carboplatina, oxaliplatina, JM-216, CI-973, etc.), antraciclinas (por exemplo, doxorubicina, daunorrubicina, etc.), antibióticos (por exemplo, mitomicina-C), inibidores da topoisomerase (por exemplo, etoposídeo, teniposídeo e camptotecinas), ou outro citotóxicos, tais como ricina, toxina da difteria (DT), exotoxina de *Pseudomonas* (PE) A, PE40, abrina, saporina, proteína viral de *Phytolacca*, brometo de etídio, glicocorticoide, toxina de antraz e outros. Ver, por exemplo, a patente US 5,932,188.

Os mAb específicos de IL-1 α humana também podem ser conjugados num marcador detetável. Os marcadores detetáveis que podem ser empregues na presente invenção compreendem biotina ou estreptavidina, esferas magnéticas, corantes fluorescentes (por exemplo, isotiocianato de fluoresceína, *texas red* (vermelho texas), rodamina, proteína fluorescente verde e semelhantes), radiomarcadores (por exemplo, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , ^{32}P , ^{111}In , ^{97}Ru , ^{67}Ga , ^{68}Ga ou ^{72}As), substâncias radio-opacas, tais como metais para radioimagem, agentes paramagnéticos para imagiologia de ressonância magnética, enzimas (por exemplo, peroxidase de rábano, fosfatase alcalina e outros usualmente utilizados num ELISA), e marcadores colorimétricos, tais como ouro coloidal, ou esferas de vidro colorido ou de plástico (por exemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.). Os meios para detetar esses marcadores são bem conhecidos dos especialistas da técnica. Por conseguinte, por exemplo, os radiomarcadores podem ser detetados utilizando película

fotográfica ou contadores de cintilação. Também se pode empregar marcadores fluorescentes e os mesmos podem ser detetados utilizando um fotodetector para detetar a luz emitida. Os marcadores enzimáticos são tipicamente detetados ao fornecer a enzima com um substrato e ao detetar o produto de reação originado pela ação da enzima no substrato, e os marcadores colorimétricos são detetados pela simples visualização do marcador colorido.

A presente invenção também compreende moléculas de ácidos nucleicos que codificam mAbs totalmente humanos, específicos da IL-1 α humana, como definido nas reivindicações. Embora a mesma molécula de ácidos nucleicos possa codificar tanto as cadeias pesadas como leves de um mAb específica de IL-1 α humana, também se pode utilizar duas moléculas de ácidos nucleicos diferentes, uma que codifica a cadeia pesada e outra que codifica a cadeia leve. As sequências de aminoácidos de três mAbs IgG1 específicos da IL-1 α humana encontram-se apresentadas no presente documento. Ver as SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9 e 11. Os exemplos de moléculas de ácidos nucleicos que codificam estas sequências de aminoácidos também se encontram descritos no presente documento. Ver as SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10 e 12. Também se pode utilizar qualquer outro ácido nucleico apropriado que codifica as sequências de aminoácidos dos dois mAbs IgG1 descritos ou outros mAbs no âmbito da invenção.

Com vista à produção de mAbs, as moléculas de ácidos nucleicos da invenção podem ser incorporadas num vetor de expressão, com uma orientação em que essas moléculas de ácidos nucleicos fiquem ligadas operacionalmente às sequências de controlo de expressão, tais como sequências de controlo transcricionais e translacionais. Os exemplos de vetores de expressão compreendem vetores derivados de

plasmídeos e vetores derivados de vírus, tais como adenovírus, vírus adenoassociados e retrovírus. As moléculas de ácidos nucleicos que codificam uma cadeia leve e uma cadeia pesada podem ser incorporadas num único vetor ou em vetores diferentes. Os vetores da invenção também poderão compreender sequências reguladoras, tais como promotores e/ou ampliadores (ver as patentes US 5,168,062, patente US 4,510,245 e patente US 4,968,615), marcadores selecionáveis ou sequências que codificam marcadores de afinidade (para facilitar a purificação) ou um marcador detetável.

Com vista à produção de mAbs, os vetores da invenção podem ser introduzidos numa célula hospedeira apropriada, como, por exemplo, uma célula procariótica como uma bactéria ou, preferencialmente, uma célula eucariótica, como uma célula hospedeira de mamífero, vegetal ou de levedura. Os exemplos de métodos para introduzir polinucleótidos heterólogos nas células hospedeiras compreendem a utilização de vetores virais, electroporação, encapsulamento do(s) polinucleótido(s) em lipossomas, transfecção mediada por dextrano, precipitação de fosfato de cálcio, transfecção mediada por polibreno, fusão de protoplastos, transformação mediada por agrobactéria, transformação biolística, e microinjeção direta do ADN nos núcleos. As linhas celulares de mamífero são atualmente preferidas para a expressão dos mAbs a partir de vetores. Os exemplos de células hospedeiras de mamífero compreendem células dos ovários de hamster chinês (*Chinese hamster ovary cells*) (CHO) (por exemplo, a linha celular DG44 CHO), células HeLa, células renais de hamster bebé (*baby hamster kidney cells*) (BHK), células renais de macaco verde africano (*African green monkey kidney cells*) (COS), células do carcinoma hepatocelular humano (por exemplo, Hep G2), células NS0, células SP2, células HEK-293T, células 293 Freestyle, e

células NIH-3T3. Os mAbs da invenção também poderão ser expressos em animais ou plantas transgênicos. Ver, por exemplo, as patentes US 5,827,690; 5,756,687; 5,750,172; 5,741,957; 6,046,037; e 5,959,177.

A revelação descreve um método para detetar uma célula que expressa a IL-1 α humana numa amostra, ao fazer contactar a célula com um mAb específico da IL-1 α humana e ao detetar o mAb ligado à célula. A invenção disponibiliza igualmente um método para matar uma célula que expressa a IL-1 α humana, ao fazer contactar a célula com um mAb específico da IL-1 α humana. Isso pode ser conseguido por morte mediada pelo complemento, citotoxicidade de mediação celular dependente de Ab, ou fornecimento mediado por Ab de uma citotoxina. O Abs descrito no presente documento também deu provas de poder ser empregue noutros métodos. Por exemplo, o MABp1 reduziu ICAM1 induzido pela IL-1 α e a expressão de E-selectina em células endoteliais. O MABp1 também deu provas de ser empregue em imunoenaios para detetar e quantificar a IL-1 α numa amostra biológica.

EXEMPLOS

Exemplo 1- Clonagem de IgG1 anti-hIL-1 α e cadeias Kappa

As sequências de cadeia pesada de região variável (V-HC) e de cadeia leve de região variável (V-LC) foram sintetizadas geneticamente utilizando a informação de sequências de aminoácidos constantes da patente US 5,959,085. A V-HC foi amplificada por PCR introduzindo *loci* HindIII/Clal a montante do códon de iniciação ATG e um *locus* NheI na terminação 3'. A região constante de IgG1 de linha germinal humana (inclusive exões e intrões) foi amplificada por PCR, modificando os dois tripletos 5' que codificam os primeiros dois aminoácidos Ala-Ser num *locus* NheI, e introduzindo um

locus BamHI na terminação 3'. A sequência de aminoácidos da região constante de IgG1 da linha germinal humana correspondia à Swiss-Prot entry P01857, à exceção de uma troca de K171Q e de V261L. A V-HC e a sequência de IgG1-HC constante foram ligadas utilizando o *locus* NheI e foram clonadas no pcDNA3 utilizando os *loci* HindIII e BamHI.

>hIL-1a-IgG1-HC

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFTFSMFG
 VHWVRQAPGKGLEWVA AVSYDGSNKYYAESVKGRFTISRDN SKNILFLQMD
 —SLRLEDTAVYYCARGRPKVVIPAPLAHWGQGTLVTFSSASTKGPSVFPLAPSS
 KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
 VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAQTK
 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
 PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIALEWESNGQPENNYKTP
 PVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
 (SEQ ID NO:1)

>hIL-1a-IgG1-HC

atggagttcgggctgagttgggtgttcctgggtggctctgctgcggggcgtgcagtgccaggtgcagctggaggagagtg
 gggtggcgtggtgcagcctggccggtctctgcgcctgtctgcactgcctccggtttacctttctatgtttggtgtgcactgg
 gtgcgccaggtccccggcaaggactggaatgggtggccgccgtgagttacgacgggtccaacaaatattacgctgaga
 gctgaaaggcagattcaccatcagcagagataattccaagaatattctgttctgcagatggacagctctgagactggagg
 aactgctgtgtactactgcgctcgtggacgccctaagggtggtcatccccgccccctggcacattggggccaggaactc
 tggtagacctttctagcgttagcaccaggccatcggctttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggca
 cagcggccctgggtgcttggtaaggactactccccgaaccgggtgacgggtgctgtggaactcaggcgcctgaccag
 cggctccacacctccccgggtgtcctacagcctcaggactctactccccagcagcgtagtgaccgtgccctccagcag
 cttgggacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaagggtggacaagaaagttgagccaaa
 tctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcactgaactcctggggggaccgtcagcttctctccccccaa
 aacccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgagggtcacatgcgtggtgggtggacgtgagccacgaagaccctga

ggccaagttcaactggtacgtggacggcgtggagggtgcataatgccagacaaagccgcgggaggagcagtacaacag
cacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctcca
acaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccc
tcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtaaaaggtcttatcccagcgacatc
gccctggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctcc
ttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtttctcatgctccgtgatgatgag
gctctgcacaaccactacacgcagaagacgctctccttaagtccgggaaaataa (SEQ ID NO:2)

Amplificou-se a V-LC por PCR introduzindo *loci* HindIII/Clal a montante do códon de iniciação ATG e um *locus* BsiWI na terminação 3'. A sequência Kappa-LC constante humana foi amplificada por PCR introduzindo um *locus* 5' BsiWI que codifica uma Arg adicional e os primeiros aminoácidos Thr, e um *locus* BamHI na terminação 3'. A sequência de aminoácidos Kappa-LC constante humana correspondia à Swiss Prot entry P01834. As V-HC e sequências Kappa-LC constantes foram ligadas utilizando o *locus* BsiWI e foram clonadas no pcDNA3 utilizando *loci* HindIII e BamHI.

>hIL-1a-K-LC

MDMRVPAQLLGLLLWFPGRCDIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISS
WLAWYQQKPGKAPKLLIYEASNLETGVPSRFSGSGSGSDFTLTISSLQPEDFA
TYQCQTSSFLSFGGGTKVEHRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC [SEQ ID NO:3]

>hIL-1a-K-LC

atggacatgcgcgtgcccgccagctgctggggctgctgctgctgtggtccctggatctaggtgcgacattcagatgacc
cagtccccagctcagtgctcagcctccgtgggagacagagtgacaatcacctgccgcgctctcaggggaatctctagttg
ctggcctggtaccagcagaagcctggaaaggcccccaagctgctgatctatgaagcctcaacctggagaccggcgtgc
cctctcgttcagcggctcaggctcaggcagtgatttactctgaccatcagctccctgcagccagaggatttcgctacttact
actgccagcagaccctctccttctgctgtccttcgggggagggcacaaggtggagcaccgtacgggtggctgcaccatctg
tcttcacttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataactctatcccagaga
ggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgctcagagcaggacagcaa
ggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaacacaaagtctacgcctgcga
agtcacccatcagggcctgagttcaccggtgacaaagagcttcaacaggggagagtgtag[SEQ ID NO:4]

Exemplo 2- Produção de IgG1 NATHMAB-hIL-1a e cadeia Kappa

A sequência completa que codifica a cadeia pesada de NATHMAB-hIL-1a/IgG1 foi sintetizada geneticamente. A sequência V-HC correspondia à sequência de aminoácidos descrita na patente US 5,959,085. A sequência da IgG1-HC constante humana correspondia à Swiss-Prot entry P01857. A sequência de nucleótidos foi otimizada com códon com vista à expressão em células CHO. Adicionou-se uma sequência Kozac (gccacc) a montante do ATG inicial.

>NATHMAB-hIL-1A-IGG1-HC

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFTFSMFG
 VHWRQAPGKGLEWVAASVYDGSNKYYAESVKGRETISRDNKNILELQMD
 SLRLEDTAVYYCARGRPKVVIPAPLAHWGQGLVTFSSASTKGPSVFPLAPSS
 KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
 VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGPP
 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
 PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
 PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
 [SEQ ID NO:5]

>NATHMAB-hIL-1A-IGG1^{HC}

gccaccatggagtttggtctgtcctgggtgttcttggtggctctgctgaggggggtgcagtgccaggtccagctggtggagt
 ctggtgggggagtggtgcagcctgggagatctctgcggctgtcttgactgcctctggttcacttctctatgtttggtgtgca
 ttgggtcaggcaagcaccaggcaaggactcgagtggtgcagctgtgagctatgacgggtcaacaaatattacgctg
 agtctgtcaaggtaggttaccatcagccgggataattccaaaatatcctgttctgcaaatggactctctgaggctggaa
 gatactgcagctactattgtgcaagggggaggccaaaggtggtgatccccgctccccctgctcactggggacagggaac
 cctggtgacttccagctctgctagcaccaggccctagcgtgtccattggctcctcctccaaatctacttctggaggcac
 cggccctgggatgtctcgtgaaagattatttctgagcccgctaccgtgagctggaacagcggcgccctgactagcgg
 cgtgcacaccttcccgcagtgctgcaatctagcgggctgtactccctgagctctgtcgtgaccgtgccctccagcagcctc
 ggaactcagacctacatctgcaatgtcaatcataaacctctaataccaaagtcgataagaagtcgaacctaaatcttgcga
 taaaaccatacctgccccctgcccagcaccggaactgtggcggtccctctgtgttctgttccccccaaacccaaa
 gataccctgatgatctctaggacccccgaggtcacttgtcgtggtggatgtgtccacgaagatccagaagtc aaattca

actggtatgtggacggggtcgaagtgcacaacgcaaagaccaagcctagggaggaacagtataatagcacatataggtt
 ggtcagcgtcctgaccgtcctgcatcaggactggctgaatggcaaagaataaagtgtaaagtgtccaacaaggccctgcc
 agccccaatcgaaaagacaatctctaaagccaaggggcaaccccggaacctcaggtctatacactgccaccctctcgg
 gatgaactgaccaagaatcaggtgagcctgacatgtcttgaagggttttatccctccgacattgccgtggagtgggaga
 gcaatggacaaccagaaaataactacaaaaccacccccctgtgctggactccgatggctcctctctactctactctaaagctg
 acagtgataagtctaggtggcagcaggggaatgtgtctctctctgtgatgcacgaggcactgcacaatcattatacac
 aaaagtctctgtctctgtctccaggaaagtaa [SEQ ID NO:6]

A sequência completa que codifica a cadeia leve NATHMAB-hIL-1a/Kappa foi geneticamente sintetizada. A sequência V-LC correspondia à sequência de aminoácidos descrita na patente US 5,959,085. A sequência Kappa-LC constante humana correspondia à Swiss-Prot entry P01834. A sequência de nucleótidos foi otimizada por códon com vista à expressão em células CHO. Adicionou-se uma sequência Kozac (gccacc) a montante do ATG.

>NATHMAB-hIL-1A-K-LC

MDMRVPAQLLGLLLLWFPGRCDIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISS
 WLAWYQQKPGKAPKLLIYEASNLETGVPSRFSGSGSGSDFTLTISLQPEDFA
 TYYCQQTSSFLLSFGGGTKVEHTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
 YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
 VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC [SEQ ID NO:7]

NATHMAB-hIL-1A-K-LC

gccaccatggacatgcgcgttctgccagctcctcggactgctgctgctttgggtcccaggctcccgggtgatattcag
atgacacagctccctcctccgtatctgcatccgtgggcgacagggtcacaatcacttgtagggccagccaggggatctc
tagttggctcgcgatggtaccaacaaaagccaggtaaggctccgaaactgctcattfacgaagctagtaacctcgaacag
gctgccaagccgggttagcggctccgggtccgggtctgacttcaccctcactatttcctcctgcaacctgaggatttggc
acatattactgtcagcaaaacttcttcttctgctctcctttgggtgggggaactaagggtggagcacacagtgccgccccca
gctctttatcttcccccaagcgatgaacagctgaagtcagggaccgccagcgtggctgcctgctcaataatftttacc
tcgcgaggctaaggccaatggaaagtggataacgccctccagagcggtaactctcaggagtctgtcacagagcaaga
cagcaaggatagcacctattccctctccagcacctgacactgtctaaggccgactacgagaaacacaaaagtgtacgctt
gtgaggtgactcaccagggactgagtagccctgtgacaaaacttcaataggggagaatgctga [SEQ ID
NO:8]

Exemplo 3 - Expressão de NATHMAB-IL1-a (subtipo IgG1/k)

A NATHMAB-IL1 α foi expressa e purificada utilizando um método de transfecção transiente. Sujeitou-se o sobrenadante de cultura de células ou Ab purificado por afinidade de proteína G a maior análise, como abaixo descrito. Fez-se a cultura de células renais embrionárias humanas (*Human embryonic kidney cells*) (HEK) 293T em DMEM contendo FCS a 10%, e as mesmas foram transfectadas transientemente utilizando reagente jetPEI (Polyplus) de acordo com o protocolo do fabricante. Fez-se a cultura das células em placas de 10 cm (3×10^6 células por placa de 10 cm) 24 h antes da transfecção, para atingir uma densidade de aproximadamente 50% no ponto de transfecção. Utilizou-se 5 μ g por placa de pcDNA3-anti-hIL-1 α -IgG1-HC e o dobro de excesso molar de pcDNA3-anti-hIL-1 α -Kappa para transfecção. Após recuperação, mudou-se o meio para DMEM contendo FCS a 2% (10 mL por placa) e colheu-se AD durante 5 a 6 dias. Recolheu-se o sobrenadante, filtrou-se, ajustou-se o valor de pH para 7,5 8, e armazenou-se nos 4°C até posterior utilização.

Incubou-se parte do sobrenadante (250 mL) com sefarose de proteína G (*protein G sepharose*) (GE Healthcare) durante 3 h nos 4°C numa roda rotativa. Em seguida, carregou-se a sefarose de proteína G numa coluna de gravidade e lavou-se com PBS. Eluiu-se o Ab em frações de 1 mL utilizando glicina 100 mM/NaCl 150 mM em Tris 100 µL (pH de 8), a que se seguiu diálise com PBS contendo glicerol a 10%. Mediu-se a concentração de proteína total de cada fração utilizando o BCA Protein Detection Kit (Pierce). O tamanho correto das cadeias pesadas e leves e do Ab nativo montado foi confirmado por SDS-PAGE.

Testou-se o sobrenadante contendo Ab NATHMAB-hIL-1α purificado e lisados celulares de Triton X-100 de células HEK 293T produtoras, relativamente a ligação a antigénio num radioensaio (RIA) utilizando ¹²⁵I-hIL-1α. Ensaiou-se a ligação por meio de absorção em proteína G. Todas as amostras ligavam ¹²⁵I-hIL-1α com a maior atividade no eluato. A ligação da NATHMAB-hIL-1α purificada numa concentração de 0,012% (atividade semimáxima em RIA) a ¹²⁵I-hIL-1α foi utilizada para medir o coeficiente de afinidade. O K_a de NATHMAB-hIL-1α sob estas condições era de $3,03 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$. O recálculo revelou uma concentração estimada de aproximadamente 30 µg/mL de IgG anti-hIL-1α ativa no eluato purificado.

Testou-se a atividade neutralizante da NATHMAB-hIL-1α num bioensaio utilizando a sublinha EL4-6.1 murina, que produz níveis elevados de IL-2 ao ser tratada com IL-1α murina ou humana (Zubler et al., *J. Immunol.* 134:3662-3668, 1985). Incubou-se as concentrações indicadas de NATHMAB-hIL-1α (eluato) durante 30 min nos 37°C com diversas concentrações de hIL-1α recombinante (eBioscience) num volume final de 100 µL/poço numa placa de cultura de 96 poços (de fundo plano). Realizou-se cada ponto em triplicado e em meio de

cultura (DMEM, FCS 5%). Adicionou-se a cada poço 100 µL de uma suspensão de células ELA-6.1 (5×10^5 células/mL) em meio de cultura contendo 0,2 µg/mL de ionomicina. Após incubação durante 24 h nos 37°C numa incubadora de CO₂ a 5%, colheu-se os sobrenadantes celulares livres e fez-se o seu ensaio relativamente a concentrações de IL-2 utilizando um ELISA disponível no mercado (R&D Systems). Os resultados mostravam que a NATHMAB-IL-1α neutralizou eficazmente a secreção de IL-2 hIL-1α-induzida pelas células EL-4.

De modo a testar a neutralização de hIL-1α de ligação a membrana, utilizou-se o mesmo ensaio de base celular EL-4 como acima descrito com as seguintes modificações. Incubou-se diferentes concentrações de NATHMAB-hIL-1α (eluato) com diversas quantidades de monócitos ativados humanos. Com vista à preparação dos monócitos, isolou-se PBMC de crosta inflamatória utilizando centrifugação Ficoll-Paque. Deixou-se que os monócitos aderissem durante 1,5 h nos 37°C em RPMI em placas de plástico. Removeu-se por lavagem os linfócitos não aderentes para dar origem a uma cultura de monócitos quase pura. Fez-se a cultura dos monócitos em RPMI contendo Gln, Pyr e FCS a 10% durante 24 h com LPS (1 µg/mL) nos 37°C numa incubadora de CO₂ a 5%. As células foram desprendidas com PBS/EDTA 2 mM, foram raspadas com cuidado das placas, e foram transferidas para tubos Falcon. As células foram lavadas duas vezes com PBS, foram ressuspensas em PBS/PFA 1% e foram fixadas durante 10 min nos 20°C. As células foram lavadas com tampão glicina (glicina 150 mM, NaCl 75 mM, pH de 7,4), depois com meio de cultura e foram contadas. Os resultados mostravam que a NATHMAB-hIL-1α neutralizava com eficácia a secreção de IL-2 por células EL-4, induzida pela hIL-1α de ligação membranar. Numa experiência semelhante à acima descrita, testou-se a NATHMAB-hIL-1α relativamente à neutralização de IL-1α murina. Incubou-se as quantidades indicadas de

sobrenadante de NATHMAB-hIL-1 α com IL-1 α recombinante humana (h) ou murina (m) (eBioscience). O sobrenadante contendo a IL-1 α humana neutralizada com Ab, mas não murina.

Exemplo 4- Morte mediada por Ab de células cancerígenas

Células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC), isoladas da crosta inflamatória por meio de preparação de Ficoll Paque padrão, foram incubadas em RPMI-1640 CM ou RPMI-1640-CM contendo rhIL-2 (30 ng/mL, ebioscience) nos 37°C e com CO₂ a 5% durante a noite e foram empregues como células efetoras (E). Utilizou-se células THP1 como alvos (T). Realizou-se o ensaio em placas de 96 poços com cada ponto em triplicado. Após 1×10^4 alvos, que foram incubados com diferente concentração de MABp1 durante 15 min, adicionou-se células efetoras numa relação ET de 25:1 e 50:1 para 1×10^4 alvos e incubou-se durante mais 4 horas. Transferiu-se 75 μ L de volume de ensaio para uma nova placa de 96 poços e ensaiou-se a citotoxicidade com o kit de detecção de citotoxicidade *LDH cytotoxicity detection kit* (Roche) de acordo com o protocolo do fabricante. A % de lise específica= (libertação experimental média-libertação espontânea média sem anticorpo) \times 100/(libertação máxima média dos alvos-libertação espontânea média dos alvos) A. Utilizou-se PBMC não tratadas como células efetoras. B. Utilizou-se PBMC tratadas com rhIL-2 como células efetoras. Nos dois casos, concentrações crescentes (1,25 a 20 μ g/mL) de MABp1 tiveram por resultado uma maior morte de células alvo (até cerca de 90%) com ambas as relações de ET.

Exemplo 5- Sequências de mAB específicas anti-IL1 α humana.

A sequência completa que codifica outra anti-hIL-1aIgG₁/cadeia leve Kappa humana específica da IL1 α humana

(MABp1) foi sintetizada e expressa como acima descrito. Nos ácidos nucleicos que codificam as cadeias leves e pesadas, adicionou-se uma sequência Kozac (gccacc) a montante do ATG inicial.

Cadeia pesada

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFTFSMFG
 VHWVRQAPGKGLEWVAAVSVDGSKNYAESVKGRFTISRDNKNILFLQMD
 SLRLEDTAVYYCARGRPKVVIPAPLAHWGQGLVTFSSASTKGPSVFPLAPSS
 KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
 VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELGGP
 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
 PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
 PVLDSDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
 [SEQ ID NO:9]

gccaccatggagtttggctctgctcctgggtgttcttgggtgctctgctgaggggggfgcagtgccaggtccagctggaggagt
 ctgggtgggggagtggtgcagcctgggagatctctgctgctgctgctgactgcctctggtttcactttctctatggttgggtgta
 ttgggtcaggcaagcaccaggcaaggactcagtggtgctgcagctgtgagctatgacgggtctaacaatattacgctg
 agtctgtcaagggtaggtttaccatcagccgggataaattcaaaaatattcctgttctgcaaatggactctctgaggctggaa
 gatactgcagctactattgtcaagggggaggccaaagggtggtgatccccgctccccctgctcactggggacaggggaac
 cctggtgactttcagctctgctagcacaagggcctagcgtgtccattggctccttctccaaatctactctgaggcac
 cgccgcccctgggatgtctcgtgaaagattatttctgagcccgtaaccgtgagctggaacagcggcgcctgactagcgg

cggtcacacctttcccgcagtgctgcaatctagcgggctgtactccctgagctctgtcgtgaccgtgccctccagcagcctc
 ggaactcagacctacatctgcaatgtcaatcataaacctctaatacacaagtcgataagagggtcgaacctaactcttgcg
 ataaaaccatacctgccccctgcccagcaccgaactgctggggggtccctctgtgttctgttccccccaaacccaa
 agataccctgatgatctctagaccctggagtcactgtgtcgtggtggatgtgtcccacgaagatccagaagtcacaatc
 aactggtatgtggacggggcgaagtgcacaacgcaaagaccagcctaggagggaacagtataatgacacatataggg
 tggcagcgtcctgaccgtcctgcatcaggactggctgaatggcaagaatataagttaaagtgtccaacaaggcctgc
 cagccccaatcgaagacaatctctaaagccaaggggcaaccccggaacctcaggtctatacactgccaccctctcgg
 gaggaatgaccaagaatcaggtgagcctgacatgtctgtgaagggttttatccctccgacattgccgtggagtgggaga
 gcaatggacaaccagaaaataactacaaaaccacccccctgtgctggactccgatggttcttcttctactctaagctg
 acagtgataagtctaggtggcagcaggggaatgtgttctcctgctctgtgatgcacgaggcactgcacaatcattatacac
 aaaagtctctgtctctgtctccaggaaagtaa [SEQ ID NO:10]

HBS-EP numa gama de teste de 100 nM a 0,05 nM. O débito era de 30 μ L/min. Registou-se os dados de dissociação para cada diluição de citocinas durante 15 minutos. A superfície do CM5 foi regenerada após cada ciclo utilizando uma única injeção de MgCl_2 3 M durante 25 segundos com um débito de 30 μ L/min. Empregou-se o software BiaEvaluation e um modelo de ligação Langmuir para ajustar os dados. Determinou-se que o K_D para MABp1 era inferior a $2,0 \times 10^{-10}$ M.

Exemplo 7 - O MABp1 inibe a invasão de células tumorais numa matriz de membrana basal.

A matrigel (BD), uma matriz de membrana basal, foi descongelada nos 4°C durante a noite e o diluído (5 mg/mL para 1 mg/mL) em meio de cultura celular frio sem soro. Colocou-se 100 μ L da matrigel diluída nas câmaras superiores de um transwell de 24 poços (Costar) e incubou-se o transwell nos 37°C durante pelo menos 4 a 5 h com vista à gelificação. Fez-se a colheita de células tumorais (MDA-MB-231 e THP-1) a partir de frascos de cultura de tecido por meio de tripsina/EDTA, lavou-se com meio de cultura, e ressuspendeu-se em meio contendo FBS a 1% com uma densidade de 1×10^6 células/mL. A matrigel gelificada foi lavada com cuidado com meio de cultura sem soro aquecido, e adicionou-se 100 μ L da suspensão de células em cada poço. A câmara inferior do transwell foi enchida com 600 μ L de meio de cultura, e incubou-se as placas nos 37°C durante 12 a 24 h. As células que não invadiram a matrigel foram raspadas com cuidado do topo de cada transwell com um cotonete. Depois removeu-se os transwells das placas de 24 poços e corou-se com violeta de cristal após fixação das células invadidas com metanol ou etanol a 70%. As células invadidas foram contadas ao fotomicroscópio. A percentagem de células que invadiram a matrigel foi inibida de modo significativo na presença de MABp1.

Exemplo 8 - O MABp1 bloqueia o aumento da expressão de ICAM1 em células endoteliais.

Fez-se a cultura de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) (BD Biosciences) em placas de 24 poços com 5×10^5 por poço em 1 mL de meio M-200, suplementado com suplemento de crescimento de baixo soro, *low-serum growth supplement* (Invitrogen). Deixou-se as células repousar durante 3-4 horas. Aspirou-se o meio e adicionou-se mais 1 mL de M-200 por poço. Adicionou-se MABp1 diretamente às células @ 4,26 $\mu\text{g/mL}$, coincubou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente e, depois, adicionou-se IL-1 α humana recombinante (rhIL1A, eBioscience) para uma concentração final de 40 pg/mL. Poços de controlo positivos receberam a adição apenas de IL-1 α . As células HUVEC na ausência de IL-1 α ou na ausência de MABp1 serviram de controlos negativos. Passadas 17-20 horas de incubação nos 37°C, CO₂ a 5%, levantou-se as células das placas por meio de um tratamento não enzimático durante 20 minutos, utilizando reagente Cellstripper (Cellgro Mediatech) e ensaiou-se depois de imediato relativamente à expressão de CD54 (ICAM-1), utilizando protocolos de citometria de fluxo padrão. O tampão corante continha PBS da Dulbecco suplementado com soro bovino fetal termodesativado a 2%. Empregou-se CD54 (ICAM-1) mAb anti-humano murino PE-conjugado (eBioscience, clone HA58) ou um controlo de isotipo IgG1k murino PE-conjugado (eBiociencia, #12-4714) de acordo com as instruções do fabricante, para corar células HUVEC num volume corante de 100 microlitros durante 20 minutos no escuro à temperatura ambiente. Realizou-se subsequentemente duas lavagens em tampão corante e depois colheu-se amostras num citómetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences). Entre várias experiências independentes (n=5) neutralizou-se o aumento de moléculas de adesão ICAM-1 induzido por rhIL1A na superfície de células HUVEC através de MABp1, para

níveis basais apresentados pelas células HUVEC não estimuladas.

Exemplo 9 - O MABp1 bloqueia o aumento da expressão da E-selectina em células endoteliais.

À semelhança dos seus efeitos na indução de ICAM-1, também se observou neutralização mediada por MABp1 da indução de CD62E (E-selectina) em células HUVEC. Este efeito era mais pronunciado quando as células HUVEC não eram estimuladas por rhIL-1a solúvel, mas por IL-1 α membranosa ancorada por glicosil-fosfatidilinositol à superfície de células DG44 CHO (células GPI-IL1A). Neste experiência, fez-se a cocultura de culturas confluentes de células HUVEC em placas de 6 poços durante a noite com 5×10^6 células GPI-IL1A DG44 em meio M-200, seja por si só, na presença de 10 μ g/mL de MABp1, ou na presença de 10 μ g/mL de Ab de controlo isotipo D5. Passadas 17-20 horas, lavou-se monocamadas HUVEC extensivamente com PBS da Dulbecco e depois elevou-se por tratamento não enzimático durante 20 minutos com reagente Cellstripper (Collgro Mediatech) e sujeitou-se de imediato a ensaio da expressão de CD62E (E-selectina), utilizando protocolos de citometria de fluxo padrão. O tampão corante continha PBS da Dulbecco suplementado com soro bovino fetal a 2% termodesativado. Empregou-se CD62E mAb anti-humano murino PE-conjugado (eBioscience, clone P2H3) ou um controlo de isotipo IgG1k murino PE-conjugado (eBiociencia, clone P3) de acordo com as instruções do fabricante, para corar células HUVEC num volume corante de 100 microlitros durante 20 minutos no escuro à temperatura ambiente. Realizou-se seguidamente duas lavagens em tampão corante e depois adquiriu-se amostras num citómetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences). A expressão aumentada de E-selectina na superfície de células HUVEC, induzida por GPI-IL-1a

membranosa, foi neutralizada por MABp1 para níveis basais apresentados por células HUVEC não estimuladas.

Exemplo 10 - Bioensaio de MRC-5 relativamente à potência do MABp1 (neutralização de rhIL1A)

Obteve-se a linha celular MRC-5, derivada de fibroblastos de pulmão humano fetal a partir da coleção ATCC (CCL-171). Ensaiou-se a potência de neutralização da IL-1 do MABp1 através da medição da libertação, induzida pela IL-1a, da IL-6 de células MRC-5. Fez-se a cultura de células MRC-5 com 5×10^3 por poço numa placa de 96 poços em 100 microlitros de meio completo DMEM. Fez-se a cultura das células durante a noite nos 37°C numa incubadora de CO₂ a 5% humidificada. Fez-se subsequentemente a cultura de células MRC-5 confluentes durante mais 24 horas com 20 pg/mL de IL-1A humana recombinante (rhIL1A, eBioscience), seja por si só ou na presença de concentrações crescentes de MABp1. As células de controlo negativas não foram estimuladas com rhIL1A. Passadas 24 horas, colheu-se os sobrenadantes e ensaiou-se os mesmos relativamente à libertação de IL-6, utilizando um IL-6 ELISA kit da eBioscience. O IC₅₀, ou a concentração de MABp1 necessária para uma inibição de 50% da libertação de IL-6 máxima, era de 0,001-0,01 µg/mL.

Exemplo 11 - O MABp1 identifica IL-1a+ Células.

Cem microlitros de sangue inteiro anticoagulado com heparina de sódio foram aliquoteados para tubos FACS de poliestireno. Incubou-se amostras à temperatura ambiente durante 15 minutos com 1 mg de IgG humana (purificada com proteína A) mais 2 mL de soro bovino fetal termodesativado para bloquear os recetores Fc. Depois adicionou-se Abs primários à amostra: 1 mg de MABp1 marcado com Alexa-488, 1

mg de IL1A Ab humano anti-membrana monoclonal marcado com FITC (FAB200F, R&D Systems), ou 1 mg de um controlo de isotipo murino (IC002F, R&D Systems). Incubou-se Abs primários com amostra durante 30 minutos à temperatura ambiente no escuro. Depois ocorreu a lise dos eritrócitos de amostra (solução BD Biosciences PharmLyse) à temperatura ambiente durante 15 minutos, centrifugou-se com 300 x g durante 5 minutos, e aspirou-se. Lavou-se peletes de amostra três vezes com 1 mL de solução salina equilibrada Hank (*Hank's balanced salt solution* - HBSS) contendo soro bovino fetal termodesativado a 2%. A amostra foi ressuspensa em 0,3 mL de HBSS + FBS a 2% e colheu-se dados num citómetro de fluxo FACSCalibur e os mesmos foram analisados com o software CellQuest. Análise de citometria de fluxo de PBMC humanas utilizando MABp1 mostrou que apenas 0,2% das PBMC eram positivas para IL-1 α .

Exemplo 12 - MABp1 para detetar e rastrear infeções e inflamação.

A análise por citometria de fluxo (como no Exemplo 11) de PBMC humanas, utilizando MABp1, mostrou um aumento de 3,6 vezes da percentagem de PBMC positivas para IL-1 α num sujeito com uma infeção subclínica, em comparação com um controlo normal. De modo semelhante, num sujeito com um dente do siso inflamado, um aumento da percentagem de PBMC positivas para IL-1 α ⁺. Observou-se uma diminuição substancial do número de IL-1 α ⁺ PBMC 14 a 45 dias após a remoção do dente do siso.

Exemplo 13 - Imunoensaio para detetar e/ou quantificar a IL-1 a.

Em geral, níveis muito baixos de IL-1 α encontram-se presentes no plasma de sujeitos humanos. Dado que estes

níveis se encontram com frequência além do limiar de detecção de imunoenaios convencionais, desenvolveu-se um ELISA com sensibilidade melhorada. Neste ELISA, pode adicionar-se Ab anti-IL-1 α exógeno (por exemplo, MABp1) a uma amostra biológica a ser testada (por exemplo, plasma humano), sob condições que permitem que o Ab ligue IL-1 α na amostra. Visto se ter observado que quase toda a IL-1 α nas amostras de plasma humano já se encontra ligada ao Ab anti-IL-1 α endógeno, é possível com frequência omitir a última etapa. A amostra com complexos de IL-1 α -Ab é depois aplicada a um filtro (equipamento de centrifugação Amicon) com uma separação do peso molecular de cerca de 100 kDa, de modo a separar os complexos de IL-1 α -Ab das moléculas na amostra inferiores ao valor de separação do peso molecular. Numa experiência, isto teve por resultado uma concentração de 50 vezes. Depois adicionou-se a amostra processada (e diluições da mesma) a poços de uma placa de microtítulo revestida com um Ab de captura IgG anti-humano (2 ug/mL de IgG anti-humana murina, específica de Fc, Southern Biotech, referência do produto #9042-01). Depois de se deixar passar tempo para ligar os complexos de IL-1 α -Ab na amostra, lavou-se os poços para remover o material não ligante. Depois adicionou-se um Ab secundário de IL-1 α anti-humano marcado aos poços (0,2 ug/mL de IL-1A Ab anti-humano murino monoclonal biotina-conjugado, clone CRM6, eBioscience, catálogo # 13-7017). Após se deixar passar tempo para ocorrer a ligação a IL-1 α nos poços, lavou-se a placa e quantificou-se a quantidade de IL-1 α anti-humana marcada em cada poço como indicador da concentração de IL-1 α na amostra a ser testada.

Outras execuções

Deverá entender-se que, embora a invenção tenha sido descrita juntamente com uma descrição detalhada da mesma, a

descrição anterior destina-se a ilustrar e não a limitar o âmbito da invenção, o qual é definido pelo âmbito das reivindicações anexas. Outros aspetos, vantagens e modificações encontram-se abrangidos pelo âmbito das reivindicações que se seguem.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal (mAb) IgG1 humano purificado, que se liga especificamente à IL-1 α humana, em que o mAb compreende uma cadeia pesada, ligada por covalência a uma cadeia leve, em que a cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 9 e a cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:11.
2. Conjunto de ácidos nucleicos isolados, compreendendo um primeiro ácido nucleico, que codifica a cadeia pesada de um mAb IgG1 humano, que se liga especificamente à IL-1 α , e um segundo ácido nucleico que codifica a cadeia leve do mAb IgG1 humano, que se liga especificamente à IL-1 α humana, sendo que o primeiro ácido nucleico codifica a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 9 e o segundo ácido nucleico codifica a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:11.
3. Conjunto de ácidos nucleicos isolados de acordo com a reivindicação 2, em que o primeiro ácido nucleico compreende a sequência de nucleótidos da SEQ ID NO: 10 e o segundo ácido nucleico compreende a sequência de nucleótidos da SEQ ID NO: 12.
4. Conjunto de ácidos nucleicos isolados de acordo com a reivindicação 2, em que o conjunto de ácidos nucleicos isolados se encontra dentro de pelo menos um vetor de expressão.
5. Conjunto de ácidos nucleicos isolados de acordo com a reivindicação 3, em que o conjunto de ácidos nucleicos

isolados se encontra dentro de pelo menos um vetor de expressão.

6. Conjunto de ácidos nucleicos isolados de acordo com a reivindicação 2, em que o conjunto de ácidos nucleicos isolados se encontra dentro de pelo menos uma célula hospedeira isolada.
7. Conjunto de ácidos nucleicos isolados de acordo com a reivindicação 6, em que a célula hospedeira é uma célula de mamífero.
8. Célula hospedeira na qual se introduziu ácidos nucleicos isolados, compreendendo um primeiro ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 9 e um segundo ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 11.
9. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 8, em que o conjunto de ácidos nucleicos isolados se encontra dentro de pelo menos um vetor de expressão.
10. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 8, em que a célula hospedeira é uma célula de mamífero.
11. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 10, em que a célula hospedeira é uma célula dos ovários de hamster chinês.
12. Anticorpo monoclonal IgG1 humano, que se liga especificamente à IL-1 α , em que o anticorpo monoclonal compreende a sequência de aminoácidos de uma imunoglobulina produzida pela expressão, numa célula hospedeira de mamífero, de um primeiro ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 9

e um segundo ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 11.

13. Anticorpo monoclonal IgG1 humano de acordo com a reivindicação 12, em que a célula hospedeira de mamífero é uma célula de ovário de hamster chinês.