

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

(22) Data de pedido: 2002.10.26	(73) Titular(es): JANSSEN BIOTECH, INC 800/850 RIDGEVIEW DRIVE HORSHAM, PA 19044 US
(30) Prioridade(s): 2001.11.14 US 332743 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2005.08.17	(72) Inventor(es): JILL GILES-KOMAR US DAVID PERITT US MOHIT TRIKHA US DAVID KNIGHT US
(45) Data e BPI da concessão: 2013.08.21 203/2013	(74) Mandatário: LUÍSA MARIA FERREIRA GUERREIRO PRACETA FERNANDO NAMORA, Nº 7, 3º ESQ. 2820-598 CHARNECA DA CAPARICA PT

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS ANTI-IL-6, COMPOSIÇÕES, MÉTODOS E UTILIZAÇÕES**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A, PELO MENOS, UM NOVO ANTICORPO QUIMÉRICO, HUMANIZADO OU ENXERTADO EM RDC ANTI-IL-6 DERIVADO A PARTIR DO ANTICORPO MURINO CLB-8, INCLUINDO ÁCIDOS NUCLEICOS ISOLADOS QUE CODIFICAM PELO MENOS UM DESTES ANTICORPOS ANTI-IL-6, VECTORES, CÉLULAS HOSPEDEIRAS, ANIMAIS TRANSGÉNICOS OU PLANTAS, MÉTODOS DE PREPARAÇÃO E UTILIZAÇÃO DO MESMO, INCLUINDO COMPOSIÇÕES TERAPÊUTICAS, MÉTODOS E DISPOSITIVOS.

RESUMO

ANTICORPOS ANTI-IL-6, COMPOSIÇÕES, MÉTODOS E UTILIZAÇÕES

A presente invenção refere-se a, pelo menos, um novo anticorpo quimérico, humanizado ou enxertado em RDC anti-IL-6 derivado a partir do anticorpo murino CLB-8, incluindo ácidos nucleicos isolados que codificam pelo menos um destes anticorpos anti-IL-6, vectores, células hospedeiras, animais transgênicos ou plantas, métodos de preparação e utilização do mesmo, incluindo composições terapêuticas, métodos e dispositivos.

DESCRIÇÃO

ANTICORPOS ANTI-IL-6, COMPOSIÇÕES, MÉTODOS E UTILIZAÇÕES

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a anticorpos, incluindo porções ou variantes especificadas, específicos para, pelo menos, uma proteína interleucina-6 (IL-6 também conhecido como interferão $\beta 2$) ou fragmento, bem como ácidos nucleicos que codificam para estes anticorpos anti-IL-6, ácidos nucleicos complementares, vectores, células hospedeiras e métodos de fabrico e utilização dos mesmos, incluindo as formulações terapêuticas, administração e dispositivos

TÉCNICA RELACIONADAS

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina pró-inflamatória, que é produzida por muitos tipos de células diferentes. *In vivo*, os monócitos estimulados, os fibroblastos e as células endoteliais representam as principais fontes de IL-6. Outras células tais como macrófagos, linfócitos T e B, granulócitos, queratinócitos, células masto, osteoblastos, crondrocitos, células gliais, e células do músculo liso também produzem IL-6 após a estimulação (Kishimoto, T., Blood 74:1-10 (1989) e Kurihara, N. et al., J. Immunology 144:4226-4230 (1990)). Muitas células tumorais também produzem IL-6 (Smith, P.C. et al. Cytokine and Growth Factor Reviews 12:33-40 (2001)) e, recentemente, a IL-6 foi indicada para ser um fator prognóstico para a progressão do cancro da próstata (Nakashima, J. et al. Clinical Cancer Research 6:2702-2706 (2000)). A produção de IL-6 pode ser regulada pela própria IL-6 e, dependendo do tipo de célula, a IL-6 pode estimular ou inibir a sua própria síntese.

A IL-6 pode ligar-se ao receptor IL-6 expresso em células B ativadas por mitogénio, células T, monócitos periféricos, e em certos tumores (Ishimi, Y. et al., J. Immunology 145:3297-3303 (1990)). O receptor da IL-6 tem, pelo menos, dois componentes diferentes, e é composto por uma cadeia alfa chamada gp80 que é responsável pela ligação da IL-6 e uma cadeia beta designado gp130 que é necessária para a transdução de sinal (Adebanjo, O. et al., J. Cell Biology 142:1347-1356 (1998) e Poli, V. et al. EMBO 13:1189-1196 (1994)). A família de citocinas que inclui a IL-6, LIF, oncostatina M, IL-11, CNTF, CT-1 e todos os sinais através da gp130 após a ligação aos seus receptores cognatos. Além disso, todos os membros da família de citocinas da IL-6 podem induzir a expressão de proteínas hepáticas de fase aguda (Bellido, T. et al. J. Clin. Investigation 97:431-437 (1996)).

Existem pelo menos duas principais funções biológicas de IL-6: mediação de proteínas de fase aguda e ação como um factor de diferenciação e ativação (Avvisti, G. et al., Baillieres Clinical Hematology 8:815-829 (1995) e Poli, V. et al. EMBO 13:1189-1196 (1994)). As proteínas de fase aguda são conhecidas para regular as respostas imunes, mediar a inflamação, e desempenham um papel na remodelação de tecidos. Como um factor de diferenciação e ativação, a IL-6 induz as células B a diferenciar e segregar anticorpos, induz as células T para se diferenciarem em células T citotóxicas, ativa factores de sinalização celular e promove a hematopoiese (Ishimi, Y. et al., J. Immunology 145:3297-3303 (1990)). A IL-6 está proeminentemente envolvida em muitas funções corporais críticas e processos. Como resultado, os processos fisiológicos, incluindo o metabolismo do osso, a

transformação neoplásica, e as respostas imunes e inflamatórias podem ser melhoradas, suprimidas ou prevenidas pela manipulação da atividade biológica de IL-6 *in vivo*, por meio de um anticorpo (Adebanjo, O. et al., J. Cell Biology 142:1347-1356 (1998)).

Embora a IL-6 esteja envolvida em muitas vias, os ratinhos knockout IL-6 tem um fenótipo normal, são viáveis e férteis, e esses animais mostram uma ligeira diminuição do número de células T e diminuição da resposta a proteínas de fase aguda na lesão do tecido (Kopf M et al, Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice, Nature, 368 (6469):339-42, 1994). Em contraste, os ratinhos transgênicos que sobre expressam a IL-6 desenvolvem doenças neurológicas, tais como a neurodegeneração, astrocitose, vasculogênese cerebral, e estes ratinhos não desenvolvem uma barreira hemato-encefálica (Campbell et al., Neurologic Disease Induced in Transgenic Mice by Cerebral Overexpression of Interleukin 6 PNAS 90: 10061-10065. 1993).

Estudos recentes indicaram que um anticorpo monoclonal contra a IL-6 pode inibir *in vivo* o crescimento de tumores da próstata (Smith, PC e Keller, ET, The Prostate in press e Okamoto, M. et al., Cancer Research 57:141-146 (1997) e carcinoma de células renais (Weissglas, M. et al., The Journal of Urology 153:554-557 (1995)). Em adição a um efeito direto sobre o crescimento do tumor, bloqueando a produção de IL-6 também pode quimio-sensibilizar e aumentar a eficácia citotóxica (Smith, PC et al. Cytokine and Growth Factor Reviews 12:33-40 (2001)). Colectivamente, a literatura ensina-nos que o bloqueio da atividade da IL-6

pode inibir a degradação do osso, o crescimento do tumor e a caquexia do cancro.

Imunoterapia passiva, utilizando anticorpos não-humanos, policlonais (por exemplo, anti-soros) ou monoclonais (Mab) e seus fragmentos (por exemplo, dos próprios produtos de digestão proteolítica) são potenciais agentes terapêuticos que estão a ser desenvolvidos como tratamentos para diversas doenças. No entanto, os anticorpos compostos de porções não-humanas são conhecidos por provocar uma resposta imunitária quando administrados a seres humanos. Esta resposta imunitária torna a administração do anticorpo repetida inadequada para a terapia e pode resultar num complexo imunitário de depuração mediada pelos anticorpos em circulação, reduzindo, assim, o benefício terapêutico para os pacientes. Exemplos de condições que podem ser atribuídas ao repetir a administração de anticorpos compostos por fracções não-humanas são a doença do soro e anafilaxia.

Numa tentativa para evitar estes e outros problemas, uma série de abordagens, incluindo a quimerização e "humanização" foram realizadas para reduzir a imunogenicidade dos anticorpos/fragmentos. Estas abordagens têm produzido anticorpos com imunogenicidade reduzida. Estes anticorpos são substancialmente de origem humana, com apenas as regiões determinantes de complementaridade (CDR) e certos resíduos quadro que a influenciam a conformação CDR a serem de originais não humanos. Os novos anticorpos monoclonais humanos ou humanizados são, portanto, particularmente úteis isoladamente ou em combinação com moléculas existentes para utilizações imunoterapêuticas.

Por conseguinte, existe uma necessidade de proporcionar uma elevada afinidade, neutralizando os anticorpos quiméricos, ou humanos para a IL-6 ou os seus fragmentos que superem uma mais destes problemas, assim como melhoramentos em relação a anticorpos conhecidos ou fragmentos dos mesmos, para utilização na prevenção, tratamento, melhoria, ou para o diagnóstico de condições relacionadas com a IL-6.

Os anticorpos monoclonais de ratinho para a produção de IL-6 a partir de uma linha de células de hibridoma são conhecidos, por exemplo, nas Patentes US 5618700 e 6086874. A Patente US 5856135 descreve anticorpos humanos remodelados para IL-6 humana guiados a partir de um anticorpo monoclonal de ratinho SK2 em que as regiões determinantes de complementaridade (CDR) da região variável do anticorpo de ratinho SK2 são transplantadas para a região variável de um anticorpo humano e juntas à região constante de um anticorpo humano.

Outros anticorpos monoclonais de murino foram descritos e classificados como neutralizantes, que impedem a ligação do receptor, ou não-neutralizantes (Brakenhoff et al, J. Immunol. (1990) (145:561). Entre este grupo de anticorpos neutralizantes de anticorpos monoclonais para IL-6 pode ser dividido em dois grupos; e os epítomos putativos na molécula de IL-6 dos sítios I e II designados. O sítio I impede a ligação a gp80 (IL6R) e, portanto, evita a ativação de gp130. O epítomo do sítio I foi ainda caracterizado como compreendendo regiões de ambas as porções de terminais amino e terminais carboxi da molécula de IL-6. Os ligantes do sítio II evitam a ativação de gp130 e, portanto, podem reconhecer um epítomo conformacional envolvido na sinalização.

Um anticorpo quimérico de IL-6 é discutido em van Zaanen et al., *British Journal of Hematology* (1998) (783-790). É conhecido o anticorpo monoclonal IL-6 de murino referido como CLB-6/8 ou CLB-8, que possui uma alta afinidade para IL-6 ligado ao epítipo do sítio I, (Brakenhoff et al, supra), mas os domínios de ligação ao antigénio (regiões CDR) deste anticorpo não são conhecidos. Como descrito acima, no entanto, o anticorpo de murino, é altamente imunogénico em humanos e o seu valor terapêutico, por conseguinte, limitado. Existe, portanto, uma necessidade continuada de anticorpos anti-IL-6, que exibam uma afinidade elevada e um perfil farmacêutico favorável.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona anticorpos anti-IL-6 isolados quiméricos, tendo uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID N°: 7 e uma região variável de cadeia leve de SEQ ID N°: 8, bem como composições de anticorpos anti-IL-6, que codificam ou complementam os ácidos nucleicos, vectores, células hospedeiras, composições, formulações, dispositivos, animais transgénicos, plantas transgénicas com eles relacionados, e métodos de fabrico e utilização dos mesmos, como aqui descrito e ativado, em associação com o que é conhecido na técnica. O anticorpo da presente invenção neutraliza especificamente a IL-6 humana com elevada afinidade.

A invenção proporciona um anticorpo quimérico ou um fragmento de anticorpo capaz de inibir a IL-6 humana que compreende uma região de cadeia variável pesada da SEQ ID N°: 7 e uma região variável de cadeia leve da SEQ ID N°: 8.

A invenção também proporciona um ácido nucleico que codifica o anticorpo da invenção.

A invenção também proporciona um vector e uma célula hospedeira compreendendo o ácido nucleico da invenção.

A invenção também proporciona um método para produzir pelo menos um anticorpo anti-IL-6 ou um fragmento de anticorpo, que compreende a tradução de um ácido nucleico da invenção, sob condições *in vitro*, *in vivo* ou *in situ*, de tal modo que o anticorpo anti-IL-6 ou fragmento é expresso em quantidades detectáveis ou recuperáveis.

A invenção proporciona também o anticorpo da invenção para utilização em terapia.

A invenção proporciona também composições, dispositivos médicos e artigos de manufactura que compreendem o anticorpo da invenção.

A invenção também proporciona um método para produzir o anticorpo da invenção, que compreende a transfecção de uma célula hospedeira ou animal transgénico não humano ou planta transgénica ou célula vegetal capaz de expressar em quantidades recuperáveis o referido anticorpo com uma molécula de ácido nucleico que codifica para tais anticorpos e recuperar a anticorpo da célula, animal ou vegetal.

A invenção também proporciona um animal transgênico não-humano ou planta expressando o anticorpo da invenção.

A presente invenção proporciona, pelo menos, um anticorpo CLB-8 anti-IL-6 isolado humano-rato quimérico, humanizado ou enxertado em CDR ("anticorpo cCLB-8"), como aqui descrito. O anticorpo cCLB-8 aqui descrito inclui qualquer molécula de proteína ou péptido que compreende pelo menos uma região determinante de complementaridade (CDR) de uma cadeia pesada ou leve ou uma porção de ligação ao ligando do mesmo, derivado do anticorpo monoclonal murino CLB-8, em combinação com uma região constante de cadeia pesada ou de cadeia leve, uma região de estrutura, ou qualquer porção do mesmo, que pode ser incorporada num anticorpo da presente invenção. É aqui revelado um anticorpo quimérico anti-IL-6, que compreende duas cadeias leves e duas cadeias pesadas, cada uma das cadeias compreendendo, pelo menos, parte de uma região constante humana e pelo menos parte de uma região variável (V) a partir de derivados do anticorpo monoclonal murino CLB8 tendo especificidade para IL-6 humana, ligando o referido anticorpo com elevada afinidade, a um epítipo inibidor e/ou neutralizante da IL-6 humana, como o anticorpo cCLB-8. Fragmentos ou um derivado de um tal anticorpo, tal como uma ou mais porções da cadeia do anticorpo, como a constante de cadeia pesada, as regiões de diversidade, de união ou variável, ou a constante de cadeia leve, regiões variáveis ou de união são aqui divulgados.

O anticorpo pode compreender, pelo menos, uma porção específica de pelo menos uma região determinante de complementaridade (CDR) (por exemplo, CDR1, CDR2 ou CDR3 da região variável de cadeia pesada ou leve) derivado do anticorpo monoclonal murino CLB-8, e/ou pelo menos uma

região de estrutura constante ou variável ou qualquer porção da mesma. A sequência de aminoácidos de anticorpo pode ainda compreender, opcionalmente, pelo menos uma substituição específica, inserção ou deleção, tal como aqui descrito ou como conhecido na técnica.

Os anticorpos incluem aqueles anticorpos quiméricos, humanizados e/ou enxertados com CDR, que irão inibir competitivamente a ligação *in vivo* de IL-6 humana de anti-IL-6 murino CLB-8, anti-IL-6 CLB-8quimérico, ou de um anticorpo possuindo substancialmente as mesmas características de ligação, bem como os seus fragmentos e regiões.

Os anticorpos aqui descritos ligam epítomos reconhecidos por CLB-8 e cCLB-8, que estão incluídos no sítio I do epítome como descrito por Brackenhoff et al. (supra). Os métodos preferidos para determinar a especificidade do anticorpo monoclonal e a afinidade por inibição competitiva podem ser encontrados em Harlow et al, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque, 1988). Pelo menos um dos anticorpos aqui descrito liga-se, pelo menos, a um epítomo especificado específico para a IL-6 humana da proteína, subunidade, fragmento, ou porção de uma combinação destes, em que o anticorpo monoclonal CLB-8 se liga. O epítomo pode compreender, pelo menos, uma região de ligação do anticorpo para o qual o anticorpo CLB-8 se liga, cujo epítomo é de preferência constituído por pelo menos 1-5 aminoácidos de pelo menos uma porção do mesmo, tais como, mas não limitados a, pelo menos, um domínio funcional, extracelular, solúvel, hidrofílico, externo ou

citoplasmático da proteína humana IL-6, ou qualquer parte dela.

Um anticorpo anti-IL-6-8 cCLB isolado de mamíferos incluindo pelo menos uma região variável compreendendo a SEQ ID N°: 7 ou 8 e as sequências de ácido nucleico que os codifica (SEQ ID N°: 15 ou 16) são aqui divulgados.

Um anticorpo anti-IL-6cCLB-8 isolado de mamífero, que compreende (i) a totalidade das regiões determinantes de complementaridade (CDR) da cadeia pesada de sequências de aminoácidos das SEQ ID N°s: 1, 2 e 3 e as sequências de ácidos nucleicos que as codificam (SEQ ID N°s: 9-11); ou (ii) todas as CDR de cadeia leve das sequências de aminoácidos das SEQ ID N°s: 4, 5 e 6 e as sequências de ácidos nucleicos que os codificam (SEQ ID N°s: 12-14) também são aqui divulgados.

Um anticorpo anti-IL-6 cCLB-8 isolado de mamífero, que compreende pelo menos uma CDR de cadeia pesada ou cadeia leve possuindo a sequência de aminoácidos de pelo menos uma das SEQ ID. N°s: 1, 2, 3, 4, 5, ou 6 e as sequências de ácidos nucleicos que os codificam (SEQ ID N°s: 9-14) também é aqui descrito.

Um anticorpo anti-IL-6 cCLB-8 de mamífero isolado, quimérico, humanizado ou enxertado com CDR, que compreende pelo menos uma CDR humana, em que o anticorpo se liga especificamente pelo menos a um epítipo compreendendo pelo menos 1-3 aminoácidos do epítipo de IL-6 humana à qual o anticorpo CLB-8 se liga é também aqui divulgado.

Pelo menos, um anticorpo pode ainda opcionalmente ligar a IL-6 com uma afinidade (K_d) de pelo menos 10^{-9} M, preferivelmente pelo menos 10^{-10} M, e/ou, pelo menos, neutralizar essencialmente uma atividade de pelo menos uma proteína IL-6. Numa concretização preferida, o anticorpo liga-se a IL-6 com uma afinidade (K_d) de pelo menos 1×10^{-11} M, preferencialmente de 5×10^{-11} que neutraliza a IL-6 humana.

São também aqui divulgados são moléculas de ácido nucleico isoladas compreendendo, complementares, ou hibridando com, um polinucleotídeo que codifica os anticorpos anti-IL-6 específicos acima mencionados, incluindo pelo menos uma sequência especificada, domínio porção ou variante. A presente invenção proporciona ainda vectores recombinantes que incluem anti-IL-6, anticorpos de moléculas de ácido nucleico da invenção, células hospedeiras que contenham tais ácidos nucleicos e/ou vectores recombinantes, assim como os métodos de fazer e/ou utilizar tais anticorpos de ácidos nucleicos, vectores e/ou células hospedeiras. Assim, a invenção compreende um ácido nucleico isolado que codifica um anticorpo anti-IL-6-8 cCLB da invenção; um vector de ácido nucleico isolado compreendendo o ácido nucleico isolado e/ou uma célula hospedeira procariótica ou eucariótica compreendendo o ácido nucleico isolado. A célula hospedeira pode ser, opcionalmente, pelo menos uma selecionada a partir de células COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2/0, 293, HeLa, células de mieloma ou células de linfoma, ou qualquer derivado, imortalizado ou transformada da mesma célula. Também é fornecido um método para produzir pelo menos um anticorpo anti-IL-6-8 cCLB da invenção, que compreende a tradução do anticorpo que codifica o ácido nucleico sob condições *in*

vitro, *in vivo* ou *in situ*, de tal modo que o anticorpo IL-6 é expresso em quantidades detectáveis ou recuperáveis.

Um anticorpo anti-idiotipo IL-6 para, pelo menos, um anticorpo anti-IL-6 cCLB-8 da presente invenção é aqui divulgado. O anticorpo anti-idiotipo inclui qualquer proteína ou péptido contendo uma molécula que compreende pelo menos uma porção de uma molécula de imunoglobulina, tal como, mas não limitada a, pelo menos, uma região determinante de complementaridade (CDR) de uma cadeia pesada ou leve ou uma porção de ligação de ligando da mesma, uma região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve, uma região constante de cadeia pesada ou de cadeia leve, uma região de estrutura, ou qualquer parte das mesmas, que podem ser incorporados num anticorpo anti-idiotipo para o anticorpo da presente invenção. Um anticorpo anti-idiotipo pode incluir ou ser derivado de qualquer mamífero, tal como, mas não limitado a um humano, um rato, um coelho, um roedor, um primata, e semelhantes.

Aqui reveladas são também as moléculas de ácido nucleico isoladas compreendendo, complementando, ou hibridando com, um polinucleótido que codifica pelo menos um anticorpo anti-idiotipo IL-6, compreendendo pelo menos uma sequência especificada, domínio porção ou sua variante, e vectores recombinantes compreendendo os referidos anticorpos anti-idiotipo IL-6 que codificam moléculas de ácidos nucleicos, células hospedeiras que contenham tais ácidos nucleicos e/ou vectores recombinantes, assim como os métodos de fabricação e/ou utilização de tais anticorpos anti-idiotipos de ácidos nucleicos, vectores e/ou células hospedeiras.

A presente invenção proporciona também, pelo menos, um método para a expressão de pelo menos um anticorpo anti-IL-6 acima mencionado, numa célula hospedeira, compreendendo a cultura de uma célula hospedeira, como aqui descrito, sob condições em que pelo menos um anticorpo anti-IL-6 é expresso em quantidades detectáveis e/ou recuperáveis.

Também é fornecido um método para produzir pelo menos um anticorpo anti-IL-6 isolado da presente invenção, compreendendo o fornecimento de um animal transgênico ou planta transgênica ou célula vegetal capaz de expressar o anticorpo em quantidades recuperáveis. Proporcionado, ainda, na presente invenção é pelo menos um anticorpo anti-IL-6 produzido pelo método acima descrito.

A presente invenção proporciona também pelo menos uma composição que compreende (a) um anticorpo anti-IL-6-8 cCLB isolado codificando o ácido nucleico e/ou o anticorpo da invenção; e (b) um transportador ou diluente adequado. O transportador ou diluente pode ser, opcionalmente, farmacologicamente aceitável, de acordo com os transportadores ou diluentes conhecidos. A composição pode compreender ainda, opcionalmente, pelo menos, um outro composto, proteína ou composição.

A presente invenção ainda fornece, pelo menos, um anticorpo anti-IL-6 cCLB-8 ou composição de anticorpo, para administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz para modular ou tratar pelo menos uma patologia relacionada com IL-6 numa célula, tecido, órgão, animal ou paciente e/ou, antes de, subsequente a, ou durante um estado relacionado, como conhecido na técnica e/ou como aqui

descrito. Um método para o diagnóstico ou tratamento de uma condição relacionada com IL-6 numa célula, tecido, órgão ou animal, compreendendo o contacto ou a administração de uma composição compreendendo uma quantidade eficaz de pelo menos um anticorpo anti-IL-6-8 cCLB isolado da invenção com, ou para, a célula, tecido, órgão ou animal, é aqui divulgado. O método pode ainda compreender, opcionalmente, a utilização de uma quantidade eficaz de 0,001-50 mg/kg das células, tecido, órgão ou animal. O método pode ainda compreender, opcionalmente, a utilização do contacto ou a administração de, pelo menos, um modo selecionado de entre parentérico, subcutâneo, intramuscular, intravenosa, intrarticular, intrabronquial, intra-abdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitário, intracelular, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intra-hepático, intramiocardial, intraosteal, intrapélvico, intrapericárdico, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intra-rectal, intra-renal, intra-retiniano, intraespinal, intra-sinovial, intratorácico, intra-uterino, intravesical, bolus, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal ou transdérmico. O método pode ainda, opcionalmente, compreender a administração, antes, simultaneamente ou depois de contactar o anticorpo ou a administração de pelo menos uma composição que compreende uma quantidade eficaz de pelo menos um composto ou uma proteína selecionada a partir de, pelo menos, um de um marcador detectável ou um repórter, um antagonista de TNF, um antirreumático, um relaxante muscular, um narcótico, um fármaco droga anti-inflamatório não-esteróide (NSAID), um analgésico, um anestésico, um sedativo, um anestésico local, um bloqueador neuromuscular, um antimicrobiano, um antipsoriático, um corticosteróide, um esteroide

anabolizante, uma eritropoietina, uma imunização, uma imunoglobulina, um imunossupressor, uma hormona do crescimento, um fármaco de reposição hormonal, um radiofármaco, um antidepressivo, um antipsicótico, um estimulante, uma medicação para a asma, um agonista beta, um esteroide inalado, uma epinefrina ou seu análogo, um agente anti-cancro citotóxico ou outro, um anti-metabolito, tal como o metotrexato, um agente anti-proliferativo, uma citocina ou um antagonista da citocina.

A presente invenção proporciona ainda, pelo menos, um anticorpo anti-IL-6 cCLB-8 para o diagnóstico de, pelo menos, uma condição relacionada com IL-6, numa célula, tecido, órgão, animal ou paciente e/ou, antes de, subsequente a, ou durante a um estado relacionado, como conhecido na técnica e/ou como aqui descrito.

A presente invenção proporciona também, pelo menos, uma composição ou um dispositivo que compreende pelo menos um anticorpo anti-IL-6, de acordo com a presente invenção.

Também é fornecida uma composição que compreende um anticorpo da invenção e pelo menos um transportador ou diluente farmacologicamente aceitável. A composição pode, opcionalmente, compreender ainda uma quantidade eficaz de pelo menos um composto ou uma proteína selecionada a partir de, pelo menos, um marcador detectável ou um repórter, um agente anti-cancro citotóxico ou outro, um anti-metabolito, um agente anti-proliferativo, tal como o metotrexato, uma citocina ou um antagonista da citocina, um antagonista de TNF, um antirreumático, um relaxante muscular, um narcótico, um medicamento anti-inflamatório não-esteróide

(NTHE), um analgésico, um anestésico, um sedativo, um anestésico local, um bloqueador neuromuscular, um agente antimicrobiano, um antipsoriático, um corticosteróide, um esteroide anabolizante, uma eritropoietina, uma imunização, uma imunoglobulina, um imunossupressor, uma hormona do crescimento, um fármaco hormonal de substituição, um radiofármaco, um antidepressivo, um antipsicótico, um estimulante, uma medicação para a asma, um agonista beta, um esteroide inalado, uma epinefrina ou análogo.

Também é fornecido um dispositivo médico, que compreende pelo menos um anticorpo anti-IL-6 da invenção, em que o dispositivo é adequado para contactar ou administrar pelo menos um anticorpo anti-IL-6 por, pelo menos, um modo selecionado de entre parentérico, subcutâneo, intramuscular, intravenoso, intrarticular, intrabrônquico, intra-abdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitário, intracelular, intracelular, intracelular, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intra-hepático, intramiocardial, intraosteal, intrapélvico, intrapericardiaco, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intra-rectal, intrarenal, intraretiniano, intraespinal, intra-sinovial, intratorácico, intra-uterino, intravesical, bolus, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal ou transdérmico.

Também é fornecido um artigo de manufactura para uso farmacêutico ou de diagnóstico humano, compreendendo material de embalagem e um recipiente que compreende uma solução ou uma forma liofilizada de pelo menos um anticorpo anti-IL-6 da presente invenção. O artigo de fabrico pode compreender, opcionalmente, tendo o recipiente, como um

componente de um sistema ou dispositivo de entrega parentérica, subcutânea, intramuscular, intravenosa, intrarticular, intrabronquial, intra-abdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitária, intracelular, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólica, intracervical, intragástrica, intra-hepática, intramiocárdica, intraosteal, intrapélvica, intrapericárdica, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intra-rectal, intrarenal, intra-retiniana, intraespinal, intra-sinovial, intratorácica, intra-uterina, intravesical, bolus, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal ou transdérmica.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1: Gráfico mostrando a ligação de eCLB8 para a IL-6 recombinante humana.

Figura 2: Gráfico mostrando a inibição da IL-6 mediada por secreção de IgM mu a partir de células SKW6.4 por cCLB8.

Figura 3: Gráfico mostrando a inibição da IL-6 mediada por, produção de MCP-1 por cCLB8.

Figura 4: Imagem de um western blot mostrando inibição da sinalização de IL-6 por cCLB8 em células de leucemia monocítica humanas THP-1.

Figura 5: Gráfico mostrando a inibição por cCLB8 de IL-6 induzida por produção de soro amilóide A de células HepG2.

Figura 6: Gráfico mostrando a capacidade de cCLB8 para neutralizar a proliferação induzida de células de rhIL-6.

Figura 7: Gráfico mostrando a redução relativa de perda de peso corporal do hospedeiro em ratos portadores de tumores

humanos tratados tanto com anticorpos IL-6 anti-humano e anti-rato.

Figura 8A-G: Gráfico mostrando os perfis de estudo de inibição de soro de sete anticorpos anti-idiotipo.

Figura 9: Gráfico mostrando a inibição da ligação de cCLB8 à IL-6 humana por Mabs anti-id.

Figura 10: Gráfico mostrando a ligação anti-id para cCLB-8 pré-ligado para IL-6 humana.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Citações

As referências a seguir são relevantes: Ausubel, et al., Ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque, Nova Iorque (1987-2001); Sambrook, et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Edição, Cold Spring Harbor, Nova Iorque (1989); Harlow e Lane, *Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Nova Iorque (1989); Colligan, et al., Eds., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, Nova Iorque, NY, (1997-2001).

Códigos de Aminoácidos

Os aminoácidos que compõem os anticorpos anti-IL-6 da presente invenção são muitas vezes abreviados. As designações dos aminoácidos podem ser indicadas por designação do aminoácido pelo seu código de letra única, o seu código de três letras, nome, ou três codões de nucleótidos), como é bem compreendido na técnica (veja

Alberts, B., et al, Molecular Biologi of the Cell, Third Ed, Garland Publishing, Inc., New York, 1994).

Definições

Como aqui utilizado, um "anticorpo anti-interleucina-6 cCLB-8", "anticorpo anti-IL-6-8 cCLB", "uma porção de anticorpo anti-IL-6 cCLB-8" ou "fragmento de anticorpo anti-IL-6 cCLB-8" e/ou " variante de anticorpo anti-IL-6 cCLB-8" e semelhantes incluem qualquer proteína ou péptido contendo molécula que compreende pelo menos uma porção de uma molécula de imunoglobulina, que contém pelo menos uma região determinante de complementaridade (CDR) de uma cadeia pesada ou leve ou uma porção de ligação ao ligando desta derivada do anticorpo monoclonal murino CLB-8 em combinação com uma região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve, uma região constante de cadeia pesada ou de cadeia leve, uma região de estrutura, ou de qualquer porção da mesma, de origem não-murina, de preferência de origem humana, que pode ser incorporada num anticorpo da presente invenção. Tal anticorpo é capaz de modular, diminuir, antagonizar, mitigar, aliviar, bloquear, inibir, ab-rogar e/ou interferir com, pelo menos, uma atividade da IL-6 ou uma ligação, ou com a atividade do receptor da IL-6 ou uma ligação, *in vitro*, *in situ* e/ou *in vivo*. Como um exemplo não limitativo, um anticorpo anti-IL-6 apropriado, a porção especificada ou variante da presente invenção podem ligar com afinidade elevada a um epítipo inibidor e/ou neutralizante da IL-6 humana reconhecida pelo anticorpo monoclonal CLB-8. Um anticorpo anti-IL-6 adequado, a porção especificada ou variante, também pode afectar opcionalmente, pelo menos, uma atividade ou função de IL-6, tal como, mas não limitado a, ARN, ADN, ou síntese da proteína, libertação de IL-6, sinalização do receptor de

IL-6, membrana de clivagem de IL-6, atividade da IL-6, produção e/ou síntese de IL-6.

O termo "anticorpo" pretende ainda abranger anticorpos, fragmentos de digestão, porções especificadas e as suas variantes, incluindo imitadores de anticorpo ou compreendendo porções de anticorpos que imitam a estrutura e/ou função de um anticorpo ou fragmento especificado ou parte do mesmo, incluindo uma única cadeia de anticorpos e seus fragmentos; cada uma contendo, pelo menos, uma CDR derivada do anticorpo monoclonal CLB-8. Fragmentos funcionais incluem fragmentos de ligação ao antigénio que se ligam a um mamífero de IL-6. Por exemplo, fragmentos de anticorpo capazes de se ligar à IL-6 ou partes do mesmo, incluindo, mas não limitado a fragmentos Fab (por exemplo, por digestão com papaína), Fab' (por exemplo, por digestão com pepsina e redução parcial) e F(ab')₂ (por exemplo, por digestão com pepsina), facb (por exemplo, por digestão com plasmina), pFc' (por exemplo, por digestão da pepsina ou plasmina), Fd (por exemplo, por digestão com pepsina, redução parcial e reagregação), Fv ou scFv (por exemplo, por técnicas de biologia molecular), são abrangidos pela invenção (ver, por exemplo, Colligan, Immunology, supra).

Tais fragmentos podem ser produzidos por clivagem enzimática, técnicas sintéticas ou recombinantes, como é conhecido na técnica e/ou como aqui descrito. Os anticorpos também podem ser produzidos numa variedade de formas truncadas, usando genes de anticorpos nos quais um ou mais codões de terminação foram introduzidos a montante do sítio de paragem natural. Por exemplo, uma combinação de gene que codifica uma porção de cadeia pesada F(ab')₂ pode ser concebida para incluir sequências de ADN que

codificam o domínio CH_1 e/ou a região da dobradiça da cadeia pesada. As várias porções de anticorpos podem ser unidas quimicamente por técnicas convencionais, ou podem ser preparadas como uma proteína contígua utilizando técnicas de engenharia genética.

Tal como aqui utilizado os anticorpos "quiméricos" ou anticorpos "humanizados" ou " enxertados em CDR" incluem qualquer combinação dos aqui descritos CDR de murino com uma ou mais proteínas ou péptidos derivados de um anticorpo não-murino, de preferência, humano. Os anticorpos quiméricos ou humanizados são fornecidos em que as CDR são derivadas do anticorpo murino CLB-8 capaz de se ligar a IL-6 humana e pelo menos uma porção, ou o restante do anticorpo é derivado de um ou mais anticorpos humanos. Assim, a parte do anticorpo humano pode incluir a estrutura, domínios C_L , C_H (por exemplo, C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}), as regiões de dobradiça, (V_L , V_H)), que não são substancialmente imunogénicos em seres humanos. As regiões do anticorpo, que são derivadas de anticorpos humanos, não precisam de ter 100% de identidade com os anticorpos humanos. Numa forma de realização preferida, como muitos dos resíduos de aminoácidos humanos são, quanto possível, retidos para que a imunogenicidade seja insignificante, mas os resíduos humanos podem ser modificados conforme necessário para suportar o local de ligação ao antigénio formado pela CDR e simultaneamente maximizar a humanização do anticorpo. Tais mudanças ou variações, mantém ou reduzem, opcionalmente, de preferência, a imunogenicidade em humanos ou outras espécies em relação aos anticorpos não-modificados. É salientado que um anticorpo humanizado pode ser produzido por um animal não humano ou uma célula procariótica ou eucariótica que seja capaz de expressar

genes de imunoglobulina humana funcionalmente rearranjada (por exemplo, de cadeia pesada e/ou cadeia leve). Além disso, quando o anticorpo é um anticorpo de cadeia simples, pode compreender um péptido de ligação que não é encontrado em anticorpos humanos nativos. Por exemplo, um Fv pode compreender um péptido ligante, tal como duas a cerca de oito glicinas ou outros resíduos de aminoácidos, que ligam a região variável da cadeia pesada e a região variável da cadeia leve. Tais péptidos ligantes são considerados como sendo de origem humana.

Anticorpos da Presente Invenção

De acordo com a presente invenção, o anticorpo anti-IL-6 cCLB-8 compreende um anticorpo em que as regiões variáveis são derivadas de anticorpo murino CLB-8 capaz de se ligar a e inibir a função de IL-6 humana e as regiões constantes do anticorpo são derivadas de um ou mais anticorpos humanos. Em alguns anticorpos aqui descritos a região variável ou CDR derivadas de anticorpos murinos CLB-8 têm de preferência entre cerca de 90% a cerca de 100% de identidade com a região variável ou CDRs do anticorpo de murino CLB-8, embora qualquer e todas as modificações, incluindo substituições, inserções e deleções, são contempladas, desde que o anticorpo quimérico mantenha a capacidade de se ligar e inibir a IL-6. As regiões dos anticorpos quiméricos, humanizados ou enxertado com CDR que são derivados de anticorpos humanos, não precisam de ter 100% de identidade com os anticorpos humanos. Numa forma de realização preferida, como muitos dos resíduos de aminoácidos humanos quanto possível, são retidos de forma que a imunogenicidade seja insignificante, mas os resíduos humanos, em especial, resíduos da região de estrutura, são substituídos como necessário e como ensinado aqui a seguir, em conformidade com a presente invenção. Tais modificações,

tal como aqui divulgadas são necessárias para suportar o sítio de ligação ao antigénio formado pelas CDRs, enquanto simultaneamente maximizam a humanização do anticorpo.

O anticorpo monoclonal murino CLB-8 contra a IL-6 humana é conhecido na técnica (Brakenhoff et al, supra), mas as regiões CDR deste anticorpo não foram até agora divulgadas. Pela primeira vez, aqui revelados são anticorpos quiméricos, humanizados ou enxertados com CDR derivados das regiões CDR de anticorpo monoclonal murino CLB-8 e os métodos para a preparação de tais anticorpos. De acordo com a presente invenção, o ADNc (SEQ ID N°: 15) e as sequências de aminoácidos da cadeia pesada (SEQ ID N°: 7) de murino CLB-8 de cadeia pesada são fornecidas no Exemplo 2. O cADN e a sequência de aminoácidos deduzida da cadeia leve de murino CLB-8 (SEQ ID N° 8) são também fornecidos no Exemplo 2em (SEQ ID N°: 16). Cada uma das regiões variáveis de cadeia pesada e leve contém três CDRs, que se combinam para formar o sítio de ligação ao antigénio. As três CDRs são rodeadas por quatro regiões FR, que funcionam essencialmente para suportar as CDRs. As sequências das CDRs dentro das sequências das regiões variáveis de cadeia pesada e leve podem ser identificadas por alinhamento assistido por computador de acordo com Kabat et al. (1987) em *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 4^a ed., United States Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office, Washington, DC, ou por modelação molecular das regiões variáveis, utilizando por exemplo o programa ENCAD, como descrito por Levitt (1983) *J. Mol. Biol.* 168:595.

Numa forma de realização preferida, as CDRs são derivadas de anticorpo monoclonal murino CLB-8. As CDRs de cadeia pesada preferidas têm as sequências seguintes:

CDR1 SFAMS 8SEQ ID N° 1)

CDR2 EISSGGSYTYYPDTVTG (SEQ ID N° 2)

CDR3 GLWGYALDY (SEQ ID N° 3)

As CDRs de cadeia leve preferidas têm as sequências seguintes:

CDR1 SASSSVSYMY (SEQ ID N° 4)

CDR2 DTSNLAS (SEQ ID N°5)

CDR3 QQESGYPYT (SEQ ID N° 6)

As sequências das CDR do anticorpo murino CLB-8, podem ser modificadas por inserções, substituições e deleções na medida em que o anticorpo enxertado com CDR mantenha a capacidade de se ligar e inibir a IL-6 humana. O perito na técnica pode determinar a manutenção desta atividade, realizando os testes funcionais descritos a seguir. As CDRs podem ter, por exemplo, desde cerca de 50% a cerca de 100% de homologia com as CDRs das SEQ ID N°s 1-6. Numa forma de realização preferida, as CDRs têm desde cerca de 80% a cerca de 100% de homologia com as CDRs das SEQ ID N°s: 1-6. Numa concretização mais preferida, as CDRs têm desde cerca de 90% a cerca de 100% de homologia com as CDRs das SEQ ID N°s: 1-6. Numa forma de realização mais preferida, as CDRs têm desde cerca de 100% de homologia com as CDRs das SEQ ID N°s:1-6.

Alternativamente, toda a região variável da cadeia pesada e da cadeia leve da região variável do anticorpo murino CLB-8 como descrito no Exemplo 2 (SEQ.ID N°s: 7 e 8), podem ser combinadas com as regiões constantes e de estrutura humanas para formar o anticorpo quimérico cCLB-8 da presente invenção.

Os genes humanos que codificam as regiões constantes (C) dos anticorpos quiméricos, dos fragmentos e das regiões da presente invenção podem ser derivados a partir de uma biblioteca de fígado fetal humano, por métodos conhecidos. Os genes das regiões C humanas podem ser derivados de qualquer célula humana, incluindo aquelas que expressam e produzem imunoglobulinas humanas. A região C_H humana pode ser derivada de qualquer uma das classes ou isotípos conhecidos de cadeias H humanas, incluindo gama, μ , α , δ , ϵ , e respectivos subtipos, tais como G1, G2, G3 e G4. Uma vez que o isotípo da cadeia H é responsável pelas várias funções efectoras de um anticorpo, a escolha de uma região C_H vai ser guiada pelas funções efectoras desejadas, tais como a fixação de complemento, ou atividade de anticorpo dependente da citotoxicidade celular (ADCC). De preferência, a região C_H é derivado de gama 1 (IgG1).

A região C_L humana pode ser derivada de qualquer isotípo da cadeia L humana, kappa ou lambda, preferivelmente kappa.

Os genes que codificam regiões C de imunoglobulinas humanas são obtidos de células humanas por meio de técnicas de clonagem padrão (Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2^a Edição, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque (1989) e Ausubel et al,

eds. Current Protocols in Molecular Biology (1987-1993)). Genes de regiões C humanas estão facilmente disponíveis a partir de clones conhecidos contendo genes que representam as duas classes de cadeias L, as cinco classes de cadeias H e respectivas subclasses. Fragmentos de anticorpos quiméricos, tais como $F(ab^1)_2$ e Fab, podem ser preparados através da concepção de um gene de cadeia H quimérico que é apropriadamente truncado. Por exemplo, um gene quimérico que codifica uma porção de de cadeia H de um fragmento $F(ab^1)_2$ incluiria sequências de ADN que codificam o domínio CH1 e a região de dobradiça da cadeia H, seguido por um codão de paragem da tradução para produzir a molécula truncada.

Geralmente, num exemplo, os anticorpos quiméricos, os fragmentos e as regiões da presente invenção são produzidos por clonagem de segmentos de ADN que codificam a cadeia H e L das regiões de ligação ao antigénio do anticorpo específico anti-IL-6 CLB-8, e juntando estes segmentos de ADN a segmentos de ADN codificam as regiões C_H e C_L , respectivamente, para produzir genes que codificam imunoglobulinas quiméricas.

Assim, numa concretização preferida, um gene quimérico fundido é criado o qual compreende um primeiro segmento de ADN que codifica pelo menos a região de ligação ao antigénio de origem não-humana, como uma região V funcionalmente rearranjada com segmento de união (J), ligada um segundo segmento de ADN que codifica pelo menos uma parte de uma região C humana.

As sequências das regiões variáveis do anticorpo murino CLB-8, podem ser modificadas por inserções, substituições e deleções na medida em que o anticorpo quimérico mantenha a capacidade de se ligar e inibir a IL-6 humana. O perito na técnica pode determinar a manutenção desta atividade, realizando os testes funcionais descritos a seguir. As regiões variáveis podem ter, por exemplo, desde cerca de 50% a cerca de 100% de homologia com as regiões variáveis de SEQ ID N°:7-8. Numa concretização preferida as regiões variáveis têm desde cerca de 80% a cerca de 100% de homologia com as regiões variáveis de SEQ ID N°s: 7-8. Numa concretização mais preferida, as regiões variáveis têm desde cerca de 90% a cerca de 100% de homologia com as regiões variáveis de SEQ ID N°s: 7-8. Numa forma de realização mais preferida, as regiões variáveis têm desde cerca de 100% de homologia com as CDRs das SEQ ID N°s: 1-6.

Por conveniência, o esquema numérico de Kabat et al., foi aqui adoptado. Os resíduos são designados por números minúsculos ou hífen como necessário para conformar as presentes sequências com a sequência numerada padrão de Kabat.

No caso de um anticorpo enxertado por CDR ou humanizado, onde a região CDR do anticorpo CLB-8 é combinada com uma região humana, os resíduos podem ser retidos na região FR, que são idiossincráticos ao anticorpo progenitor, por exemplo, CLB-8. Os resíduos que demonstraram ser críticos na humanização de outros anticorpos, também podem ser retidos. As orientações anteriores são seguidas na extensão necessária para suportar o sítio de ligação ao antigénio formado pelas CDRs e simultaneamente maximizar a humanização do anticorpo.

A sequência de aminoácidos de uma região variável da cadeia pesada derivada representativa de um anticorpo monoclonal murino CLB-8 e de um anticorpo humano é apresentada no Exemplo 2 abaixo.

A sequência de aminoácidos de uma região variável de cadeia leve quimérica representativa derivada do anticorpo monoclonal murino CLB-8 e de um anticorpo humano é também mostrada no Exemplo 2.

Um anticorpo quimérico contendo as regiões variáveis do anticorpo murino CLB-8 de tem sido demonstrada, em conformidade com a presente invenção ser tão eficaz como o anticorpo monoclonal murino CLB-8 na ligação a IL-6.

Métodos para a manipulação ou humanização de anticorpos não humanos ou humanos podem ser usados e são bem conhecidos na técnica. Geralmente, um anticorpo humanizado ou manipulado tem um ou mais resíduos de aminoácidos a partir de uma fonte que é não humana, como por exemplo, mas não limitado a ratinho, rato, coelho, primata não humano ou outro mamífero. Estes resíduos de aminoácidos humanos são frequentemente referidos como resíduos de "importação", que são tipicamente retirados de uma variável de "importação", constante ou outro domínio de uma sequência humana conhecida. Sequências Ig humanas conhecidas são divulgadas, por exemplo, em www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/~mrc7/mikeimages.html;

www.antibodyresource.com/;
mcb.harvard.edu/Biolinks/Immunology.html.www.immunologylink.com/;
pathbox.wustl.edu/~HCENTER/index.html; www.biotech.ufl.edu/~hcl/;
www.pebio.com/pa/340913/340913.html;
www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/;
www.m.ehime-u.ac.jp/~Yasuhito/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp;
www.icnet.uk/AXP/FACS/Davies/links.html;
www.biotech.ufl.edu/~FCCL/protocol.html;
www.isac-net.org/sites_geo.html; aximt1.imtuni-marburg.de/~rek/AEPStart.html;
baserv.uci.kun.nl/~jraats/links1.html;
www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/;
www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/intro.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html;
imgt.cnusc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/abs/index.html;
antibody.bath.ac.uk/;
abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html;
www.unizh.ch/~honegger/AHOseminar/Slide01.html;
www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/;
www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm;
www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html;
www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html;
www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html;
www.cryst.bioc.cam.ac.uk/~fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html;
www.jerini.de/fr_products.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html.
Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983).

Tais sequências importadas podem ser utilizadas para reduzir a imunogenicidade ou reduzir, aumentar ou modificar a ligação, a afinidade, em linha, fora da linha, avidéz, especificidade, meia-vida, ou qualquer outra característica

adequada, como conhecido na técnica. Em geral, parte ou a totalidade das sequências de CDR não humanas ou humanas são mantidas enquanto as sequências não-humanas de regiões variáveis e constantes são substituídas com aminoácidos humanos ou outros. Os anticorpos também podem, opcionalmente, ser humanizados com retenção de elevada afinidade para o antigénio e outras propriedades biológicas favoráveis. Para atingir este objectivo, os anticorpos humanizados podem ser opcionalmente preparados por um processo de análise das sequências parentais e vários produtos humanizados conceptuais utilizando modelos tridimensionais das sequências parentais e humanizadas. Modelos tridimensionais de imunoglobulinas estão vulgarmente disponíveis e são familiares aos peritos na técnica. Estão disponíveis programas de computador que ilustram e exibem estruturas tridimensionais conformacionais prováveis de sequências de imunoglobulina candidatas selecionadas. A inspeção destas apresentações permite a análise do papel provável dos resíduos no funcionamento da sequência de imunoglobulina candidata, ou seja, a análise dos resíduos que influenciam a capacidade da imunoglobulina candidata de se ligar ao seu antigénio. Desta maneira, os resíduos FR podem ser selecionados e combinados a partir das sequências de consenso e de importação de modo que a característica de anticorpo desejada, tal como maior afinidade para o antigénio alvo, seja alcançada. Em geral, os resíduos CDR estão diretamente e muito substancialmente envolvidos na influência da ligação ao antigénio. A humanização ou manipulação de anticorpos pode ser realizada utilizando qualquer método conhecido, tal como mas não limitado às descritas em Winter (Jones et al., Nature 321:522 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323 (1988); Verhoeyen et al., Science 239:1534 (1988)); Sims et al. J. Immunol. 151: 2296 (1993);

Chothia e Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987); Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992); Presta et al. J. Immunol. 151:2623 (1993); Patentes US 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539, 4816567; PCT/US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234; GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430; EP 229246.

A região constante humana do anticorpo quimérico da invenção pode ser de qualquer classe (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD, etc.) ou isotipo e pode compreender uma cadeia leve kappa ou lambda. Numa forma de realização, a região constante humana compreende uma cadeia pesada de IgG ou um fragmento definido, por exemplo, pelo menos um dos isotipos, IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. Numa outra forma de realização, o anticorpo anti-humano IL-6 humana compreende uma cadeia pesada de IgG1 e uma cadeia leve de IgG1 K. Os anticorpos anti-IL-6 isolados da presente invenção compreendem as sequências de aminoácidos de anticorpos aqui divulgados codificadas por qualquer polinucleídeo adequado. De preferência, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno liga-se à IL-6 humana e, desse modo neutraliza parcialmente ou substancialmente, pelo menos, uma atividade biológica da proteína. O anticorpo CLB-8, ou porção especificada ou sua variante, neutraliza parcialmente ou, de preferência, substancialmente, pelo menos, uma atividade biológica de, pelo menos, uma proteína IL-6, ou fragmento e desse modo inibe as atividades mediadas através da ligação de IL-6 para o receptor de IL-6 ou através de outros mecanismos dependentes mediados de IL-6. Tal como aqui utilizado, o termo "anticorpo neutralizante" refere-se a um anticorpo que pode inibir uma atividade de IL-6 dependente

em cerca de 20-120%, preferivelmente em pelo menos cerca de 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% ou mais dependendo do ensaio. A capacidade de um anticorpo anti-IL-6 para inibir a atividade dependente da IL-6 é preferencialmente avaliada por, pelo menos, uma proteína de IL-6 adequada ou ensaio do receptor, tal como aqui descrito e/ou como conhecido na técnica.

Pelo menos um anticorpo da presente invenção liga-se, pelo menos, a um epítipo especificado específico para, pelo menos, uma proteína IL-6, subunidade, fragmento, porção ou qualquer combinação destes aos quais o anticorpo CLB-8 se liga. Pelo menos um epítipo pode compreender, pelo menos, uma região de ligação ao anticorpo que compreende pelo menos uma porção da proteína, cujo epítipo é de preferência constituído por pelo menos uma porção da proteína extracelular, hidrofílica, solúvel, externa ou citoplasmática. Geralmente, o anticorpo humano ou fragmento de ligação ao antigénio aqui descrito compreende uma região de ligação ao antigénio, que compreende pelo menos uma região determinante de complementaridade humana (CDR1, CDR2 e CDR3) da SEQ ID N°s. 1, 2 e 3 ou variante de pelo menos uma região variável de cadeia pesada e de pelo menos uma região determinante de complementaridade humana (CDR4, CDR5 e CDR6) (SEQ ID N° 4, 5 e 6) ou a variante de pelo menos uma região variável de cadeia leve. Como um exemplo não limitativo, o anticorpo, ou porção de ligação ao antigénio ou a variante pode compreender, pelo menos, uma das CDR3 de cadeia pesada possuindo a sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 3, e/ou CDR3 de uma cadeia leve possuindo a sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 6. Numa concretização particular, o anticorpo ou fragmento de

ligação ao antigénio pode ter uma região de ligação ao antigénio, que compreende pelo menos uma porção de pelo menos uma CDR de cadeia pesada (isto é, CDR1, CDR2 e/ou CDR3) possuindo a sequência de aminoácidos das CDRs correspondentes 1, 2 e/ou 3 (por exemplo, SEQ ID N°s: 1, 2 e/ou 3). Numa outra forma de realização particular, o anticorpo, ou porção de ligação ao antigénio ou variante pode ter uma região de ligação ao antigénio, que compreende pelo menos uma porção de pelo menos uma CDR de cadeia leve (isto é, CDR4, CDR5 e/ou CDR6) possuindo a sequência de aminoácidos da correspondente CDR 4, 5 e/ou 6 (por exemplo, SEQ ID N°s: 4, 5 e/ou 6). Numa forma de realização preferida, as três CDRs de cadeias pesadas e as três CDRs de cadeia leve do anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio têm a sequência de aminoácidos da CDR correspondente de, pelo menos, um dos mAb cCLB8, quiméricos anti-IL-6 Mab, como descrito aqui. Tais anticorpos podem ser preparados por química unindo as diferentes porções (por exemplo, CDRs, estrutura) do anticorpo utilizando técnicas convencionais, através da preparação expressão de uma molécula de ácido nucleico (isto é, uma ou mais) que codifica o anticorpo utilizando técnicas convencionais da tecnologia de ADN recombinante ou através de qualquer outro método adequado e utilizando qualquer um dos possíveis codões redundantes que irão resultar na expressão de um polipeptídeo, por exemplo, SEQ ID N°: 15 ou 16.

Os anticorpos que se ligam a IL-6 humano e que compreendem a região variável cadeia pesada ou leve definida ou regiões CDR podem ser preparados usando métodos adequados, tais como a apresentação de fagos (Katsube, Y., et al., Int J Mol. Med, 1 (5):863-868 (1998)), ou métodos que utilizam animais transgênicos, tal como conhecido na técnica e/ou

como aqui descrito. Por exemplo, o anticorpo, a porção ou variante especificada, pode ser expressa usando o ácido nucleico de codificação, ou parte do mesmo numa célula hospedeira adequada.

Tal como indicado, também são aqui descritos anticorpos, fragmentos de ligação ao antigénio, cadeias de imunoglobulina e CDRs compreendendo os aminoácidos numa sequência que é substancialmente a mesma que uma sequência de aminoácidos aqui descrita. Tais anticorpos anti-IL-6 podem incluir uma ou mais substituições de aminoácidos, deleções ou adições, tanto por mutações naturais como por manipulação humana, como aqui especificado. De preferência, tais anticorpos ou fragmentos de ligação ao antigénio e anticorpos que compreendem tais cadeias ou CDRs podem ligar a IL-6 humana com elevada afinidade (por exemplo, K_D inferior ou igual a cerca de 10^{-9} M). As sequências de aminoácidos que são substancialmente as mesmas que as sequências aqui descritas incluem sequências que compreendem substituições conservativas de aminoácidos, bem como deleções de aminoácidos e/ou inserções. Uma substituição conservativa de aminoácidos refere-se à substituição de um primeiro aminoácido por um segundo aminoácido que tem propriedades químicas e/ou físicas (por exemplo, carga, estrutura, polaridade, hidrofobicidade/hidrofiliabilidade) que são semelhantes aos do primeiro aminoácido. As substituições conservativas incluem a substituição de um aminoácido por outro dentro dos seguintes grupos: lisina (K), arginina (R) e histidina (H); aspartato (D) e glutamato (E); asparagina (N), glutamina (Q), serina (S), treonina (T), tirosina (Y), K, R, H, D e E; alanina (A), valina (V), leucina (L), isoleucina (I),

prolina (P), fenilalanina (F), triptofano (W), metionina (M), cisteína (C) e glicina (G); F, W e Y; C, S e T.

Naturalmente, o número de substituições de aminoácidos que um perito na especialidade irá fazer depende de muitos factores, incluindo os descritos acima. De um modo geral, o número de substituições de aminoácidos, inserções ou eliminações de um determinado anticorpo anti-IL-6, fragmento ou variante, não será superior a 40, 30, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, tal como de 1-30 ou qualquer gama ou valor no mesmo, tal como aqui especificado.

Os aminoácidos num anticorpo anti-IL-6 da presente invenção, que são essenciais para a função podem ser identificados por métodos conhecidos na técnica, tais como mutagénese de sítio-dirigida ou a mutagénese de varrimento de alanina (por exemplo, Ausubel, supra, Capítulos 8, 15; Cunningham e Wells, Science 244:1081-1085 (1989)). Este último procedimento introduz mutações de alanina únicas em todos os resíduos da molécula. As moléculas mutante resultantes são então testadas quanto à atividade biológica, tal como, mas não limitados a, pelo menos, uma atividade neutralizante de IL-6. Os sítios que são críticos para a ligação de anticorpos também podem ser identificados por análise estrutural tal como a cristalização, a ressonância magnética nuclear ou a marcação por fotoafinidade (Smith, et al., J. Mol. Biol. 224:899-904 (1992) e de Vos, et al., Science 255:306-312 (1992)).

Os anticorpos anti-IL-6 aqui divulgados podem incluir, mas não estão limitados a, pelo menos, uma porção, sequência ou

combinação selecionada a partir de 5 de todos os aminoácidos contíguos de, pelo menos, uma das SEQ ID N°s: 1, 2, 3, 4, 5, 6.

Um anticorpo anti-IL-6 pode ainda compreender, opcionalmente, um polipeptídeo de pelo menos um de 70-100% dos aminoácidos contíguos de, pelo menos, uma das SEQ ID N°s: 7, 8.

Numa forma de realização aqui descrita, a sequência de aminoácidos de uma cadeia de imunoglobulina, ou parte da mesma (por exemplo, região variável, CDR) tem cerca de 70-99% de identidade (por exemplo, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ou qualquer faixa ou valor de entre esses) para a sequência de aminoácidos da cadeia correspondente de, pelo menos, uma das SEQ ID N°s: 7, 8. Por exemplo, a sequência de aminoácidos de uma região variável de cadeia leve pode ser comparada com a sequência da SEQ ID N°: 8, ou a sequência de aminoácidos de uma CDR3 de cadeia pesada pode ser comparada com a SEQ ID N°: 7. Preferivelmente, a identidade de 70-99% de aminoácidos (ou seja, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ou qualquer gama ou valor de entre esses) é determinada utilizando um algoritmo de computador adequado, como é conhecido na técnica.

Exemplos de sequências das regiões variáveis de cadeia pesada e de cadeia leve são fornecidos nas SEQ ID N°s: 7, 8. Os anticorpos da presente invenção, ou suas variantes específicas da mesma, podem compreender qualquer número de resíduos de aminoácidos contíguos a partir de um anticorpo

da presente invenção, em que o número é selecionado a partir do grupo de inteiros consistindo em 10-100% o número de resíduos contíguos de um anticorpo anti-IL-6. Opcionalmente, esta subsequência de aminoácidos contíguos, tem, pelo menos, cerca de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250 ou mais aminoácidos de comprimento, ou qualquer intervalo ou valor de entre esses. Além disso, o número de tais subsequências pode ser qualquer número inteiro selecionado a partir do grupo que consiste em de 1 a 20, tal como pelo menos 2, 3, 4, ou 5.

Como os especialistas compreenderão, a presente invenção inclui, pelo menos, um anticorpo biologicamente ativo da presente invenção. Os anticorpos biologicamente ativos têm uma atividade específica pelo menos 20%, 30%, ou 40%, e, de preferência, pelo menos, 50%, 60%, ou 70%, e mais preferencialmente pelo menos 80%, 90% ou 95%-100% da do anticorpo nativo (não sintético), endógeno ou afins e conhecidos. Os métodos de ensaio e medidas de quantificar a atividade enzimática e especificidade para o substrato, são bem conhecidos dos peritos na técnica.

Também são aqui divulgados anticorpos humanos e fragmentos de ligação ao antigénio, como aqui descritos, que são modificados pela ligação covalente de um grupo orgânico. Tal modificação pode produzir um anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio com propriedades farmacocinéticas melhoradas (por exemplo, semivida no soro aumentada *in vivo*). O radical orgânico pode ser um grupo de cadeia linear ou ramificada polimérica hidrófila, um grupo de ácido gordo, ou um grupo éster de ácido gordo. Em concretizações particulares, o grupo hidrófilo polimérico

pode ter um peso molecular de cerca de 800 a cerca de 120000 Daltons e pode ser um polialquileno glicol (por exemplo, polietileno glicol (PEG), polipropileno glicol (PPG)), polímero de hidratos de carbono, polímero de aminoácidos ou polivinil pirrolidona, e o ácido gordo ou grupo éster de ácido gordo pode compreender de cerca de oito a cerca de quarenta átomos de carbono.

Os anticorpos modificados e fragmentos de ligação ao antigénio podem compreender uma ou mais porções orgânicas que são covalentemente ligadas, diretamente ou indiretamente, ao anticorpo. Cada grupo orgânico que está ligado a um anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio pode ser, independentemente, um grupo polimérico hidrófilo, um grupo de ácido gordo ou de um grupo éster de ácido gordo. Tal como aqui utilizado, o termo "ácido gordo" engloba os ácidos mono-carboxílicos e ácidos dicarboxílicos. Um "grupo hidrófilo polimérico", tal como o termo é aqui utilizado, refere-se a um polímero orgânico que é mais solúvel em água do que em octano. Por exemplo, a polilisina é mais solúvel em água do que em octano. Assim, um anticorpo modificado pela ligação covalente de polilisina é aqui divulgado. Os polímeros hidrofílicos adequados para a modificação de anticorpos podem ser lineares ou ramificados e incluem, por exemplo, polialquileno glicóis (por exemplo, PEG, monometoxi-polietilenoglicol (mPEG), PPG e semelhantes), hidratos de carbono (por exemplo, dextrano, celulose, oligossacarídeos, e polissacarídeos semelhantes), polímeros de aminoácidos hidrofílicos (por exemplo, polilisina, poliarginina, poliaspartato e semelhantes), óxidos de polialquileno (por exemplo, óxido de polietileno, óxido de polipropileno e semelhantes) e polivinil pirrolidona. De preferência, o

polímero hidrofílico que modifica o anticorpo tem um peso molecular de cerca de 800 a cerca de 150000 Daltons como uma entidade molecular separada. Por exemplo, PEG₅₀₀₀ e PEG₂₀₀₀₀, em que o subscrito é o peso molecular médio do polímero em Daltons, podem ser usados. O grupo polimérico hidrófilo pode ser substituído com um a cerca de seis grupos alquilo, grupos de ácidos gordos ou de ésteres de ácidos gordos. Os polímeros hidrofílicos que são substituídos com um grupo de ácido gordo ou éster de ácido gordo, podem ser preparados através do emprego de métodos adequados. Por exemplo, um polímero compreendendo um grupo amina pode ser acoplado a um carboxilato do ácido gordo ou do éster de ácido gordo, e um carboxilato ativado (por exemplo, ativado com N, N-carbonildiimidazole) num ácido gordo ou éster de ácido gordo pode ser acoplado a um grupo hidroxilo de um polímero.

Os ácidos gordos e ésteres de ácidos gordos adequados para modificar anticorpos podem ser saturados ou podem conter uma ou mais unidades de insaturação. Ácidos gordos que são adequados para modificar anticorpos da invenção incluem, por exemplo, n-dodecanoato (C₁₂, laurato), n-tetradecanoato (C₁₄, miristato), n-octadecanoato (C₁₈, estearato), n-eicosanoato (C₂₀, araquidato), n-docosanoato (C₂₂, beenato), n-triacontanoate (C₃₀), N-tetracontanoate (C₄₀), *cis*- Δ 9-octadecanoato (C₁₈, oleato), *allcis*- Δ 5,8,11,14-eicosatetraenoate (C₂₀, araquidonato), ácido octanedíoco, ácido tetradecanedíoco, ácido octadecanedíoco, ácido docosanedíoco, e semelhantes. Ésteres de ácidos gordos adequados incluem mono-ésteres de ácidos dicarboxílicos, que compreendem um grupo alquilo inferior linear ou ramificado. O grupo alquilo inferior pode compreender desde

um a cerca de doze, de preferência, um até cerca de seis átomos de carbono.

Os anticorpos humanos modificados e fragmentos de ligação ao antigénio podem ser preparados usando métodos adequados, como por exemplo por reação com um ou mais agentes modificadores. Um "agente de modificação" como o termo é aqui utilizado, refere-se a um grupo orgânico adequado (por exemplo, o polímero hidrofílico, um ácido gordo, um éster de ácido gordo) que compreende um grupo de ativação. Um "grupo de ativação" é uma porção química ou grupo funcional que pode, sob condições apropriadas, reagir com um segundo grupo químico, formando assim uma ligação covalente entre o agente de modificação e o segundo grupo químico. Por exemplo, grupos de ativação amino-reativos incluem grupos electrófilos, tais como tosilato, mesilato, halo (cloro, bromo, flúor, iodo), ésteres de N-hidroxissuccinimidilo (NHS), e semelhantes. Grupos de ativação que podem reagir com tióis incluem, por exemplo, maleimida, iodoacetilo, acrilolil, dissulfuretos de piridilo, ácido 5-tiol-2-nitrobenzco tiol (TNB-tiol), e semelhantes. Um grupo funcional aldeído pode ser acoplado às moléculas contendo amina ou hidrazida, e um grupo azida pode reagir com um grupo fosforoso trivalente para formar ligações fosforamidato ou fosforimida. Os métodos adequados para introduzir grupos de ativação em moléculas são conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Hermanson, GT, Bioconjugate Techniques, Academic Press: San Diego, CA (1996)). Um grupo de ativação pode ser ligado diretamente ao grupo orgânico (por exemplo, o polímero hidrofílico, ácido gordo, éster de ácido gordo), ou através de uma porção ligante, por exemplo, um grupo C₁-C₁₂, bivalente em que um ou mais átomos de carbono podem ser substituídos por um heteroátomo tal

como oxigênio, azoto ou enxofre. Porções ligantes adequadas incluem, por exemplo, tetraetilenoglicol, $-(\text{CH}_2)_3-$, $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_6-\text{NH}-$, $-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-$ e $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}-\text{NH}-$. Agentes modificadores que compreendem uma porção ligante podem ser produzidos, por exemplo, por reação de um mono-Boc-alquildiamina (por exemplo, mono-Boc-etilenodiamina, mono-Boc-diamino-hexano) com um ácido gordo, na presença de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) para formar uma ligação amida entre a amina livre e o carboxilato de ácido gordo. O grupo protetor Boc pode ser removido do produto por tratamento com ácido trifluoroacético (TFA) para expor uma amina primária que pode ser acoplada a outro carboxilato como descrito, ou pode ser feita reagir com anidrido maleico e o produto resultante ciclizado para produzir um maleimido ativado derivado do ácido gordo. (Ver, por exemplo, Thompson, et al., WO 92/16221).

Os anticorpos modificados podem ser produzidos por reação de um anticorpo humano ou um fragmento de ligação ao antigénio com um agente de modificação. Por exemplo, as porções orgânicas podem ser ligadas ao anticorpo de uma forma não específica do sítio, empregando um agente de modificação amino-reativo, por exemplo, um éster de NHS de PEG. Os anticorpos humanos modificados ou fragmentos de ligação ao antigénio podem também ser preparados por redução de ligações dissulfureto (por exemplo, ligações intra-cadeia de dissulfureto) de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio. O anticorpo reduzido ou fragmento de ligação ao antigénio pode então ser feito reagir com um agente de modificação de tiol-reativo para produzir o anticorpo modificado. Os anticorpos humanos modificados e fragmentos de ligação ao antigénio compreendendo uma porção

orgânica que é ligada a sítios específicos de um anticorpo da presente invenção pode ser preparados utilizando métodos adequados, tais como proteólise reversa (Fisch et al., *Bioconjugate Chem.*, 3:147-153 (1992); Werlen et al., *Bioconjugate Chem.*, 5:411-417 (1994); Kumaran et al., *Protein Sci.* 6 (10):2233-2241 (1997); Itoh et al., *Bioorg. Chem.*, 24 (1):59-68 (1996); Capellas et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 56 (4):456-463 (1997)), e os métodos descritos em Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996).

Os anticorpos da invenção podem ligar IL-6 humana com uma ampla gama de afinidades (K_D). Numa forma de realização preferida, pelo menos um mAb humano da presente invenção pode, opcionalmente, ligar-se a IL-6 humana com elevada afinidade. Por exemplo, um mAb pode ligar-se a IL-6 humana, com um K_D igual ou inferior a cerca de 10^{-7} M, tal como, mas não limitados a, 0,1-9,9 (ou qualquer gama ou valor dentre esse) $\times 10^{-7}$, 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} , ou qualquer intervalo ou valor dentre esses.

A afinidade ou avidéz de um anticorpo para um antigénio pode ser determinada experimentalmente utilizando qualquer método adequado. (Ver, por exemplo, Berzofsky, et al, "Antibody-Antigen Interactions", em *Fundamental Immunology*, Paul, W.E., Ed, Raven Press: New York, NY (1984); Kuby, Janis *Immunology*, W.H. Freeman and Company: New York, NY (1992), e métodos aqui descritos). A afinidade medida de uma determinada interação anticorpo-antigénio pode variar se medida sob diferentes condições (por exemplo, a concentração salina, pH). Assim, as medições de afinidade e outros parâmetros de ligação ao antigénio (por exemplo, K_D , K_A , K_d) são de preferência

feitos com soluções padronizadas de anticorpo e de antigénio, e um tampão padronizado, tal como o tampão aqui descrito.

Anticorpos anti-IL-6-8 cCLB úteis nos métodos e nas composições da presente invenção são caracterizados por ligação de elevada afinidade à IL-6 e, opcionalmente, e preferencialmente, terem baixa toxicidade. Em particular, um anticorpo, fragmento especificado ou variante da invenção, em que os componentes individuais, tais como a região variável, região constante e estrutura, individualmente e/ou colectivamente, opcionalmente e preferencialmente, possuem baixa imunogenicidade, são úteis na presente invenção. Os anticorpos que podem ser utilizados na invenção são facultativamente caracterizados pela sua capacidade para tratar pacientes durante períodos prolongados com atenuação dos sintomas mensurável e toxicidade baixa e/ou aceitável. Baixa ou aceitável imunogenicidade e/ou afinidade elevada, bem como outras propriedades adequadas, podem contribuir para os resultados terapêuticos atingidos. "Baixa imunogenicidade" é aqui definida como o aumento significativo de HAAA, HACA ou HAMA em menos respostas do que cerca de 75%, ou preferivelmente menos do que cerca de 50% dos pacientes tratados e/ou aumento de títulos baixos no paciente tratado (menos do que cerca de 300, de preferência inferior a cerca de 100 medidos com um imunoensaio de enzima antigene duplo) (Elliott et al., Lancet 344:1125-1127 (1994)).

Quando cCLB8 é comparado com outros anticorpos específicos IL-6 CLB.IL-6/14 e CLB.IL-6/16, pode-se ver as características distintas de afinidade do anticorpo e especificidade do epitopo. cCLB8, um anticorpo que se liga

a IL-6 e normalmente bloqueia a interação entre a IL-6 e o seu receptor, pode inibir praticamente 100% da função da IL-6, como ilustrado em ambas, como o bioensaio de proliferação celular 7TD1 dependente de IL-6 e ensaio baseado em Luminex de ligação de IL-6 ao de receptor IL-6. Em contraste, CLB.IL-6/16, um anticorpo que se liga a IL-6, mas neutraliza por estericamente impedir a interação entre o complexo IL-6/IL-6R e o componente de sinalização de gp130, pode inibir apenas 62% da ligação biotina-IL-6. Finalmente, um anticorpo que se liga a IL-6, mas não interfere com a sua atividade biológica, tal como o CLB.IL-6/14, não exibe uma inibição de ligação de biotina-IL-6 da fase sólida sIL-6R/gp80.

Anticorpos bio específicos, hetero específicos, hetero conjugados ou semelhantes podem também ser usados uma vez que são anticorpos monoclonais, humanizados, que possuem especificidades de ligação para pelo menos dois antigénios diferentes. No presente caso, uma das especificidades de ligação é pelo menos uma proteína IL-6, a outra é para qualquer outro antigénio. Os métodos para produzir anticorpos bio específicos são conhecidos na técnica. Tradicionalmente, a produção recombinante de anticorpos bio específicos baseia-se na co-expressão de pares de cadeia pesada-cadeia leve de duas imunoglobulinas, onde as duas cadeias pesadas têm especificidades diferentes (Milstein e Cuello, Nature 305:537 (1983)). Devido ao arranjo aleatório de cadeias pesadas e leves de imunoglobulina, estes hibridomas (quadromas) produzem uma mistura potencial de 10 moléculas de anticorpo diferentes, das quais apenas uma tem a estrutura bio específica correta. A purificação da molécula correta, que é usualmente realizada por passos de cromatografia de afinidade, é bastante complicada, e os

rendimentos de produto são baixos. Procedimentos semelhantes são divulgados, por exemplo, na WO 93/08829, Patentes US 6210668, 6193967, 6132992, 6106833, 6060285, 6037453, 6010902, 5989530, 5959084, 5959083, 5932448, 5833985, 5821333, 5807706, 5643759, 5601819, 5582996, 5496549, 4676980, WO 91/00360, WO 92/00373, EP 03089, Traunecker et al. EMBO J. 10:3655 (1991), Suresh et al., Methods in Enzymology 121:210 (1986).

Moléculas de Ácido Nucleico

Utilizando a informação aqui fornecida, tal como as sequências de nucleótidos que codificam pelo menos 70-100% dos aminoácidos contíguos de, pelo menos, uma das SEQ ID N°s: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, fragmentos especificados, variantes ou sequências de consenso dos mesmos, ou um vector depositado compreendendo, pelo menos, uma dessas sequências, uma molécula de ácido nucleico que codifica pelo menos um anticorpo anti-IL-6 cCLB-8 podem ser obtidas utilizando métodos aqui ou como é conhecido na técnica descrita.

As moléculas de ácido nucleico da presente invenção podem estar na forma de ARN, tal como mARN, hnARN, tARN ou qualquer outra forma, ou na forma de ADN, incluindo, mas não limitado a, cADN e ADN genómico obtido através de clonagem ou produzido sinteticamente, ou quaisquer combinações dos mesmos. O ADN pode ser de cadeia tripla, de cadeia dupla ou de cadeia simples, ou qualquer combinação destes. Qualquer porção de, pelo menos, uma cadeia de ADN ou ARN pode ser a cadeia de codificação, também conhecida como a cadeia com sentido, ou pode ser a cadeia não codificante, também referida como cadeia antessentido.

As moléculas de ácido nucleico isoladas aqui divulgadas podem incluir moléculas de ácido nucleico compreendendo uma grelha de leitura aberta (ORF), opcionalmente com um ou mais intrões, por exemplo, mas não limitado a, pelo menos, uma porção específica de, pelo menos, uma CDR, como CDR1, CDR2 e/ou CDR3 de, pelo menos, uma cadeia pesada (por exemplo, SEQ ID N°s :1-3) ou cadeia leve (por exemplo, SEQ ID N°s: 4-6); moléculas de ácido nucleico compreendendo a sequência que codifica para um anticorpo anti-IL-6, ou região variável (por exemplo, SEQ ID N°s: 15 ou 16); e moléculas de ácidos nucleicos que compreendem uma sequência de nucleótidos substancialmente diferente daqueles descritos acima, mas que, devido à degenerescência do código genético, ainda codificam, pelo menos, um anticorpo anti-IL-6 como aqui descrito e/ou como conhecido na arte. Claro que, o código genético é bem conhecido na técnica. Assim, seria rotina para um perito na técnica gerar tais variantes degeneradas de ácidos nucleicos que codificam para anticorpos anti-IL-6 específicos da presente invenção. Ver, por exemplo, Ausubel, et al., *Supra*, e as variantes de ácidos nucleicos que estão incluídas na presente invenção. Exemplos não limitativos de moléculas de ácido nucleico isoladas incluem as SEQ ID N°s: 9-16; correspondentes a exemplos não limitativos de um ácido nucleico codificando, respectivamente, HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2, LC CDR3, região variável de HC e região variável de LC.

Tal como é aqui indicado, as moléculas de ácido nucleico da presente invenção, que compreendem um ácido nucleico que codifica um anticorpo anti-IL-6 da invenção podem incluir, mas não estão limitadas a, aqueles que codificam a sequência de aminoácidos de um fragmento de anticorpo, por

si só; a sequência de codificação para o anticorpo inteiro ou uma porção deste; a sequência que codifica para um anticorpo, fragmento ou porção, bem como sequências adicionais, tais como a sequência codificadora de pelo menos um péptido de sinal líder ou de fusão, com ou sem as referidas sequências de codificação adicionais, tal como, pelo menos, um intrão, em conjunto com sequências não codificantes adicionais, incluindo, mas não limitado a, sequências não-codificantes 5' e 3', tais como as sequências transcritas, não traduzidas que desempenham um papel na transcrição, no processamento de mARN, incluindo sinais de splicing e de poliadenilação (por exemplo, ligação ao ribossoma e estabilidade de mARN); uma sequência de codificação adicional que codifica para aminoácidos adicionais, tais como aqueles que proporcionam funcionalidades adicionais. Assim, a sequência que codifica um anticorpo pode ser fundida com uma sequência marcadora, tal como uma sequência que codifica um péptido que facilita a purificação do anticorpo fundido compreendendo um fragmento de anticorpo ou porção.

Polinucleótidos que seletivamente hibridam com um polinucleótido como aqui descrito

São também aqui divulgados ácidos nucleicos isolados que hibridam sob condições de hibridação seletiva com um polinucleótido aqui revelado. Deste modo, estes polinucleótidos podem ser utilizados para o isolamento, detecção e/ou quantificação de ácidos nucleicos compreendendo esses polinucleótidos. Por exemplo, esses polinucleótidos podem ser utilizados para identificar, isolar ou amplificar clones parciais ou de comprimento completo de uma biblioteca depositada. Em algumas concretizações, os polinucleótidos são sequências genómicas ou de cADN isolado, ou de outro modo, complementares para

um cADN a partir de uma biblioteca de ácido nucleico humana ou de mamífero.

De preferência, a biblioteca de cADN compreende pelo menos 80% sequências de comprimento total, de preferência pelo menos 85% ou 90% sequências de comprimento total, e mais preferivelmente pelo menos 95% de sequências de comprimento total. As bibliotecas de cADN podem ser normalizadas para aumentar a representação das sequências raras. As condições de hibridação de rigor moderado ou baixo são tipicamente, mas não exclusivamente, empregues com sequências com uma identidade de sequência reduzida em relação às sequências complementares. Condições de rigor moderado e elevado podem, opcionalmente, ser empregues para a maior identidade de sequências. Condições de baixo rigor permitem a hibridação seletiva de sequências tendo cerca de 70% de identidade de sequência e podem ser utilizadas para identificar sequências de ortólogos ou parálogos.

Opcionalmente, os polinucleótidos irão codificar pelo menos uma porção de um anticorpo codificado pelos polinucleótidos aqui descritos. Os polinucleótidos abraçam sequências de ácidos nucleicos que podem ser utilizadas para a hibridação seletiva com um polinucleótido que codifica um anticorpo da presente invenção. Ver, por exemplo, Ausubel, supra; Colligan, supra.

Construção de Ácidos Nucleicos

Os ácidos nucleicos isolados da presente invenção podem ser feitos utilizando (a) métodos recombinantes, (b) técnicas sintéticas, (c), técnicas de purificação, ou suas combinações, bem conhecidas na técnica.

Os ácidos nucleicos podem, convenientemente, compreender sequências, além de um polinucleótido da presente invenção. Por exemplo, um sítio de multi-clonagem compreendendo um ou mais sítios de restrição de endonuclease pode ser inserido no ácido nucleico para auxiliar no isolamento do polinucleótido. Além disso, as sequências traduzíveis podem ser inseridas para auxiliar no isolamento do polinucleótido traduzido da presente invenção. Por exemplo, uma sequência marcadora de hexa-histidina proporciona um meio conveniente para purificar as proteínas da presente invenção. O ácido nucleico da presente invenção - excluindo a sequência de codificação - é opcionalmente um vector, adaptador ou ligante para clonagem e/ou expressão de um polinucleótido da presente invenção.

Sequências adicionais podem ser adicionados a tal clonagem e/ou sequências de expressão para otimizar a sua função na clonagem e/ou expressão, para auxiliar no isolamento do polinucleótido ou para melhorar a introdução do polinucleótido para uma célula. A utilização de vectores de clonagem, vectores de expressão, adaptadores e ligantes são bem conhecidos na técnica. (Ver, por exemplo, Ausubel, *supra*, ou Sambrook, *supra*).

Métodos recombinantes para a construção de ácidos nucleicos

As composições de ácido nucleico isolado da presente invenção, tais como ARN, cADN, ADN genómico, ou qualquer combinação dos mesmos, podem ser obtidas a partir de fontes biológicas através de qualquer número de metodologias de clonagem conhecidas dos especialistas na técnica. Em algumas concretizações, as sondas de oligonucleótidos que hibridam seletivamente, sob condições rigorosas, com os polinucleótidos da presente invenção são usadas para

identificar a sequência desejada de uma biblioteca de cADN ou ADN genómico. O isolamento de ARN, e construção de bibliotecas de cADN e genómico, é bem conhecido dos peritos na técnica. (Ver, por exemplo, Ausubel, *supra*, ou Sambrook, *supra*).

Métodos de apresentação e isolamento de ácidos nucleicos

Uma biblioteca de cADN ou genómico pode ser pesquisada usando uma sonda com base na sequência de um polinucleótido da presente invenção, tal como aquelas aqui reveladas. As sondas podem ser utilizadas para hibridar com o ADN genómico ou cADN para isolar sequências de genes homólogos nas mesmas ou em diferentes organismos. Aqueles peritos na técnica apreciarão que vários graus de rigor de hibridização podem ser empregues no ensaio; e quer a hibridação ou o meio de lavagem podem ser rigorosos. À medida que as condições de hibridação se tornam mais rigorosas, deve existir um maior grau de complementaridade entre a sonda e o alvo para que ocorra a formação dupla. O grau de rigor pode ser controlado por um ou mais de temperatura, força iónica, pH e pela presença de um solvente parcialmente desnaturante como a formamida. Por exemplo, o rigor da hibridação é convenientemente variado pela alteração da polaridade da solução reagente através, por exemplo, da manipulação da concentração de formamida dentro da gama de 0% a 50%. O grau de complementaridade (identidade de sequência) requerido para a ligação detectável irá variar de acordo com o rigor do meio de hibridização e/ou do meio de lavagem. O grau de complementaridade será otimamente de 100%, ou 70-100%, ou qualquer intervalo ou valor dentre esses. No entanto, deve ser compreendido que pequenas variações na sequência nas sondas e iniciadores podem ser compensadas por redução do rigor da hibridização e/ou do meio de lavagem.

Os métodos de amplificação de ARN ou ADN são bem conhecidos na técnica e podem ser utilizados de acordo com a presente invenção, sem experimentação indevida, com base nos ensinamentos e orientações aqui apresentados.

Os métodos conhecidos de amplificação de ADN ou ARN incluem, mas não estão limitados a, reação em cadeia da polimerase (PCR) e processos de amplificação relacionados (ver, por exemplo, as Patentes US 4683195, 4683202, 4800159, 4965188, de Mullis, et al.; 4795699 e 4921794 de Tabor et al; 5142033 de Innis; 5122464 de Wilson, et al.; 5091310 de Innis; 5066584 de Gyllensten et al.; 4889818 de Gelfand, et al.; 4994370 de Prata, et al.; 4766067 de Biswas; 4656134 de Ringold) e amplificação mediada por ARN que usa ARN antessentido para a sequência alvo como um molde para a síntese de ADN de cadeia dupla (Patente US 5130238 de Malek, et al., com o nome comercial NASBA). (Ver, por exemplo, Ausubel, *supra*; ou Sambrook, *supra*).

Por exemplo, a tecnologia de reação em cadeia da polimerase (PCR) pode ser utilizada para amplificar as sequências de polinucleótidos da presente invenção e genes relacionados diretamente a partir de ADN genómico ou bibliotecas de cADN. PCR e outros métodos de amplificação *in vitro* podem também ser úteis, por exemplo, para clonar sequências de ácido nucleico que codificam proteínas para serem expressas, para fazer ácidos nucleicos para usar como sondas para detectar a presença do mARN desejado em amostras, para a sequenciação de ácido nucleico, ou para outros fins. Exemplos de técnicas suficientes para dirigir pessoas experientes através de métodos de amplificação *in vitro* são encontrados em Berger, *supra*, Sambrook, *supra*, e Ausubel, *supra*, assim como em Mullis, et al., Patente US

4683202 (1987); e Innis, et al., PCR Protocols A Guide to Methods and Applications, Eds., Academic Press Inc., San Diego, CA (1990). Kits comercialmente disponíveis para a amplificação genômica por PCR são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, o Kit Advantage-GC Genomic PCR (Clontech). Além disso, por exemplo, o gene T4 da proteína 32 (Boehringer Mannheim) pode ser usado para melhorar o rendimento de produtos de PCR longos.

Métodos de síntese para a construção de ácidos nucleicos

Os ácidos nucleicos isolados da presente invenção podem também ser preparados por síntese química direta através de métodos conhecidos (ver, por exemplo, Ausubel, et al. supra). A síntese química produz geralmente um oligonucleótido de cadeia simples, que pode ser convertido em ADN de cadeia dupla por hibridização com uma sequência complementar, ou por polimerização com uma polimerase de ADN utilizando a cadeia simples como um molde. Um perito na técnica reconhecerá que enquanto a síntese química de ADN pode ser limitada a sequências de cerca de 100 ou mais bases, sequências mais longas podem ser obtidas por ligação de sequências mais curtas.

Cassetes de expressão recombinantes

A presente invenção proporciona ainda cassetes de expressão recombinantes compreendendo um ácido nucleico da presente invenção. Uma sequência de ácido nucleico da presente invenção, por exemplo um cADN ou uma sequência genômica que codifica um anticorpo da presente invenção, pode ser utilizada para construir uma cassette de expressão recombinante que pode ser introduzida em pelo menos uma célula hospedeira desejada. Uma cassette de expressão recombinante compreenderá tipicamente um polinucleótido da

presente invenção operacionalmente ligado a sequências reguladoras da iniciação da transcrição que irão dirigir a transcrição do polinucleótido na célula hospedeira pretendida. Ambos os promotores heterólogos e não heterólogos (ou seja, endógenos) podem ser empregues para dirigir a expressão dos ácidos nucleicos da presente invenção.

Em algumas formas de realização, os ácidos nucleicos isolados que servem como promotor, potenciador, ou outros elementos podem ser introduzidos na posição apropriada (a montante, a jusante ou no intrão) de uma forma não-heteróloga de um polinucleótido da presente invenção, de modo a sub-regular ou sobre-regular a expressão de um polinucleótido da presente invenção. Por exemplo, os promotores endógenos podem ser alterados *in vivo* ou *in vitro*, por mutação, eliminação e/ou substituição.

Vetores e células hospedeiras

A presente invenção também se refere a vectores que incluem moléculas de ácido nucleico isoladas da presente invenção, células hospedeiras que são geneticamente manipuladas com os vectores recombinantes, e a produção de, pelo menos, um anticorpo anti-IL-6 através de técnicas recombinantes, como é bem conhecido na técnica. Ver, por exemplo, Sambrook, et al, supra, . Ausubel, et al, supra.

Os polinucleótidos podem opcionalmente ser unidos a um vector que contém um marcador de seleção para propagação num hospedeiro. Geralmente, um vector plasmídeo é introduzido num precipitado, tal como um precipitado de fosfato de cálcio, ou num complexo com um lípido carregado.

Se o vector for um vírus, pode ser empacotado *in vitro* utilizando uma linha celular de empacotamento apropriada e depois transduzido em células hospedeiras.

O inserto de ADN deve ser operativamente ligado a um promotor apropriado. As construções de expressão irão conter adicionalmente sítios para a iniciação da transcrição, terminação e, na região transcrita, um sítio de ligação ao ribossoma para a tradução. A porção de codificação dos transcritos maduros expressos pelas construções incluirá de preferência, um início de tradução no codão de iniciação e de terminação (por exemplo, UAA, UGA ou UAG) apropriadamente posicionado no fim do mRNA a ser traduzido, com UAA e UAG preferidos para a expressão em células de mamífero ou eucarióticas.

Os vectores de expressão irão incluir, opcionalmente, mas preferivelmente, pelo menos, um marcador selecionável. Tais marcadores incluem, por exemplo, mas não limitado a, metotrexato (MTX), di-hidrofolato redutase (DHFR, Patentes US 4399216; 4634665; 4656134; 4956288; 5149636; 5179017, ampicilina, neomicina (G418), ácido micofenólico, glutamina sintetase (GS, Patentes US 5122464; 5770359; 5827739) resistência à cultura de células eucarióticas, e genes de resistência à tetraciclina ou ampicilina para cultivo em *E. coli* e outras bactérias ou procarióticos. Meios de cultura apropriados e as condições para as células hospedeiras acima descritas são conhecidos na técnica. Os vectores apropriados serão prontamente evidentes para um especialista na matéria. A introdução de um vector de construção para uma célula hospedeira pode ser efectuada por transfecção com fosfato de cálcio, transfecção de DEAE mediada por dextrano, transfecção catiónica mediada por

lípidos, electroporação, transdução, infecção ou outros métodos conhecidos. Tais métodos estão descritos na técnica, tais como Sambrook, supra, Capítulos 1-4 e 16-18; Ausubel, supra, Capítulos 1, 9, 13, 15, 16.

Pelo menos um anticorpo da presente invenção pode ser expresso numa forma modificada, tal como uma proteína de fusão, e pode incluir não só sinais de secreção, mas também regiões funcionais heterólogas adicionais. Por exemplo, uma região de aminoácidos adicionais, em particular aminoácidos carregados, pode ser adicionada ao terminal N de um anticorpo para melhorar a estabilidade e persistência na "célula hospedeira, durante a purificação ou durante a manipulação e armazenamento subsequentes. Além disso, porções de péptidos podem ser adicionadas a um anticorpo da presente invenção para facilitar a purificação. Tais regiões podem ser removidas antes da preparação final de um anticorpo ou, pelo menos, um seu fragmento. Tais métodos são descritos em muitos manuais de laboratório convencionais, tais como Sambrook, supra, Capítulos 17,29-17,42 e 18,1-18,74; Ausubel, supra, Capítulos 16, 17 e 18.

Os vulgares peritos na técnica são conhecedores dos numerosos sistemas de expressão disponíveis para expressão de um ácido nucleico que codifica uma proteína da presente invenção.

Alternativamente, os ácidos nucleicos da presente invenção podem ser expressos numa célula hospedeira ligando (por manipulação) numa célula hospedeira que contém ADN endógeno que codifica um anticorpo da presente invenção. Tais métodos são bem conhecidos na técnica, por exemplo, como

descrito nas Patentes US 5580734, 5641670, 5733746, e 5733761.

Culturas de células ilustrativas úteis para a produção dos anticorpos, ou de porções determinadas variantes da mesma, são as células de mamíferos. Os sistemas de células de mamífero estarão muitas vezes na forma de monocamadas de células, embora as suspensões de células de mamífero ou biorreatores possam também ser usadas. Um certo número de linhas de células hospedeiras adequadas, capazes de expressar proteínas glicosiladas intactas foi desenvolvido na técnica, e incluem as linhas celulares COS-1 (por exemplo, ATCC CRL 1650), COS-7 (por exemplo, ATCC CRL-1651), HEK293, BHK21 (por exemplo, ATCC CRL-10), CHO (por exemplo, ATCC CRL 1610) e BSC-1 (por exemplo, ATCC CRL-26), as células COS-7, as células CHO, as células Hep G2, P3x63Ag8.653, SP2/0-AG14, células 293, células HeLa e semelhantes, estão prontamente disponíveis a partir de, por exemplo, a American Type Culture Collection, Manassas, Va (www.atcc.org). As células hospedeiras preferidas incluem células de origem linfóide tais como células de mieloma e linfoma. Células hospedeiras particularmente preferidas são as células P3x63Ag8.653 (número de acesso ATCC CRL-1580) e SP2/0-Ag14 células (número de acesso ATCC CRL-1851). Numa concretização particularmente preferida, a célula recombinante é uma célula P3X63Ab8.653 ou SP2/0-Ag14.

Os vectores de expressão para estas células podem incluir uma ou mais das seguintes sequências de controlo de expressão, tais como, mas não limitadas a uma origem de replicação, um promotor (por exemplo, promotores tardios ou precoces de SV40, o promotor de CMV (Patentes 5168062;

5385839), um promotor de HSV tk, um promotor pgk (fosfoglicerato quinase), um promotor EF-1 alfa (Patente US 5266491), pelo menos um promotor de imunoglobulina humana; um potenciador e/ou sítios de processamento de informação, tais como sítios de ligação ao ribossoma, sítios de splicing de ARN, sítios de poliadenilação (por exemplo, um sítio de adição SV40 grande T Ag poli), e sequências de terminação da transcrição. Ver, por exemplo, Ausubel et al, supra, Sambrook, et al, supra. Outras células úteis para a produção de ácidos nucleicos ou proteínas da presente invenção são conhecidas e/ou estão disponíveis, por exemplo, a partir da American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas (www.atcc.org) ou outras fontes conhecidas ou comerciais.

Quando as células hospedeiras eucarióticas são empregues, as sequências de poliadenilação ou de terminação da transcrição são tipicamente incorporadas no vector. Um exemplo de uma sequência de terminação é a sequência de poliadenilação do gene da hormona de crescimento bovina. Sequências para o splicing preciso da transcrição também podem ser incluídas. Um exemplo de uma sequência de splicing é o intrão VP1 de SV40 (Sprague, et al. Virol. 45:773-781 (1983)). Além disso, as sequências de genes para controlar a replicação na célula hospedeira podem ser incorporadas no vector, como conhecido na técnica.

Produção de um anticorpo

Pelo menos um anticorpo anti-IL-6 da presente invenção pode ser, opcionalmente, produzido por uma linha celular, uma linha celular mista, uma célula imortalizada ou população clonal de células imortalizadas, como bem conhecido na técnica. Ver, por exemplo, Ausubel, et al., Ed., Current

Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque, Nova Iorque (1987-2001); Sambrook, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edição, Cold Spring Harbor, Nova Iorque (1989); Harlow e Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nova Iorque (1989); Colligan, et al., Eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, Nova Iorque, NY, (1997-2001).

Numa abordagem, um hibridoma que é produzido através da fusão de uma linha celular imortal adequada (por exemplo, uma linha de células de mieloma, tais como, mas não limitadas a, Sp2/0, Sp2/0-AG14, NSO, NS1, NS2, AE-1, L.5, > 243, P3x63Ag8.653, Sp2 SA3, Sp2 MAI, SP2 SS1, Sp2 SA5, U937, MLA 144, IV ACT, MOLT4, DA-1, JURKAT, WEHI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMAIWA, NEURO 2A, ou semelhantes, ou heteromielomas, produtos da fusão dos mesmos, ou qualquer célula ou fusão celular dela derivada, ou qualquer outra linha celular adequada, como conhecido na técnica. Veja-se, por exemplo, www.atcc.org, www.lifetech.com, e semelhantes, com as células produtoras de anticorpos, tais como, mas não limitados a, baço clonado ou isolado, sangue periférico, linfa, amígdalas, ou outras células que contenham células imunitárias ou B, ou quaisquer outras células que expressam sequências constantes ou variáveis de cadeia pesada ou leve ou de estrutura ou de CDR, quer como ácido nucleico endógeno ou heterólogo, recombinante ou endógeno, viral, bacteriano, de algas, procariótico, anfíbio, insectos, répteis, peixes, mamíferos, roedores, equinos, ovinos, caprinos, primatas, eucarióticos, ADN genómico, cADN, rADN, mitocondrial ADN ou ARN, ADN do cloroplasto ou ARN, hnARN, mARN, tARN, de

cadeia simples, dupla ou tripla, hibridização e similares ou qualquer combinação dos mesmos. Ver, por exemplo, Ausubel, supra, e Colligan, Immunology, supra, capítulo 2.

Qualquer outra célula hospedeira adequada pode também ser usada para a expressão heteróloga ou endógena de ácido nucleico que codifica um anticorpo, fragmento especificado ou sua variante, da presente invenção. As células fundidas (hibridomas) ou as células recombinantes podem ser isoladas utilizando condições de cultura seletivas ou outros modos conhecidos adequados e clonadas por diluição limitante ou separação de células, ou outros métodos conhecidos. As células que produzem anticorpos com a especificidade desejada podem ser selecionadas por um ensaio adequado (por exemplo, ELISA).

Os anticorpos da presente invenção também podem ser preparados utilizando, pelo menos, um anticorpo anti-IL-6, que codifica o ácido nucleico para proporcionar animais transgênicos ou mamíferos, como cabras, vacas, cavalos, ovelhas, e semelhantes, que produzem tais anticorpos no seu leite. Tais animais podem ser fornecidos através de métodos conhecidos. Ver, por exemplo, mas não limitado a, Patentes US 5827690; 5849992; 4873316; 5849992; 5994616, 5565362; 5304489, e semelhantes.

Os anticorpos da presente invenção podem, adicionalmente, ser preparados utilizando pelo menos um anticorpo anti-IL-6, que codifica o ácido nucleico para fornecer plantas transgênicas e células de plantas em cultura (por exemplo, mas não limitado a tabaco e milho) que produzem esses anticorpos, porções ou variantes especificadas nas partes

das plantas ou em células cultivadas da mesma. Como um exemplo não limitante, folhas de tabaco transgênico expressando as proteínas recombinantes foram utilizadas com sucesso para proporcionar grandes quantidades de proteínas recombinantes utilizando, por exemplo, um promotor indutível. Ver, por exemplo, Cramer, et al., Curr. Top. Microbol. Immunol. 240:95-118 (1999) e referências aí citadas. Além disso, o milho transgênico tem sido utilizado para expressar proteínas de mamífero a níveis de produção comercial, com atividades biológicas equivalentes às produzidas em outros sistemas recombinantes ou purificados a partir de fontes naturais. Ver, por exemplo, Hood et al., Adv. Exp. Med. Chem. Biol. 464:127-147 (1999) e referências aí citadas, os anticorpos também têm sido produzidos em grandes quantidades a partir de sementes de plantas transgênicas, incluindo fragmentos de anticorpos, tais como anticorpos de cadeia simples (scFv), incluindo sementes de tabaco e de tubérculos de batata. Ver, por exemplo, Conrad et al., Plant Mol. Biol. 38:101-109 (1998) e referências aí citadas. Assim, os anticorpos da presente invenção também podem ser produzidos utilizando as plantas transgênicas, de acordo com métodos conhecidos. Ver também, por exemplo, Fischer et al., Biotechnol. Appl. Biochem. 30:99-108 (Outubro de 1999), Ma et al., Trends Biotechnol. 13:522-7 (1995); Ma et al., Plant Physiol. 109:341-6 (1995); Whitelam et al. Biochem. Soc. Trans. 22:940-944 (1994), e as referências aí citadas.

Purificação de um anticorpo

Um anticorpo anti-IL-6 pode ser recuperado e purificado a partir de culturas de células recombinantes por métodos bem conhecidos, incluindo, mas não se limitando a, purificação de proteína A, sulfato de amônio ou etanol, precipitação, extração ácida, cromatografia de troca aniônica ou

catiónica, cromatografia com fosfocelulose, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia de afinidade, cromatografia de hidroxilapatite e cromatografia de lectina. Cromatografia líquida de alto desempenho ("HPLC") também pode ser utilizada para a purificação. Ver, por exemplo, Colligan, Current Protocols in Immunology ou Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, Nova Iorque, NY, (1997-2001), por exemplo, os capítulos 1, 4, 6, 8, 9, 10.

Os anticorpos da presente invenção incluem produtos naturalmente purificados, produtos de procedimentos sintéticos químicos e produtos produzidos através de técnicas recombinantes a partir de um hospedeiro eucariótico, incluindo, por exemplo, levedura, plantas superiores, insectos e células de mamíferos. Dependendo do hospedeiro empregue num procedimento de produção recombinante, o anticorpo da presente invenção pode ser glicosilado ou podem ser não-glicosilado, com preferência por glicosilado. Tais métodos são descritos em muitos manuais laboratoriais padrão, tais como Sambrook, supra, secções 17,37-17,42; Ausubel, supra, Capítulos 10, 12, 13, 16, 18 e 20, Colligan, Protein Science, supra, capítulos 12-14.

Clonagem e expressão do anticorpo de IL-6 em células de mamífero

Um vector de expressão de mamífero típico contém pelo menos um elemento promotor, que medeia o início da transcrição do mRNA, a sequência de codificação de anticorpo, e os sinais necessários para a terminação da transcrição e poliadenilação do transcrito. Elementos adicionais incluem potenciadores, sequências de Kozak e sequências

intervenientes ladeadas por sítios de doador e receptor para o splicing de ARN. Uma transcrição altamente eficiente pode ser alcançada com os promotores precoces e tardios de SV40, as repetições terminais longas (LTRS) de Retrovírus, por exemplo, RSV, HTLVI, HiVi e o promotor precoce do citomegalovírus (CMV). No entanto, os elementos celulares também podem ser utilizados (por exemplo, o promotor de actina humana). Vectores de expressão adequados para utilização na prática da presente invenção incluem, por exemplo, vectores, tais como pIRES1neo pRetro-Off, pRetro-On, pLXSN, ou pLNCX (Clontech Labs, Palo Alto, CA), pcADN3.1 (+/-), pcADN/Zeo (+/-) ou pcADN3.1/Hygro (+/-) (Invitrogen), pSVL e PMSG (Pharmacia, Uppsala, Suécia), pRSVcat (ATCC 37152), pSV2dhfr (ATCC 37146) e pBC12MI (ATCC 67109). As células hospedeiras de mamífero que podem ser utilizadas incluem Hela 293 humana, células H9 e Jurkat, células de rato NIH3T3 e C127, células Cos 1, Cos 7 e CV 1, células de codorniz QC1-3, células L de ratinho e células de ovário de hamster chinês (CHO).

Alternativamente, o gene pode ser expresso em linhas de células estáveis que contêm o gene integrado num cromossoma. A co-transfecção com um marcador selecionável, tal como dhfr, gpt, neomicina ou higromicina permite a identificação e isolamento das células transfectadas.

O gene transfectado pode também ser amplificado para expressar grandes quantidades do anticorpo codificado. O marcador DHFR (di-hidrofolato redutase) é útil para desenvolver linhagens de células que carregam várias centenas ou mesmo vários milhares de cópias do gene de interesse. Outra marca de seleção útil é a enzima glutamina sintetase (GS) (Murphy, et al. Biochem. J. 227:277-279

(1991); Bebbington, et al., *Bio/Technology* 10:169-175 (1992)). Utilizando estes marcadores, as células de mamífero são cultivadas em meio seletivo e as células com a maior resistência são selecionadas. Estas linhas de células contêm o gene amplificado integrado num cromossoma. Células do ovário de hamster chinês (CHO) e as células NSO são frequentemente utilizadas para a produção de anticorpos.

Os vectores de expressão pC1 e pC4 contêm o promotor forte (LTR) do Vírus do Sarcoma de Rous (Cullen, et al., *Molec. Cell. Biol.* 5:438-447 (1985)) mais um fragmento do ativador de CMV (Boshart, et al., *Cell* 41:521-530 (1985)). Múltiplos sítios de clonagem, por exemplo, com os sítios de clivagem da enzima de restrição BamHI, XbaI e Asp718, facilitam a clonagem do gene de interesse. Os vectores contêm em adição, o intrão 3', o sinal de poliadenilação e terminação do gene de preproinsulina de rato.

Clonagem e expressão em células CHO

O vector pC4 é usado para a expressão do anticorpo de IL-6. O plasmídeo pC4 é um derivado do plasmídeo pSV2-dhfr (número de acesso ATCC 37146). O plasmídeo contém o gene DHFR de rato sob controlo do promotor precoce de SV40. O ovário de hamster chinês ou outras células a que faltam atividade de diidrofolato que são transfectadas com estes plasmídeos podem ser selecionados por crescimento das células num meio seletivo (por exemplo, alfa minus MEM, Life Technologies, Gaithersburg, MD) suplementado com o agente quimioterápico metotrexato. A amplificação dos genes DHFR em células resistentes ao metotrexato (MTX) tem sido bem documentada (ver, por exemplo, F.W. Alt, et al. *J. Biol. Chem.* 253:1357-1370 (1978); J.L. Hamlin e C. Ma,

Biochem. et Biophys. Acta 1097:107-143 (1990); e M.J. Page e M.A. Sydenham, Biotechnology 9:64-68 (1991)). As células crescidas em concentrações crescentes de MTX desenvolvem resistência ao fármaco por superprodução da enzima alvo, DHFR, como resultado da amplificação do gene DHFR. Se um segundo gene é ligado ao gene DHFR, ele é normalmente co-amplificado e sobre expresso. É sabido na técnica que esta abordagem pode ser usada para desenvolver linhagens de células que transportem mais de 1000 cópias do gene ou genes amplificados. Subsequentemente, quando o é metotrexato retirado, as linhas de células que são obtidas contêm o gene amplificado integrado num ou mais cromossomas da célula hospedeira.

O plasmídeo pC4 contém, para expressar o gene de interesse, o promotor forte da repetição terminal longa (LTR) do Vírus do Sarcoma de Rous (Cullen, et al., Molec. Cell. Biol. 5:438-447 (1985)) mais um fragmento isolado do ativador do gene precoce imediato do citomegalovírus humano (CMV) (Boshart, et al., Cell 41:521-530 (1985)). A jusante do promotor estão os sítios de clivagem de enzimas de restrição BamHI, XbaI e Asp718 que permitem a integração dos genes. Atrás destes sítios de clonagem o plasmídeo contém a extremidade 3' do intrão e o sítio de poliadenilação do gene da preproinsulina de rato. Outros promotores de elevada eficiência podem também ser utilizados para a expressão, por exemplo, o promotor humano de b-actina, os promotores de SV40 precoces ou tardios, ou as repetições terminais longas de outros retrovírus, por exemplo, HIV e HTLV. Os sistemas de expressão de genes Clontech Tet-Off e Tet-On e sistemas semelhantes podem ser utilizados para expressar a IL-6, de um modo regulado em células de mamífero (M. Gossen, e H. Bujard, Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 89: 5547-5551 (1992)). Para a poliadenilação do mRNA outros sinais, por exemplo, a partir da hormona de crescimento humana ou de genes de globina podem ser usados também. Linhas de células estáveis que transportem um gene de interesse integrado nos cromossomas também podem ser selecionadas mediante co-transfecção com um marcador selecionável, tal como gpt, G418 ou higromicina. É vantajoso usar mais do que um marcador selecionável no início, por exemplo G418 mais metotrexato.

O plasmídeo pC4 é digerido com enzimas de restrição e depois desfosforilado utilizando fosfatase intestinal de vitelo por processos conhecidos na técnica. O vector é então isolado a partir de um gel de agarose a 1%.

A sequência de ADN que codifica para o anticorpo completo de IL-6 é utilizado, por exemplo, tal como apresentado nas SEQ ID N°s: 7 e 8, correspondendo às regiões variáveis HC e LC de um anticorpo da presente invenção, a IL-6, de acordo com passos de métodos conhecidos. O ácido nucleico isolado que codifica uma região constante humana adequada (isto é, as regiões de HC e LC), também é utilizado nesta construção.

A região variável e constante isolada que codifica o ADN e o vector desfosforilado são então ligados com ligase de ADN T4. As células de E. coli HB101 ou XL-1 Blue são então transformadas e são identificadas as bactérias que contêm o fragmento inserido no plasmídeo pC4 usando, por exemplo, análise de restrição enzimática.

Células de ovário de hamster chinês (CHO), na falta de um gene de DHFR ativo, são utilizadas para a transfecção. 5 µg do plasmídeo de expressão pC4 são co-transfectados com 0,5 µg do plasmídeo pSV2-neo usando lipofectina. O plasmídeo pSV2neo contém uma marca de seleção dominante, o gene neo de Tn5 que codifica uma enzima que confere resistência a um grupo de antibióticos incluindo o G418. As células são semeadas em alfa minus MEM enriquecido com 1 µg/ml de G418. Após 2 dias, as células são tratadas com tripsina e semeadas em placas de clonagem de hibridoma (Greiner, Alemanha) em alfa minus MEM enriquecido com 10, 25 ou 50 ng/ml de metotrexato mais 1 µg/ml de G418. Depois de cerca de 10-14 dias os clones individuais são tripsinizados e semeados em placas de petri de 6 poços ou frascos de 10 ml usando diferentes concentrações de metotrexato (50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM). Os clones que crescem nas maiores concentrações de metotrexato são, então, transferidos para novas placas de 6 poços contendo concentrações ainda mais elevadas de metotrexato (1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM). O mesmo procedimento é repetido até que sejam obtidos clones que crescem a uma concentração de 100-200 mM. A expressão do produto do gene desejado é analisada, por exemplo, por SDS-PAGE e Western blot ou por análise de HPLC de fase inversa.

Anticorpos anti-idiotipo para composição de anticorpos anti-IL-6

Além dos anticorpos monoclonais ou quiméricos anti-IL-6, um anticorpo anti-idiotípico (anti-Id) específico para esses anticorpos da invenção é aqui descrito. Um anticorpo anti-Id é um anticorpo que reconhece determinantes únicos geralmente associados com a região de ligação de antigénio de outro anticorpo. O anti-Id pode ser preparado por imunização de um animal da mesma espécie e tipo genético

(por exemplo, estirpe de ratinho) como a fonte do anticorpo Id com o anticorpo ou uma região contendo CDR. O animal imunizado irá reconhecer e responder aos determinantes idiotípicos do anticorpo imunizante e produzirá um anticorpo anti-Id. O anticorpo anti-Id também pode ser utilizado como um "imunogénio" para induzir uma resposta imune em ainda outro animal, produzindo um chamado anticorpo anti-anti-Id.

Composições de anticorpos anti-IL-6

A presente invenção proporciona também, pelo menos, uma composição de anticorpo anti-IL-6, que compreende um anticorpo da invenção que é fornecida com uma composição que não ocorre naturalmente, mistura ou forma. Tais composições compreendem composições que não ocorrem naturalmente compreendendo pelo menos uma ou duas variantes eliminadas no terminal C e/ou N de comprimento total, domínios, fragmentos ou variantes especificadas, da sequência de aminoácidos do anticorpo anti-IL-6 selecionado de entre o grupo que consiste em 70-100% dos aminoácidos contíguos das SEQ ID N°s: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, ou fragmentos específicos, domínios ou as suas variantes. As composições de anticorpo anti-IL-6 preferidas incluem pelo menos um ou dois de comprimento total, fragmentos, variantes ou domínios como pelo menos uma CDR ou LBR contendo porções da sequência anticorpo de anti-IL-6, 70-100% das SEQ ID N°s: 1, 2, 3, 4, 5, 6, ou fragmentos especificados, domínios ou variantes destes. Outras composições preferidas compreendem 40-99% de pelo menos um de 70-100% das SEQ ID N°s: 1, 2, 3, 4, 5, 6, ou fragmentos especificados, domínios ou as suas variantes. Essas percentagens de composição são em peso, volume, concentração, molaridade ou molalidade como soluções líquidas ou secas, misturas, suspensões, emulsões ou

colóides, como é conhecido na técnica ou como aqui descrito.

As composições de anticorpo anti-IL-6 da presente invenção podem ainda compreender, pelo menos, uma de qualquer quantidade adequada e eficaz de uma composição ou formulação farmacêutica compreendendo pelo menos um anticorpo anti-IL-6 para uma célula, tecido, órgão, animal ou paciente em necessidade de tal modulação, tratamento ou terapia, que compreende ainda, opcionalmente, pelo menos um selecionado a partir de, pelo menos, um antagonista de TNF (por exemplo, mas não limitado a um anticorpo ou fragmento de TNF, um receptor solúvel de TNF ou fragmento, suas proteínas de fusão, ou uma pequena molécula antagonista de TNF), um antirreumático (por exemplo, metotrexato, auranofina, aurotioglucose, azatioprina, etanercept, tiomalato de ouro de sódio, sulfato de hidroxiclороquina, leflunomida, sulfasalzine), um relaxante muscular, um narcótico, um medicamento anti-inflamatório não-esteróide (NSAID), um analgésico, um anestésico, um sedativo, um anestésico local, um bloqueador neuromuscular, um antimicrobiano (por exemplo, aminoglicósidos, um antifúngico, um antiparasitário, um antiviral, um carbapenem, cefalosporina, uma flurorquinolone, um macrolido, uma penicilina, uma sulfonamida, tetraciclina, ou um outro antimicrobiano), um antipsoriático, um corticosteróide, um esteroide, um agente anabolizante relacionada com a diabetes, um mineral, um nutriente, um agente da tireóide, uma vitamina, uma hormona relacionado com o cálcio, um antidiarreico, um antitússico, um antiemético, um anti-úlceras, um laxante, um anticoagulante, uma eritropoietina (por exemplo, a epoetina alfa), um filgrastim (por exemplo, G-CSF, Neupogen), um sargramostim

(GM-CSF, Leuquina), uma imunização, uma imunoglobulina, um imunossupressor (p. ex. basiliximab, ciclosporina, daclizumab), uma growth.hormone, um fármaco de substituição hormonal, um modulador de receptor de estrogénio, um midriático, um cicloplégico, um agente alquilante, um antimetabolito, um inibidor mitótico, um radiofármaco, um agente antidepressivo, um agente antimaníaco, um antipsicótico, um ansiolítico, um hipnótico, um simpatomimético, um estimulante, donepezilo, tacrina, uma medicação para a asma, um agonista beta, um esteroide inalado, um inibidor de leucotrienos, uma metilxantina, uma cromolina, uma epinefrina ou análogo, dornase-alfa (Pulmozyme), uma citoquina ou um antagonista da citoquina. Exemplos não limitativos de tais citoquinas incluem, mas não estão limitados a qualquer de IL-1 a IL-23. As dosagens adequadas são bem conhecidas na técnica. Ver, por exemplo, Wells et al. Eds., *Pharmacotherapy Handbook*, 2nd Edition, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000); *PDR Pharmacopeia*, Tarascon Pocket Pharmacopeia 2000 Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000).

Tais anti-cancro ou anti-infecciosos podem também incluir moléculas de toxina que estão associadas, ligadas a, co-formuladas ou co-administradas com, pelo menos, um anticorpo da presente invenção. A toxina pode, opcionalmente, atuar para matar seletivamente a célula ou tecido patológico. A célula patológica pode ser um cancro ou outra célula. Essas toxinas podem ser, mas não estão limitados a, a toxina purificada ou recombinante ou fragmento de toxina compreendendo, pelo menos um domínio funcional citotóxico da toxina, por exemplo, selecionado a partir de, pelo menos, um de rícino, toxina da difteria, uma toxina de veneno ou uma toxina bacteriana. O termo

toxina também inclui tanto as endotoxinas como as exotoxinas produzidas por quaisquer bactérias ou vírus de ocorrência natural, mutantes ou recombinantes que possam causar qualquer condição patológica em seres humanos e outros mamíferos, incluindo o choque da toxina, o que pode resultar na morte. Essas toxinas podem incluir, mas não estão limitados a, enterotoxinas de *E. Coli*, enterotoxina termo-lábil (LT), enterotoxina termo-estável (ST), citotoxina de *Shigella*, enterotoxinas de *Aeromonas*, síndrome do choque tóxico da toxina-1 (TSST-1), enterotoxina estafilocócica A (SEA), B (SEB) ou C (SEC), enterotoxinas estreptocócicas e semelhantes. Estas bactérias incluem, mas não estão limitadas a, estirpes de uma espécie de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* entero-hemorrágica (por exemplo, as estirpes do serotipo 0157: H7), espécies de *Staphylococcus*, (por exemplo, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes*), espécies de *Shigella* (por exemplo, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* e *Shigella sonnei*), espécies de *Salmonella* (por exemplo, *Salmonella typhi*, *Salmonella cólera suis*, *Salmonella enteritidis*), espécies de *Clostridium* (por exemplo, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*), espécies de *Camphlobacter* (por exemplo, *Camphlobacter jejuni*, *Camphlobacter fetus*), espécies de *Helicobacter*, (por exemplo, *Helicobacter pylori*), espécies de *Aeromonas* (por exemplo, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*), *Pleisomonas shigelloides*, *Yersina enterocolitica*, espécies de *Vibrios* (por exemplo, *Vibrios cholerae*, *Vibrios parahemolyticus*), espécies de *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus*. Ver, por exemplo, Stein, ed., INTERNAL MEDICINE, 3ª ed., Pp 1-13, Little, Brown and Co., Boston, (1990); Evans et al., eds, Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control, 2d. Ed., pp 239-254,

Plenum Medical Book Co., Nova Iorque (1991); Mandell et al., Principles and Practice of Infectious Diseases, 3d. Ed., Churchill Livingstone, Nova Iorque (1990); Berkow et al, eds., The Merck Manual, 16^a edição, Merck and Co., Rahway, NJ, 1992; Wood et al., FEMS Microbiology Immunology, 76:121-134 (1991); Marrack et al., Science, 248:705-711 (1990).

Compostos de anticorpos anti-IL-6, composições ou combinações da presente invenção podem ainda compreender, pelo menos, um de qualquer auxiliar adequado, tal como, mas não limitado a, um diluente, ligante, estabilizador, tampões, sais, solventes lipófilos, conservante, adjuvante ou semelhantes. São preferidos auxiliares farmacêuticamente aceitáveis. Exemplos não limitativos de, e métodos de preparação de tais soluções estéreis são bem conhecidos na técnica, tais como, mas não limitado a, Gennaro, Ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a Edição, Mack Publishing Co. (Easton, PA) 1990. Transportadores farmacêuticamente aceitáveis podem ser rotineiramente selecionados que são adequados para o modo de administração, solubilidade e/ou a estabilidade do anticorpo anti-IL-6, fragmento ou variante de composição, bem conhecido na técnica ou como aqui descrito.

Excipientes e aditivos farmacêuticos úteis na presente composição incluem, mas não estão limitadas a proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos e hidratos de carbono, (por exemplo, açúcares, incluindo monosacáridos, di-, tri-, tetra-, e oligossacáridos; açúcares derivatizados tais como alditóis, ácidos aldônicos, açúcares esterificados e semelhantes; e polissacáridos ou polímeros de açúcar), que podem estar presentes isoladamente ou em combinação,

compreendendo isoladamente ou em combinação 1-99,99% em peso ou volume. Excipientes exemplares incluem a proteína da albumina do soro tal como a albumina do soro humano (HSA), albumina humana recombinante (rHA), gelatina, caseína e semelhantes. Componentes aminoácidos/anticorpos representativos, os quais também podem funcionar numa capacidade tamponante, incluem alanina, glicina, arginina, betaína, histidina, ácido glutâmico, ácido aspártico, cisteína, lisina, leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, aspartame, e semelhantes. Um aminoácido preferido é a glicina.

Os excipientes de hidratos de carbono adequados para utilização na invenção incluem, por exemplo, os monossacáridos, tais como frutose, maltose, galactose, glicose, D-manose, sorbose, e semelhantes; dissacáridos, tais como lactose, sacarose, trealose, celobiose, e semelhantes; polissacáridos, tais como rafinose, melezitose, maltodextrinas, dextranos, amidos e semelhantes; e alditóis, tais como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol sorbitol (glucitol), mioinositol e semelhantes. Os excipientes de hidratos de carbono preferidos para utilização na presente invenção são o manitol, trealose e rafinose.

As composições de anticorpos anti-IL-6 também podem incluir um tampão ou um agente de ajuste de pH, normalmente, o tampão é um sal preparado a partir de um ácido orgânico ou uma base. Tampões representativos incluem sais de ácidos orgânicos, tais como sais de ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glucónico, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético ou ácido ftálico; Tris, cloridrato de trometamina ou tampões de fosfato. Os

tampões preferidos para uso nas presentes composições são os sais de ácidos orgânicos tais como o citrato.

Além disso, as composições de anticorpos anti-IL-6 da invenção podem incluir excipientes/aditivos poliméricos, tais como polivinilpirrolidonas, ficóis (um açúcar polimérico), dextratos (por exemplo, ciclodextrinas, tais como 2-hidroxi-propil- β -ciclodextrina), polietileno-glicóis, agentes aromatizantes, agentes antimicrobianos, adoçantes, antioxidantes, agentes anti-estáticos, agentes tensioativos (por exemplo, polissorbatos, tais como "Tween 20" e "Tween 80"), lípidos (por exemplo, fosfolípidos, ácidos gordos), esteroides (por exemplo, colesterol), e agentes quelantes (por exemplo, EDTA).

Estes e excipientes farmacêuticos adicionais conhecidos e/ou aditivos adequados para utilização nas composições de anticorpo anti-IL-6, porção ou variante de acordo com a invenção são conhecidos na técnica, por exemplo, como listado em "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19a ed, Williams & Williams (1995), e no "Physician's Desk Reference", 52^a ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998). Transportadores ou excipientes preferidos os hidratos de carbono (por exemplo, sacarídeos e alditóis) e tampões (por exemplo, citrato) ou agentes poliméricos.

Formulações

Como observado acima, a invenção proporciona formulações estáveis, que são de preferência um tampão fosfato com solução salina ou um sal escolhido, assim como as soluções e formulações conservadas contendo um conservante bem como formulações conservadas multiuso adequadas para utilização

farmacêutica ou veterinária, que compreendem pelo menos um anticorpo anti-IL-6 numa formulação farmacêuticamente aceitável. Formulações conservadas contendo, pelo menos, um conservante conhecido ou, opcionalmente, selecionado de entre o grupo constituído por, pelo menos, um fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, álcool benzil, nitrito fenilmercúrico, fenoxietanol, formaldeído, clorobutanol, cloreto de magnésio (por exemplo, hexahidrato), alquilparabeno (metilo, etilo, propilo, butilo e semelhantes), cloreto de benzalcónio, cloreto de benzetónio, dehidroacetato de sódio e timerosal, ou as suas misturas num diluente aquoso. Qualquer concentração ou mistura adequada pode ser utilizada, como conhecido na técnica, tal como 0,001-5%, ou qualquer intervalo ou valor dentre esses, tal como, mas não limitado a 0,001, 0,003, 0,005, 0,009, 0,01, 0,02, 0,03, 0,05, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,3, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9 ou qualquer faixa ou valor dentre esses. Exemplos não limitativos incluem, sem conservante, 0,1-2% de m-cresol (por exemplo, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,9, 1,0%), 0,1-3% de álcool benzílico (por exemplo, 0,5, 0,9, 1,1, 1,5, 1,9, 2,0, 2,5%), 0,001-0,5% de timerosal (por exemplo, 0,005, 0,01), 0,001-2,0% de fenol (por exemplo, 0,05, 0,25, 0,28, 0,5, 0,9, 1,0%), 0,0005-1,0% de alquilparabenos (por exemplo, 0,00075, 0,0009, 0,001, 0,002, 0,005, 0,0075, 0,009, 0,01, 0,02, 0,05, 0,075, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,75, 0,9, 1,0%), e semelhantes.

Como observado acima, a invenção proporciona um artigo de fabrico, compreendendo material de embalagem e, pelo menos,

um frasco compreendendo uma solução de, pelo menos, um anticorpo anti-IL-6 com os tampões e/ou conservantes prescritos, opcionalmente, num diluente aquoso, em que o referido material de embalagem compreende um rótulo que indica que tal solução pode ser mantida durante um período de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 40, 48, 54, 60, 66, 72 horas ou mais. A invenção compreende ainda um artigo de fabrico, compreendendo material de embalagem, um primeiro frasco compreendendo, pelo menos um anticorpo anti-IL-6 liofilizado e um segundo frasco compreendendo um diluente aquoso do tampão ou conservante prescritos, em que o referido material de embalagem inclui um rótulo que instrui um paciente para reconstituir, pelo menos, um anticorpo anti-IL-6 no diluente aquoso para formar uma solução que pode ser mantida durante um período de 24 horas ou mais.

Pelo menos um anticorpo anti-IL-6 utilizado de acordo com a presente invenção pode ser produzido por meios recombinantes, incluindo a partir de células de mamíferos ou preparações transgênicas, ou pode ser purificado a partir de outras fontes biológicas, como aqui descrito ou como conhecido na técnica.

A gama de, pelo menos, um anticorpo anti-IL-6 no produto da presente invenção inclui quantidades que produzam depois da reconstituição, se num sistema molhado/seco, concentrações desde cerca de 1,0 µg/ml a cerca de 1000 mg/ml, embora concentrações inferiores e mais elevadas sejam operáveis e estejam dependentes do veículo de entrega pretendido, por exemplo, formulações em solução irão diferir do sistema transdérmico, pulmonar, transmucoso, ou osmótico ou métodos de micro-bomba.

De preferência, o diluente aquoso compreende ainda opcionalmente um conservante farmacologicamente aceitável. Os conservantes preferidos incluem aqueles selecionados a partir do grupo consistindo por fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, álcool benzílico, alquilparabeno (metilo, etilo, propilo, butilo e semelhantes), cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio, dehidroacetato de sódio e timerosal, ou as suas misturas. A concentração do conservante usado na formulação é uma concentração suficiente para produzir um efeito anti-microbiano. Tais concentrações estão dependentes do conservante selecionado e são facilmente determinadas pelo perito na técnica.

Outros excipientes, por exemplo, agentes de isotonicidade, tampões, antioxidantes, intensificadores de conservação, podem ser facultativamente e preferencialmente adicionados ao diluente. Um agente de isotonicidade, tal como a glicerina, é vulgarmente usado em concentrações conhecidas. Um tampão fisiologicamente tolerado é de preferência adicionado para proporcionar melhoria do controlo do pH. As formulações podem cobrir uma ampla gama de valores de pH, tal como desde cerca de pH 4 a cerca de pH 10, e gamas preferidas desde cerca de pH 5 a cerca de pH 9, e uma gama mais preferida de cerca de 6,0 a cerca de 8,0. De preferência as formulações da presente invenção têm pH entre cerca de 6,8 e cerca de 7,8. Os tampões preferidos incluem tampões de fosfato, mais preferencialmente fosfato de sódio, particularmente solução salina tamponada com fosfato (PBS).

Outros aditivos, tal como solubilizantes farmacologicamente aceitáveis como Tween 20 (polioxietileno (20) sorbitano), Tween 40 (polioxietileno (20) sorbitano monopalmitato),

Tween 80 (polioxietileno (20) sorbitano monooleato), Pluronic F68 (copolímeros de blocos de polioxietileno polioxipropileno), e PEG (polietileno glicol) ou agentes tensioativos não iónicos tais como polissorbato 20 ou 80 ou poloxero 184 ou 188, polióis Pluronic®, outros co-polímeros de bloco e quelantes, tais como EDTA e EGTA podem ser facultativamente adicionados às formulações ou composições para reduzir a agregação. Estes aditivos são particularmente úteis se uma bomba ou recipiente de plástico é utilizado para administrar a formulação. A presença do agente tensioativo farmacologicamente aceitável atenua a propensão da proteína para se agregar.

As formulações da presente invenção podem ser preparadas por um processo que compreende misturar, pelo menos, um anticorpo anti-IL-6 e um conservante selecionado de entre o grupo consistindo em fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, álcool benzilo, alquilparabeno, (metilo, etilo, propilo, butilo e semelhantes), cloreto de benzalcónio, cloreto de benzetónio, dehidroacetato de sódio e timerosal ou as suas misturas num diluente aquoso. A mistura de, pelo menos, um anticorpo anti-IL-6 e conservante num diluente aquoso é levada a cabo utilizando procedimentos de dissolução e mistura convencionais. Para preparar uma formulação adequada, por exemplo, uma quantidade medida de, pelo menos, um anticorpo anti-IL-6 na solução tamponada é combinada com o conservante desejado numa solução tamponada em quantidades suficientes para proporcionar a proteína e conservante, nas concentrações desejadas. Variações deste processo serão reconhecidas por um perito na técnica. Por exemplo, a ordem em que os componentes são adicionados, se são utilizados aditivos adicionais, a temperatura e pH a que a formulação é

preparada, são todos factores que podem ser otimizados para a concentração e meios de administração usados.

As formulações reivindicadas podem ser fornecidas aos pacientes como soluções límpidas ou como dois frascos compreendendo um frasco de, pelo menos, um anticorpo anti-IL-6 liofilizado, que é reconstituído com um segundo frasco que contém água, um conservante e/ou excipientes, preferencialmente um tampão fosfato e/ou uma solução salina e um sal escolhido, num diluente aquoso. Tanto um frasco de solução única ou frasco duplo requerendo reconstituição podem ser reutilizados múltiplas vezes e podem ser suficientes para um único ou múltiplos ciclos de tratamento do paciente e, portanto, podem proporcionar um regime de tratamento mais conveniente do que o atualmente disponível.

Os presentes artigos de manufactura reivindicados são úteis para a administração ao longo de um período de imediatamente a vinte e quatro horas ou mais. Por conseguinte, os artigos de manufactura presentemente reivindicados oferecem vantagens significativas para o paciente. As formulações da invenção podem, opcionalmente, ser armazenadas com segurança a temperaturas desde cerca de 2 até cerca de 40°C e retêm a atividade biológica da proteína por períodos prolongados de tempo, permitindo assim uma rotulagem da embalagem indicando que a solução pode ser mantida e/ou utilizado ao longo de um período de 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 ou 96 horas ou mais. Se for usado diluente preservado, tal rótulo pode incluir uso até 1-12 meses, meio, um e meio e/ou dois anos.

As soluções de pelo menos um anticorpo anti-IL-6 da invenção podem ser preparadas por um processo que compreende a mistura de, pelo menos, um anticorpo num diluente aquoso. A mistura é levada a cabo utilizando procedimentos de dissolução e mistura convencionais. Para preparar um diluente adequado, por exemplo, uma quantidade medida de, pelo menos, um anticorpo em água ou tampão, é combinada em quantidades suficientes para proporcionar a proteína e, opcionalmente, um conservante ou tampão nas concentrações desejadas. Variações deste processo serão reconhecidas por um perito na técnica. Por exemplo, a ordem em que os componentes são adicionados, se são utilizados aditivos adicionais, a temperatura e pH a que a formulação é preparada, são todos factores que podem ser optimizados para a concentração e meios de administração usados.

Os produtos reivindicados podem ser fornecidos aos pacientes como soluções límpidas ou como dois frascos compreendendo um frasco de, pelo menos, um anticorpo anti-IL-6 liofilizado, que é reconstituído com um segundo frasco contendo o diluente aquoso. Tanto um frasco de solução única ou frasco duplo requerendo reconstituição podem ser reutilizados múltiplas vezes e podem ser suficientes para um único ou múltiplos ciclos de tratamento do paciente e, assim, proporcionar um regime de tratamento mais conveniente do que o atualmente disponível.

Os produtos reivindicados podem ser fornecidos indiretamente aos pacientes por fornecimento a farmácias, clínicas, ou outras instituições e facilidades, soluções límpidas ou frascos duplos compreendendo um frasco de, pelo menos, um anticorpo anti-IL-6 liofilizado, que é

reconstituída com um segundo frasco que contém o diluente aquoso. A solução transparente, neste caso, pode ser até um litro ou mesmo maior em tamanho, proporcionando um grande reservatório do qual pequenas porções da solução de, pelo menos um, anticorpo pode ser recuperada uma ou múltiplas vezes para transferir para frascos mais pequenos e fornecida pela farmácia ou clínica para os seus clientes e/ou pacientes.

Dispositivos reconhecidos compreendendo estes sistemas de frascos individuais incluem os dispositivos de caneta-injectora para a entrega de uma solução, tais como canetas BD, BD Autojector[®], HumaJect[®], NovoPen[®], B-D[®] Pen, Autopen[®] e Optipen[®], GenotropinPen[®], Genotronorm Pen[®], Humatro Pen[®], RecoPen[®], Roferon Pen[®], Biojector[®], iject[®], J-tip Needle-Free Injector[®], Intraject[®], Medi-Ject[®], por exemplo, como feito ou desenvolvido por Becton Dickenson (Franklin Lakes, NJ, www.bectondickenson.com), Disetronic (Burgdorf, Suíça, www.disetronic.com); Bioject, Portland, Oregon (www.bioject.com); National Medical Products, Weston Medical (Peterborough, Reino Unido, www.weston-medical.com), Medi-Ject Corp (Minneapolis, MN, www.mediject.com). Dispositivos reconhecidos compreendendo um sistema de frasco duplo incluem os sistemas de caneta de injeção para reconstituir um fármaco liofilizado num cartucho para distribuição da solução reconstituída tal como o HumatroPen[®].

Os produtos presentemente reivindicados incluem material de embalagem. O material de embalagem proporciona, para além da informação necessária pelas agências reguladoras, as condições sob as quais o produto pode ser utilizado. O material de embalagem da presente invenção fornece

instruções ao paciente para reconstituir, pelo menos, um anticorpo anti-IL-6 no diluente aquoso para formar uma solução e para usar a solução num período de 2-24 horas ou superior para os dois frascos de produto, húmido/seco. Para o frasco único de solução, o rótulo indica que tal solução pode ser usada por um período de 2-24 horas ou mais. Os produtos atualmente reivindicados são úteis para o uso do produto farmacêutico humano.

As formulações da presente invenção podem ser preparadas por um processo que compreende a mistura de pelo menos um anticorpo anti-IL-6 e um tampão selecionado, de preferência um tampão de fosfato ou uma solução salina contendo o sal escolhido. A mistura de, pelo menos, um anticorpo e o tampão num diluente aquoso é levada a cabo utilizando procedimentos de dissolução e mistura convencionais. Para preparar uma formulação adequada, por exemplo, uma quantidade medida de, pelo menos, um anticorpo em água ou tampão é combinada com o agente de tamponamento desejado em água em quantidades suficientes para proporcionar a proteína e tampão nas concentrações desejadas. Variações deste processo serão reconhecidas por um perito na técnica. Por exemplo, a ordem em que os componentes são adicionados, se são utilizados aditivos adicionais, a temperatura e pH a que a formulação é preparada, são todos factores que podem ser optimizados para a concentração e meios de administração usados.

As formulações estáveis ou conservadas reivindicadas podem ser fornecidas aos pacientes como soluções límpidas ou como dois frascos compreendendo um frasco de, pelo menos, um anticorpo anti-IL-6 liofilizado que é reconstituído com um segundo frasco que contém um conservante ou tampão e

excipientes num diluente aquoso. Tanto um frasco de solução única ou frasco duplo requerendo a reconstituição podem ser reutilizados múltiplas vezes e podem ser suficientes para um único ou múltiplos ciclos de tratamento do paciente e, assim, proporcionar um regime de tratamento mais conveniente do que o atualmente disponível.

Pelo menos um anticorpo anti-IL-6 em qualquer das formulações ou soluções estáveis ou conservadas aqui descritas, pode ser administrado a um paciente através de uma variedade de métodos de distribuição incluindo injeção SC ou IM; transdérmico, pulmonar, transmucoso, implante, bomba osmótica, cartucho, micro-bomba, ou outros meios apreciados pelo perito na técnica, bem conhecidas na técnica.

Aplicações Terapêuticas

A IL-6, devido à sua atividade pleiotrópica, está implicada na patologia de uma variedade de doenças. Por conseguinte, uma elevada afinidade, neutralizando o anticorpo quimérico ou humano para a IL-6, seria desejável para ser usado nas doenças relacionadas com a IL-6, tais como, o cancro, caquexia, SLE, artrite reumatoide, osteoporose, trauma cerebral, edema cerebral, depressão, e de CHF. O cCLB8 ou quaisquer derivados deste mAb, incluindo quimérico ou humanizado, ou fragmentos podem ser utilizados no alívio da dor óssea, inibindo o crescimento de tumores, tais como melanoma, renal, da próstata, da mama, do pulmão, cancro do cólon e mieloma múltiplo, doenças linfoproliferativas e outras doenças em que a IL-6 tem sido implicada. Este anticorpo pode ser usado quer como um agente único ou em combinação com outros agentes terapêuticos. Além disso, este Mab pode ser usado como um meio quimiosensitivo, o

qual pode aumentar a eficácia terapêutica dos agentes citotóxicos. Este anticorpo pode ser utilizado como um radiosensibilizador pelo que pode melhorar a eficácia da radiação. Pode, também, ser usado em combinação com outros agentes imuno-moduladores de tumor, tais como IL-2, IL-12 e/ou IFNalfa.

Assim, a presente invenção também fornece um método para modular ou tratar, pelo menos, uma doença relacionada com a IL-6, numa célula, tecido, órgão, animal ou paciente, como conhecido na técnica ou como aqui descrito, utilizando pelo menos um anticorpo anti-IL-6 da presente invenção.

A IL-6 é conhecida por aumentar a proliferação, diferenciação e sobrevivência de células plasmáticas malignas no mieloma múltiplo (MM) por meio de um mecanismo autócrino ou parácrino que envolve a inibição da apoptose das células malignas. MM é uma doença maligna incurável das células plasmáticas onde, o bloqueio da IL-6 tem sido postulada como sendo uma terapia eficaz (Anderson et al, Multiple Myeloma: New Insights and Therapeutic Approaches. Hematology: 147-165, 2000). A IL-6 tem também um efeito tumorigénico no carcinoma de células basais, onde as células transfectadas de IL-6 mostraram um aumento da taxa de crescimento do tumor quer por supressão da apoptose quer pela promoção ativa (Jee et al., Overexpression of Interleukin-6 in human basal cell carcinoma cells lines increases anti-apoptotic activity and tumorigenic potency. Oncogene, Vol. 20, No. 2 pp.198-208, 2001). A IL-6 também pode promover a resistência das células do cancro da mama à quimioterapia por induzir a expressão do gene *mdr1* (*mdr1* e vias de metalotioneína) (Conze et al., Autocrine Production

of Interleukin 6 Causes Multidrug Resistance in Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* 61: 8851-8858, 2001).

A capacidade da IL-6 para mediar a sobrevivência das células do tumor e a progressão da doença foi confirmada pelos efeitos inibitórios de anti-IL-6 mAb sobre o crescimento tumoral, tanto *in vitro* e *in vivo*. Foi relatado que o bloqueio de IL-6 pode inibir o crescimento de tumores cerebrais humanos (glioblastomas) *in vitro* (Goswami et al., Interleukin-6-mediated autocrine growth promotion in human glioblastoma multiforme cell line U87MG. *J Neurochem* 71: 1837-1845, 1998). Utilizando a mesma abordagem, foi demonstrado que a injeção de anticorpo murino anti-IL-6 CLB8, prolongou a sobrevivência de ratinhos portadores de tumores humanos (Mauray et al, Epstein-Barr vírus-dependent lymphoproliferative disease: critical role of IL-6. *Eur J Immunol*, 30 (7):2065-73, 2000). Também foi relatado que o anticorpo anti-IL-6m CLBB regrediu o crescimento de tumores de carcinoma renal humano e diminuiu as concentrações de cálcio no soro em ratinhos nus (Weisglass et al., The role of Interleukin-6 in the induction of hypercalcemia in renal cell carcinoma transplanted into nude mice. *Endocrinology* 138 (5):1879-8., 1995). O anticorpo CLB-8 também regrediu a hormona estabelecida de xenoenxertos refractários de tumor da próstata humana em ratos (Smith et al. 2001). O anticorpo monoclonal anti-interleucina-6 induz a regressão de xenoenxertos de cancro da próstata humano em ratinhos nus (Smith e Keller, *Prostate*, 48 (1):47-53).

A IL-6 também pode ser um factor de prognóstico e um marcador para malignidades. No carcinoma de células renais (RCC), foram relatados níveis elevados de IL-6 para correlacionar com a metástase do tumor e, eventualmente,

para prognóstico pobre e curta sobrevivência (Jean-Yves Blay et al. 1992). Além disso, no RCC, níveis séricos de IL-6 estão associados a uma resposta fraca à terapia com IL-2 (Fumagalli, et al. 1999) marcadores de soro de pré-tratamento e resposta dos linfócitos à terapia de interleucina-2. Br J Cancer 80 (3-4):407-11 e correlacionados com o grau de toxicidade de IL-2 associada (Capuron et al. 2001). A associação entre a ativação imunitária e sintomas depressivos precoces em pacientes com cancro tratados com terapia de base de interleucina-2. Psychoneuroendocrinology, 26 (8):797-808.

Níveis elevados de IL-6 também se correlacionam com pior prognóstico e à presença de doença metastática no cancro da mama (Kurebayashi 2000 e Benoy 2002), regulação da secreção de interleucina-6 a partir de células de cancro da mama e suas implicações clínicas. Breast Cancer; 7 (2):124-9. O soro da interleucina 6, o plasma VEGF, soro de VEGF, e carga de plaquetas VEGF em pacientes com cancro da mama. Clin Breast Cancer; 2 (4):311-5.

A IL-6 é a hipótese de ser um fator causal de morbidade relacionada ao cancro tais como astenia/caquexia e reabsorção óssea. A caquexia induzida por tumor (Cahlin et al. 2000) e a reabsorção óssea (hipercalcemia subsequente) (Sandhu et al., 1999) foram encontradas para estarem diminuídas em ratos knockout de IL-6. A depressão associada ao cancro, e edema cerebral secundário em tumores cerebrais também têm sido associados com níveis elevados de IL-6 (Musselman et al 2001.). O anticorpo antiIL-6 cCLB8 da invenção também inibiu o melanoma humano e a caquexia induzida por carcinoma da próstata humano em ratinhos nus.

Experiência clínica com agentes anti-IL-6

Vários ensaios clínicos com anticorpos monoclonais contra a IL-6, foram realizados em várias doenças, incluindo a leucemia de células do plasma, mieloma múltiplo, doença B-lymfo-proliferativa, artrite reumatoide, carcinoma de células renais e linfoma associado a SIDA.

Um estudo de Fase I de dose crescente com o anticorpo anti-IL-6 cCLB-8 da presente invenção para o tratamento de pacientes refractários com fase avançada do mieloma múltiplo (N = 12) demonstrou que alguns pacientes tiveram estabilização da doença. Após a interrupção do tratamento, houve aceleração no aumento dos níveis de proteína M, sugerindo a recuperação da doença após a retirada da terapia. O anticorpo anti-IL-6-8 cCLB inibiu a circulação livre de IL-6. Mais importante ainda é que nenhuma toxicidade (exceto trombocitopenia transitória em dois pacientes pré-tratados intensivamente) ou reações alérgicas foram observadas. A proteína C-reativa (CRP) diminuiu abaixo do nível de detecção em todos os pacientes. O anticorpo anti-IL-6 cCLB-8 demonstrou uma longa semivida circulante de 17,8 dias, e não houve resposta imunitária do anticorpo anti-quimérico humano (HACA) observada (van Zaanen et al. 1998). A administração de CNTO 328 não causou alterações na pressão arterial, pulso, temperatura, hemoglobina, funções do fígado e funções renais. Excepto para trombocitopenia transitória em dois pacientes pesadamente pré-tratados, não foram observadas nenhuma toxicidade ou reações alérgicas, e não houve nenhuma resposta imune ao anticorpo anti-quimérico humano (HACA). Três pacientes desenvolveram complicações relacionadas com a infecção durante o tratamento, no entanto, uma possível relação com o anticorpo anti-IL-6 cCLB-8 era improvável

porque as complicações infecciosas são comuns na fase final do mieloma múltiplo e são uma das principais causas de morte. Além disso, todos os três pacientes foram capazes de responder à sua infecção, mesmo na presença do anticorpo anti-IL-6 cCLB-8, sugerindo que a terapia com anti-IL-6 não é capaz de bloquear a IL-6 durante a infecção. Não foram relatadas mortes associadas ao tratamento. Em conclusão, os resultados deste estudo sugerem que anticorpo anti-IL-6cCLB-8 foi seguro em pacientes com mieloma múltiplo.

Assim, aqui descrito é um método para modular ou tratar, pelo menos, uma doença maligna numa célula, tecido, órgão, animal ou paciente, incluindo, mas não limitado a, pelo menos, um dos seguintes: mieloma múltiplo, leucemia, leucemia aguda, leucemia linfoblástica aguda (ALL), de células B, T ou FAB ALL, leucemia mielóide aguda (AML), leucemia mielóide crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de células pilosas, síndrome mielodiplástica (MDS), linfoma, doença de Hodgkin, linfoma maligno, linfoma não-Hodgkin, linfoma de Burkitt, mieloma múltiplo, sarcoma de Kaposi, carcinoma colorrectal, carcinoma de células renais, carcinoma pancreático, carcinoma da próstata, carcinoma da nasofaringe, histiocitose maligna, síndrome paraneoplástico/hipercalcemia da malignidade, tumores sólidos, adenocarcinomas, sarcomas, melanoma maligno, hemangioma, doença metastática, reabsorção óssea relacionada com o cancro, dor relacionada com o cancro ósseo, supressão de metástase do cancro, melhoria da caquexia do cancro e tratamento de doenças inflamatórias, tais como a glomerulonefrite proliferativa mesangial e semelhantes. Um tal método pode, opcionalmente, ser utilizado em combinação com, por administração antes, concorrentemente ou após a

administração de tais anticorpos IL-6, terapia de radiação, um agente anti-angiogénico, um agente quimioterapêutico, um inibidor da farnesil transferase ou semelhantes.

Também aqui é revelado um método para modular ou tratar, pelo menos, uma doença imunológica relacionada com a mediação de IL-6, numa célula, tecido, órgão, animal ou paciente, incluindo, mas não limitado a, pelo menos, artrite reumatoide, artrite reumatoide juvenil, início da artrite reumatoide juvenil sistémica, artrite psoriática, espondilite anquilosante, úlcera gástrica, artropatias soronegativas, osteoartrite, doença inflamatória intestinal, colite ulcerosa, lúpus eritematoso sistémico, síndrome antifosfolípide, iridociclite/uveíte/neurite óptica, fibrose pulmonar idiopática, vasculites sistémicas/granulomatose de Wegener, sarcoidose, orquite/procedimentos de reversão da vasectomia, doenças alérgicas/atópicas, asma, rinite alérgica, eczema, dermatite de contato alérgica, conjuntivite alérgica, pneumonite por hipersensibilidade, transplantes, rejeição de órgãos transplantados, doença do enxerto-versus-hospedeiro, síndrome de resposta inflamatória sistémica, síndrome de septicemia, septicemia gram positiva, septicemia gram negativa, septicemia de cultura negativa, septicemia fúngica, neutropenia febril, urosepsia, meningococemia, trauma/hemorragia, queimaduras, exposição à radiação ionizante, pancreatite aguda, síndrome da angústia respiratória do adulto, artrite reumatoide, hepatite induzida por álcool, patologias inflamatórias crónicas, sarcoidose, patologia de Crohn, anemia falciforme, diabetes, nefrose, doenças atópicas, reações de hipersensibilidade, rinite alérgica, febre dos fenos, rinite perene, conjuntivite, endometriose, asma, urticária

anafilaxia sistémica, dermatite, anemia perniciososa, doenças hemolíticas, trombocitopenia, rejeição de qualquer órgão ou tecido, rejeição do transplante do rim, rejeição de transplante de coração, rejeição de transplante de fígado, rejeição de transplante de pâncreas, rejeição de transplante de pulmão, rejeição de transplante de medula óssea (TMO), rejeição do enxerto de pele, rejeição de transplante de cartilagem, rejeição de enxerto ósseo, rejeição de transplante do intestino delgado, rejeição de implante de timo fetal, rejeição de transplantes da paratireóide, rejeição de xenoenxerto de qualquer órgão ou tecido, rejeição do enxerto, reações de hipersensibilidade anti-receptor, doença de Graves, doença de Raynaud, diabetes resistente à insulina tipo B, asma, miastenia grave, citotoxicidade mediada por anticorpo, reações de hipersensibilidade do tipo III, lúpus eritematoso sistémico, síndrome POEMS (polineuropatia, organomegalia, endocrinopatia, gamopatia monoclonal e síndrome de alterações da pele), polineuropatia, organomegalia, endocrinopatia, gamopatia monoclonal, síndrome de alterações da pele, síndrome antifosfolípido, pênfigo, esclerodermia, doença mista do tecido conjuntivo, doença idiopática de Addison, diabetes mellitus, hepatite crónica ativa, cirrose biliar primária, vitiligo, vasculite síndrome MI pós-cardiotomia, hipersensibilidade de tipo IV, dermatite de contato, pneumonite por hipersensibilidade, rejeição do enxerto, granulomas devido a organismos intracelulares, sensibilidade a fármacos metabólica /idiopática, doença de Wilson, hemacromatose, deficiência de alfa-1-antitripsina, retinopatia diabética, tiroidite de Hashimoto, osteoporose, avaliação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, cirrose biliar primária, tiroidite, encefalomielite, caquexia, fibrose quística, doença pulmonar crónica neonatal, doença pulmonar crónica

obstrutiva (COPD), linfocitose hematofagocítica familiar, condições dermatológicas, psoríase, alopecia, síndrome nefrótica, nefrite, nefrite glomerular, insuficiência renal aguda, hemodiálise, uremia, toxicidade, pré-eclâmpsia, terapia okt3, terapia anti-CD3, terapia de citoquina, quimioterapia, terapia de radiação (por exemplo, incluindo, mas não limitado a astenia, anemia, caquexia, e semelhantes), intoxicação crônica por salicilato, apneia do sono, obesidade, insuficiência cardíaca, sinusite, doença inflamatória do intestino, e semelhantes. Ver, por exemplo, The Merck Manual, Edições 12-17, Merck & Company, Rahway, NJ (1972, 1977, 1982, 1987, 1992, 1999) Pharmacotherapy Handbook, Wells et al. Eds., Segunda Edição, Appleton e Lange, Stamford, Conn (1998, 2000).

Também aqui é revelado um método para modular ou tratar, pelo menos, uma doença infecciosa de uma célula, tecido, órgão, animal ou paciente, incluindo, mas não limitado a, pelo menos, um dos seguintes: uma infecção bacteriana aguda ou crônica, processos parasitários ou infecciosos agudos e crônicos, incluindo infecções bacterianas, virais e fúngicas, infecção por o HIV/neuropatia por HIV, meningite, hepatite (A, B ou C, ou semelhantes), artrite séptica, peritonite, pneumonia, epiglote, e. coli 0157:H7, síndrome hemolítico-urémico/púrpura trombocitopênica trombótica, malária, febre hemorrágica de dengue, leishmaniose, lepra, síndrome do choque tóxico, miosite estreptocócica, gangrena gasosa, tuberculose micobacteriana, avium micobacteriana intracelular, pneumonia por Pneumocystis carinii, doença inflamatória pélvica, orquite/epidimite, legionella, doença de Lyme, gripe A, vírus de Epstein-Barr, síndrome hemafagocítico

associado vital, encefalite vital/meningite asséptica, e semelhantes.

Qualquer destes métodos pode, opcionalmente, compreender a administração de uma quantidade eficaz de, pelo menos, uma composição ou composição farmacêutica compreendendo pelo menos um anticorpo anti-IL-6 a uma célula, tecido, órgão, animal ou paciente em necessidade de tal modulação, tratamento ou terapia. As indicações para tratamento com terapia anti-IL-6 são descritas nas seguintes referências. Van Snick, "Interleukin-6: Na Overview", *Ann. Rev. Immunol.*, 8:253-278 (1990); Campbell et al., "Essential Role for Interferon-gamma and Interleukin-6 in Autoimmune Insulin-dependent Diabetes in NOD/Wehi Mice", *J. Clin. Invest.*, 87:739-742 (1991); Heinrich et al. "Interleukin-6 Monoclonal Antibody Therapy for a Patient with Plasma Cell Leukemia", *Blood*, 78 (5):1198-1204 (1991); Starnes et al. "Anti-IL-6 Monoclonal Antibodies Protect Against Lethal *Escherichia coli* Infection and Lethal Tumor Necrosis Factor-alpha. Challenge in Mice", *J. Immunol.*, 145 (12):4185-4191 (1990); Strassman et al., "Evidence for the involvement of interleukin 6 in Experimental Cancer Cachexia" *J. Clin. Invest.*, 89:1681-1684 (1992).

Qualquer método aqui descrito pode compreender a administração de uma quantidade eficaz de uma composição ou formulação farmacêutica compreendendo pelo menos um anticorpo anti-IL-6 a uma célula, tecido, órgão, animal ou paciente em necessidade de tal modulação, tratamento ou terapia. Tal método pode compreender ainda, opcionalmente, a co-administração ou a terapia de combinação para o tratamento de tais doenças autoimunes ou doenças malignas, em que a administração do referido pelo menos um anticorpo

anti-IL-6-, porção especificada ou variante, compreende ainda a administração, antes, simultaneamente e/ou depois de, pelo menos, um selecionado de, pelo menos, um antagonista de TNF (por exemplo, mas não limitado a um anticorpo ou fragmento de TNF, um receptor solúvel de TNF ou fragmento, suas proteínas de fusão ou uma pequena molécula antagonista de TNF), um anticorpo de IL-18 ou fragmento, uma pequena molécula antagonista de IL-18 ou receptor de proteína de ligação de IL-18, um anticorpo de IL-1 (incluindo IL-1 alfa e IL-1 beta), ou fragmento, um antagonista do receptor solúvel de IL-1, um antirreumático (por exemplo, metotrexato, auranofina, aurotioglucose, azatioprina, etanercept, tiomalato de ouro de sódio, sulfato de hidroxiclороquina, leflunomida, sulfassalazina, terapia de radiação, um agente anti-angiogénico, um agente quimioterapêutico, talidomida, um relaxante muscular, um narcótico, um fármaco anti-inflamatório não-esteróide (NSAID), um analgésico, um anestésico, um sedativo, um anestésico local, um bloqueador neuromuscular, um antimicrobiano (por exemplo, aminoglicosídeos, um antifúngico, um antiparasitário, um antiviral, um carbapenem, cefalosporina, flurorquinolona, macrolídeo, penicilina, sulfonamida, tetraciclina, outro antimicrobiano), um antipsoriático, um corticosteróide, um esteróide, um agente anabólico relacionado com a diabetes, um mineral, um nutriente, um agente da tiróide, uma vitamina, uma hormona relacionada com o cálcio, um eritropoietina (p. ex., epoetina alfa), um filgrastim (por exemplo, G-CSF, Neupogen), um sargramostim (GM-CSF, leuquina), uma imunização, uma imunoglobulina, um imunossupressor (por exemplo, basiliximab, ciclosporina, daclizumab), uma hormona de crescimento, um fármaco de substituição hormonal, um modulador de receptor de estrogénio, um midriático, um cicloplégico, um agente

alquilante, um antimetabolito, um inibidor mitótico, um radiofármaco, um agente antidepressivo, um agente antimaníaco, um antipsicótico, um ansiolítico, um hipnótico, um simpatomimético, um estimulante, donepezil, tacrina, uma medicação para a asma, um agonista beta, um esteroide inalado, um inibidor de leucotrienos, uma metilxantina, uma cromolina, uma epinefrina ou análogo, dornase-alfa (Pulmozyme), uma citoquina ou um antagonista da citoquina. Dosagens adequados são bem conhecidas na especialidade. Ver, por exemplo, Wells et al. Eds., *Pharmacotherapy Handbook*, 2nd Edition, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000); *PDR Pharmacopeia*, Tarascon Pocket Pharmacopeia 2000 Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000).

Os antagonistas de TNF adequados para as composições, terapia de combinação, coadministração, e/ou dispositivos da presente invenção (compreendendo ainda pelo menos um anticorpo, sua porção especificada e variante, da presente invenção), incluem, mas não estão limitados a, anticorpos anti-TNF, fragmentos de ligação ao antigénio dos mesmos, e as moléculas receptoras que se ligam especificamente ao TNF; compostos que previnem e/ou inibem a síntese de TNF, a libertação de TNF ou a sua ação sobre células-alvo, tais como talidomida, tenidap, inibidores da fosfodiesterase (por exemplo, pentoxifilina e rolipram), agonistas do receptor da adenosina A2b e potenciadores do receptor da adenosina A2b; compostos que previnem e/ou inibem a sinalização do receptor de TNF, tal como os inibidores de quinase da proteína ativada por mitógeno (MAP); compostos que bloqueiam e/ou inibem a clivagem de TNF de membrana, tais como a inibidores de metaloproteinase; compostos que bloqueiam e/ou inibem a atividade de TNF, tais como a

enzima conversora da angiotensina (ECA) (por exemplo, captopril); e compostos que bloqueiam e/ou inibem a produção de TNF e/ou síntese, tais como inibidores da quinase MAP.

Tratamentos terapêuticos.

Qualquer método aqui descrito pode compreender um método para o tratamento de um distúrbio mediado por IL-6, que compreende a administração de uma quantidade eficaz de uma composição ou formulação farmacêutica compreendendo pelo menos um anticorpo anti-IL-6 a uma célula, tecido, órgão, animal ou paciente necessidade de tal modulação, tratamento ou terapia. Tal método pode compreender ainda, opcionalmente, a terapêutica de coadministração ou combinação para o tratamento de tais doenças imunes, em que a administração do referido pelo menos um anticorpo anti-IL-6, sua porção especificada ou variante, compreende ainda a administração de, antes, concorrentemente e/ou depois, pelo menos um agente, tal como descrito acima.

Tipicamente, o tratamento de condições patológicas é efectuado por administração de uma quantidade eficaz ou dosagem de, pelo menos, uma composição de anticorpo anti-IL-6 no total, em média, a uma gama de, pelo menos, cerca de 0,01 a 500 miligramas de pelo menos um anticorpo anti-IL-6 por quilograma de paciente por dose, e preferivelmente de pelo menos cerca de 0,1 a 100 miligramas de anticorpo/quilograma de doente por administração única ou múltipla, dependendo da atividade específica contida na composição. Alternativamente, a concentração de soro eficaz pode compreender 0,1-5000 µg/ml de concentração no soro por administração única ou múltipla. As dosagens adequadas são do conhecimento dos médicos e vão, naturalmente, depender

do estado de doença em particular, a atividade específica da composição a ser administrada, e do doente particular submetido a tratamento. Em alguns casos, para atingir o valor terapêutico desejado, pode ser necessário prever a administração repetida, isto é, administrações individuais repetidas de uma dose particular, medida ou monitorizada, em que as administrações individuais são repetidas até que a dose diária ou o efeito desejado seja alcançado.

As doses preferidas podem incluir, opcionalmente, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 e/ou 100-500 mg/Kg/administração, ou qualquer gama, valor ou sua fracção, ou para atingir uma concentração sérica de 0,1, 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,5, 1,9, 2,0, 2,5, 2,9, 3,0, 3,5, 3,9, 4,0, 4,5, 4,9, 5,0, 5,5, 5,9, 6,0, 6,5, 6,9, 7,0, 7,5, 7,9, 8,0, 8,5, 8,9, 9,0, 9,5, 9,9, 10, 10,5, 10,9, 11, 11,5, 11,9, 12, 12,5, 12,9, 13,0, 13,5, 13,9, 14,0, 14,5, 14,9, 15,0, 15,5, 15,9, 16,0, 16,5, 16,9, 17, 17,5, 17,9, 18, 18,5, 18,9, 19, 19,5, 19,9, 20, 20,5, 20,9, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 96, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 e/ou 5000 µg/ml de concentração no soro por administração única ou múltipla, ou qualquer gama, valor ou sua fracção.

Alternativamente, a dosagem administrada pode variar dependendo de factores conhecidos, tais como as características farmacodinâmicas do agente particular e do seu modo e via de administração, a idade, saúde e peso do receptor, a natureza e extensão dos sintomas, tipo de tratamento concorrente, frequência do tratamento e efeito desejado. Normalmente, uma dosagem de ingrediente ativo pode ser de cerca de 0,1 a 100 miligramas por quilograma de peso corporal. Habitualmente 0,1 a 50 e, de preferência de 0,1 a 10 miligramas por quilograma por administração ou em forma de libertação sustentada que seja EFicaz para obter OS resultados desejados.

Como um exemplo não limitante, o tratamento de seres humanos ou animais pode ser proporcionado como um tempo ou dosagem periódica de pelo menos um anticorpo da presente invenção, 0,1 a 100 mg/kg, tal como 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 ou 100 mg/kg, por dia, em, pelo menos, um dos dias 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, ou 40, ou alternativamente ou adicionalmente, pelo menos, uma das semanas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, ou 52, ou alternativamente ou adicionalmente, pelo menos, um de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 anos, ou qualquer combinação destas, utilizando-se uma única, ou em doses repetidas de infusão.

As formas de dosagem (composição) adequadas para administração interna contêm, geralmente, desde cerca de 0,1 miligrama até cerca de 500 miligramas de ingrediente ativo por unidade ou recipiente. Nestas composições farmacêuticas o ingrediente ativo estará normalmente presente numa quantidade de cerca de 0,5-99,999% em peso com base no peso total da composição.

Formulações parenterais e Administração

Para administração parentérica, o anticorpo pode ser formulada como uma solução, suspensão, emulsão ou pó liofilizado em associação, ou fornecido em separado, com um veículo parenteral farmacêuticamente aceitável. Exemplos de tais veículos são água, solução salina, solução de Ringer, solução de dextrose e 1-10% de albumina de soro humano. Os lipossomas e veículos não aquosos tais como óleos fixos, também podem ser usados. O veículo ou pó liofilizado pode conter aditivos que mantêm a isotonicidade (por exemplo, cloreto de sódio, manitol) e a estabilidade química (por exemplo, tampões e conservantes). A formulação é esterilizada por técnicas conhecidas ou adequadas.

Os veículos farmacêuticos adequados estão descritos na edição mais recente de Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol, um texto de referência padrão neste campo.

As formulações para administração parentérica podem conter como excipientes comuns água estéril ou solução salina, polialquilenoglicóis tais como polietilenoglicol, óleos de origem vegetal, naftalenos hidrogenados e semelhantes. As suspensões aquosas ou oleosas para injeção podem ser preparadas usando um emulsionante ou humidificador adequado

e um agente de suspensão, de acordo com métodos conhecidos. Os agentes para a injeção podem ser agentes de diluição, não-tóxicos, não-oralmente administrável, tais como uma solução aquosa, uma solução injetável estéril ou suspensão num solvente. São permitidos como veículo ou solvente utilizável, água, solução de Ringer, solução salina isotónica, etc.; como um solvente comum, ou solvente de suspensão, óleo não volátil estéril pode ser usado. Para estes fins, qualquer tipo de óleo não volátil e ácido gordo pode ser usado, incluindo os óleos gordos naturais ou sintéticos ou semissintéticos ou ácidos gordos; mono, di ou triglicéridos naturais ou sintéticos ou semissintéticos. Administração parental é conhecido na técnica e inclui, mas não está limitado a, meios convencionais de injeções, um dispositivo de agulha de injeção de gás de pressão reduzida, tal como descrito na Patente US 5851198, e um dispositivo perfurador a laser como descrito na Patente US 5839446.

Entrega Alternativa

Um anticorpo anti-IL-6 pode ser administrado por via parentérica, subcutânea, intramuscular, intravenosa, intrarticular, intrabronquial, intra-abdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitária, intracelular, intracelular, intracerebroventricular, intracólica, intracervical, intragástrica, intra-hepática, intramiocárdica, intraosteal, intrapélvica, intrapericárdica, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intra-rectal, intrarenal, intra-retiniana, intraespinal, intra-sinovial, intratorácica, intra-uterina, intravesical, bolus, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal ou transdérmica. Pelo menos, uma composição de anticorpo anti-IL-6 pode ser preparada para utilização para administração parentérica

(subcutânea, intramuscular ou intravenosa) ou qualquer outra administração particularmente na forma de soluções líquidas ou suspensões, para uso em administração vaginal ou rectal particularmente em formas semissólidas tais como, mas não se limitando a, cremes e supositórios; para administração bucal ou sublingual, tal como, mas não limitado a, na forma de comprimidos ou cápsulas; ou por via intranasal, tal como, mas não limitado a, na forma de pós, gotas nasais ou aerossóis ou certos agentes; ou por via transdérmica, como não se limitando a um gel, pomada, loção, suspensão ou sistema de entrega por adesivo com potenciadores de químicos, tais como dimetilsulfóxido tanto para modificar a estrutura da pele como para aumentar a concentração de fármaco no sistema transdérmico (Junginger, et al. Em "Drug Permeation Enhancement"; Hsieh, D.S., eds, pp 59-90 (Marcel Dekker, Inc., New York 1994.), ou com agentes oxidantes que possibilitam a aplicação de formulações contendo proteínas e péptidos na pele (WO 98/53847), ou aplicações de campos eléctricos para criar vias de transporte transientes, tais como a electroporação, ou para aumentar a mobilidade dos fármacos carregados através da pele, tais como iontoforese, ou aplicação de ultrassons, tal como, a sonoforese (Patentes US 4309989 e 4767402).

Administração Pulmonar/Nasal

Para a administração pulmonar, preferivelmente, pelo menos, uma composição de anticorpo anti-IL-6 é entregue num tamanho de partícula eficaz para atingir as vias aéreas inferiores do pulmão ou seios nasais. Um anticorpo anti-IL-6 pode ser entregue por qualquer um de uma variedade de dispositivos de inalação ou nasais conhecidos na técnica para a administração de um agente terapêutico por inalação. Estes dispositivos capazes de depositar formulações de

aerossol na cavidade do seio ou alvéolos de um paciente incluem inaladores de dose calibrada, nebulizadores, geradores de pó seco, pulverizadores, e similares. Outros dispositivos adequados para dirigir a administração pulmonar ou nasal de anticorpos são também conhecidos na técnica. Todos estes dispositivos podem utilizar formulações adequadas para a administração de um anticorpo num aerossol. Tais aerossóis podem ser constituídos por soluções (tanto aquosas, como não aquosas) ou por partículas sólidas. Os inaladores de dose medida, como o inalador de dose medida Ventolin[®], tipicamente usam um gás propulsor e requerem a atuação durante a inspiração (Ver, por exemplo, WO 94/16970, WO 98/35888). Inaladores de pó seco, como Turbohaler[™] (Astra), Rotahaler[®] (Glaxo), Discus[®] (Glaxo), inalador Spiros[™] (Dura), os dispositivos comercializados pela Inhale Therapeutics, e o inalador de pó Spinhaler[®] (Fisons), usam a atuação por respiração de um pó misto (US 4668218 Astra, EP 237507 Astra, WO 97/25086 Glaxo, WO 94/08552 Dura, US 5458135 Inhale, WO 94/06498 Fisons). Nebulizadores como AERx[™] Aradigm, nebulizador Ultravent[®] (Mallinckrodt), e o nebulizador Acorn II[®] (Marquest Medical Products) (US 5404871 Aradigm, WO 97/22376), produzem aerossóis a partir de soluções, enquanto os inaladores de dose calibrada, inaladores de pó seco, etc. geram aerossóis de pequenas partículas. Estes exemplos específicos de dispositivos de inalação comercialmente disponíveis são destinados a ser uma representação dos dispositivos específicos apropriados para esta prática, e não pretendem ser limitativos. De preferência, uma composição que compreende pelo menos um anticorpo anti-IL-6 é fornecido por um inalador de pó seco ou um pulverizador. Existem diversas características desejáveis de um dispositivo de inalação para administrar pelo menos um anticorpo da presente invenção. Por exemplo,

a entrega do dispositivo de inalação é vantajosamente confiável, reproduzível e precisa. O dispositivo de inalação pode, opcionalmente, fornecer pequenas partículas secas, por exemplo, menos do que cerca de 10 μm , de preferência cerca de 1-5 μm , para uma boa respirabilidade.

Administração de composições do anticorpo de IL-6 como um spray

Um pulverizador, incluindo uma de anticorpo de proteína composição IL-6, pode ser produzido forçando uma suspensão ou solução de pelo menos um anticorpo anti-IL-6 do anticorpo através de um bocal sob pressão. O tamanho e configuração do bocal, a pressão aplicada e a taxa de alimentação de líquido podem ser escolhidos para alcançar o resultado desejado e o tamanho da partícula. Um spray elétrico pode ser produzido, por exemplo, por um campo elétrico, em ligação com uma alimentação capilar ou bocal. Vantajosamente, as partículas de, pelo menos, uma composição de anticorpo de proteína anti-IL-6, emitidas por um pulverizador têm um tamanho de partícula inferior a cerca de 10 μm , de preferência no intervalo de cerca de 1 μm a cerca de 5 μm , e mais preferencialmente de cerca de 2 μm a cerca 3 μm .

As formulações de pelo menos uma composição de anticorpo de proteína anti-IL-6, adequada para o uso com um pulverizador tipicamente incluem a composição de anticorpo de proteína numa solução aquosa a uma concentração de cerca de 0,1 mg a cerca de 100 mg de pelo menos uma composição de anticorpo de proteína anti-IL-6 por ml de solução ou mg/gm, ou qualquer intervalo ou valor do mesmo, por exemplo, mas não limitado a, 0,1, 0,2., 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16,17,18,

19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 ou 100 mg/ml ou mg/gm. A formulação pode incluir agentes tais como um excipiente, um tampão, um agente de isotonicidade, um conservante, um tensioativo, e, preferivelmente, zinco. A formulação pode também incluir um excipiente ou agente para a estabilização composição de anticorpo da proteína, tal como um tampão, um agente de redução, grandes quantidades de uma proteína, ou um hidrato de carbono. As proteínas a granel úteis na formulação da composição de anticorpo de proteínas incluem albumina, protamina, ou semelhantes. Hidratos de carbono típicos úteis na formulação da composição de anticorpo de proteínas incluem sacarose, manitol, lactose, trealose, glicose, ou similar. A formulação de composição de anticorpo da proteína também pode incluir um tensioativo, que pode reduzir ou prevenir a agregação induzida da superfície da composição de anticorpo da proteína causada pela atomização da solução na formação de um aerossol. Vários agentes tensioativos convencionais podem ser empregues, tais como ésteres de polioxietileno de ácidos gordos e álcoois, e ésteres de ácidos gordos de polioxietileno sorbitol. Os valores variarão geralmente entre 0,001 e 14% em peso da formulação. Agentes tensioativos especialmente preferidos para estes fins são monooleato de polioxietileno sorbitano, polissorbato 80, polissorbato 20 ou semelhantes. Agentes adicionais conhecidos na técnica para a formulação de uma proteína, tal como anticorpos IL-6 ou partes ou variantes especificadas, podem também ser incluídos na formulação.

Administração de composições de anticorpos IL-6 por um nebulizador

A composição de anticorpo de pProteína pode ser administrada por um nebulizador, como nebulizador de jacto ou um nebulizador ultrassónico. Tipicamente, num

nebulizador de jacto, uma fonte de ar comprimido é usado para criar um jacto de ar de alta velocidade através de um orifício. À medida que o gás se expande para além do bocal, uma região de baixa pressão é criada, a qual estabelece uma solução de composição de anticorpo da proteína através de um tubo capilar ligado a um reservatório de líquido. O fluxo líquido do tubo capilar é cortado em filamentos instáveis e gotículas à medida que sai do tubo, criando o aerossol. Uma variedade de configurações, caudais, e tipos de deflectores pode ser empregue para conseguir as características de desempenho desejadas de um determinado nebulizador de jacto. Num nebulizador ultrassónico, é usada a alta frequência de energia eléctrica para criar energia mecânica vibracional, tipicamente empregando um transdutor piezoeléctrico. Esta energia é transmitida para a formulação de composição de anticorpo da proteína, quer directamente ou através de um fluido de acoplamento, criando um aerossol incluindo a composição do anticorpo da proteína. Vantajosamente, as partículas de composição de anticorpo da proteína entregue por um nebulizador têm um tamanho de partícula inferior a cerca de 10 μm , de preferência no intervalo de cerca de 1 μm a cerca de 5 μm , e mais preferencialmente de cerca de 2 μm a cerca de 3 μm .

As formulações de pelo menos um anticorpo anti-IL-6 adequadas para utilização com um nebulizador, tanto a jacto como ultrassónico, incluem, tipicamente, uma concentração de cerca de 0,1 mg até cerca de 100 mg de, pelo menos, um anticorpo da anti-IL-6 por ml de solução. A formulação pode incluir agentes tais como um excipiente, um tampão, um agente de isotonicidade, um conservante, um tensioativo, e, preferivelmente, zinco. A formulação pode também incluir

um excipiente ou agente de estabilização de pelo menos uma composição de anticorpo da proteína anti-IL-6, tal como um tampão, um agente de redução, grandes quantidades de uma proteína, ou um hidrato de carbono. Proteínas a granel úteis na formulação de, pelo menos, uma composição de anticorpo da proteína anti-IL-6 incluem albumina, protamina, ou semelhantes. Hidratos de carbono típicos úteis na formulação, pelo menos, um anticorpo anti-IL-6 incluem sacarose, manitol, lactose, trealose, glicose, ou semelhantes. Pelo menos, Uma formulação de anticorpo anti-IL-6, também pode incluir um tensioativo, que pode reduzir ou prevenir a agregação induzida da superfície de pelo menos um anticorpo anti-IL-6 causada pela atomização da solução na formação de um aerossol. Vários agentes tensioativos convencionais podem ser empregues, tais como ésteres de polioxietileno de ácidos gordos e álcoois, e ésteres de ácidos gordos de sorbitol de polioxietileno. Os valores variarão geralmente entre 0,001 e 4%, em peso, da formulação. Agentes tensioativos especialmente preferidos para estes fins são polioxietileno sorbitano mono-oleato, polysorbato 80, polysorbato 20, ou semelhantes. Agentes adicionais conhecidos na técnica para a formulação de uma proteína, tal como a proteína de anticorpo também podem ser incluídos na formulação.

Administração de composições de anticorpos IL-6 por um inalador de dose calibrada

Num inalador de dose calibrada (MDI), um propulsor, pelo menos, um anticorpo anti-IL-6, e quaisquer excipientes ou outros aditivos estão contidos numa lata como uma mistura que contém um gás comprimido liquefeito. O acionamento da válvula de medição liberta a mistura como um aerossol, contendo preferivelmente partículas na faixa de tamanho de menos de cerca de 10 μm , de preferência cerca de 1 μm a

cerca de 5 μm , e mais preferencialmente de cerca de 2 μm a cerca de 3 μm . O tamanho de partículas de aerossol desejado pode ser obtido pelo emprego de uma formulação de uma composição de anticorpo da proteína produzida por vários métodos conhecidos dos peritos na técnica, incluindo jacto de moagem, secagem por atomização, condensação de ponto crítico, ou semelhantes. Os inaladores de dose calibrada preferidos incluem aqueles fabricados pela 3M ou Glaxo e empregando um propulsor de hidrofluorocarboneto.

Formulações de pelo menos um anticorpo anti-IL-6 para uso com um dispositivo inalador de dose calibrada geralmente incluem um pó finamente dividido contendo, pelo menos, um anticorpo anti-IL-6 como uma suspensão num meio não aquoso, por exemplo, suspenso num propulsor com o auxílio de um agente tensioativo. O propulsor pode ser qualquer material convencional empregue para este fim, tal como clorofluorocarbono, hidroclorofluorocarboneto, hidrofluorocarboneto, ou um hidrocarboneto, incluindo triclorofluorometano, diclorodifluorometano, dichlorotetrafluoroethanol e 1,1,1,2-tetrafluoroetano, HFA-134a (hidrofluoroalcano-134a), HFA-227 (hidrofluoroalcano-227), ou semelhantes. De preferência, o propulsor é um hidrofluorocarboneto. O agente tensioativo pode ser escolhido para estabilizar, pelo menos, um anticorpo anti-IL-6 como uma suspensão no propulsor, para proteger o agente ativo contra a degradação química, e semelhantes. Os tensioativos adequados incluem trioleato de sorbitano, lecitina de soja, ácido oleico, ou semelhantes. Em alguns casos, são preferidos os aerossóis de soluções com solventes, tais como etanol. Agentes adicionais conhecidos na técnica para a formulação de uma proteína, tal como a proteína também podem ser incluídos na formulação.

Um dos vulgares peritos na técnica reconhecerá que os métodos podem ser realizados através da administração pulmonar de composições de, pelo menos, um anticorpo anti-IL-6 por meio de dispositivos não descritos aqui.

Formulações orais e administração

As formulações para administração oral contam com a coadministração de adjuvantes (por exemplo, resorcinóis e tensioativos não iônicos tais como éter oleílico de polioxietileno e éter n-hexadecylpolyethylene) para aumentar artificialmente a permeabilidade das paredes intestinais, bem como a coadministração de inibidores enzimáticos (por exemplo, inibidores da tripsina pancreática, diisopropilfluorofosfato (DFP) e trasilol) para inibir a degradação enzimática. O composto constituinte ativo da forma de dosagem de tipo sólido para administração oral pode ser misturado com pelo menos um aditivo, incluindo sacarose, lactose, celulose, manitol, trealose, rafinose, maltitol, dextrano, amidos, agar, arginates, quitinas, quitosanas, pectinas, goma de tragacanto, goma-arábica, gelatina, colagénio, caseína, albumina, polímeros sintéticos ou semissintéticos e glicéridos. Estas formas de dosagem podem também conter outro tipo de aditivos, por exemplo, agente de diluição inativo, lubrificante, tal como estearato de magnésio, parabeno, um agente conservante tal como o ácido sórbico, o ácido ascórbico, alfa-tocoferol, antioxidantes, tais como cisteína, desintegrador, pasta, espessante, agente de tamponamento, edulcorante, agente aromatizante, agente perfumante, etc.

Os comprimidos e pílulas podem ainda ser processados em preparações de revestimento entérico. As preparações

líquidas para administração oral incluem emulsões, xarope, elixir, suspensão e preparações de solução admissíveis para uso médico. Estas preparações podem conter agentes de diluição inativos normalmente utilizados no referido campo, por exemplo, água. Os lipossomas foram também descritos como sistemas de fornecimento de fármacos para a insulina e heparina (Patente US 4239754). Mais recentemente, as microesferas de polímeros artificiais de aminoácidos mistos (proteínóides) têm sido utilizadas para entregar fármacos (Patente US 4925673). Além disso, os compostos transportadores descritos nas Patentes US 5879681 e 55871753 são usados para entregar agentes biologicamente ativos por via oral são conhecidos na técnica.

Formulações mucosais e administração

Para a absorção através das mucosas, composições e métodos de administração de pelo menos um anticorpo anti-IL-6 incluem uma emulsão compreendendo uma pluralidade de partículas submicrométricas, uma macromolécula muco adesiva, um péptido bioativo e uma fase aquosa contínua, que promove a absorção através das mucosas conseguindo muco adesão das partículas da emulsão (Patente US 5514670). As superfícies mucosas adequadas para aplicação das emulsões da presente invenção podem incluir a córnea, conjuntival, bucal, sublingual, nasal, vaginal, pulmonar, estomacal, intestinal e rectal. As formulações para administração vaginal ou rectal, por exemplo, supositórios, podem conter como excipientes, por exemplo, polialquilenoglicóis, vaselina, manteiga de cacau, e outros semelhantes. As formulações para administração intranasal podem ser sólidas e conter como excipientes, por exemplo, lactose ou podem ser soluções aquosas ou oleosas de gotas nasais. Para administração bucal, os excipientes incluem açúcares,

estearato de cálcio, estearato de magnésio, amido pré-gelatinado e semelhantes (Patente US 5849695).

Formulações transdérmicas e administração

Para a administração transdérmica, pelo menos um anticorpo anti-IL-6 é encapsulado num dispositivo de entrega, tais como um lipossoma ou micropartículas poliméricas, nanopartículas, microcápsulas ou microesferas (referidas colectivamente como micropartículas, a menos que indicado o contrário). Um certo número de dispositivos adequados que são conhecidos, incluindo micropartículas feitas de polímeros sintéticos, tais como ácidos poli-hidroxi, tais como ácido poliláctico, ácido poliglicólico e seus copolímeros, poliortoésteres, polianidridos e polifosfazenos, e polímeros naturais tais como o colagénio, poliaminoácidos, albumina e outras proteínas, alginato e outros polissacáridos, e suas combinações (Patente US 5814599).

Administração prolongada e formulações

Pode ser por vezes desejável administrar os compostos da presente invenção ao sujeito ao longo de períodos de tempo prolongados, por exemplo, por períodos de uma semana a um ano a partir de uma única administração. Várias formas de dosagem de libertação lenta, depósito ou de implantes podem ser utilizadas. Por exemplo, uma forma de dosagem pode conter um sal farmacologicamente aceitável e não tóxico dos compostos que possui um baixo grau de solubilidade nos fluidos corporais, por exemplo, (a) um sal de adição de ácido com um ácido polibásico tal como ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido tânico, ácido pâmico, ácido algínico, ácido poliglutâmico, ácidos de naftaleno mono- ou di-sulfónicos, ácido

poligalacturónico, e similares; (b) um sal com um catião metálico polivalente tal como zinco, cálcio, bismuto, bário, magnésio, alumínio, cobre, cobalto, níquel, cádmio e semelhantes, ou com um catião orgânico formado a partir de, por exemplo, N,N'-dibenzil-etilenodiamina ou etilenodiamina; ou (c) combinações de (a) e (b) por exemplo, um sal de tanato de zinco. Além disso, os compostos da presente invenção ou, de preferência, um sal relativamente insolúvel, tal como os descritos acima, podem ser formulados num gel, por exemplo, um gel de monoestearato de alumínio com, por exemplo, óleo de sésamo, adequado para injeção. Os sais particularmente preferidos são os sais de zinco, sais de tanato de zinco, sais de pamoato, e similares. Outro tipo de formulação de depósito de libertação lenta para injeção conterá o composto ou sal disperso para ser encapsulado num polímero de degradação lenta, não tóxico, não antigénico tal como um ácido poliláctico/polímero do ácido poliglicólico por exemplo como descrito na Patente US 3773919. Os compostos ou, de preferência, sais relativamente insolúveis tais como aqueles descritos acima podem também ser formulados em pelotas silásticas de matriz de colesterol, particularmente para uso em animais. Formulações de libertação lenta, de depósito ou de implante adicionais, por exemplo, de lipossomas de gás ou líquido são conhecidas na literatura (Patente US 5770222 e "Sustained and Controlled Drug Delivery Systems", J.R. Robinson ed., Marcel Dekker, Inc., NY, 1978).

Abreviaturas

BSA - Albumina de soro bovino

EIA - Imunoensaio enzimático

FBS - Soro fetal bovino

H₂O₂ - Peróxido de hidrogénio

HRP - Peroxidase de rábano
Ig - Imunoglobulina
IL-6 - Interleucina-6
IP - Intraperitoneal
IV - Intravenosa
Mab - Anticorpo monoclonal
OD - Densidade óptica
OPD - Dicloridrato de o-fenilenediamina
PEG - Polietilenoglicol
PSA - Penicilina, estreptomicina, anfotericina
RT - Temperatura ambiente
SQ - Subcutânea
v/v - Volume por volume
w/v - Peso por volume

EXEMPLO I GERAÇÃO DE MURINOS CLB8 MAB

Imunização

O hibridoma que dá origem a que o anticorpo murino CLB-IL6-8 foi derivado a partir de uma fusão, realizado num laboratório do Dr. Lucien Aarden, Central Laboratory of the Netherlands Red Cross Transfusion Service (CLB) conforme relatado (Brackenhoff et al, J. Immunol. (1990) 145: 561-568).

Ratos fêmeas Balb/c de oito semanas de idade, obtidas a partir de determinado agente patogénico de matrizes livres de CLB foram imunizados por via intramuscular (IM) com 10 µg de interleucina-6 recombinante purificada (rIL-6) (CLB) emulsionada em adjuvante completo de Freund. Três injeções IM subsequentes com 10 µg cada de rIL-6 em adjuvante incompleto de Freund, foram realizadas em intervalos de 4-8 semanas.

Fusão celular

Quatro dias após a última injeção IM de reforço, um rato foi sacrificado, o baço foi retirado e finamente picado. Uma única suspensão celular foi obtida em solução salina equilibrada de Earle. As células foram lavadas e contadas. A fusão foi realizada a uma proporção de 1:3 de células do baço para células viáveis de mieloma murino (SP2/0-Ag14) na presença de 42% (p/v) de polietilenoglicol em meio de Dulbecco modificado por Iscove (MDMI). O parceiro de fusão segregando não-Ig SP2/0 foi estabelecida a partir de um banco de células mantido a CLB. Após a fusão, as células foram ressuspensas em IMDM, suplementado com 5% de soro fetal bovino, 50 µM de penicilina/estreptomicina, 5×10^{-5} M 2-mreceptoethanol (2-ME) e HAT (6×10^{-4} M de hipoxantina, $6,5 \times 10^{-7}$ M de aminopterin, $6,4 \times 10^{-5}$ M de timidina). A proliferação destes hibridomas imediatamente após a fusão é dependente de IL-6, por conseguinte, 100 U/mL de IL-6 murino purificado (Van Smick, Bruxelas), foi adicionado ao meio de seleção. As células fundidas foram então distribuídas em placas de 96 poços a 1×10^5 células/100 microL por poço.

Caracterização primária de hibridomas murino anti-IL-6

Híbridos secretores anti-IL-6 foram selecionados por ensaio imunoenzimático (ELISA) e radioimunoensaio (RIA) (Brackenhoff et al. (1990) 145: 561-568).

A ELISA de fase sólida foi utilizada para o rastreio de anticorpos monoclonais específicos para IL-6 humana. rIL-6 purificada (0,5 µg/mL) foi revestida durante a noite à temperatura ambiente em solução salina tamponada com fosfato (PBS) em placas de fundo plano (Dynatech), com 100 µL/poço. As placas foram lavadas com PBS, 0,02% (v/v) de

Tween 20 (PBS/Tween), e foram incubadas com diluições 1:2 de sobrenadantes de cultura em PBS/Tween suplementado com 0,2% de gelatina (PTG) durante 2 horas à temperatura ambiente. Após a lavagem, as placas foram incubadas com peroxidase de rábano conjugada com monoclonal de rato anti-rato de cadeia leve kapa 226 (Einstein University, Nova Iorque) em PTG (2 µg/mL) durante 1 hora. As placas foram lavadas e a peroxidase ligada foi detectada com µL 100/poço de 3,5,3,5,tetrametilbenzidina/0,003% de peróxido de hidrogénio em 0,1 M de acetato de sódio, pH 5,5. A reação de cor foi parada com 2M de H₂S₀₄ e as placas foram lidas a 450 nm num leitor Multiscan Titertek. Os poços que produziram OD positiva foram escolhidos.

Um RIA de fase sólida, também foi utilizado para o rastreio de hibridomas anti-IL-6. Os anticorpos Ig anti-murino de cabra foram acoplados para brometo de cianogénio ativado com Sepharose CL-4B (Pharmacia). A Sepharose foi lavada e ressuspensa em 10 mg/ml em PBS, 0,1% de Tween 20,0, azida de sódio a 1%. Os sobrenadantes dos hibridomas foram adicionados aos grânulos de Sepharose na presença de cerca de 20000 contagens/minuto de ¹²⁵Iodine-rIL-6 (CLB) durante 6 horas com agitação constante. Os grânulos foram extensivamente lavados em PBS/Tween e contados num contador gama. Os poços produzindo as maiores atividades específicas foram escolhidos.

Os hibridomas que foram positivos em ambos os sistemas de ensaio foram estabelecidos e subclonados duas vezes a diluições limitantes em IMDM suplementado com 2x10⁻⁵ M de 2-ME e 5% de FBS (IMDM completo). O subclone independente de IL-6 CLB-IL6-8 foi selecionado e mantido em IMDM completo. As culturas de teste negativo para micoplasma usando uma mancha indireta de Hoescht após 4 dias em cultura em células alvo Vero76. A determinação de isotípo

de sobrenadante via o kit de isotípo do anticorpo monoclonal de imunoensaio Innogenetics Line (INNO-LIA) rendeu um único isótopo murino IgG₁ kappa. Esta determinação de isotípo foi confirmada por um EIA de captura

O hibridoma de murino e uma linha celular foi assim produzida, o CLBIL-6/8 foi chamado CLB8. Foi quimerizado e caracterizado adicionalmente como descrito abaixo.

EXEMPLO 2: QUIMERIZAÇÃO E SEQUENCIAMENTO

Clonagem e Expressão dos genes da região variável de cCLB8

O ADN genómico foi isolado a partir do hibridoma murino C143A que segrega um anticorpo monoclonal de murino específico para a IL-6 humana.

Para a cadeia leve, o ADN foi digerido com a endonuclease de restrição Hind III e submetido a electroforese através de um gel de agarose a 0,8%. A porção do gel contendo fragmentos de ADN de aproximadamente 3,4 kb de comprimento foi excisada e o ADN foi eluído. Os fragmentos foram ligados no vector8charon27, e empacotados em partículas de bacteriófagos. Para a cadeia pesada, o ADN foi digerido com a endonuclease de restrição EcoRI e submetido a electroforese através de um gel de agarose a 0,8%. A porção do gel contendo fragmentos de ADN de aproximadamente 3,6 kb de comprimento foi excisada e o ADN foi eluído. Os fragmentos foram ligados no vector8gtl0, e empacotados em partículas de bacteriófagos.

Ambas as bibliotecas de bacteriófago de cadeia pesada e leve foram semeadas em E. Coli, e cresceram durante a

noite. As placas foram transferidas para filtros de nitrocelulose e sondadas com fragmentos de ADN marcados com ³²P correspondendo a sequências murino J_K (cadeia leve) ou murino J_H. As placas positivas foram identificadas e purificadas em placa. O ADN do fago foi isolado, e as inserções Hind III (cadeia leve) ou Eco RI (cadeia pesada) foram isoladas e clonadas em vectores de expressão de imunoglobulinas.

Plasmídeos de expressão de cadeia pesada e leve foram utilizados para co-transfectar células SP2/0, e foi aplicada a seleção por ácido micofenólico. Os clones individuais produtores de anticorpos quiméricos foram identificados e subclonados para garantir a monoclonalidade e para gerar os produtores mais elevados.

O anticorpo purificado a partir de linhas de células individuais foi testado para a capacidade de neutralização num ensaio de proliferação de células B9 dependentes de IL-6. O anticorpo é referido como CLB8 quimérico cCLB8 ao longo deste pedido.

Região variável da cadeia pesada cCLB8

```
E V Q L V E S G G K L L K P G G S L K L
GAG GTG CAA CTG GTG GAA TCT GGA GGA AAA TTA CTG AAG CCT GGA GGG TCC CTG AAA CT

S C A A S G F T F S S F A M S W F R Q S
TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TTT GCC ATG TCT TGG TTT CGC CAG TC
```

P E K R L E W V A E I S S G G S Y T Y Y
CCA GAG AAG AGG CTG GAG TGG GTC GCA GAA ATT AGT AGT GGT GGG AGT TAC ACC TAC TAT

CDR 2

P D T V T G R F T I S R D N A K N T L Y
CCT GAC ACT GTG ACG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC ACC CTG TAC

L E M S S L R S E D T A M Y Y C A R G L
CTG GAA ATG AGC AGT CTG AGG TCT GAG GAC ACG GCC ATG TAT TAT TGT GCA AGG GGT TTA

W G Y Y A L D Y W G Q G T S V T V S S
TGG GGG TAC TAT GCT CTT GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA

CDR 3

Região variável da cadeia leve cCLB8

Q I V L I Q S P A I M S A S P G E K V T
CAA ATT GTT CTC ATA CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACC

M T C S A S S S V S Y M Y W Y Q Q K P G
ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT GTA AGT TAC ATG TAC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA

CDR 1

S S P R L L I Y D T S N L A S G V P V R

CEN 2/0

TCC TCC CCC AGA CTC CTG ATT TAT GAC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA GTC CCT GTT
CGC

CDR 2

F S G S G S G T S Y S L T I S R M E A E
TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC CGA ATG GAG GCT GAG

D A A T Y Y C Q Q W S G Y P Y F F G G G
GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAG TGG AGT GGT TAC CCA TAC ACG TTC GGA GGG GGG

CDR 3

T K L E I K
ACC AAG CTG GAA ATA AAA

EXEMPLO 3. MEDIDA DE LIGAÇÃO DO CCLB8 A IL-6 HUMANA POR EIA DE FASE SÓLIDA

Uma EIA de fase sólida foi utilizada para avaliar as características de ligação de Mab cCLB8 a IL-6 humana. Resumidamente, as placas foram revestidas com IL-6 recombinante humana (RDI) a 1 µg/mL em PBS durante a noite a 4°C. Após a lavagem em solução salina 0,15 M contendo 0,02% (v/v) de Tween 20, os poços foram bloqueados com 1% (p/v) de BSA em PBS, 200 µl/poço durante 1 hora à temperatura ambiente. O anticorpo purificado foi incubado em duas séries de diluições a partir de uma concentração de partida de 5 µg/mL durante 1 hora a 37°C. A placa foi lavada e depois sondada com 50 µl/poço de HRP-IgG marcada de cabra anti-humana (Tago) diluída a 1:20000 em 1% BSA-PBS, durante 1 hora à temperatura ambiente. A placa foi novamente lavada e 100 µl/poço foi adicionado solução de substrato citrato-fosfato (0,1M de ácido cítrico e 0,2 M de fosfato de sódio, 0,01% de H₂O₂ e 1 mg/mL de OPD) durante 15 minutos à temperatura ambiente. Foi então adicionada a

solução de paragem (4N de ácido sulfúrico) a 25 µl/poço e a absorção a 490 nm quantificada utilizando um fotómetro de placas automático. A Figura 1 mostra a ligação de cCLB8 a IL-6 medido como OD 490 nm, demonstrando que cCLB8 liga-se a IL-6 recombinante humana de um modo dependente da concentração.

EXEMPLO 4. ENSAIOS DE NEUTRALIZAÇÃO IN VITRO

Bloqueio da IL-6 por cCLB8 inibindo a secreção de IgM e de MCP-1

O anticorpo monoclonal quimérico cCLB8 foi avaliado em dois formatos de bio ensaios simples para determinar a sua bioatividade neutralizante sobre a secreção induzida de IL-6 pela IgM humana e a quimiocina MCP-1. Duas linhas de células humanas foram usadas nestes estudos. A linha celular SKW6.4 foi originalmente derivada a partir de um linfoma de Burkitt de células B transformadas por EBV e segregando IgM solúvel em resposta à IL-6. A linha celular U937 é monoblástica, comprometida com a diferenciação de monócitos e foi originalmente isolada de um paciente com linfoma histiocítico difuso. As células U937 segregam a MCP-1 em resposta à IL-6. A inibição cCLB8 destas bioatividades específicas foi avaliada, uma vez que pode ser facilmente monitorizada utilizando um formato de EIA. Antes do ensaio, as células foram privadas de soro durante a noite e, em seguida, cultivadas isoladamente no dia seguinte, com IL-6 ou com IL-6 pré-incubadas com várias concentrações de anticorpo ou um anticorpo de controlo negativo. Na conclusão de um sobrenadante de 72 horas de incubação foram recolhidas e usadas em IgM específica e MCP-1 específico do EIA. Os resultados, como mostrado nas

Figs. 2 e 3, demonstram que cCLB8 inibe significativamente IL6 e mediada por secreção de IgM MCP-1 *in vitro*.

Na experiência representada pela Fig. 2, as placas de EIA foram revestidas com um fragmento específico de anticorpo de IgM anti-humana de cabra Fc5 μ , em 10 mM de tampão de carbonato, pH 9,6 durante a noite a 4°C. As placas foram lavadas com 0,15 M de solução salina contendo 0,02% v/v de Tween 20 e bloqueadas com 1% de PBS p/v de BSA durante 1 hora. O sobrenadante de cultura de células foi adicionado duas vezes a diluições em série. Após a incubação e lavagens subsequentes com 0,02% de Tween, 0,15 M de solução salina a placa foi sondada com HRP marcado de cabra com cadeia específica de IgM μ anti-humana. O substrato OPD foi então adicionado e após o desenvolvimento da cor, a OD foi lida a 490 nm. Os dados indicam que cCLB8, mas não o isotipo de controlo negativo marcado mAb quimérico, inibe a secreção de IgM mu.

Na experiência representada pela Fig. 3, foram revestidas placas de EIA com MCP-1 cabra anti-humano em 10 mM de tampão de carbonato, pH 9,6 durante a noite a 4°C. As placas foram lavadas com 0,15 M de solução salina contendo 0,02% v/v de Tween 20 e bloqueadas com 1% de PBS p/v de BSA durante 1 hora. A cultura celular sobrenadante foi adicionada a diluições em série de duas vezes. Após uma incubação de duas horas, e lavagens subsequentes com 0,02% de Tween, 0,15 M de solução salina, a placa foi sondada com MCP-1 biotinilado anti-humano de acordo com as instruções do fabricante. As placas foram lavadas novamente e foi adicionada estreptavidina marcada com HRP durante 1 hora. O desenvolvimento da cor foi feito com substrato TMB. A OD foi lida a 450. Os dados indicam que cCLB8, mas não cK931, inibe a IL-6 mediada por produção de MCP-1.

Neutralização de IL6 mediada por fosforilação de STAT3

O receptor de IL-6 consiste numa subunidade de ligação de 80kD, IL6R α e a subunidade de transdução de sinal, gp130. A IL-6 liga-se à subunidade IL6R α e inicia a associação de IL6R α e gp130, resultando num receptor de alta afinidade e transdução do sinal. A IL6R α também existe numa forma solúvel. A IL6 pode ligar-se a IL6R solúvel (sIL6R) e o complexo pode atuar sobre as células que expressam gp130. AIL6 foi mostrada para ativar STAT3. Uma linha celular de leucemia monocítica aguda humana, THP-1, foi utilizada para demonstrar a inibição da fosforilação de STAT3 por cCLB8. As células foram estimuladas com (IL6 + sIL6R) +/- cCLB8 ou anticorpo irrelevante (K931) como um controlo negativo. Os lisados celulares foram imunoprecipitados com amostras de anti-STAT3, resolvidos em 7,5% SDS-PAGE e transferidos para uma membrana de Hybond-P, seguido por Western blotting utilizando anti-fosfotirosina-HRP. ECLplus foi usado para a detecção.

Os dados representados na Figura 4 mostram que cCLB8 pode inibir a fosforilação de STAT3 quando é a) é deixado ligar a rhIL6 antes da adição de sIL6R, b) é deixado ligar a sIL6R antes da adição de rhIL6, ou c) quando rhIL6 é deixado ligar para sIL6R antes da adição de cCLB8 e células. As células THP-1 incubadas em meio sem soro durante 16 h, raspadas dos frascos e ressuspensas em 0,5 ml de meio Lanes 2-6, IL6 incubada +/- anticorpo durante 15 min, em seguida, adicionar sIL6R e incubar durante 15 min. As células foram adicionadas e incubadas por mais 15 min. Pista 7, IL6 incubada com sIL6R durante 15 min, em seguida, adicionado CLB-IL6 e incubado durante 15 min. As células foram adicionadas e incubadas por mais 15 min. As amostras imunoprecipitadas com anti-STAT3 [1, μ g/ml], ressuspensas em tampão de amostra de Laemmli e resolvidas em 7,5% SDS-

PAGE e transferidas para Hybond-P. Membrana incubada com anti-fosfotirosina-HRP.

cCLB8 inibe a produção de amilóide sérica A

A IL-1 β é um potente indutor da produção de soro amilóide A (SAA), a partir de células HepG2 do hepatoma humano na presença de IL-6 humana (Smith e McDonald, Clin Exp. Immunol.90: 293-9 (1992)). Portanto, o cCLB8 Mab foi ensaiado quanto à capacidade para inibir a produção de SAA induzida por IL-1 β /IL-6 a partir destas células. Resumidamente, as células HepG2 foram semeadas a $2,25 \times 10^5$ /poço durante 24 horas. IL-6 (100 ng/mL, RDI) e IL-6sR (200ng/mL, S & D) foram pré-incubadas durante 30 minutos, e misturadas com IL-1 β (1 ng/ml, R & D). O cCLB8 Mab e um Mab de isotipo de controlo negativo (cSF25) foram diluídos em série e, em seguida, pré-incubados com a mistura anterior durante mais 30 minutos.

Para os resultados experimentais mostrados na Fig. 5, uma série de diluições cCLB8 ou cSF25 (um isotipo irrelevante Mab) foram pré-incubados com IL-6sR e IL-1 β e depois cultivados com células HepG2, durante 24 horas. O sobrenadante celular foi então analisado para os níveis de produção amilóide sérica A por ELISA. (Humana SAA ELISA, Biosource, realizada de acordo com as instruções do fabricante). As barras de erro indicam SEM de amostras em duplicado. Os dados apresentados na Fig. 5 indicam que cCLB8 foi capaz de inibir a produção de SAA por indução de IL-1 β /IL-6 a partir de células HepG2 de um modo dependente da dose.

Inibição da proliferação celular induzida IL-6 por cCLB8 Mab

A linha de células de mieloma murino, 7TD1, é induzida a proliferar na presença de IL-6. Para demonstrar a capacidade de cCLB8 Mab para neutralizar a atividade de IL-6, as células foram incubadas a 37°C durante 72 horas em IMDM contendo 10% de FBS e 0,5 ng/ml de IL-6 recombinante humana (R & D Systems), e com diluições seriadas de cCLB8 Mab ou controlo negativo Mab 17-La. A proliferação celular foi medida por um ensaio luminescente de ATP (ATPLite, Packard Bioscience), que se correlaciona diretamente com o número de células.

Os dados apresentados na Fig. 6 demonstram que a IL-6 estimula significativamente a proliferação de células 7TD1 e cCLB8 inibe a proliferação celular de um modo dependente da concentração com uma EC₅₀ de 7,2 ng/mL. As barras de erro indicam o SEM de amostras em duplicado. * Representa a proliferação de células na ausência de rIL-6.

EXEMPLO 5: MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS

Os epítomos de vários neutralizantes anti-IL-6 Mab, incluindo CLB8 foram caracterizados utilizando a ligação de anticorpo à IL-6 humana como proteínas mutantes como descrito (Brakenhoff, J. et al. (1990) J. Immunology 145: 561-568). Os mutantes de deleção dos terminais amino e carboxi foram preparados e o painel de anticorpos para IL-6 foi analisado por experiências de competição de anticorpos. Com base nos estudos de competição, os Mabs neutralizantes foram divididos em dois grupos (I e II). Neste método, os resíduos incluídos no epítomo de um dado MaB foram delineados pela sua incapacidade de reconhecer as correspondentes variantes específicas do sítio único de

substituição de aminoácidos da proteína antigénica. CLB.IL-6/8 foi mapeado para o sítio I da molécula de IL-6 humana, que é composta de aminoácidos Gln29-Leu34 em estreita proximidade com o terminal carboxilo da molécula. Outros estudos (Kalai, M, et al., Eur. J. Biochem. 249, 690-700 (1997)) mostraram que a CLB.IL-6/8 reconhece resíduos de aminoácidos importantes para a ligação da IL-6 para a IL-6R (gp80). Estes estudos também indicaram que o epítipo cobre as extremidades de ambas as malhas AB e as regiões da hélice D da molécula de IL-6.

EXEMPLO 6: CARACTERIZAÇÃO IN VIVO

Tratamento com IL-6 anti-humana (cCLB8) e IL-6 anti-rato de Mabs de rato atrasa a caquexia cancerosa

As células de melanoma humano (A375S2) foram inoculadas em ratinhos nus do sexo feminino e a terapia Mab foi iniciada no mesmo dia. Os anticorpos foram injetados intraperitonealmente com uma dose de 10 mg/kg (2x/semana) e C57 (anti-CMV) foi usado como um mAb de controlo. A combinação de cCLB8 (anti-IL-6) e MP520F3 (Mab para rato IL-6, R & D Systems), foram usados para criar um bloqueio combinado que inibe significativamente a perda de peso de animais portadores de tumores humanos de melanoma comparado com os animais tratados com o anticorpo C57 de controlo (Fig. 7). A terapia de anticorpos não afectou o crescimento do tumor ou o peso final do tumor. Estes resultados indicam que a IL-6 participa na perda de peso animal induzida por tumor e o bloqueio de IL-6 pode atrasar a caquexia cancerosa neste modelo.

Fig. 7. Bloqueio combinado de IL6 humana e de rato (anti-IL6 mAbs cCLB8 e MP520F3) resulta em significativa inibição

da perda de peso animal. Rectificada a perda de peso dos animais no eixo Y é (peso animal-peso tumoral no final do estudo) menos peso do animal no início do estudo. Cada barra representa a média dos dados de pelo menos 14 animais/grupo e as barras de erro indicam o desvio padrão. Duas análises de testes t de cauda indicaram que o grupo com anti-IL-6 inibiu significativamente a perda de peso corporal, com $p = 0,007$.

EXEMPLO 7: MEDIÇÕES DE AFINIDADE

O chip sensor CM-5 BIAcore 2000 (superfície de ouro no chip coberto com uma matriz de dextrano carboximetilado), HBS (10 mM de HEPES com 0,15 M de NaCl, 3,4 mM de EDTA e 0,05% de tensioativo P20, pH 7,4), os reagentes de acoplamento de amina (N-hidroxisuccinimida (NHS), N-etil-N'-(3-metilaminopropil)-carbodimide (EDC) e 1 M de etanolamina HCl) foram obtidos de BIAcore e preparados de acordo com as instruções do fabricante. Anti-Fc humano (Jackson AffiniPure de cabra anti-IgG humana, Fc \square , Cat# 109-005-098, Lote# 48646) foi adquirido a partir de Jackson ImmunoResearch.

O CLB8 quimérico (Lote# PD1F03) de anticorpo monoclonal de IgG em 5 ml de 0,15 M de cloreto de sódio, 0,01 M de fosfato de sódio, pH 7,2, foi fabricado pela Centocor. IL-6 recombinante humana (Lote# A1197111) foi comprada em R & D Systems.

Um Fc anti-humano (1,8 mg/ml) foi diluído para uma concentração de 50 μ g/ml em tampão de NaOAc (10 mM, pH 4,8) e acoplado à matriz de dextrano carboximetilado de um chip sensor CM-5 usando a química de acoplamento de amina do

fabricante, como descrito no manual de sistemas de BIAcore. Utilizando o assistente de preparação de superfície visando 10000 RU, os grupos carboxilo sobre a superfície do sensor foram primeiro ativados com NHS/EDC, seguido pela adição de Fc anti-humano. Os grupos ativados restantes foram bloqueados pela injeção de 1M de etanolamina. Cada uma das células de fluxo foi acoplada individualmente. Utilizando estas condições, foram preparadas as quatro superfícies de células de fluxo contendo 7554-9571 unidades de ressonância (RU) de Fc anti-humano. Em experiências preliminares, determinou-se que três injeções (15 μ l em 30 μ l/min) de 100mM H₃PO₄/0.05% CHAPS iriam remover eficientemente a imunoglobulina ligada e preservar a capacidade de ligação do Fc anti-humano imobilizado.

Duas experiências foram realizadas no BIAcore 2000, a 25°C e um caudal de 30 μ L/min. O cCLB8 foi dissolvido em HBS a 5 μ g/ml. A substância a analisar, a IL-6, foi dissolvida em HBS a 0,25, 0,125, 0,062, 0,031, e 0,015 μ g/ml. A quantidade designada de anticorpo fluiu sobre a respectiva célula de fluxo seguido por injeções de 30 μ l de cada concentração de IL-6 a 30 μ l/min (fase de associação) e 800 segundos ininterruptos de fluxo de tampão (fase de dissociação). A superfície do chip foi regenerada por três injeções sequenciais de 15 μ l cada com 100 mM de H₃PO₄/0,05% de CHAPS. As injeções de HBS serviram de referência (sensograma em branco) para a subtração de índices de refração em massa para análise. Utilizando o modelo de 1:1 em BIAanalysis 3.0, um ajuste local, foi feito tanto para a dissociação (k_d , [s⁻¹]) como para a associação (k_a , [M⁻¹s⁻¹]) e calculada a constante de dissociação (KD [M]) (k_d/k_a).

A análise foi feita utilizando BIAevaluation na versão 3.0. As constantes cinéticas foram derivadas a partir de dados do sensograma ajustando as curvas experimentais para as equações de taxa derivadas de modelos do mecanismo de interação. Uma análise global, usando um modelo de ligação 1:1 com ajuste local R_Umax, determinou o k_a , k_d , K_D (Tabela 1).

Tabela 1: Medidas de Afinidade para CCLB8 Mab por Biacore

Amostra	$K_a (m^{-1}s^{-1}) (x10^6)$	$K_d (s^{-1}) (x10^5)$	$K_p (M) (x10^{-11})$	Chi ²
cCLB8	1,1	6,2	5,7	0,111
cCLB8	0,37	5,2	14	0,236

EXEMPLO 8: ANTICORPOS ANTI-IDIOTIPO

O desenvolvimento de sistemas eficazes de ensaio (a detecção imuno-histoquímica e de soro) para cCLB8 requer a utilização de anticorpos anti-idiotípicos. Portanto, ratinhos Balb/c são imunizados com cCLB8 para gerar anticorpos anti-idiotípicos para cCLB8 que podem ser utilizados como sondas farmacocinéticas na detecção de soro e ensaios imono-histoquímicos.

Imunização

Cinco ratos Balb/c (Charles River Laboratories), de 6-7 semanas de idade foram imunizados ao longo de um período de 12 semanas com cCLB8 (Centocor, PD1F03) administrado a 50 µg IP e 25 µg SC. Cada rato recebeu injeções IP e SC. As injeções ocorreram em intervalos de 2 semanas durante o regime de imunização. O material de injeção para administração IP foi emulsionado com um volume igual de adjuvante de Freund (Sigma). A primeira injeção IP utilizou

Adjuvante Completo de Freund, num volume total de 200 µl. Injeções IP subsequentes continham adjuvante incompleto de Freund. O material de injeção para administração SC foi diluído em PBS e dividido entre dois sítios de injeção de 100 µl/sítio. Os ratinhos foram sangrados nos dias 0, 21, 47 e 77. As recolhas de sangue foram realizadas em ratos anestesiados por punção retro-orbital, e o soro foi recolhido para determinação do título por fase sólida de cCLB8 EIA. Três semanas após o final do protocolo de imunização, o rato# 1 recebeu uma injeção de reforço final IV, de 100 µg cCLB8 diluído em 125 µl de PBS.

Geração de anticorpos monoclonais anti-idiotípicos cCLB8 de rato

Uma fusão utilizando baço de rato Balb/c imunizado com cCLB8 resultou na identificação de sete anticorpos anti-ID específico para cCLB8 via EIA. Os 7 anticorpos anti-id foram demonstrados não ligar com outros anticorpos quiméricos ratos/humanos como C207A, C128A, C168J, C116J, C300A e C301A. Seis dos sete anticorpos eram do isotipo IgG1K e um anticorpo era IgG2bk. A Tabela 1 resume os resultados da fusão. Deve notar-se que um título sérico máximo de 1:800 foi conseguido no ratinho após 47 dias, e manteve-se constante durante toda a duração da imunização.

Isotipificação

A determinação de isotipos dos anticorpos foi realizada através do uso do Kit de isotipificação Mouse Monoclonal Antibody (Life Technologies) em formato de vareta. Uma mistura de tampão de diluição, sobrenadante de hibridoma, e conjugado anti-rato de ratinho foi incubada durante a noite à temperatura ambiente com agitação em tubos contendo varetas pré-revestidas com vários isotipos de captura de

anticorpos murino. As varetas foram removidas a partir de tubos, lavadas suavemente em dH₂O, e os isotipos determinados.

Tabela 1: Propriedades dos anticorpos monoclonais anti-idiotípicos de rato cCLB8

Código C	Isotipo
C433A	IgC1k
C434A	IgC1k
C435A	IgC1k
C436A	IgC1k
C437A	IgC1k
C438A	IgC1k
C439A	IgC1k

Ensaio de inibição de soro

Foi determinado o efeito do soro humano normal reunido (NHS) na capacidade dos 7 anticorpos anti-id que se ligam a cCLB8. Diluições duplas de Mabs anti-id a partir de 50 µg/ml foram incubadas na presença de 0%, 0,5%, 5%, e 50% de NHS durante 30 minutos a 37°C. As misturas foram transferidas para placas revestidas de cCLB8 e incubadas durante 30 minutos a 37°C. As placas foram lavadas e, em seguida, sondadas com anticorpo de cabra anti-rato IgG Fc* HRP. Nenhum dos Mabs anti-id foi impedido de ligação cCLB8 por 0% e 0,5% de NHS. Três Mabs (C433A, C435A e C437A) apresentaram inibição da ligação parcial de 5% NHS. Todos, exceto C434A e C436A, foram significativamente afetadas pela concentração NHS de 50% (Figuras 8 A-G).

Inibição da Ligação a cCLB8 huIL-6 por Mabs anti-id

A capacidade dos 7 anticorpos anti-id para inibir a ligação de cCLB8 para HUIL-6 foi avaliada. Estudos EIA anteriores demonstraram que cCLB8 liga muito fracamente com placas revestidas de huIL-6. Dois Mab (C435A e C437A) em excessos de concentração de 6-25 vezes demonstraram inibição praticamente completa de ligação cCLB8 a huIL-6. C434A expressa um efeito inibitório para cCLB8 apenas com excesso de 25 vezes. Os dois melhores anticorpos para inibir a ligação de cCLB8 para huIL-6 foram C436A e C439A. Estes dois anticorpos foram capazes de inibir completamente a ligação cCLB8 sobre uma gama de concentrações em excesso de 3 a 25 vezes. C433A e C438A não mostraram atividade inibidora (Fig. 9). Este ensaio confirmou os resultados obtidos num estudo preliminar.

Ligação anti-id para cCLB8 pré-ligado para HuIL-6

A capacidade dos sete anticorpos anti-id para ligar cCLB8 que foi pré-ligado para HUIL-6 foi examinada. cCLB8 a 10 µg/ml, foi incubado em placas de huIL-6 durante 30 minutos a 37°C. As placas foram lavadas e, em seguida, incubadas com diluições triplas de Mabs anti-id a partir de 10 µg/ml durante 30 minutos a 37°C. As placas foram lavadas e, em seguida, sondadas com anticorpo de cabra anti-rato IgG Fc* HRP. Tal como em estudos preliminares, C436A e C438A eram os únicos anticorpos capazes de se ligar a cCLB8 que foi pré-ligado a huIL-6. A Figura 10 ilustra as capacidades de ligação dos sete anticorpos anti-Id para cCLB8 que é pré-ligado para HuIL-6.

Em resumo, os sete anticorpos monoclonais anti-idiotípicos foram produzidos a partir da fusão de células de mieloma murino e células do baço de um rato Balb/c imunizado com

anticorpo quimérico IL-6 anti-humano, (cCLB8). Cinco dos anticorpos anti-id (C434A, C435A, C436A, C437A e C439A) foram capazes de bloquear a ligação de cCLB8 para huIL-6. Dois anticorpos (C436A e C438A) possuíam a capacidade de se ligar a cCLB8 que foi pré-ligado a huIL-6 e dois anticorpos (C434A e C436A) foram virtualmente inalterados pela ligação de cCLB8 por qualquer concentração de NHS testada. Os perfis largos de ligação de cCLB8 destes anticorpos anti-idiotípicos fazem de alguns delas potenciais candidatos para uso como sondas farmacocinéticas na detecção de soro e ensaios imuno-histoquímicos.

Será evidente que a invenção pode ser praticada de outra forma do que como particularmente descrito na descrição anterior e exemplos.

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110>Centocor Inc.

Giles-Komar, Jill

Trikha, Mohit

Peritt, David

Knight, David M

<120> Anticorpos anti-IL-6, composições, métodos e utilizações

<130> CEN0270

<140> 60/332743

<141> 2001-11-14

<150> 60/332743

<151> 2001-11-14

<160> 16

<170> Patentln versão 3.1

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Ser Phe Ala Met Ser
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Glu Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Thr
1 . 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Gly Leu Trp Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4

```
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr  
1                5                10
```

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 5

```
Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
1                5
```

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 6

Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 7

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Lys Leu Leu Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Glu Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Glu Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Leu Trp Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

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

<210> 9
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 9
 agctttgccatgtct 15

<210> 10
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 10
 gaaatlagta gtgtgggag ttacacctac tatccigaca ctgtgacggg c 51

<210> 11
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 11
 ggittatggg ggtactatgc fctgactac 30

<210> 12
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 12
 agtgccagct caagtgaag ttacatgtac 30

<210> 13

<211> 21
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 13
gacacaloca acctggclic t 21

<210> 14
<211> 27
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 14
cagcagtgga gggflacc atacaog 27

<210> 15
<211> 357
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 15

```
gagggtcaac tgggtggaatc tggaggaaaa ttactgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
tctctgtcag cctctggatt caccttcagt agctttgcc a tgtcttggtt tgcgccagtct 120
ccagagaaga ggctggagtg ggtcgcagaa attagtagtg gtgggagtta cacctactat 180
cctgacactg tgacgggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
ctggaaatga gcagctctgag gtctgaggac acggccatgt attattgtgc aaggggttta 300

tgggggtact atgctcttga ctactggggt caaggaacct cagtcaccgt ctctctca 357
```

<210> 16
<211> 318
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 16

```
caaattgttc tcatacagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60
atgacctgca gtgccagctc aagtgtaagt tacatgtact ggtaccagca gaagccagga 120
tcttccccca gactcctgat ttatgacaca tccaacctgg cttctggagt cctgttctgc 180
ttcagtgcca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagccgaat ggaggctgag 240
gatgctgcca cttattactg ccagcagtg agtyggtacc catacacgtt cggagggggg 300
accaagctgg aaataaaa 318
```


REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo quimérico, ou um fragmento de anticorpo capaz de inibir a IL-6 humana que compreende uma região variável de cadeia pesada da SEQ ID N° 7 e uma região variável de cadeia leve da SEQ ID N° 8.
2. Anticorpo ou fragmento de acordo com a reivindicação 1, em que o referido anticorpo ou fragmento neutraliza, pelo menos, uma atividade da IL-6 humana, tal como a inibição da secreção de IgM mu a partir de células SKW6.4, inibição da IL-6 mediada pela produção de MCP-1, inibição de IL-6 de sinalização em células monocíticas de leucemia humana THP-1, inibição da IL-6 induzida pela produção de soro amilóide A de células HepG2, e inibição da rhlL-6 da proliferação celular induzida.
3. Molécula de ácido nucleico isolado compreendendo um polinucleótido que codifica o anticorpo da reivindicação 1 ou reivindicação 2.
4. Composição de ácido nucleico que codifica o anticorpo anti-IL-6, que compreende um ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 3 e um veículo ou diluente.
5. Vector compreendendo um ácido nucleico de acordo com a reivindicação 3.
6. Vector de acordo com a reivindicação 5, em que o referido vector compreende, pelo menos, um promotor SV490 tardio ou precoce, um promotor CMV, um promotor HSV tk, um promotor pgk (fosfoglicerato quinase), um promotor de imunoglobulina humana ou um promotor de EF-1 alfa.

7. Vector de acordo com a reivindicação 5 ou reivindicação 6, em que o referido vector compreende, pelo menos, uma porção de, pelo menos, um metotrexato (MTX), uma proteína verde fluorescente (GFP), di-hidrofolato-reductase (DHFR), neomicina (G418), ou um gene de seleção de glutamina sintetase (GS).
8. Célula hospedeira compreendendo um ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 3.
9. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 8, em que a referida célula hospedeira é uma célula de COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2 / 0, 293, HeLa, mieloma ou linfoma, ou qualquer derivado, imortalizado ou transformado da mesma célula.
10. Método para produzir pelo menos um anticorpo anti-IL-6 ou um fragmento de anticorpo, que compreende a tradução de um ácido nucleico de acordo com a reivindicação 3, sob condições *in vitro*, *in vivo* ou *in situ*, de tal modo que o anticorpo anti-IL-6 ou fragmento é expresso em quantidades detectáveis ou recuperáveis.
11. Composição compreendendo um anticorpo anti-IL-6 isolado, ou fragmento de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2, e um veículo ou diluente.
12. Composição de acordo com a reivindicação 11, que compreende pelo menos uma de água estéril, água tamponada estéril, ou, pelo menos, um dos seguintes conservantes: fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, álcool benzico, nitrito fenilmercúrico, fenoxietanol, formaldeído, clorobutanol, cloreto de magnésio, alquilparabeno, cloreto de benzalcónio,

cloreto de benzetónio, dehidroacetato de sódio, timerosal, e suas misturas, num diluente aquoso.

13. Composição de acordo com a reivindicação 11 ou reivindicação 12, em que a concentração de anticorpos anti-IL-6 ou fragmento é de 0,1 mg/ml a 100 mg/ml.

14. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 13, compreendendo ainda pelo menos um de um antagonista de TNF, um antirreumático, um relaxante muscular, um narcótico, um medicamento anti-inflamatório não-esteróide (NSAID), um analgésico, um agente anestésico, um sedativo, um anestésico local, um bloqueador neuromuscular, um antimicrobiano, um antipsoriático, um corticosteroide, um esteroide anabólico, um mineral, um nutriente, uma vitamina, uma hormona relacionada com o cálcio, um antidiarreico, um antitússico, um antiemético, um anti-úlceras, um laxante, um anticoagulante, uma eritropoietina, um filgrastim, um sargramostim, uma imunoglobulina, um imunossupressor, uma hormona de crescimento, um fármaco de substituição hormonal, um modulador de receptor de estrogénio, um midriático, um cicloplégico, um agente alquilante, um antimetabolito, um mitótico inibidor, um radiofármaco, um antidepressivo, um agente antimaníaco, um antipsicótico, um ansiolítico, um hipnótico, um simpatomimético, donepezil, tacrina, medicamento para a asma, um agonista beta, um esteroide inalado, um inibidor de leucotrienos, uma metilxantina, uma cromolina, uma epinefrina, dornase alfa, e uma citoquina.

15. Dispositivo médico que compreende pelo menos um anticorpo anti-IL-6 ou um fragmento de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, em que o referido

dispositivo é adequado para contactar ou administrar o referido pelo menos um anticorpo anti-IL-6 ou um fragmento, por administração intravenosa, intracular, bolus, subcutânea, respiratória, inalação, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal ou transdérmica.

16. Artigo de manufactura para uso farmacêutico humano, incluindo material de embalagem e um recipiente que compreende uma solução ou uma forma liofilizada de pelo menos um anticorpo anti-IL-6 ou um fragmento de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2.
17. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2, uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 14, um dispositivo médico de acordo com a reivindicação 15, ou um artigo de manufactura de acordo com a reivindicação 16 para utilização em terapia.
18. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2, uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 14, um dispositivo médico de acordo com a reivindicação 15, ou um artigo de manufactura de acordo com a reivindicação 16 para utilização no tratamento de um distúrbio imune ou doença num ser humano ou animal.
19. Método para produzir pelo menos um anticorpo anti-IL-6, ou seu fragmento de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2, que compreende a transfecção de uma célula hospedeira ou animal transgénico não humano planta transgénico ou célula vegetal capaz de expressar em quantidades recuperáveis o referido anticorpo com uma molécula de ácido nucleico que codifica para tais

anticorpos e recuperar o anticorpo a partir da célula, animal ou vegetal.

20. Método de acordo com a reivindicação 19, em que a referida célula hospedeira é uma célula de mamífero não humano, uma célula de planta ou uma célula de levedura.
21. Método de acordo com a reivindicação 20, em que o referido mamífero transgênico não humano é uma cabra, uma vaca, uma ovelha, um cavalo ou um primata não humano.
22. Animal transgênico não humano ou planta que expressa, pelo menos, um anticorpo de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2.

Ligação de cCLB8 a IL-6 humana

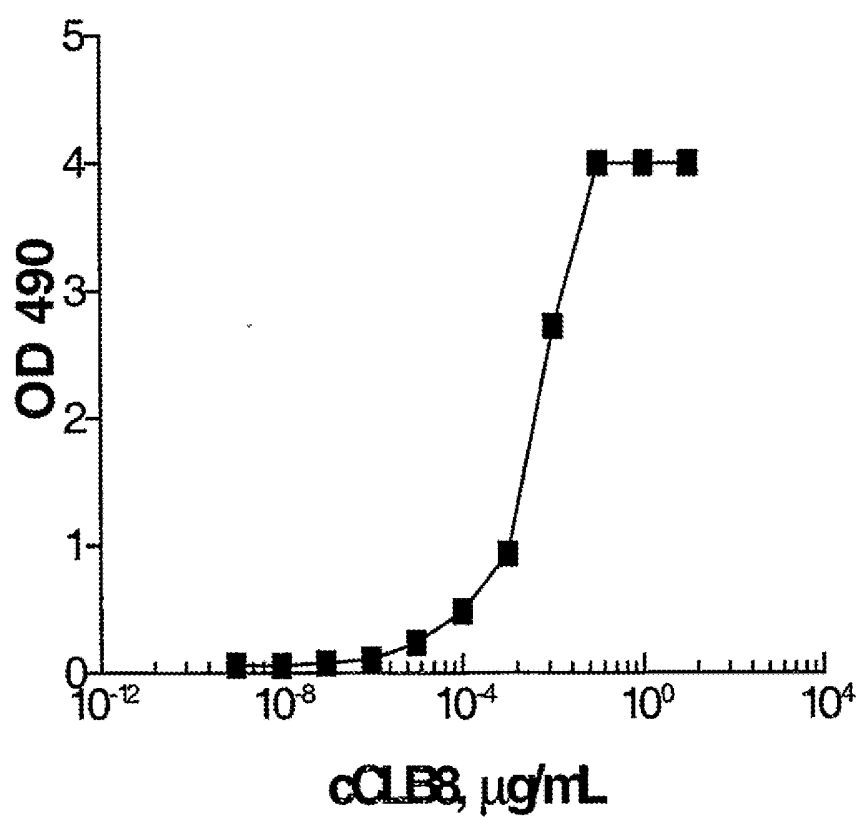


Figura 1

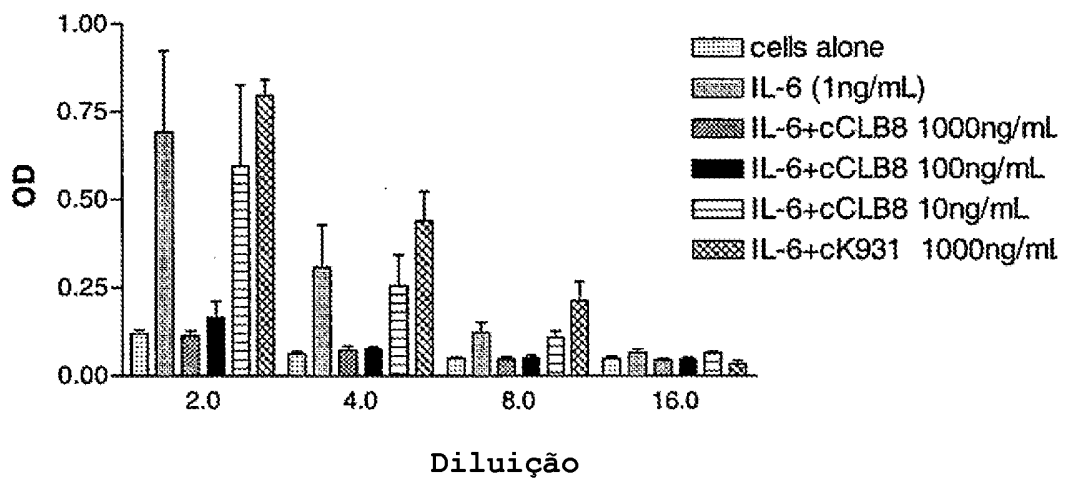


Figura 2

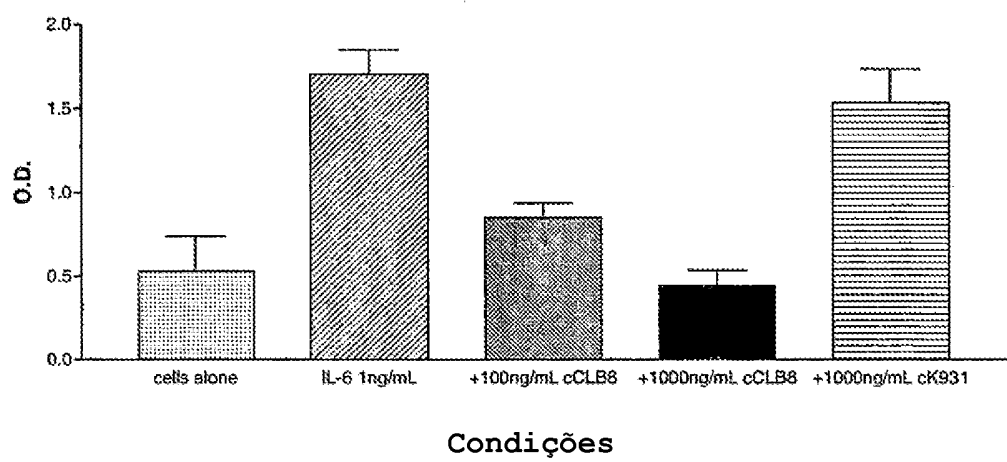


Figura 3

cCLB8 inibe IL 6 de sinalização em THP-1

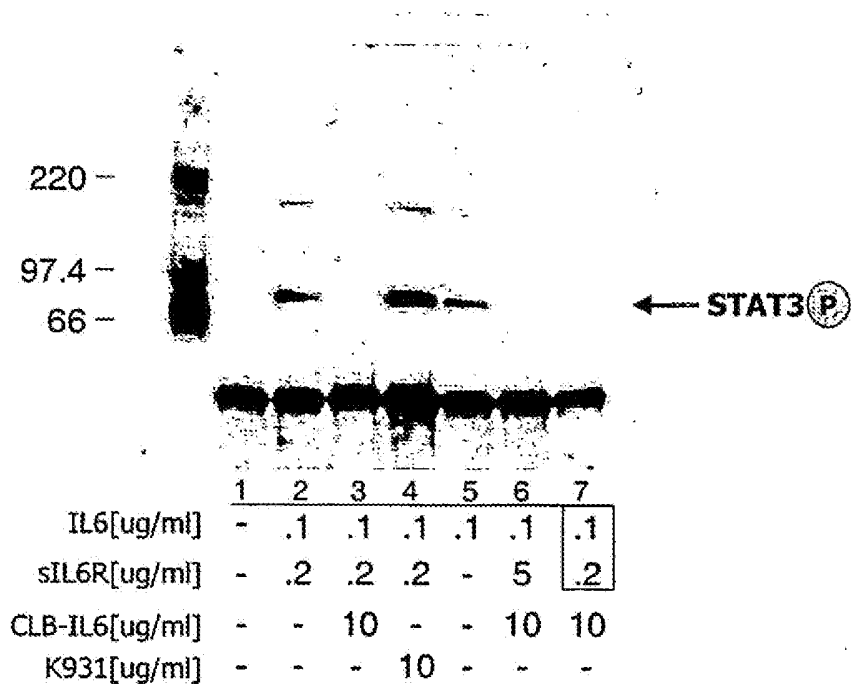


Figura 4

Inibição por cCLB8 de IL-6 induzida pela produção de soro amiloide A a partir de células HepG2

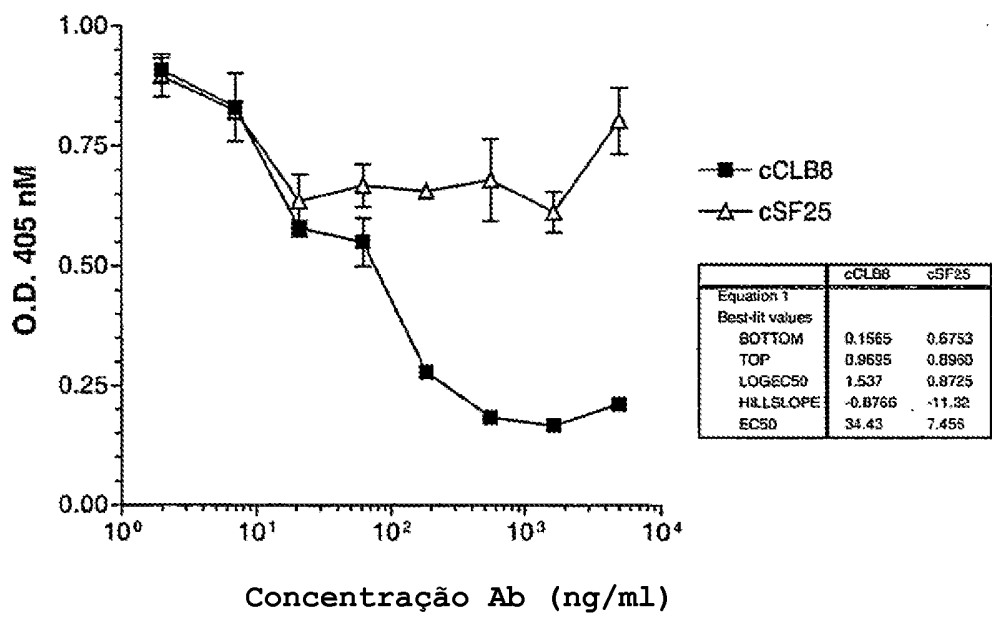


Figura 5

Neutralização de cCLB8 da proliferação celular induzida por rhIL-6

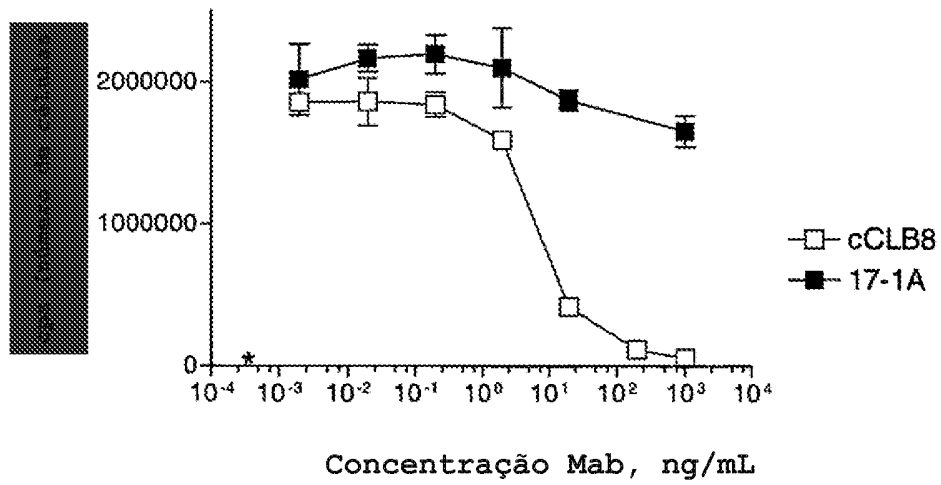


Figura 6

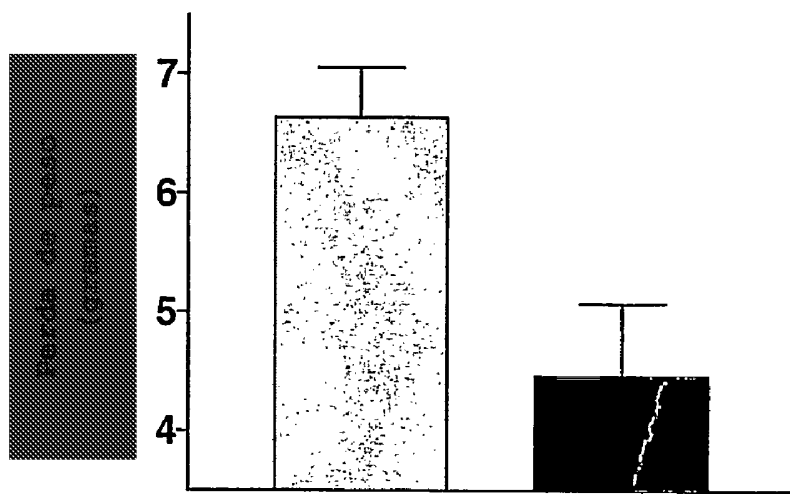
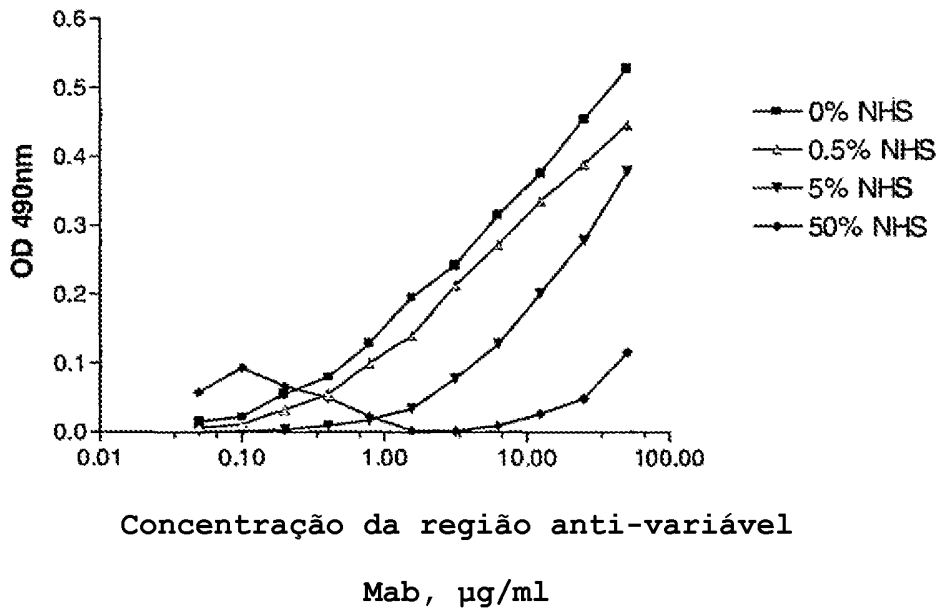


Figura 7

A. C433A



B. C434A

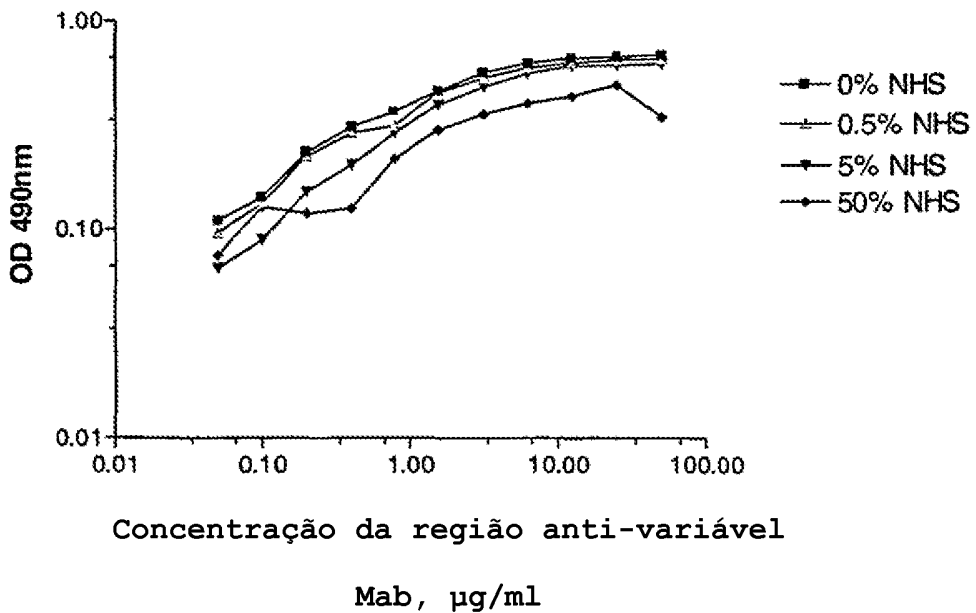
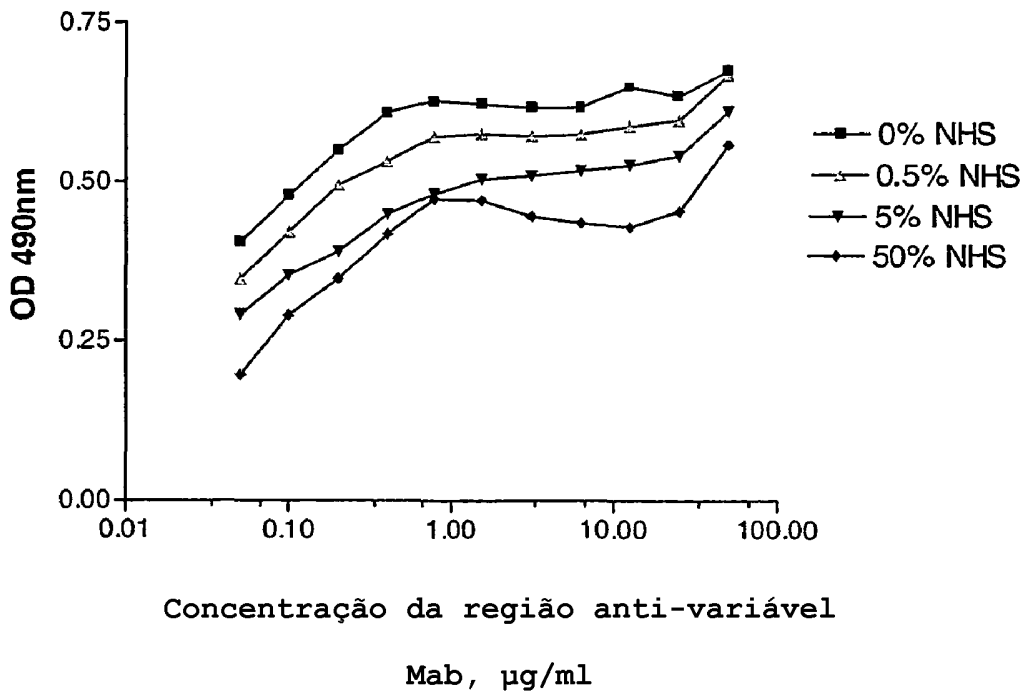
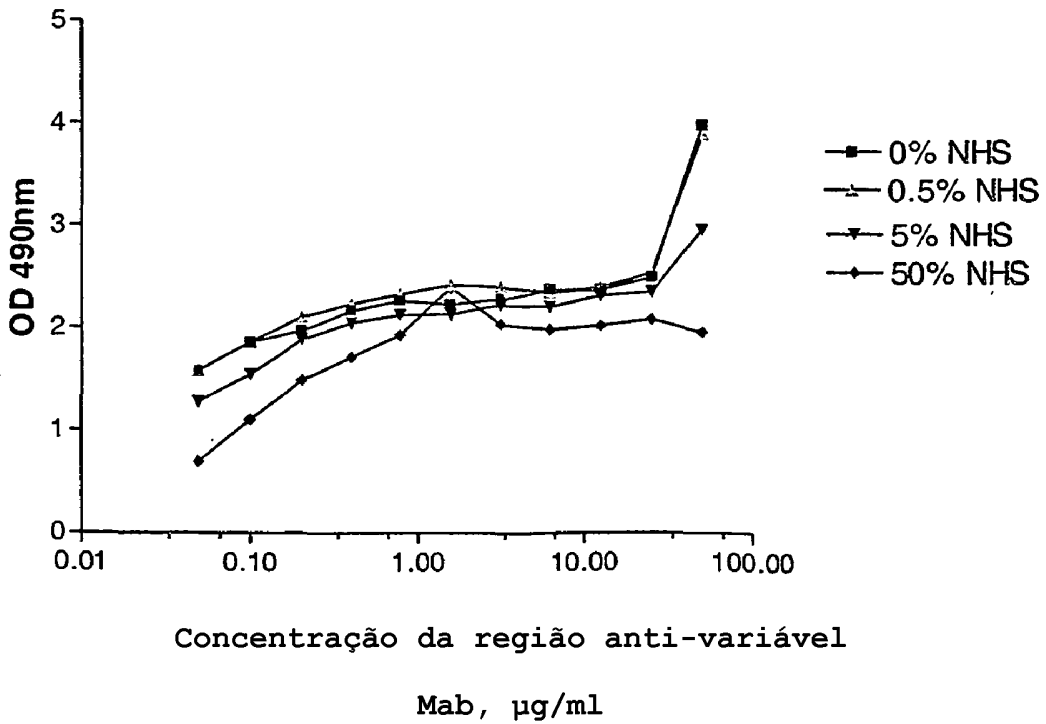


Figura 8

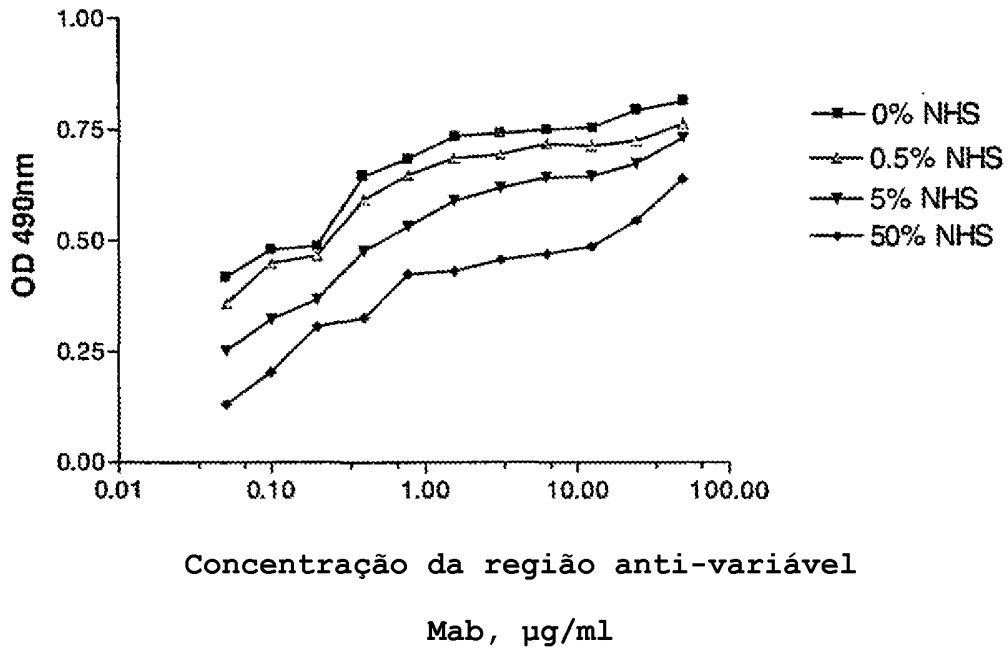
C. C435A



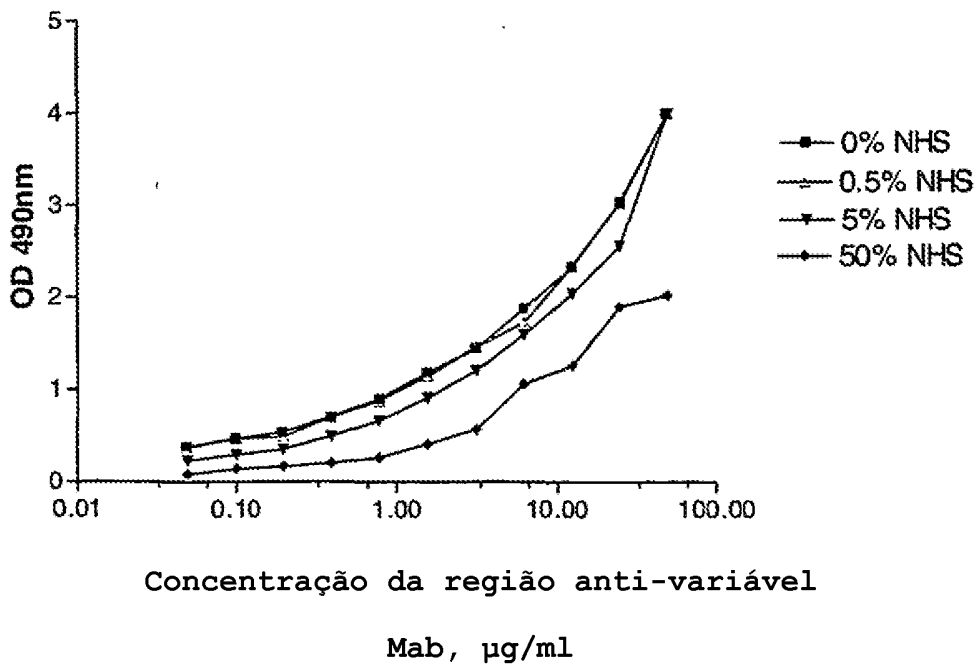
D. C436A



E. C437A



F. C438A



G. C439A

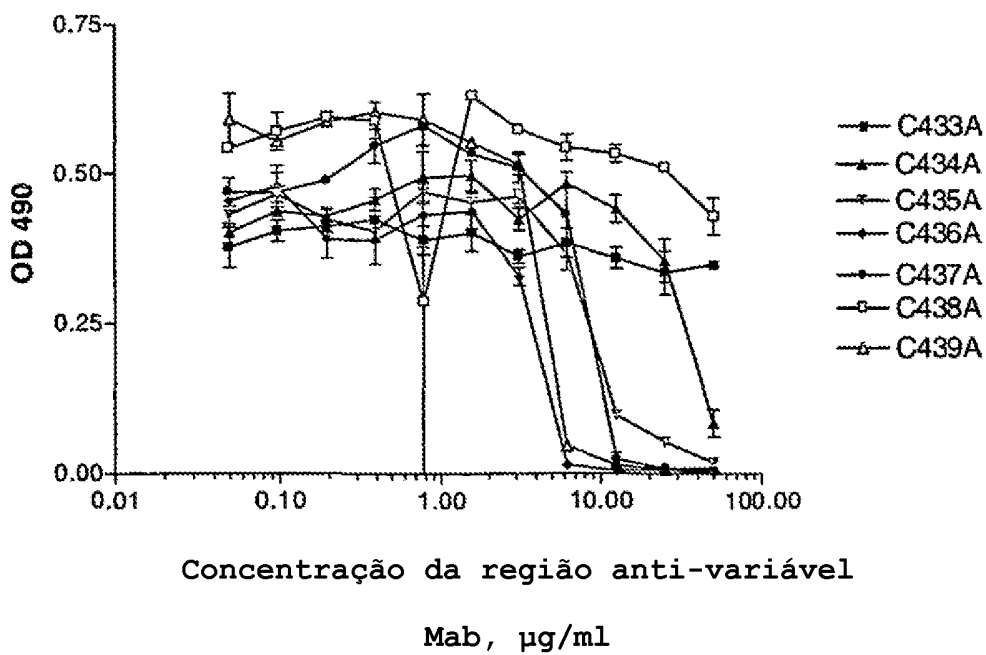
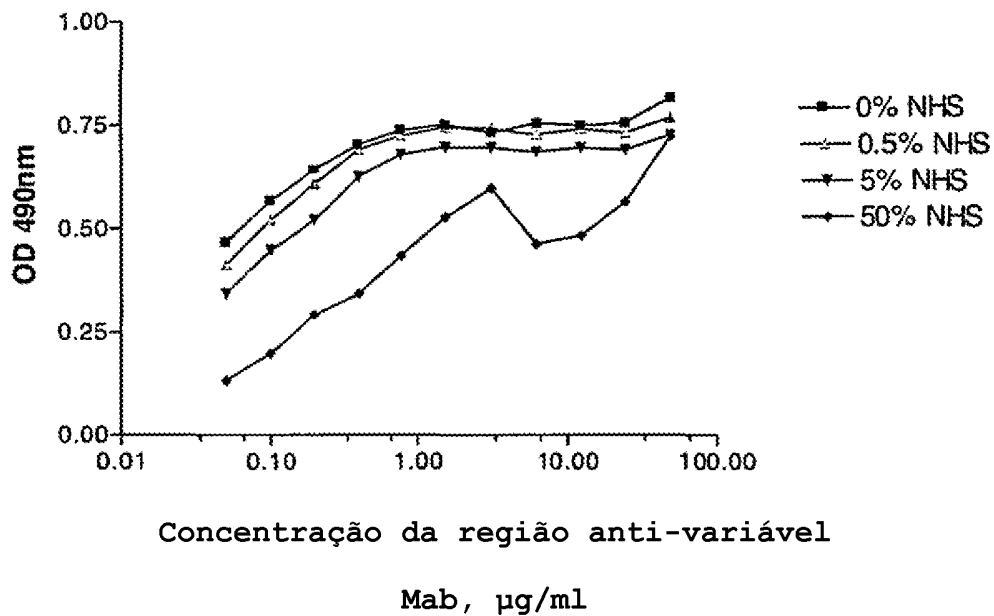


Figura 9

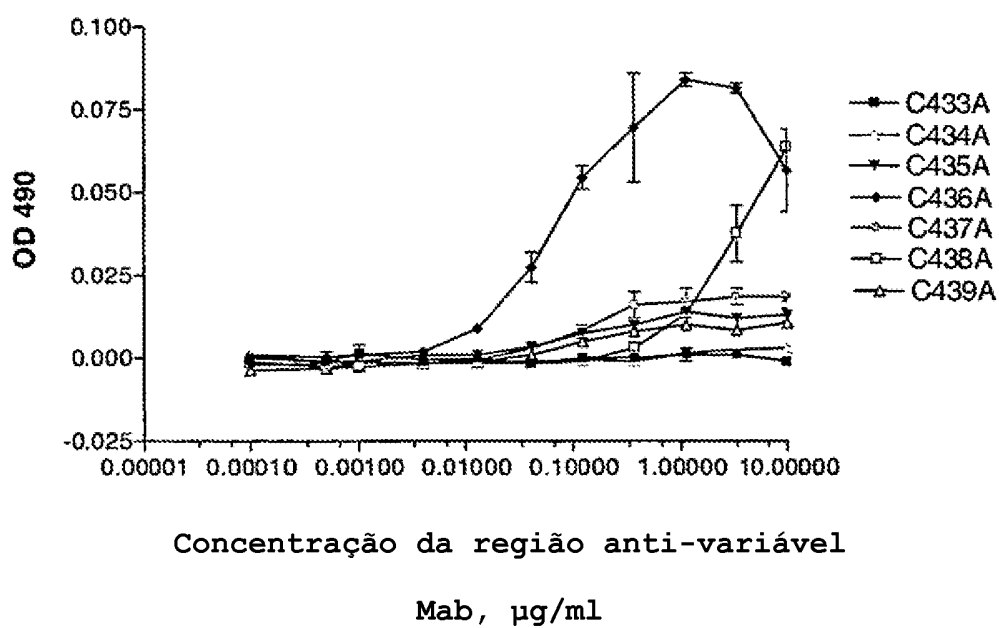


Figura 10